

ВКОРЕНУВАЊЕ И АКЛИМАТИЗАЦИЈА НА МИКРОПРОПАГИРАНА ПИПЕРКА (*Capsicum annuum* L.)

Лилјана КОЛЕВА-ГУДЕВА¹ и Мирко СПАСЕНОСКИ²

¹ ЈНУ Институтот за јужни земјоделски култури - Сирумица,

Гоце Делчев б.б., 2 400 Сирумица, Р. Македонија E-mail: liljanak@isc.ukim.edu.mk

² Универзитетот Св. Кирил и Методиј - Скопје, Природно-математички факултет, Гази Баба б.б.,
П.фах 162., 1 000 Скопје, Р. Македонија E-mail: mirkoms@junina.ukim.edu.mk

ИЗВОД

Колева-Гудева Л. и Спасеноски М. (2004). Вкоренување и аклиматизација на микропропагирана пиперка (*Capsicum annuum* L.). Зборник на трудови од 2-от Конгрес на еколозиите на Македонија со меѓународно учество, 25-29.10.2003, Охрид. Посебни изданија на Македонското еколошко друштво, Кн. 6, Скопје.

Испитувано е влијанието на ауксините (IAA, IBA и NAA) врз ризогенезата на пиперка, добиена во услови *in vitro*, како и нивната аклиматизација на надворешни услови. Како експериментален материјал беа користени две сорти на пиперка (*Capsicum annuum* L.), и тоа Куртовска капија и Златен медал. И двете сорти се доста застапени во Р. Македонија и тоа Куртовската капија претежно се одгледува во струмичкиот регион во југоисточна Македонија додека Златниот медал се среќава и во североисточниот дел на државата. Регенерацијата на пиперката беше изведена на MS (Murashige, T. и Skoog, F., 1962) медиум обогатен со различни концентрации и комбинации на цитокинини и ауксини. Вкоренувањето на изданоците беше стимулирано на MS медиум со ниски концентрации на ауксините IAA, IBA и NAA, кои беа есенцијални за вкоренувањето. Повисоки концентрации на IAA и IBA го намалуваа вкоренувањето на изданоците. Најдобри медиуми за вкоренување на пиперка се покажаа: MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 IBA и MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 NAA. Вкоренетите изданоци во услови *in vitro* беа префрлени во стерилна мешавина на перлит: тресет (1:1 v/v), и беа чувани во клима комора со контролирани услови. Аклиматизацијата беше изведена етапно во три фази: најпрво во клима комора, потоа во стакненик и во третата фаза младите аклиматизирани растенија беа изнесени во надворешни услови.

Вовед

За првата регенерација на црвена пиперка (*Capsicum annuum* L.) во 1978 година репортираат авторите Gupta, A.L. и Rao, P.S. и тоа од котиледони и хипокотили. Добиена е и органогенеза на пиперка од најразлични различни експлантатаи, на која проблематика работеле авторите: Phillips, C. G., и Husbstenberger, F. J., 1985; Agrawal, S. и сор. 1989; Ochoa-Alejo, N. и Ireta-Moreno, L., 1990; Arroyo, R. и Revilla, M. A., 1991; Valeria-Montero, L. L. и Ochoa-Alejo, N. 1992; Ebidia, A. I. A. и Hu, C. Y., 1993; Hari, I и Andrasfalvy, K., 1994. Изолирани се и протопласти од сортата Калифорниско чудо, а потоа истите се организирани во изданок на MS медиум со различни концентрации на IAA и кинетин, и на крајот биле регенерирани до адултни форми, Saxena и др., 1981. Авторите Hari, I и Lakshmi, S. кои во 1993 год. први известуваат за успешна соматска ембриогенеза на пиперка сорта Калифорниско чудо.

Литературата е богата со податоци за директна и индиректна регенерација на пиперка од најразлични експлантатаи иако се работи за видови кои не така лесно се регенерираат. Во изборот на медиум авторите главно се одлучуваат за MS (Murashige, T. и Skoog, F., 1962) со различни комбинации и концентрации во главно на цитокинини со ауксини.

Досегашните работи на полето на ткивни култури од пиперка, како нов биотехнички метод во нашата држава, е ограничен само на органогенеза и регенерација на пиперката Куртовска капија, и тоа од котиледони, хипокотили и апикални пупки, на која проблематика кај нас имаат работено само Л. Колева-Гудева и М. Спасеноски.

Материјал и методи на работа

Семето од пиперка сорти Куртовска капија и Златен медал беше стерилизирано на следниот начин: најпрво семето беше

проплакнано во дестилирана вода и се оставаше да имбибира 2-3 часа; потоа површински беше стерилизирано 15 секунди во 70% C₂H₅OH (етанол); 10 минути во 1% NaOCl (Изосан-G); а на крај се проплакваше неколку пати во стерилна вода. Вака стерилизираното семе беше поставено на 1/2 MS (Mughige, T. и Skoog, F. 1962) минерален раствор на 'ртење. Кога младите поници достигаа големина од 3-5 cm (по 21-25 дена), од нив беа изолирани почетните експлантати и истите беа поставени на хормонален MS медиум. За одредување на степенот на органогенеза на пиперка како почетни експлантати беа користени апикални пупки со големина 1-3 mm, со 1-2 лисни примордии.

Добро формираните изданоци на MS медиумите обогатени со цитокинини и ауксини потоа беа субкултивирани повторно на MS медиум во присуство само на ауксини. Испитувано е влијанието на ауксините IAA, IBA и NAA врз ризогенезата на двете испитувани сорти пиперка. Поставените култури, од двете сорти на пиперка, беа чувани во контролирани услови (клима комора) и тоа на: температура од 25 ± 1°C; релативна влажност од 50%; фотопериодизам од 16 x светло/ 8 x темно, и осветлување од 2000-3000 лукси.

Добро вкоренетите изданоци од пиперка во услови *in vitro* беа аклиматизирани на надворешни услови етапно, во 3 фази. Во првата фаза младите регенеранти беа пренесени во стерилна мешавина на перлит : тресет (1:1 v/v), и беа чувани во клима комора со контролирани услови. Во втората фаза растенијата беа засеани во нестерилна миксатура на земја : перлит : тресет (1:1:1 v/v/v), и беа пренесени во оранжериски услови, за да во последната фаза бидат префрлени во леи, на отворено.

Истражувано подрачје

Производство и оддржување на растенија со култура на ткива денес масовно се користи, затоа што за кратко време и на мал простор од едно растение може да се добијат, условно, неограничен број на генетски идентични единки. Досегашните научни истражувања покажуваат дека методот на *in vitro* култури на растителни клетки и ткива наоѓа голема примена кај повеќе видови од родот *Capsicum* а литературните податоци се сведоци за примената на најразлични типови на експлантати (George, E.F., 1996).

Генетските трансформации на пиперката, за разлика од другите градинарски култури, се сеуште лимитирани. Новите и модерни биотехнолошки методи и техниките на биоинжинерингот дозволуваат подобрување,

создавање, и селекција на сорти кои со традиционалниот начин на одгледување не може да се добијат. Иако напредокот во оваа област е значаен и евидентен за некои растенија, сепак за диференцијацијата на клеточни и ткивни култури кај пиперката се уште малку се знае.

Резултати

Од стерилно изртеното семе на 1/2 MS минерален раствор во услови *in vitro*, беа изолирани апикални пупки со големина од 1-3 mm и истите како меристемски почетни експлантати беа култивирани на хормонален MS медиум.

Во комбинирањето на хормоналниот состав на подлогата за иситување на степенот на органогенезата на апикалните пупки од сортите Куртовска капија и Златен медал, беа користени следните концентрации на цитокинините:

0,5 mg/l KIN; 0,5 mg/l ZEA; 0,5 mg/l BAP; 0,5 mg/l 2iP; 1,0 mg/l KIN; 1,0 mg/l ZEA; 1,0 mg/l BAP; 1,0 mg/l 2iP; 2,5 mg/l KIN; 2,5 mg/l ZEA; 2,5 mg/l BAP; 2,5 mg/l 2iP; 5,0 mg/l KIN; 5,0 mg/l ZEA; 5,0 mg/l BAP; 5,0 mg/l 2iP. или пак цитокинини во комбинација на ауксини:

1,0 mg/l IAA + 10,0 mg/ BAP; 0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/ BAP; 1,0 mg/l IAA + 15,0 mg/ BAP; 0,5 mg/l NAA + 2,5 mg/ BAP; 1,0 mg/l IAA + 20,0 mg/ BAP; 0,5 mg/l NAA + 5,0 mg/ BAP; 1,0 mg/l IAA + 30,0 mg/ BAP; 0,5 mg/l NAA + 10,0 mg/ BAP.

Ефектот на фитохормоните врз степенот на органогенезата на апикалните пупки на пиперка е различен за различните комбинации и концентрации. Од сите горенаведени комбинации најповолна се покажа серијата на цитокининот 2iP и за двете сорти, а KIN покажа најмал ефект во организирањето на експлантатот во изданок (Колева-Гудева Л., Спасеноски М., 2001).

Комбинацијата на NAA/BAP (за разлика од комбинацијата IAA/BAP) во MS медиумот силно влијае врз органогенезата на апикалните пупки од пиперка. Иако во релативно ниска аплицирана доза 0,5 mg/l NAA, овој ауксин ја иницира ризогенезата на апикалните пупки. Формирањето на лисни розети исто така е во висок процент и за двете сорти, така што со право може да се констатире дека NAA/BAP комбинација е прифатлива за култури во услови *in vitro* на апикални пупки од пиперка.

Регенерираните изданоци од *C. annum L.* добиени од апикалните пупки од сите испитувани MS медиуми беа повторно субкултивирани, пак на MS медиум, во присуство само на ауксини во различни концентрации и комбинации. За индукција на ризогенезата на пипера користени се 4 различни комбинации на ауксини на MS медиум и тоа:

Таб. 1 Влијание на ауксините IAA, IBA и NAA, во MS медиумот, врз ризогенезата на изданоци од пиперка (*Capsicum annuum* L.)**Tab. 1.** The effect of auxins IAA, IBA and NAA on MS medium on the root formation of pepper shoots (*Capsicum annuum* L.)

MS медиум MS medium mg/l	Куртовска капија		
	% вкоренување % rooting	бр. корени на изданок nr. of roots per shoot	дол. корени cm length of roots sm
0,1 IAA+1,0 IBA	30,13±0,52**	9,61±1,25	2,06±1,19*
0,05 IAA+0,1 IBA	73,19±3,40	11,05±0,77	4,75±0,63
0,04 IAA+0,1 IBA	82,42±2,15	6,75±0,21	3,75±0,21
0,04 IAA+0,1 NAA	91,57±0,57	18,50±2,12	5,00±0,70
mg/l	Златен медал		
0,1 IAA+1,0 IBA	32,25±1,06*	10,77±0,62	2,35±0,21
0,05 IAA+0,1 IBA	81,25±1,34*	12,31±1,14	5,35±0,21
0,04 IAA+0,1 IBA	84,40±1,13*	7,85±0,91*	3,95±0,77
0,04 IAA+0,1 NAA	96,25±5,30*	19,50±3,50	4,75±0,35

*Вредностите во секоја колона (група) означени со *, **, *** се сигнификантно различни ($p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; $\pm S.D.$, $n = 2$.

* The amounts in each column (group) marked with *, **, *** are statistically significant different; ($p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; $\pm S.D.$, $n = 2$.

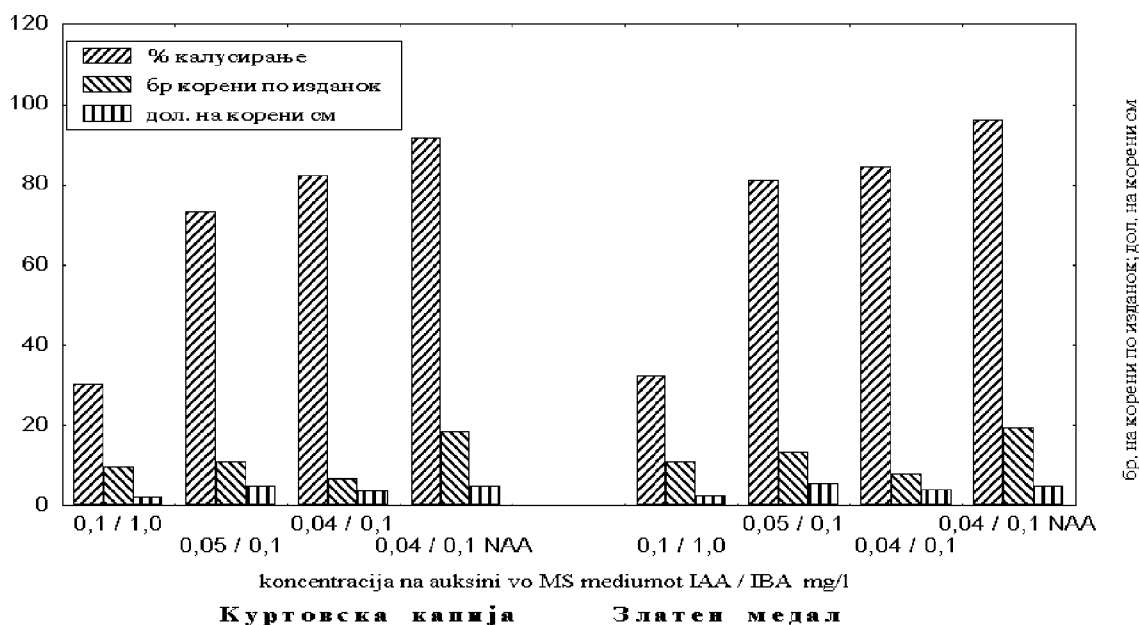
MS+0,1 mg/l IAA+1,0 mg/l IBA; MS+0,05 mg/l IAA+0,1 mg/l IBA;
MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l IBA; MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA.

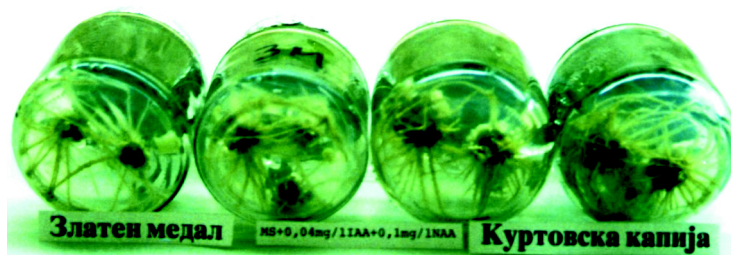
Влијанието на ауксините IAA и IBA и NAA, во MS медиумот, врз ризогенезата на изданоци од пиперка на сортите Куртовска капија и Златен медал е прикажано на Таб 1. и Сл. 1.

Корените формирани под влијание на поголеми концентрации на IAA и IBA (0,1/1,0; 0,05/0,1 mg/l) се пократки, помалку на број, имаат кафеава боја и се со доста цврста

конзистенција (Сл. 3). Пониските концентрации на IAA и IBA и NAA (0,04 IAA/0,1 IBA; 0,04 IAA/0,1 NAA; mg/l) ја стимулираат ризогенезата посилно, а кореновиот систем е поразгранет, корените се подолги, со светлозелена боја и имаат компактна структура (Сл. 2).

Од испитуваните MS медиуми за вкоренување, сортат Куртовска капија, статистичка сигнификантна разлика (т-тест на зависни примероци) во вкоренувањето во однос на другите испитувани медиуми покажува само на MS + 0,1 mg/l IAA+1,0 mg/l

**Сл. 1.** Влијание на ауксините IAA и IBA и NAA, во MS медиумот, врз ризогенезата на изданоци од пиперка (*Capsicum annuum* L.)**Fig. 1.** The effect of auxins IAA, IBA and NAA on MS medium on the root formation of pepper shoots (*Capsicum annuum* L.)



Сл. 2. Вкоренување на изданоци од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорти Куртовска капија и Златен медал на MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA

Fig. 2. Rooting of pepper shoots (*Capsicum annuum* L.) cultivars Kurtovska kapija and Golden medal on MY + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA

IBA, каде процентот на вкоренети изданоци е со релативно ниска вредност $30,13 \pm 0,52^{**}$. Највисок процент (91,57±0,57) на вкоренети изданоци се јавува на MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA, која вредност иако е неситнификантна не смее да се потцени. Генерално на медиумите каде вкоренувањето е во помал процент се јавуваат и корени со помала должина и помалку на број. На медиумите каде ризигенезата е силно изразена и должината и бројноста на корените се зголемува. Иако овие два параметри (должина и број на корени по изданок) се со статистички неситнификантни разлики (исклучок прави должината на корени на MS + 0,1 mg/l IAA+1,0 mg/l IBA), влијаат за морфолошките разлики на корените добиени во пониските и повисоките концентрации на испитуваните ауксини.

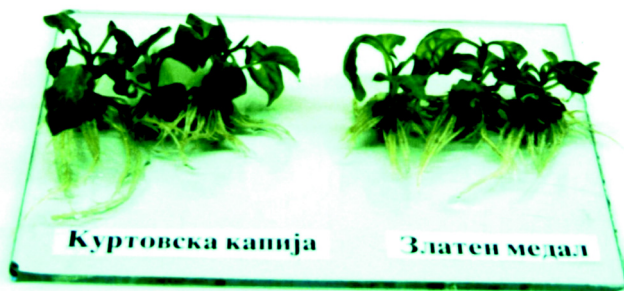
Кај сортата Златен медал вкоренувањето на сите испитувани медиуми е со статистички ситнификантна разлика. Како и кај сортата Куртовска капија, и кај оваа сорта најмало ($32,25 \pm 1,06^{*}$ %) е вкоренувањето на MS + 0,1 mg/l IAA+1,0 mg/l IBA а најголемо ($96,25 \pm 5,30^{*}$ %) кај MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA. И кај сортата Златен медал иако вкоренувањето варира во широки рамки, разли-

ките во бројноста и должината на корените не отстапува многу. Затоа и статистичката анализа (t-тест за зависни примероци) покажа неситнификантни вредности. Исклучок од тоа е бројот на корени кој се формираат на MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l IBA, каде се јавува статистички ситнификантно најмал број на корени по изданок.

Дискусија

Од сите испитувани MS медиуми за органогенеза на пиперка најповолни за формирање на изданок се покажаа сериите на 2iP и BAP како и комбинацијата NAA/BAP. За ефектот на фитохормоните во MS медиумот авторите Колева-Гудева Л., и Спасеноски, М. детално реферираат 2001 год., со што потврдуваат дека сите фитохормони аплицирани на блиски и сродни видови и вариетети немаат исти ефект.

Споредувајќи ги резултатите на двете испитувани сорти (Таб. 1, Сл. 1) сортата Златен медал покажува малку повисоки вредности од сортата Куртовска капија за сите испитувани медиуми, како во бројноста, така и во должината на корените, без исклучок. Раз-



Сл. 3. Вкоренување на изданоци од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорти Куртовска капија и Златен медал на MS + 0,1 mg/l IAA+1,0 mg/l IBA

Fig. 3. Rooting of pepper shoots (*Capsicum annuum* L.) cultivars Kurtovska kapija and Golden medal on MY + 0,1 mg/l IAA+1,0 mg/l IBA

ликата е мала но со право може да се каже дека таа подобро се вкоренува за разлика од сортата Куртовска капија. И за двете испитувани сорти најдобри медиуми за вкоренување се покажа медиумите:

MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l IBA и MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA.

Индукцијата на коренов систем кај регенерираните изданоци на пиперка, и тоа на двете испитувани сорти, се забележува доста рано, по десетина дена од субкултивирањето на изданоците, на горенаведените медиуми обогатени само со ауксини. За 20-30 дена беше забележано формирање на коренов систем, кој под влијание на различните концентрации и комбинации на ауксините покажува и морфолошки разлики во својата градба и структура.

Добро вкоренетите изданоци на горенаведените медиуми, по измивање на агарот од коренчињата со дестилирана вода, беа спремни за аклиматизација на надворешни услови.

Адаптацијата и на двете сорти на пиперка нормално се одвиваше во сите фази од адаптација, но со различен степен на способност за прилагодување кон надворешни услови. Сортата Златен медал покажува поголем афинитет за вкоренување на MS медиуми обогатено со ауксини, но во фазите за аклиматизација таа поднесе поголеми загуби од сортата Куртовска капија. Од резултатите за органогенезата, на деветте сорти, низ сите испитувани MS медиуми, како и според Murashige, T. (1979) може да се констатира дека сортата Златен медал има иако доса мал но сепак нешто поголема реакција на аплицираните хитохормони во испитуваните медиуми. Сортата пак Куртовска капија иако помалку сензитивна во услови *in vitro*, има поголема отпорност на експлантатите што се согледува подоцна во фазите на аклиматизација. Разликите во однесувањето на двете сорти е мало и во *in vitro* услови и во адаптацијата и аклиматизацијата, но сепак со тоа се потврдува фактот дека блиски и сродни видови, дури и различни сорти на еден исти вид или вариетет имаат различен одговор на исти хормонален третман и на исти услови на прилагодување.

Заклучок

Во врска со можностите за регенерација на пиперка (*C. Annuum L.*), од апикални пупки, на сортите куртовска капија и Златен медал во услови *in vitro* како и за ефектот на испитуваните ауксини врз ризогенезата на истите сорти може да се констатира следното:

- Најповолни медиуми за формирање

на изданок од апикални пупки се покажаа цитокинините на 2iP и BAP како и комбинациите на ауксин/цитокнинин, NAA/BAP;

- Најдобри медиуми за вкоренување со најголем број на корени по изданок и најголеми должини за корените се медиумите:
- MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l IBA и MS + 0,04 mg/l IAA+0,1 mg/l NAA;
- Сорта Златен медал покажува поголем афинитет за вкоренување на MS медиуми обогатено со ауксини, но во фазите за аклиматизација таа поднесе поголеми загуби од сортата Куртовска капија;
- Блиски и сродни видови, дури и различни сорти на еден исти вид или вариетет, имаат различен одговор на исти хормонален третман, и на исти услови на прилагодување, различно се однесуваат;
- Адаптацијата и на двете сорти на пиперка нормално се одвиваше во сите фази, и по 6 недели растенијата се адаптираа на надворешната средина, каде нормално се развиваа и ги завршија сите фази од вегетативниот циклус.

Референци

- Gunay A.L., Rao P.S. (1978): In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Science letters, 11: 365-372.
- Kaparakis, G. (1999): In vitro culture of pepper (*Capsicum annuum L.*), PhD theses - Kaparakis Georgis, Aristotel Univ. Hellas, submitted Univ. Nottingham, UK.
- Kenij K., et al. (1991): Effect of interaction between Variety and culture medium on induction capacity of adventitious bud from cotyledon explant in pepper *Capsicum annuum L.*, Research Reportes of Kochy Unyversity, Vol. 40: 19-32.
- Koleva-Gudeva Liljana, Sapenoski, M., (2001): The effect of some cytokinines on pepper organogenesis (*Capsicum annuum L.* cv. Kurtovska kapija and Zlaten medal) cultured in vitro. *Yearbook Institute of Southern Crops, Vol 1:31-35.*
- Koleva-Gudeva Liljana, Sapenoski, M., (2001): The effect of some cytokinines on pepper organogenesis (*Capsicum annuum L.* cv. Kurtovska kapija and Zlaten medal) cultured in vitro. *Yearbook Institute of Southern Crops, Vol 1:31-35.*
- Koleva Liljana, Spasenoski, M. (1995): Some morphological and Biological Characteristics of Pepper produced under in vitro conditions, *Acta Hort. No 462, Vol 2: 721-725.*

Phillips C.G., Hubstenberger F.J. (1985): Organogenesis in pepper tissue cultures, *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 4: 261-269.

Murashige, T., и Skoog, F., (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco

tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, Vol. 15: 473-497.

Murashige, T. (1979): Principles of rapid propagation, *Propagation of higher plants through tissue culture*, *Physiologia Plantarum*, pp 14-24..

ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED PEPPER (*Capsicum annum* L.)

Liljana KOLEVA-GUDEVA¹ & Mirko SPASENOSKI²

¹*Institute of Southern Crops - Strumica, Goce Delcev b.b. 2400 Strumica, R of Macedonia*

E-mail: liljanak@isc.ukim.edu.mk

²*University St. Cyril and Methodius Skopje, Faculty of Natural Science and Mathematics, Gazi Baba b.b. P.O. box 162,*

1000 Skopje, R of Macedonia E-mail: mirkoms@iunona.ukim.edu.mk

Summary

Some of our experimental results concerning the effect of auxins (IAA, IBA and NAA) on risogenesis, as well as acclimatization of pepper shoots cultured in vitro are summarized in this paper. Two cultivars of pepper (*Capsicum annum* L.) were used as experimental material cv. Kurtovska kapija, a red sweet and cv. Zlaten medal, red sweet type. The bout types are highly popular in the R. of Macedonia; cv. Kurtovska kapija is extensively grown in the southeaster region, while Zlaten medal is also present in the northeaster part in Macedonia. Regeneration of these cultivars was established on MS medium (Murashige, T. and Skoog, F., 1962), supplemented with different concentrations and combinations of cytokinins and auxins. Rooting of these microshoots (microcuttings) was stimulated on MS medium, with low level of various concentrations of auxins (IAA, IBA and NAA), which were essential for rooting. IAA and IBA in high concentration decreased the rooting of microcuttings. Best rooting was noticed on MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 IBA and MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 NAA. The young plantlets which were rooted in vitro were transferred in pots with sterile mixture of peat: perlite (1:1 v/v), and were held in primary growth room. Their acclimatization went through 3 stages: the first in a primary growth room, the second in glasshouse condition, and the third in outside climate conditions. After 6 weeks the plantlets became adapted to the environment and they grew into regular normal plants.