

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ЗА РАСТИТЕЛНО ПРОИЗВОДСТВО



**АНДРОГЕНЕТСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ НА НЕКОИ ГЕНОТИПОВИ ГРАДИНАРСКИ
КУЛТУРИ**

Марија Поцковска

Штип, Октомври 2021

Комисија за оцена и одбрана

Претседател:

Проф. д-р Лилјана Колева Гудева

Редовен професор на Земјоделски факултет, УГД - Штип

Ментор и член:

Проф. д-р Фиданка Трајкова

Вонреден професор на Земјоделски факултет, УГД - Штип

Член:

Проф. д-р Даниела Димовска

Вонреден професор на Земјоделски факултет, УГД - Штип

Рецензирани и објавени стручни, научни и апликативни трудови

1. Pockovska, Marija and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2019) [Evaluation of androgenic competence of different pepper, tomato and eggplant genotypes.](#) Book of Proceedings / X International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2019". pp. 525-530. ISSN 978-99976-787-2-0.
2. Pockovska, Marija and Trajkova, Fidanka and Koleva Gudeva, Liljana (2018) [Current application of anther culture as a tool for improvement of horticultural crops.](#) In: International Meeting Agriscience & Practice (ASP 2018), 10-11 May 2018, Stip, Macedonia.

Учество во научно-истражувачки проект

1. Управување на растителната генетска разновидност (ПГР) за храна и земјоделство во Македонија“ поддржан од Швајцарската Фондација Проспециерара, 2019 – тековно.

Благодарност

Огромна и најискрена благодарност изразувам до мојот ментор проф. д-р Фиданка Трајкова за можноста да работам со неа. Благодарам за сугестиите, стручните совети, огромната поддршка и охрабрувањата кои несебично ги споделувавте со мене за време на изработката на овој магистерски труд. За мене беше огромно задоволство и чест Вие да бидете мој ментор.

Искрена благодарност упатувам и до проф. д-р Лилјана Колева Гудева за стручните совети, коментари и поддршката за време на целокупното работење на магистерскиот труд.

Благодарност изразувам и до проф. д-р Даниела Димовска која со своите стручни коментари придонесе за успешна изработка на овој магистерски труд.

Голема благодарност упатувам и до лаборант дипломиран инж. агроном Емилија Пенева без која мојата експериментална работа би била многу потешка.

Искрена и длабока благодарност изразувам и до д-р Светлана Глоговац од Институт за ратарство и повртарство во Нови Сад, Србија на несебичната помош за остварување на потребните молекуларни анализи, за пријатната работна атмосфера и пријатниот престој за време на посетата на Институтот. Сето тоа за мене беше едно ново и големо искуство.

Посебна благодарност изразувам на целото мое семејство, особено на татко ми и мајка ми за дадената помош, разбирање, поддршка и верба за време на изработката на магистерскиот труд. Без нив невозможно би било остварувањето на оваа цел.

Користени кратенки

2,4-D – дихлорифенокси оцетна киселина

2iP – N⁶-2 - изопентил аденин

ANOVA – Analysis of Variance

BAP – N⁶-бензиламинопурин

C₂H₅OH – етанол

Ср хранлив медиум – Dumas de Vaulx, 1981

Ct хранлив медиум – Dumas de Vaulx and Chambonnet, 1982

СТАВ – cetyltrimethylammonium bromide; hexadecyltrimethyl-ammonium bromide
(цетилтриметиламониум бромид; хексдецил триметиламомиум бромид)

DNA – deoxyribonucleic acid (дезоксирибонуклеинска киселина)

IAA – индол-3-оцетна киселина

KIN – кинетин, 6-фурфурил-аминопурин

MS хранлив медиум – Murashige and Skoog, 1962

PCR - Polymerase Chain Reaction (полимеразна верижна реакција)

QTL - Quantitative Trait Locus (локуси за квантитативни карактеристики)

R₁ хранлив медиум – Dumas de Vaulx, 1981

SSR – Simple Sequence Repeats (едноставни повторувачки секвенци)

V₃ медиум – Dumas de Vaulx, 1981

TAE – Tris Acetate-EDTA

Краток извадок

Во текот на двегодишните истражувања беа култивирани серија култури на антери од различни генотипови пиперка (*Capsicum annuum* L.), домат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и патлиџан (*Solanum melongena* L.) со цел да се испита нивниот андрогенетски потенцијал. Беа користени шест генотипови пиперка (Edita F1, Homera F1, Duga bela, Una, Amfora и Kurtovska kapija), четири генотипови домат (Bellfort F1, Rally F1, Policarpo F1 и Novosadski jabučar) и еден генотип патлиџан (Domaći srednje dugi). Антерите изолирани од пупки во соодветна развојна фаза беа култивирани на хранливи подлоги, следејќи соодветни протоколи за секоја култура одделно.

Сите испитувани генотипови пиперка во поставениот протокол за андрогнеза резултираа со формирање на различен процент калус. Генотиповите Bela duga и Edita F1 резултираа со формирање на еден и девет ембриоди, соодветно. Како краен резултат беа добиени четири регенранти Edita_R1, Edita_R2, Edita_R3 и Edita_R4 и едно целосно аклиматизирано андрогенетско растение од генотипот Edita F1. Кај андрогенетското растение Edita_R1 беа направени фенолошки, физиолошки и молекуларни анализи, споредувани во однос на мајчиниот генотип Edita F1. Од извршената анализа утврдено е дека испитуваните регенерирани растенија се разликуваат во однос на мајчиниот генотип.

Сите испитувани генотипови домат во соодветниот протокол за андрогнеза резултираа со 6,4 % - 61,8 % калусогенеза, додека тестираниот генотип патлиџан не покажа андрогенетски потенцијал.

Со ова истражување утврдена е андрогенетската способност на испитуваните генотипови пиперка, домат и патлиџан и со тоа тие претставуваат основа за идните истражувања во оваа област, особено за добивање на андрогенетски растенија и нивно воведување во селекционерски програми.

Клучни зборови: пиперка (*Capsicum annuum* L.), домат (*Lycopersicon esculentum* Mill.), патлиџан (*Solanum melongena* L.), андрогнеза, калусогенеза, фенотип, молекуларни анализи.

Abstract

During two-years of research, series of anther cultures of different genotypes from pepper (*Capsicum annuum* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) were cultivated in order their androgenetic potential to be studied. Six pepper genotypes (Edita F1, Homera F1, Duga bela, Una, Amfora and Kurtovska kapija), four tomato genotypes (Bellfort F1, Rally F1, Policarpo F1 and Novosadski jabučar) and one eggplant (Domači srednje dugi) genotype were used in the experiment. The anthers isolated from buds at suitable developmental stage were cultivated on media, followed by appropriate protocols for each crop separately.

All examined pepper genotypes in the established androgenesis protocol resulted in formation of a different percentage of callus. Bela duga and Edita F1 genotypes resulted in the formation of one and nine embryoids, respectively. The final result was four regenerants Edita_R₁, Edita_R₂, Edita_R₃ and Edita_R₄ and one fully acclimatized androgenetic plant of the Edita F1 genotype. Phenological, physiological and molecular analyzes were performed on the androgenic plant Edita_R₁, compared to the maternal genotype Edita F1. From the performed analysis it was determined that the examined regenerated plants differ in relation to the maternal genotype.

All examined tomato genotypes in the appropriate androgenesis protocol resulted in 6.4%-61.8% callusogenesis, while the tested eggplant genotype showed no androgenetic potential.

This research has determined the androgenetic ability of the examined genotypes pepper, tomato and eggplant and thus they are the basis for future research in this area, especially for obtaining androgenetic plants and their introduction in breeding programs.

Key words: pepper (*Capsicum annuum* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), eggplant (*Solanum melongena* L.), androgenesis, callusogenesis, phenotype, molecular analysis.

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	10
1.1. Производство на пиперка, домат и патлиџан во светот и во Република Северна Македонија.....	10
1.2. Таксономија, потекло и ботанички опис на испитуваните градинарски видови.....	13
1.2.1. Таксономија, потекло и ботанички опис на пиперка (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	13
1.2.2. Таксономија, потекло и ботанички опис на домат (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.).....	15
1.2.3. Таксономија, потекло и ботанички опис на патлиџан (<i>Solanum melongena</i> L.).....	16
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА.....	18
2.1. Андрогенеза како <i>in vitro</i> метод.....	18
2.1.1. Предности на андрогенезата.....	20
2.1.2. Недостатоци на андрогенезата.....	21
2.1.3. Примена на андрогенезата.....	22
2.1.4. Досегашни истражувања за примена на методот на андрогенезата кај пиперка, домат и патлиџан.....	24
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	31
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА.....	33
4.1. Експериментален дизајн.....	33
4.2. Добивање на донор растенија.....	34
4.2.1. Опис на генотиповите пиперка одгледувани за донор растенија.....	36
4.2.2. Опис на генотиповите домат одгледувани за донор растенија.....	37
4.2.3. Опис на генотипот патлиџан одгледуван за донор растенија.....	38
4.3. Антерите како почетен материјал.....	39
4.4. Состав на хранливите подлоги и услови за култивирање на антери.....	40
4.4.1. Хранлива подлога и услови за пиперка.....	41
4.4.2. Хранлива подлога и услови за домат.....	42
4.4.3. Хранлива подлога и услови за патлиџан.....	44
4.5. Регенерација и морфологија на андрогенетските ембриониди.....	45
4.6. Спектрофотометриско одредување на фотосинтетски пигменти.....	47
4.6.1. Постапка за екстракција.....	47
4.6.2. Постапка за квантитативно одредување на содржината на хлорофили и каротеноиди.....	48
4.7. Молекуларни анализи на андрогенетските регенеранти.....	49
4.7.1. Изолација на DNA од андрогенетските регенеранти.....	49
4.7.2. Подготовка на гел за електрофореза.....	51
4.7.3. PCR анализа на андрогенетските регенеранти.....	53
4.8. Статистичка обработка на податоци.....	57
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	59

5.1. Култивирање на антери на пиперка (<i>Capsicum annuum</i> L.)	59
5.2. Култивирање на антери на домати (<i>Solanum lycopersicum</i> Mill.)	63
5.3. Култивирање на антери на патлиџан (<i>Solanum melongena</i> L.)	67
5.4. Опис и морфологија на регенеранти добиени од пиперка	69
5.5. Содржина на фотосинтетски пигменти (хлорофили и каротеноиди) на андрогенетски плодови	72
5.6. Молекуларни анализи на андрогенетски регенеранти.....	83
6. ЗАКЛУЧОК.....	86
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	89

1. ВОВЕД

1.1. Производство на пиперка, домати и патлиџан во светот и во Република Северна Македонија

Човекот го познавал и употребувал зеленчукот како храна уште во најраните периоди од историјата. Пред повеќе од 5.000 години некои зеленчукови видови биле широко распространети и конзумирани заради нивните ценети вкусови, хранливост, а особено поради нивните лековити својства во Кина, Египет и во други земји. Уште во древни времиња, неколку илјади години пред откривањето на Американскиот континент, тамошното индијанско население ги познавало, одгледувало и употребувало во исхраната доматиите, пиперката, патлиџанот, боранијата и други зеленчуци.

Интензивното производство на зеленчук во светот започнува во шеесеттите години од дваесеттиот век, сè со цел да се добие повисок принос, а тоа довело до специјализирање и јасно разграничување на поделското од градинарското производство. Во тој период настана еден интензивен развој на објекти, техника и технологија во заштитените простори кои придонеле да се добијат високи приноси (Ѓеорѓиевски, 2012).

Нашата земја има долга традиција на одгледување градинарски култури. Производството на зеленчук е застапено во сите делови на земјата, меѓутоа комерцијално најважните производни региони се наоѓаат во југоисточниот регион на државата. Меѓу градинарските култури кои најмногу се одгледуваат на отворено, а зафаќаат големи површини и под заштитени простори (пластеници и стакленици), се доматиот, пиперката и патлиџанот.

Во Табела 1 е прикажана површината на производство во хектари на пиперка, домати и патлиџан во светот, Европа и во Република Северна Македонија за периодот од 2014 - 2018 година според статистичките податоци на FAO. Според табелата може да се воочи дека во текот на тие пет години на светско ниво и во Европа најмногу површина за производство зазема доматиот, додека кај

нас во Република Северна Македонија има најголема површина за производство на пиперка. И кај трите градинарски култури површината на производство со текот на годините се зголемува.

Табела 1. Површина на производство на пиперка, домати и патлиџан (во хектари) во Светот, Европа и во Република Северна Македонија (<http://www.fao.org>).

Table 1. Area of production of pepper, tomato and eggplant (in hectares) in the world, Europe and in Republic of North Macedonia (<http://www.fao.org>).

Површина на производство на пиперка (во хектари)					
	2014	2015	2016	2017	2018
Свет	1 943 068	1 879 989	1 931 365	1 962 491	1 990 423
Европа	105 787	109 486	113 076	113 062	106 904
Република Северна Македонија	8 522	8 617	8 751	8 927	9 179
Површина на производство на домати (во хектари)					
	2014	2015	2016	2017	2018
Свет	4 903 097	4 801 263	5 013 641	4 846 778	4 762 129
Европа	498 659	504 646	471 022	464 100	448 176
Република Северна Македонија	5 720	5 642	5 604	5 597	5 569
Површина на производство на патлиџан (во хектари)					
	2014	2015	2016	2017	2018
Свет	1 859 642	1 801 586	1 792 282	1 860 831	1 864 556
Европа	35 024	35 497	34 128	33 321	33 511
Република Северна Македонија	49	55	54	55	56

Табела 2. Производство на пиперка, домати и патлиџан во тони на светско ниво, во Европа и во Република Северна Македонија (<http://www.fao.org>).

Table 2. Pepper, tomato and eggplant production in tons world wide, in Europe and in Republic of North Macedonia (<http://www.fao.org>).

Производство на пиперка (во тони)					
	2014	2015	2016	2017	2018
Свет	32 150 707	33 189 148	34 567 250	35 988 989	36 771 482
Европа	2 904 993	3 021 798	3 270 686	3 275 545	3 219 399
Република Северна Македонија	175 867	189 443	181 852	175 100	182 872
Производство на домати (во тони)					
	2014	2015	2016	2017	2018
Свет	174 787 530	176 932 416	178 206 920	180 962 146	182 258 016
Европа	22 629 551	24 189 401	24 089 080	24 029 654	23 291 126
Република Северна Македонија	160 530	173 434	161 951	159 721	161 621
Производство на патлиџан (во тони)					
	2014	2015	2016	2017	2018
Свет	49 977 219	50 560 709	51 302 856	52 489 150	54 077 210
Европа	948 674	962 437	968 291	914 137	972 119
Република Северна Македонија	912	1 014	996	1 016	1 035

Во Табела 2 е прикажано производството на пиперка, домати и патлиџан во тони на светско ниво, во Европа и во Република Северна Македонија за периодот од 2014 - 2018 година. Најголемо производство има кај доматиот на светско ниво во 2018 година, додека пак истата година во Република Северна Македонија има најголемо производство на пиперка.

Од статистичките податоци за производство на пиперка, домати и патлиџан јасно е дека овие култури се едни од најважните градинарски култури кои се користат во секојдневната исхрана. Од една страна, производителите на овие градинарски култури од година во година се соочуваат со низа предизвици во производството како климатски промени, појава на болести и штетници и други абиотски и биотски стресогени фактори. Од друга страна, производителите се соочуваат со различни потреби и желби на модерниот потрошувач во однос на барања за нови сорти и хибриди со подобрени морфолошки, физиолошки и нутритивни карактеристики.

Единствен начин да се одговори на потребите на модерниот производител и потрошувач е креирање на нови генотипови раситителни култури, вклучително пиперка, домати и патлиџан. Класичните селекционерски програми се долготрајни и бавни, па затоа сè повеќе се користат модерните методи и технологии на растителната биотехнологија како алатки за подобрување на агробиодиверзитетот. Андрогенезата е само еден од методите кои можат да се стават во функција на модерното земјоделско производство (Колева Гудева и сор., 2008).

1.2. Таксономија, потекло и ботанички опис на испитуваните градинарски видови

1.2.1. Таксономија, потекло и ботанички опис на пиперка (*Capsicum annuum* L.)

Таксономија. Таксономска припадност на пиперката (*Capsicum annuum* L.) според ICBN (International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) е следната:

Царство - Plantae

Оддел - Tracheophyta

Класа - Magnoliopsida

Ред - Solanales

Фамилија - Solanaceae

Род - *Capsicum*

Вид - *Capsicum annuum* L.

Потекло. Пиперката потекнува од Јужна и Средна Америка и била одгледувана како зеленчуков вид во старата цивилизација на Инките. Мексико, Бразил и Гватемала претставуваат родно место на различните видови и облици на пиперка, од кои со вкрстено и природно одбирање се добиле денешните сорти. По откривањето на Америка, пиперката во Европа е пренесена на почетокот на XVI век во Португалија. Од Португалија пиперката се ширела и во другите европски земји каде што на почетокот на XVII век веќе не се користела само како зачин туку и како салата. Во Македонија пиперката ја донеле Турците во XVII век (Димовска и сор., 2021).

Ботанички опис. Главното, примарно стебло на пиперката се дели на две секундарни отклонувања кои понатаму повторно се делат на терцијални отклонувања. На секое отклонување се формира еден или повеќе цветови во белозелена боја и прашници кои, за разлика од домотот, не се сраснати за венечните ливчиња.

Плодот на пиперката е ботанички исто така збирна бобинка, сјаен и може да има различна форма – од тркалезна до издолжена. Плодовите на пиперката се разликуваат по: форма, големина на плод, површина, боја, дебелина на перикарпот, лутина, градба на чашката на плодот и плодната рачка, како и положбата на плодот на растението. Во технолошка зрелост плодот може да биде со бела, жолта, портокалова, светло до темнозелена и виолетова боја, а во физиолошка зрелост: жолта, портокалова, црвена и виолетова боја. Според големината, плодот на пиперката може да биде: многу крупен (над 150 g), крупен (40-150 g), средно крупен (10-40 g) и ситен (под 10 g). Плодот може да биде: лут, полулут и сладок (Димовска и сор., 2021; Спасова, 2008).

1.2.2. Таксономија, потекло и ботанички опис на домати (*Solanum lycopersicum* Mill.)

Таксономија. Таксономската припадност на доматиот (*Solanum lycopersicum* Mill.) според ICBN (International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) е следната:

Царство - Plantae

Оддел - Tracheophyta

Класа - Magnoliopsida

Ред - Solanales

Фамилија - Solanaceae

Род - *Solanum*

Вид - *Solanum lycopersicum* Mill.

Потекло. Доматот води потекло од Јужна Америка и се смета дека бил познат 5 века пред новата ера. Со откривањето на Америка пренесен е во Шпанија, Португалија, а потоа и во Италија. Првите пишани податоци за него датираат од XVI век. Доматот бил нарекуван златно јаболко – pomidoro или јаболко на љубовта – pom amoris, затоа што во тој период имал значење, пред сè, како украсно и лековито растение со жолти и црвени плодови. Како зеленчук, доматиот почнал да се одгледува дури на почетокот на XIX век прво во Шпанија, Италија, Холандија, Англија а подоцна и во Франција и останатите делови на Европа и Северна Америка. Во нашите краеве доматиот почнал да се користи во исхраната кон крајот на XIX век, но прво само како зелен, за киселење (Димовска и сор., 2021)

Ботанички опис. Постојат неколку групи на сорти домати: индетерминантни, семидетерминантни и детерминантни. Детерминантните и индетерминантните сорти домати формираат терминално соцветие, меѓутоа кај индетерминантните сорти соцветијата биваат истиснати во странична позиција, додека апикалната пупка продолжува со раст и развој.

Цветовите на домотот се релативно мали, со пет венечни жолти ливчиња и пет прашници кои во основата се сраснати со венечните ливчиња и потполно го покриваат толчникот. Ботанички домотот е самооплодна култура, но понекогаш може да се јави и странооплодување.

Плодовите и листовите се покриени со влакненца кои испуштаат јак мирис кога ќе се скршат. Листовите на домотот се големи и сложени. Меѓу секое соцветие се формираат по 3-4 листа кај високите сорти, а кај ниските сорти после секој или после два листа се формира соцветие. После бербата листовите треба да се отстранат (дефолијација) од главното стебло за да се олесни протокот на хранливите материи до следните соцветија, односно плодови.

Плодот на домотот е сочна бобинка, содржи семе кое е обвиткано со желатинозна материја. Бојата на плодот во ботаничка (физиолошка) зрелост може да биде црвена, розова, жолта или портокалова (Спасова, 2008).

1.2.3.Таксономија, потекло и ботанички опис на патлиџан (*Solanum melongena* L.)

Таксономија. Таксономската припадност на патлиџанот (*Solanum melongena* L.) според ICBN (International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) е:

Царство - Plantae

Оддел - Tracheophyta

Класа - Magnoliopsida

Ред - Solanales

Фамилија - Solanaceae

Род - *Solanum*

Вид - *Solanum melongena* L.

Потекло. Патлиџанот е растение од тропските реони на Индија. Од Индија се проширил најпрво во Кина и Јапонија, а потоа и во останатите делови на Азија

и Африка. Во XIII век патлицанот е донесен во Италија и Шпанија, а во XVI век се одгледувал во јужните реони на Франција, Балканот и Турција. Со откривањето на Америка, почнало одгледувањето на патлицанот на новиот континент во областите со погодна клима за овој вид. Ширењето на патлицанот во Македонија се вршило во времето на доаѓањето на Турците (Димовска и сор., 2021).

Ботанички опис. Патлицанот е тропско повеќегодишно растение кое се одгледува како едногодишно во умерените климатски подрачја. Стеблото е често боцкаво. Цветовите се бели до виолетови по боја, со пет-лобусна корола и жолти прашници. Висината на растението помеѓу 40 и 150 cm, со големи листови. Плодот ботанички е класифициран како бобинка и содржи бројни мали меки семки кои имаат горчлив вкус.

Постојат сорти со најразлични форми на патлицан и варирање на бојата на плодот од виолетова до бела. Плодовите на некои сорти имаат облик на јајце, сјајни, со виолетова боја на кожата и бело месо со сунѓереста текстура. Постојат сорти со бела боја на кожата и месото и имаат издолжена форма. Плодовите на дивите сорти патлицан имаат изразено горчлив вкус, додека културните форми содржат помалку горчливи материји од соланин гликоалкалоид - М (Спасова, 2008).

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

2.1. Андрогенеза како *in vitro* метод

Андрогенезата е процес со кој од машкиот гаметофит, односно од микроспората (незрели поленови зрна), се развиваат хаплоидни растенија (Touraev et al., 2001).

Андрогенезата е една од најважните методи кои се често користени во програмите за размножување на растенија за производство на двојни хаплоиди. Тоа вклучува индукција на микроспорна ембриогенеза што доведува до развој на хаплоиден ембрион наместо зрело зрно од полен. Сепак, ембриогената фаза на микроспорите варира кај видовите (Touraev et al., 2001). Микроспорите се подложни на андрогенеза и се состојат од хаплоиден (n) број на хромозоми и затоа од нив произлегуваат хаплоидни растенија. Производството на хаплоиди или дихаплоиди преку андрогенеза може да биде постигнато или преку изолирана микроспорна култура или со култура на антери (Asif, 2013).

Методот на андрогенезата се користи за добивање на хаплоидни растенија. Хаплоидните растенија се организми кои содржат хаплоиден број на хромозоми во соматските клетки. Добиените хаплоиди имаат идентичен генотип како и гаметите од кои настанале па затоа тие се идеален материјал за испитување во областа на генетиката и селекцијата на растенијата. По природен пат спонтаното добивање на хаплоиди кај растенијата е многу ретка појава.

Растенијата хаплоиди, преку култура на антери, обично се добиваат на два начини, со култивирање на антери во течни или полутечни медиуми што вклучува одвојување на поленот со агитација и со култивирање на антери на цврсти медиуми. Во суштина, површински стерилизираните пупки се отвараат во стерилна средина проследено со отстранување на антерата и нивно култивирање на течен или цврст медиум (Sunderland et al., 1984). Откако ќе се заврши

формирањето на ембриони, ембрионот се префрла на медиум за регенерација под светлински услови за органогена диференцијација (развој на корен).

Развојот на ембрионите може да биде на директен или индиректен начин. Со директниот начин од изолираните антери или микроспори се развива ембрион, а со индиректниот начин прво се развива калус (недиференцирани ткива), а од него може да се развијат изданоци (Колева Гудева, 2010).

Ефективноста на културата на антери е многу зависна од растот, условите за развој и физиолошката состојба на донор растенијата, фазата на полен или микроспората во времето на дисекција на антерата, генотипот и составот на хранливите подлоги (Колева Гудева, 2010; Asif, 2013).

Според Колева Гудева и Трајкова (2016), успешноста на андрогенезата и бројот на индуцирани хаплоидни регнеранти зависи од следните фактори:

- Генотипот на растението - донор е еден од најважните фактори за позитивниот исход на андрогенезата бидејќи микроспорите од некои видови полесно се индуцираат за добивање на хаплоиди, а други потешко. Кај некои земјоделски култури вакви разлики постојат на ниво на различни популации, сорти и хибриди;
- Сидот на антерата – составот на сидот, неговата градба и материите што ги содржи сидот на антерата ја условуваат успешноста на андрогенезата;
- Медиумот за култивирање на антерите и неговата густина – составот на медиумот што се користи во андрогенеза се креира во зависност од тоа кои растенија се предмет на истражување;
- Стадиумот на развој на микроспорите или поленот – најдобро време за индукција на промената кај микроспорите е пред самата делба на микроспорите или после нивната митоза;
- Ефектите на температурата и светлината – примената на различни температурни и светлосни „шокови“ во текот на андрогенезата има големо значење за зголемување на нејзината ефикасност и креирање на поголем број хаплоиди и

- Генералниот физиолошки статус на растението - донор е важен фактор бидејќи го условува квалитетот на антерите и поленот од донор - растенијата, а со тоа индиректно и самата андрогенеза.

Физиолошката состојба, условите за раст и развој и генотипот на донор растенијата се меѓу важните фактори кои одлучуваат за ефикасноста на културата на антерите, бидејќи овие состојби директно се мешаат во вкупната ефикасност на ембриогените зрна од полен (Sunderland and Dunwell, 1973).

Предтретманите се категоризирани како „широко користени“. Најчесто адаптирани предтретмани со ладно и топло, различна содржина на азот и сахароза во хранливата подлога, тешки метали и хемиски третмани, промена во рН, влажност, осмотски нивоа (Shariatpanahi et al., 2006). Меѓу сите наведени предтретмани, температурните шокови се најмногу прилагодени и најчесто употребувани во процесот на андрогенеза.

Составот на хранливите подлоги, исто така, зазема важна позиција во културата на антери за да предизвика ембриогенеза (Chu et al., 1990).

2.1.1. Предности на андрогенезата

Според Колева Гудева (2010), Murovec & Bohanec (2012) и Колева Гудева и Трајкова (2017) андрогенезата како метод за производство на *in vitro* култури има повеќе предности во однос на конвенционалната селекција:

- Предности за добивање на хомозиготни линии од дихаплоиди во однос на конвенционалните методи. Користејќи методи за добивање на дихаплоиди, хомозиготноста се постигнува во една генерација, елиминирајќи ја потребата за употреба на неколку генерации во конвенционалната селекција;
- Значајна заштеда на време, особено кај двегодишни култури и во култури со долг период на премин од вегетативна во генеративна фаза;

- Кај растителни видови со висока ефикасност и применливост на методот на андрогнеза постои извонреден потенцијал за експлоатација на дихаплоидите кај комерцијални растенија;
- Хаплоидите и дихаплоидите се користат во генетски студии, како што е генетско мапирање, студии поврзани со маркери/карактеристики, локација на локуси за квантитативни карактеристики (QTL), геномика и се цел на генетски трансформации;
- Техниката на индукција на хаплоидна може ефикасно да се комбинира со неколку други биотехнолошки техники на растенија, овозможувајќи нови достигнувања, како што се повратно вкрстување, хибридно одгледување и генетска трансформација и
- Со добивање на хомозиготи се добива можност за користење при селекцијата на наследен материјал од кои би се одбрале потребни и пожелни карактеристики во однос на принос, квалитет, отпорност спрема болести и штетници.

2.1.2. Недостатоци на андрогенезата

Според Seguí-Simarro et al. (2011), како главни недостатоци кои се појавуваат во процесот на андрогенезата може да се набројат следните:

- Културите од антери имаат ограничена ефикасност, произведувајќи само мал број ембриони по култивирана антера;
- Технологијата за развој на дихаплоиди за некои растителни видови е добро развиевна, но од друга страна кај други растителни видови има ограничувања, вклучувајќи умерена ефикасност;
- Генотипот е највлијателниот фактор кој ја одредува ефикасноста на андрогенезата. Главното ограничување за развој на протокол за андрогнеза е генотип кој минимално или воопшто не реагира на дадените услови;
- Кај андрогенетските регенеранти понекогаш е тешко да се иницира формирање на корени и

- Аклиматизацијата на добиените регенеранти од *in vitro* во *in vivo* услови е многу сложен и тежок процес. Во текот на аклиматизацијата, регенерантите може да бидат нападнати од многу патогени организми, бидејќи тие се понежни, со слабо развиена кутикула и се осетливи на болести.

2.1.3. Примена на андрогенезата

Уште од раните 1990-ти биле развиени основни андрогенетски протоколи за добивање на хаплоиди и дихаплоиди, но за жал повеќето од нив биле неефикасни. Во почетокот на XXI век, постигнат е значителен напредок во оваа технологијата главно со емпириско тестирање кое е долготрајно и скапо, но резултирало со успехот. Во тој период биле креирани успешни, рутински и исплатливи протоколи за најчесто проучуваните култури како јачмен, пченица, тритикале, пченка, ориз и маслодавна репка. Исто така, постигнат е значителен напредок и кај градинарски, овошни, украсни, дрвенести и лековити видови, иако андрогенетскиот одговор кај многу од нив е слаб, посебно кај легуминозните растенија. Во последната декада има воспоставување на успешни објавени протоколи за добивање на дихаплоиди од речиси 200 видови растенија (Wędzony et al., 2009).

Интересот на селекционерите за добивање на хаплоиди, или дихаплоиди со удвојување на бројот на хромозомите, лежи во можноста за скратување на времето кое е потребно за да се добие целосно хомозиготни линии во споредба со конвенционалното одгледување. Диплоизацијата на хаплоидите преку гаметска ембриогенеза овозможува во еден чекор да се развијат целосно хомозиготни линии од хетерозиготни родители. Во конвенционалното производство, чистите линии се добиваат после неколку генерации и сè уште може да не бидат 100 % хомозиготни (Germana, 2006).

Креирањето на хаплоиди е потребно од две основни причини: 1) присуство на еден сет на хромозоми ја олеснува изолацијата на мутантите кои може да се добијат и 2) добивање изогени диплоиди со диплоидизација на хромозомот. Иако

и со конвенционалното вкрстување е можно да се добијат чисти линии, ова е процес што одзема многу време. Со достапноста на *in vitro* методите, постои нов интерес за пороизводство на хаплоиди за подобрување на културите (Вајај, 1983). Со култура на антери, хаплоидите можат да се добијат за пократко време и со удвојување на нивниот број на хромозоми хомозиготните диплоиди може да се добијат во една генерација (Вајај, 2012).

Културите на хаплоидни клетки се исто така корисен материјал за проучување на генетиката на соматските клетки, особено за мутациите (Вајај, 1983).

Дихаплоидите исто така може да ја зголемат ефикасноста на програмите за размножување на култури, особено за мапирање на геномот. Тие всушност, обезбедуваат одличен материјал за да се добијат веродостојни информации за локацијата на мајор-гените и QTL за економски важни карактеристики (Khush and Virmani, 1996).

За подобрување на сортните карактеристики се користат *in vitro* произведени хаплоидни растенија за земјоделски култури како пченица, ориз, пченка, јачмен, компир, тутун и др. Хаплоидите можат да се користат за да се добие хомозиготност на гените во случаи каде што тоа тешко се постигнува, како што се само-некомпатибилни алели кај рж. Кај јачменот моноплоидите се средство за избор на гамети и доколку се произведуваат од хибридите F1 тогаш бројот на генерации на самоопрашување, што нормално се бара за да се произведат униформни линии, се елиминираат. Оваа заштеда на бројот на генерации е многу важен кај зимскиот јачмен поради потребното време за вернелизација. Втора предност на удвоените моноплоиди е сигурноста на дадениот избор. При скрининг за принос, квалитет или отпорност на болести може да се биде сигурен дека поради хомозиготност посакуваните карактеристики нема да се изгубат поради сегрегација од хетерозиготни локуси во подоцнежните генерации (Jensen, 1974).

Meѓу другите употреби, хомозиготните растенија, добиени преку култура на антери, исто така биле употребени за избор на линии за размножување на *Nicotiana tabacum* L. со висока содржина на алкалоиди (Collins et al., 1974).

2.1.4. Досегашни истражувања за примена на методот на андрогенезата кај пиперка, домати и патлиџан

2.1.4.1. Андрогенеза кај пиперка (*Capsicum annuum* L.)

Qin and Rotino (1993), изолирале антери од четири F1 хибриди и тринаесет сорти од благи и лути пиперки. Користен е методот Dumas de Vault et al. (1982) со модификации кај регулаторите на раст во хранливата подлога. Резултатите покажале дека во некои случаи ембриоиди се добиени само на подлогата која содржи ВАР. Вкупно 268 ембриоиди се добиени од 2 937 *in vitro* култивирани антери од 15 генотипови и 181 регенерирани растенија од 12 генотипови.

Dolcet-Sanjuan et al. (1997) од четиринаесет F1 хибриди изолирале антери и ги култивирале на модифицирана подлога Н составена од двофазен систем од полуцврста и течна фаза. Хранлива подлога Н е модификација на хранливата подлога NN (Nitsch and Nitsch, 1969). Вкупниот број на формирани ембриоиди бил поголем на подлогата со 40 g/l малтоза, но ембрионите се развивале подобро на подлогата која содржи 10-20 g/l малтоза. Во зависност од генотипот бројот на ембриоиди и регенерирани растенија се движел од 3 до 750.

Mutiko and Fari (1996) испитувале повеќе од 500 сорти и F1 хибриди на пиперка. Антерите биле култивирани според методот на Dumas de Vault et al. (1981). Според нив андрогенетскиот потенцијал зависи од типот на сортата на пиперката, така што сортите бабура покажале највисок андрогенетски потенцијал додека пак лутите сорти најнизок или воопшто не покажале.

Gemesne et al. (2000) го испитувале степенот на плоидност преку методот на течна цитометрија кај пиперка добиена со култура на антери и утврдиле дека 68,5 % од растенијата биле хаплоидни, 29,8 % биле спонтани дихаплоиди, 0,7 % биле тетраплоиди и 1 % од растенијата биле анеуплоиди.

Колева Гудева и Спасеноски (2002) користеле девет сорти на пиперка за култура на антери. Антерите биле култивирани на индукциони медиуми со соодветни инкубациони третмани и хормонални комбинации. Резултатите покажале дека на подлогите MS и N со соодветните инкубациони третмани антерите имаат висок потенцијал за формирање на калус. На подлогите LS и NN формирањето на калус е умерено. Додека пак, само на медиумот Ср, а потоа со префрлање на R₁ добиени се хаплоидни ембриоиди, а калусирањето е минимално.

Supena et al. (2006) испитувале андрогенетски потенцијал на 12 индонезиски сорти лута пиперка користејќи четири различни методи. За култивирање на антери користеле три протоколи: според Dumas de Vaulx et al. (1981), според Dolcet-Sanjuan et al. (1997) и протоколот според Johansson et al. (1982). Исто така изолирале и микроспори користејќи го методот според Touraev and Heberle-Bors (2003). За култура на антери најдобри резултати покажале испитуваните сорти според Dolcet-Sanjuan et al. (1997), потоа процедурата според Johansson et al. (1982) и најмалку резултат дал протоколот според Dumas de Vaulx et al. (1981). Од изолираните микроспори многу мал процент формирале ембриоиди.

Rodeva et al. (2007) вршеле истражување за андрогенетскиот потенцијал на две различни територии: Република Северна Македонија и Република Бугарија. Во Република Северна Македонија биле испитувани 19 генотипови на пиперка и користен е методот Dumas de Vaulx et al. (1981). Резултатите покажале дека од 19 генотипови, 12 покажале способност за формирање ембриоиди. Во Република Бугарија се испитувани 22 сорти и F1 хибриди. Користена е подлога според Murashige and Skoog (1962). Резултатите покажале дека индукција на ембриогенеза е добиена кај 5 од вкупно 22 генотипови на пиперка.

Shrestha et al. (2011) испитувале еден хибрид на блага пиперка Boogie. Користена е подлога според Dumas de Vaulx et al. (1981). Во нивното истражување тие добиле калусирање и регенерирани растенија.

Niklas – Nowak et al. (2012) објавиле дека кај испитуваните пиперки, 31 од 63 растенија или 49 % , биле спонтани дихаплоиди.

Колева Гудева и Трајкова (2012) вршеле истражување на 19 генотипови пиперка. Од вкупно испитуваните 19 генотипови 12 покажале потенцијал за формирање ембриоиди од кои имаат регенерирано растенија. Три генотипови лута пиперка и четири генотипови блага пиперка не покажале андрогенетски потенцијал.

Roshany et al. (2013) во своето истражување користеле два F1 хибриди, две хранливи подлоги, две различни температури за инкубација, четири хормонални третмани за индукција на калус и шест различни хормонални третмани за фазата за регенерација. Резултатите покажале формирање на калус на 30 °C и C хранлива подлога збогатена со 0,5 mg/l BA и 0,5 mg/l NAA, додека подлогата збогатена само со 0,1 mg/l 2,4-D продуцира најголем степен на калусирање.

Колева Гудева et al. (2013) вршеле истражување на девет сорти пиперка. Користена е истата подлога и постапка како во истражувањето од Колева Гудева и Трајкова (2012) со тоа што резултатите покажуваат дека единствената сорта која не покажала резултати е лута пиперка, а сите други сорти покажале андрогенетски потенцијал со формирање калус и директна ембриогенеза.

Al Remi et al. (2014) за нивното истражување користеле четири различни генотипови пиперка. Тие го испитувале влијанието на хранливата подлога и генотипот врз андрогенетскиот потенцијал. Антерите ги поставувале на 16 различни хранливи подлоги. Истражувањето резултирало со формирање на ембриоиди од кои сите се развиле во регенерирани растенија. Заклучиле дека 94% од растенијата формирани од ембриоиди имале хаплоиден број хромозоми, а само 6% биле бележани како спонтани дихаплоиди.

Nowaczyk et al. (2014) го испитувале андрогенетскиот потенцијал на по десет растенија од вкупно шест групи хибриди добиени со интервидово вкрстување на *Capsicum frutescens* x *Capsicum annuum*. Антерите биле изолирани

според методот на Chambonnet (1988). Од изолираните антери добиле калусирање и помал процент на регенерирани растенија.

Irikova et al. (2011) како донор-растенија користеле 8 линии, 7 сорти и 4 хибриди блага пиперка. Изолираните антери ги култивирале на две различни хранливи подлоги: С според Dumas de Vault et al. (1981) и Cm според Sibi et al. (1979). Нивните резултати покажале калусогенеза што доведува до формирање на не-ембриоген калус, ретко индиректна органогенеза кај некои калуси без формирање регенеранти и директна ембриогенеза што доведува до развој на компактен, кружен, млечно-бел ембрион и до формирање на регенеранти.

Keleşet al. (2015) го споредувале степенот на спонтани дихаплоиди кај различни видови на пиперка. Степенот на плоидија го одредувале преку култура на антери, користејќи течна цитометрија и SSR маркери. Резултатите покажале дека различен степен на спонтани дихаплоиди се добиле кај различни видови пиперка. Највисок степен на спонтани дихаплоиди има кај бабури (53,4 %), додека зелениот тип на пиперка има најнизок степен на спонтани дихаплоиди (22,2 %).

Heidari et al. (2017) испитувале пет хибриди во андрогенеза според методот на Dumas de Vault et al. (1981). Испитуваните хибриди резултирале со формирање на калус, ембриоиди и регенерирани растенија. Резултатите покажале дека андрогенетскиот потенцијал многу зависи од генотипот.

2.1.4.2. Андрогенеза кај домат (*Solanum lycopersicum* Mill.)

Kao et al. (1980) со изолирање на антери од домат добиле голем број на хаплоидни растенија кај три од испитуваните седум кинески сорти. Во нивното истражување фазата на диференцијација на микроспората и температурата, како и видот на подлогата и генотипот биле главни фактори за успешноста на андрогенеза кај доматот.

Zamir et al. (1980) во своето истражување ја утврдувале улогата на фазата на микроспората за успешноста на култура на антери кај домот. Тие изолирале антери од 15 машки стерилни мутанти и нивните фертилни изогенски линии и ги култивирале на модифицирани MS медиуми. Само антерите од еден мутант (ms10ss) лесно формирале калус кој содржел хаплоидни клетки и клетки со повисок степен на плоидија.

Ziv et al. (1984) ги испитувале ефектите на генотипот и хранливиот медиум врз индукцијата на калус и формирањето на изданоци кај култура на антери на домот. Тие во истражувањето користеле пет машки стерилни сорти и нивните изогени фертилни линии и 19 стерилни мутанти од F2 генерација. Тие покажале дека индукцијата на калус и формирањето на изданоци директно зависи од генотипот на домотот.

Varghese & Sharma (1984) во своето истражување изолирале антери во различни фази на развој од три генотипови и еден F1 хибрид домот и ги култивирале на различни дефинирани хранливи подлоги. Тие преку истражувањето докажале дека само антери кои содржат микроспори во рана фаза од развојот формирале андроген калус.

Summers et al. (1992) изолирале антери во различни фази од три сорти на домот. Со своето истражување тие покажале дека кај домотот со култура на антери може да се индуцира калус од секоја фаза на развој на антерите – од профазата 1 (лептотен) до микроспори во бинуклеатна фаза. Но, кај некои сорти можеби нема да се формира калус после метафаза 1. Оптимална фаза за индукција и раст на калус е профазата 1.

Zagorska et al. (1998) за испитување на андрогенетскиот потенцијал кај домот изолираните антери ги култивирале на подлога според Murashige and Skoog (1962) збогатена со zeatin или 2-ip и IAA. Култивираните антери резултирале со формирање на калус и добивање на регенеранти. Резултатите од нивното истражување покажале дека генотипот силно делува на андрогенетскиот потенцијал кај домотот.

Brasiliero et al. (1999) изолирале антери од домати ($2n = 24$) и ги култивирале на подлога според Murashige and Skoog (1962) со витамини според Nitsch (1969). Во нивното истражување тие заклучиле дека формирањето на калус од изолираните антери зависи од регулаторите на раст и составот на хранливата подлога. Регенерираните растенија кои ги добиле биле тетраплоидни.

Escobar - Guzman et al. (2009) го испитувале андрогенетскиот потенцијал кај вкупно десет генотипови домати со изолирање на антери и култивирање на хранливи подлоги NN и MS. Во текот на истражувањето подлогата NN не дала добри резултати, па тие подоцна ја користеле само хранливата подлога MS. Кај осум од десетте генотипови тие добиле ембриониди и регенерирани растенија.

Motallebi - Azar (2010) изолирал антери од девет линии на домати. Во процесот на испитување на андрогенетскиот потенцијал на овие линии домати биле користени три различни подлоги. Формирање на калус имало на M1 и M2 подлогите, а формираните изданоци само на M1 подлога.

Corral - Martinez et al. (2010) за донор растенија користеле три генотипови. Индукционата подлога што ја користеле во истражувањето била според Murashige & Skoog (1962). Култивираниите антери резултирале со формирање калус и биле добиени 93 регенерирани растенија.

Kumar et al. (2020) изолирале антери од петнаесет генотипови домати и ги култивирале на MS хранлива подлога со различни концентрации на ауксини и цитокинини за индукција на калус. Кај осум генотипови добиле калусирање, а само кај еден генотип успешно регенерирале растенија.

2.1.4.3. Андрогенеза кај патлиџан (*Solanum melongena* L.)

Miyoshi (1996) во своето истражување изолирале микроспори од три F1 хибриди на патлиџан. Изолираните микроспори ги култивирале на модифицирана

NLN хранлива подлога. Како резултат добиле калусогенеза и регенерирани растенија.

Alpsoy & Seniz (2004) во нивното истражување употребиле вкупно 15 различни генотипови на патлицан. Истражувањето траело 4 години и изолираните антери ги култивирале на четири различни подлоги со различна концентрација на хормони за раст. Тие заклучиле дека генотипот има големо влијание врз андрогенетскиот потенцијал со тоа што од сите 15 испитувани генотипови, ембриоиди и регенерирани растенија добиле само кај 5 од нив.

Rotino et al. (2005) за испитување на андрогенетската способност изолирале антери од четири различни генотипови на патлицан. Изолираните антери ги култивирале на четири различни подлоги. Најдобри резултати, според формирани калуси и ембриоиди и добиени регенеранти, добиле со подлогите C6 и C9.

Salas et al. (2011) изолирале антери од дванаесет генотипови патлицан. Антерите биле култивирани, според Dumas de Vault & Chambonnet (1982). Во нивното истражување тие добиле калусирање, ембриоиди и регенерирани растенија. Сите генотипови формирале калуси, пет од дванаесетте испитувани генотипови резултирале со формирани ембриоиди, а само кај три генотипови има регенерирани растенија.

Basay & Ellialtioglu (2013) направиле двегодишно истражување за да го испитаат ефектот на генотипските фактори врз ефикасноста на култура на антери кај патлицан. Изолирале антери од пет генотипови и дванаесет хибридни линии. Антерите ги култивирале на хранлива подлога според Dumas de Vault & Chambonnet (1982). Од петте генотипови само кај два има формирано ембриоиди и регенеранти, а од дванаесетте хибридни линии ембриоиди и регенерирани растенија има само кај две од нив.

Од достапните трудови за испитување на андрогенетскиот потенцијал кај патлицан се гледа дека успешноста е помала во однос на другите култури кај кои се испитува методот на андрогенеза. Поради тоа патлицанот помалку се користи за истражувања поврзани со андрогенеза.

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Целта на ова истражување беше да се испита андрогенетската способност на различните генотипови на пиперка, домати и патлиџан на соодветни хранливи подлоги во *in vitro* услови.

Целата на ова истражување е постигната со реализација следните задачи:

1. Во текот на двете години од истражувањето беа користени шест генотипови пиперка: Edita, Homera, Duga Bela, Una, Amfora и Kurtovska kapija, четири генотипови домати: Bellfort, Rally, Policarpo, Novosadski jabučar и еден генотип патлиџан – Domači srednje dugi.

2. Од избраните сорти од незрели пупки беа изолирани антери и култивирани на хранливи подлоги во *in vitro* услови за секоја култура соодветно. Основната цел беше да се испита андрогенетскиот потенцијал на различните генотипови на пиперка, домати и патлиџан и да се согледа процентот на калусирање и формирање ембриониди, нивно вкоренување и аклиматизација на андрогенетските регенеранти.

3. Испитување на морфолошките карактеристики на добиените регенеранти во однос на мајчиниот генотип.

4. Одредување на содржината на фотосинтетски пигменти во плодови од мајчиниот генотип и андрогенетски регенеранти.

5. Молекуларни анализи и споредба на мајчиниот генотип со андрогенетските регенеранти.

6. Обработка на добиените резултати со соодветни статистички анализи.

Поставените задачи за испитување на андрогенетскиот потенцијал на користените генотипови пиперка (*Capsicum annuum* L.) се надоврзуваат и се прошируваат во однос на претходните истражувања на пиперка вршени во Лабораторијата за растителна биотехнологија при Земјоделскиот факултет, УГД –

Штип. Поставените задачи за утврдување на андрогенетскиот потенција на домати (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и патлиџан (*Solanum melongena* L.) се првични истражувања од ваков тип во Република Северна Македонија и пошироко, земајќи предвид дека се достапни малку литературни податоци за добивање култура на антери од домати и патлиџан.

Овие истражувања во однос на потенцијалот на андрогенеза кај различните генотипови пиперка, домати и патлиџан се основа за идни современи истражувања во оваа област, особено за добивање на андрогенетски растенија и нивно воведување во селекционерски програми.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

Сите лабораториски истражувања, освен молекуларните анализи, беа извршени во Лабораторијата за растителна биотехнологија во Наставниот центар Струмица при Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип. Молекуларните анализи беа извршени во Институт за ратарство и повртарство - Нови Сад, Србија.

4.1. Експериментален дизајн

Како почетен експериментален материјал за андрогенеза беа користени антери од комерцијално достапни генотипови на пиперка, домати и патлиџан.

Во двете експериментални години (2018 и 2019 година) беа поставени антери во повеќе турнуси од шест генотипови пиперка, четири генотипови домати и еден генотип патлиџан. Најголем број на турнуси кај пиперка има кај Amfora – 18 турнуси, а најмал број на турнуси кај Edita F1 (2018) и Omega F1 по 11 турнуси. Просечниот број на поставени антери кај пиперка се движи од 43,5 (кај Amfora) до 58,2 (кај Omega F1) по турнус (Табела 3).

Најголем број на турнуси од изолираните антери на домати има кај Novosadski jabučar (13 турнуси), а најмал кај Relly F1 (само еден турнус). Просечниот број на изолирани антери кај домати се движи од 21,3 (кај Policarpo F1) до 49 (кај Relly F1) по турнус (Табела 3). Малиот број на турнуси кај домати се должи на инфестацијата на растенијата домати во првата експериментална година од доматен листен минер (*Tuta absoluta* Meyrick.) со што дојде до целосно сушење на растенијата.

Кај патлиџанот беше користен само еден генотип Domači srednje dugi кај кој има вкупно 6 турнуси со просечно 24 изолирани антери по турнус. Малиот број на

турнуси и изолирани антери кај патлиџанот се должи на малиот број на формирани пупки во текот на вегетацијата.

Табела 3. Експериментален дизајн на култура од антери кај различни генотипови пиперка, домати и патлиџан во двете експериментални години.
Table 3. Experimental design of anther culture from different genotypes of pepper, tomato and eggplant in two experimental years.

Генотип	Вкупен број на турнуси	Просечен број на култивирани антери по турнус
Пиперка		
1. Edita F1 – 2018	11	50,5
2. Homera F1	11	58,2
3. Bela duga	13	47,6
4. Edita F1- 2019	15	35,2
5. Amfora	18	43,5
6. Una	17	57,9
7. Kurtovska kapija	13	43,6
Домат		
1. Belfort F1	3	26,7
2. Relly F1	1	49
3. Policarpo F1	3	21,3
4. Novosadski jabučar	13	41,9
Патлиџан		
1. Domači srednje dugi	6	24

4.2. Добивање на донор растенија

За добивање на донор растенија во текот на двегодишното истражување беа користени шест генотипови пиперка, четири генотипови домати и еден генотип патлиџан.

Во текот на првата година од истражувањето сеењето на семето од сите култури беше извршено во контејнери на 16.6.2018 година. Пикирањето беше извршено во фаза на формирање на три листови и растенијата беа префрлени во саксии наполнети со тресет. Растенијата беа расадени кога имаа висина околку 15 - 20 cm и беа одгледувани на отворено. Во текот на вегетацијата растенијата беа третирани со соодветни инсектициди и фунгициди и беа прихранувани со минерални ѓубрива.

Втората година сеењето беше извршено на 10.3.2019 година во пластични контејнери како и претходната година. По расадувањето растенијата беа одгледувани прво во заштитен простор на Земјоделски факултет во Наставен центар Струмица, а подоцна во текот на опитот беа префрлени на отворено.



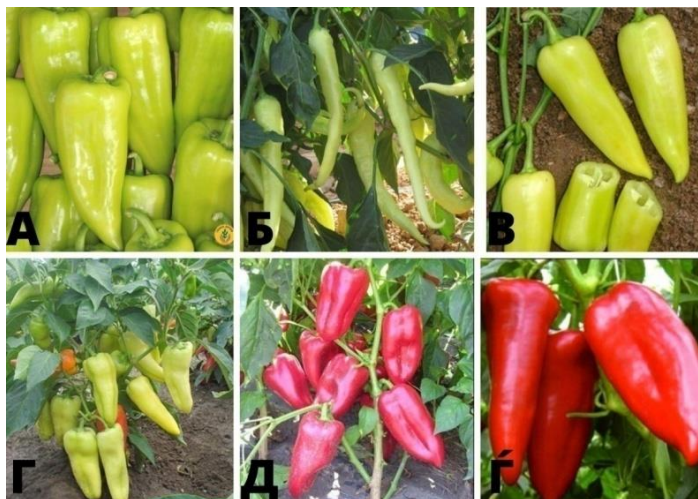
Слика 1. Подготовка на донор растенијата од пиперка, домати и патлиџан.

Figure 1. Preparation of donor plants of pepper, tomato and eggplant.

4.2.1. Опис на генотиповите пиперка одгледувани за донор растенија

Во текот на истражувањето за добивање на донор растенија беа користени вкупно шест генотипови пиперка:

1. **Edita F1** е стандарден хибрид блага пиперка со зелена боја. Се одликува со отворен хабитус и има средно дебел перикарп. Плодовите се со ширина од 4 - 5 cm, должина 15 - 16 cm и со просечна маса 130 g. При одгледување бараат плодна почва и минерални ѓубрива збогатени со азот. Отпорна е на бактериоза и затоа дава добри резултати и при одгледување на отворено.
2. **Homera F1** е ран хибрид лута пиперка. Се одликува со многу долги и изедначени плодови со дебел перикарп. Плодовите се со ширина 3 - 4 cm и должина 20 cm. Бојата на плодовите е млечнозелена / светложолта. Се карактеризира со висок принос и отпорност на Tm0 вирус.
3. **Duga bela** е средно рана сорта пиперка и се одликува со силни и високи растенија. Плодовите се долги, тип – капија и во технолошка зрелост имаат млечнобела боја, а во физиолошка се со црвена боја. Високо приносна сорта со 35 - 45 t/ha технолошки зрели плодови.
4. **Una** е средно рана сорта која се одликува со плодови тип капија. Должината на плодовите е 14 - 18 cm, ширина 4 cm и маса 80 - 120 g. Дебелината на перикарпот просечно изнесува околу 5 mm. Плодовите се светложолти во технолошка зрелост, а интензивно црвени во физиолошка зрелост.
5. **Amfora** е средно рана сорта. Плодовите се тип капија и нивната просечна должина е околу 12 - 15 cm, ширината околу 5 cm и дебелината на перикарпот 4 - 6 mm. Масата на плодовите достигнува просечна вредност околу 100 g. Бојата на плодот во технолошка зрелост е темнозелена, а во физиолошка зрелост интензивно црвена. Може да се одгледува и во затворени простори и на отворено поле.
6. **Kurtovska kapija** е доцна сорта со плод тип капија. Должината на плодот е 12 - 16 cm, ширината е околу 5 cm, а дебелината на перикарпот е околу 3 - 4 mm. Во технолошка зрелост има темнозелена боја, а во физиолошка зрелост интензивно црвена боја.



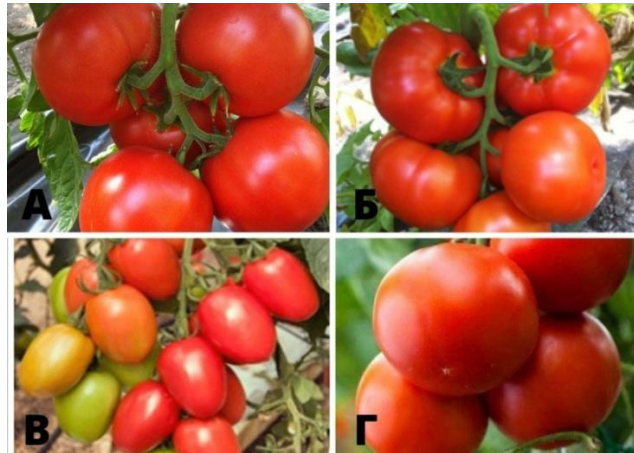
Слика 2. / Figure 2. A) Edita F1, Б) Homera F1, В) Bela duga, Г) Una, Д) Amfora, Ѓ) Kurtovska kapija.

4.2.2. Опис на генотиповите домати одгледувани за дозор растенија

Во текот на истражувањето за добивање на дозор растенија беа користени четири сорти домати:

1. **Belfort F1** е ран хибриден домати. Хибридот има кратки интернодии што овозможува да се одгледува и во оранжерији. Плодовите се темно црвени, цврсти и заоблени. Дополнителна предност дава вкусот на плодот кој е сличен како кај розевите домати. Масата на плодот е околу 220 - 250 g.
2. **Rally F1** е ран хибриден домати со полуотворен хабитус. Плодовите се крупни, нивната маса достигнува вредност од 250 - 350 g, меснати и вкусни. Се одликува со многу силен коренов систем, отпорен на нематоди. Нема нерамномерно зреење.
3. **Policarpo F1** е многу ран хибриден домати кој се одликува со плодови кои имаат форма на слива. Плодовите се изедначени со просечна тежина 160 - 180 g. Поради одличната отпорност овој хибрид е погоден за сите начини на одгледување.
4. **Novosadski jabučar** е средно рана сорта со вегетација околу 120 дена. Се одликува со индетерминантен тип на пораст. Плодовите се округли со

интензивно црвена боја и со просечна маса од 130 - 150 g. Има добар однос на вкупните шеќери и киселини, со содржина на сува материја од 6 - 6,5 %.



Слика 3. / Figure 3. A) Bellfort F1, Б) Rally F1, B) Policarpo F1, Г) Novosadski jabučar.

4.2.3. Опис на генотипот патлиџан одгледуван за донор растенија

Во истражувањето за добивање на донор растенија беше користена само една сорта патлиџан:

1. **Domaći srednje dugi** е рана сорта која се одликува со плодови со темно виолетова боја и изразен сјај, кои имаат крушковидна форма и се долги 16 - 18 cm. Високородна сорта со принос од 30 - 40 t/ha.



Слика 4. / Figure 4. Domaći srednje dugi.

4.3. Антерите како почетен материјал

Како почетен материјал користени се незрели пупки од домати, пиперка и патлиџан кои содржат антери. Собирањето на пупките се вршеше наутро, по што следувааше нивна стерелизација која се одвиваше на следниот начин: пупките се промиваат со протечна водоводна вода 30 минути, потоа се ставаат 2 минути во 70% алкохол C_2H_5OH , потоа уште 10 минути во 1,5% Izosan G и на крај трипати се промиваат во дестилирана и стелиризирана вода.

Изолираните антери беа култивирани во петри кутии. Во еден петриев сад беа култивирани по 5 или 10 антери поставени со конкавната страна врз медиумот. Изолираните антери беа мерени по должина и ширина.



Слика 5. Изолирање на антери и култивирање на хранлива подлога.

Figure 5. Anther isolation and their cultivation of medium.

4.4. Состав на хранливите подлоги и услови за култивирање на антери

Во истражувањето беа користени различни хранливи подлоги соодветни за различните култури. Хранливите подлоги беа со рН 5.7 мерена и прилагодена со рН метар (Слика 6).



Слика 6. Мерење на рН вредност на хранлива подлога.

Figure 6. Measuring medium pH value.

После подготовката на хранливите подлоги за секоја култура соодветно, истите беа стерилизирани со автоклавирање за време од 20 минути на температура над 100 °C и притисок од 1,2 А.



Слика 7. Подготовка на подлога.

Figure 7. Medium preparation.

4.4.1. Хранлива подлога и услови за пиперка

Како индукциона хранлива подлога за андрогенеза на пиперка беше користена подлогата на Dumas de Vaultx et al. (1981).

Најпрво беше направен температурниот третман од 12 дена, кој е значаен за индуцирање на хаплоидни и спонтани дихаплоидни ембриоиди од микроспорите. Температурниот третман се одвива на Ср хранлива подлога (Табела 4) во две фази: прво антерите се инкубираат 8 дена на 35 °C на темно, а потоа следните 4 дена на клима - комора на 25 °C 12 часа светло/ 12 часа темно.

После температурниот третман од 12 дена, антерите беа пренесени на R₁ подлога (Табела 5) на 12 часа темно/ 12 часа светло на 25 °C. На секои 30 дена антерите беа пренесувани (пасажирани) на свежа R₁ подлога.

Формираните ембриоиди беа поставувани на подлога за вкоренување V₃ (Табела 6), после која беше спроведена аклиматизација во надворешна средина.

Табела 4. Состав на Ср хранлива подлога.

Table 4. Composition of Ср nutrient medium.

Состав на Ср хранлива подлога (за еден литар подлога)	
SNGM макро хранлив раствор	100 ml
Micro 2 хранлив раствор	10 ml
Раствор F витамини	1 ml
Раствор Morel витамини	1 ml
Витамин B ₁₂	0,6 ml
Хелирано железо (FeNaEDTA)	1 ml
2,4-D	0,1 ml
KIN	0,1 ml
Дестилирана вода	890 ml
Сахароза	30 g
Агар	10 g

Табела 5. Состав на R₁ хранлива подлога.

Table 5. Composition of R₁ nutrient medium.

Состав на R₁ хранлива подлога (за еден литар подлога)	
SNGM макро хранлив раствор	100 ml
Micro 2 хранлив раствор	10 ml
Раствор F витамини	1 ml
Раствор Morel витамини	1 ml
Хелирано железо (FeNaEDTA)	1 ml
KIN	1 ml
Дестилирана вода	886 ml
Сахароза	30 g
Агар	10 g

Табела 6. Состав на V₃ подлога за вкоренување.

Table 6. Composition of V₃ nutrient medium.

Состав на V₃ хранлива подлога (за еден литар подлога)	
MS макро хранлив раствор	100 ml
Micro-Heller хранлив раствор	1 ml
Раствор Morel витамини	2 ml
Хелирано железо (FeNaEDTA)	2 ml
Дестилирана вода	1000ml
Сахароза	30 g
Агар	10 g

4.4.2. Хранлива подлога и услови за домот

За андрогенеза на домот беше користена MS индукциона хранлива подлога според Murashige & Skoog (1962).

Најпрво антерите беа инкубирани во клима - комора на 25 °C на темно еден месец, а потоа беа префрелени на 16/8 фотопериод. Антерите и формираните калуси беа пасажирани на свежа подлога секој месец.

Формираните зелени калуси беа пасажирани на MS₂ медиум, а како подлога за вкоренување беше користена MS₃ подлогата.

MS₁: MS + 20g сахароза + 1 mg/l 2ip + 2 mg/l IAA

MS₂: MS + 20 g сахароза + 0,25 mg/IBAP

MS₃: ½ MS + 10g сахароза

Во Табела 7 е прикажан составот на хранливата подлога MS, додека пак во Табела 8 е прикажан деталниот состав на MS растворот кој се користи во хранливата подлога.

Табела 7. Состав на MS хранлива подлога.

Table 7. Composition of MS nutrient medium.

Состав на MS хранлива подлога (за еден литар подлога)	
Казеин хидролизат	0,2 g
Инозитол (myo)	0,1 g
Хелирано железо (FeNaEDTA)	10 ml
Никотинска киселина	0,5 ml
Витамин Б ₁	0,1 ml
Витамин Б ₆	1 ml
MS раствор	100 ml
Дестилирана вода	900 ml
Сахароза	30 g
Агар	7g

Табела 8. Состав на MS раствор.

Table 8. Composition of MS solution.

Состав на MS раствор (g/l)	
NH ₄ NO ₃	16,50 g
KNO ₃	19 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	4,40 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	3,70 g
KH ₂ PO ₄	1,70 g
H ₃ BO ₃	0,06 g
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,22 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,09 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,02 g
KJ	0,08 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,025 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,025 g

Доколку се формираат ембриоиди истите се поставуваат на подлога за вкоренување V₃, што се користи и е детално објаснета во насловот 4.4.1. Хранлива подлога и услови за пиперка. После вкоренувањето следи аклиматизација во надворешна средина.

4.4.3. Хранлива подлога и услови за патлиџан

За андрогенеза на патлиџан како индукциона подлога беше користена подлогата според Dumas de Vault & Chambonet (1982). Подлогата е бележена како Ct хранлива подлога. Деталниот состав на Ct хранливата подлога е прикажан во Табела 9.

Прво беше направен температурниот предтретман на 35 °C, 8 дена на темно. Потоа антерите беа префрлени на светло со 12/12 фотопериод на 25 °C.

Секој месец антерите се пасажираа на свежа подлога. Доколку се формираат ембриоиди истите се пасажираат на подлога за вкоренување V₃.

Табела 9. Состав на Ct хранлива подлога.

Table 9. Composition of Ct nutrient medium.

Состав на Ct хранлива подлога	
SNGM масно хранлив раствор	100 ml
Micro 2 хранлив раствор	10 ml
Раствор F витамини	1 ml
Раствор Mogen витамини	1 ml
Витамин B ₁₂	0,6 ml
Хелирано железо (FeNaEDTA)	1 ml
2,4-D	0,01 ml
KIN	0,01 ml
Дестилирана вода	890 ml
Сахароза	30 g
Агар	10 g

4.5. Регенерација и морфологија на андрогенетските ембриоиди

Формираните ембриоиди од процесот на андрогенеза се одвојуваат и се префрлуваат на подлога за вкоренување која е различна за различни видови култури.

Ембриоидите се префрлуваат во епрувета во која има соодветна подлога за индукција на корени и по формирањето на добро развиен коренов систем следува постапка за пренесување на младите растенија во надворешни услови (аклиматизација).



Слика 8. Постапка за аклиматизација.

Figure 8. Acclimatization procedure.

Аклиматизацијата се врши со пресадување на добиените регенеранти на смеска од тресет и перлит која претходно е стерилизирана. Најпрво корењата се мијат со протечна водоводна вода за да се отстрани подлогата од нив. Потоа се промиваат со дестилирана вода и се потопуваат во раствор од 1 g/l Benomil за време од 30 секунди. На крај се префрлуваат во смеската и се покриваат со прозирна платична чаша. На секој втор ден од засадувањето се прави по еден отвор на чашата, а после третиот ден се полеваат со 20 ml $\frac{1}{2}$ MS раствор. Откако ќе се отстрани чашата растението е целосно аклиматизирано и прилагодено за растење во надворешни услови.

Не сите добиени регенеранти успеваат успешно да се аклиматизираат, а на сето тоа влијаат повеќе фактори.

Добиените регенеранти кои беа аклиматизирани се следеа за морфолошките карактеристики, со мерење на вегетативните и генеративните органи, и истите беа споредувани со мајчиниот генотип.

4.6. Спектрофотометриско одредување на фотосинтетски пигменти

4.6.1. Постапка за екстракција

Методот на спектрофотометриско одредување на фотосинтетските пигменти се состои од екстракција на хлорофили и каротеноиди од растителниот материјал. Како растителен материјал во истражувањето беа користени зрели плодови од регенерантот Edita_R₁ и зрели плодови од мајчиниот генотип Edita F1.

Постапката за екстракција (прикажана на Слика 9) е следна: се зема 0,2 g растителен материјал и се става во аван каде се мацерира со 25 ml 96 % C₂H₅OH, етанол. Откако ќе се добие хомогена смеса се процедува преку филтер - хартија и се полни во тиквичка од 25 ml. Тиквичката се дополнува со 96% етанол до маркицата. Со тоа се добива екстракт од пигментите и така добиените екстракти се складираат на темно, со цел да не дојде до разградување на хлорофилот.



Слика 9. Екстракција на хлорофил и каротеноиди и мерење на UV/VIS спектрофотометар (Jenway 6305).

Figure 9. Extraction of chlorophyll and carotenoids and UV/VIS spectrophotometer measurement (Jenway 6305).

4.6.2. Постапка за квантитативно одредување на содржината на хлорофили и каротеноиди

Откако беше завршена екстракцијата на фотосинтетските пигменти, од тиквичката екстрактите се префрлуваат во кивети за да се одредат содржините на хлорофили и каротеноиди на UV/VIS спектрофотометар (Jenway 6305).

Спектрофотометарот прво се калибрира со кивета полна со 96 % етанол. Потоа се анализираат екстрактите на спектрофотометарот на бранови должини кои се соодветни за пигментите што се испитуваат.

Спектрофотометарски беа мерени апсорбанциите на хлорофили и каротеноиди на следните бранови должини:

Хлорофил **a** (Ch_a) – 665 nm бранова должина

Хлорофил **б** (Ch_b) – 649 nm бранова должина

Вкупни хлорофили **a+б** (Ch_{a+b}) – 654 nm бранова должина

Каротеноиди (Car) – 470 nm бранова должина

Анализираните фотосинтетски пигменти (хлорофил а, хлорофил б и каротеноиди) беа пресметувани според следните формули (Велешанова, 2019):

$$Ch_a = (13,7 \times A_{665} - 5,76 \times A_{649})$$

$$Ch_b = (25,8 \times A_{649} - 7,6 \times A_{665})$$

$$Car = (1000 \times A_{470} - 2,13 \times A_{665}) - (97,64 \times A_{649}) / 209$$

Вкупните хлорофили Ch_{a+b} беа пресметан според Palta (1990):

$$Ch_{a+b} = 1000 \times A_{654} / 39,8$$

4.7. Молекуларни анализи на андрогенетските регенеранти

Добиениете андрогенетски регенеранти беа искористени за молекуларни анализи. Молекуларните анализи се вршеа во лабораториите на Институт за ратарство и повртарство – Нови Сад, Република Србија.

Примероците кои беа анализирани се следните:

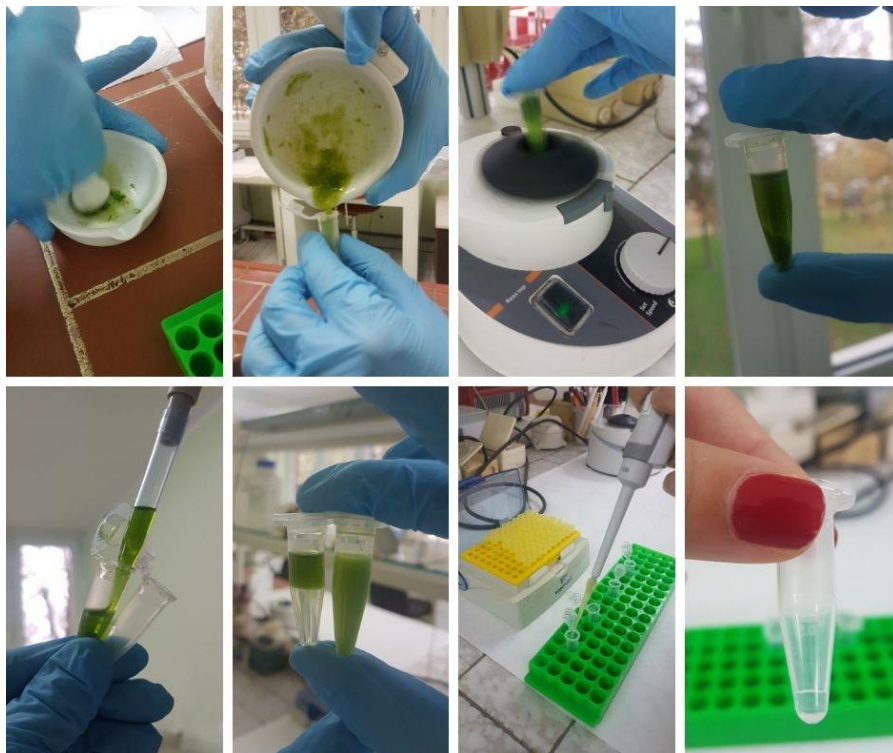
- Edita F1 – мајчин генотип (контрола)
- Edita_R₁ – регенерирано растение (успешно аклиматизирано)
- Edita_R₂ – регенерант (регенерант со неуспешна аклиматизација)
- Edita_R₃ – регенерант (регенерант со неуспешна аклиматизација)
- Edita_R₄ – регенерант (регенерант со неуспешна аклиматизација)

4.7.1. Изолација на DNA од андрогенетските регенеранти

Прво беше извршена екстракција на геномска DNA според модифициран протокол Somma (2004). Протоколот кој се вршеше за изолација на DNA беше според СТАВ метод:

- Најпрво во ладни авани (кои се одржуваат во лед) се додава 1,5 ml СТАВ екстрациски пуфер, 3 µl 0,2 % меркаптоетанол (C₂H₆OS) и лисна маса од регенерантите.
- Се мацираат додека не се добие хомогена смеса.
- Измацираниот материјал се става во стерилни епендорф епрувети од 1,5 ml.
- Се додава 20 µl Protease K и се меша на вортекс.
- Се инкубираат 45 минути на 65 °C.
- Се центрифугира 15 минути на 13.000 грm.
- Добиениот супернатант (оклу 600 µl) се пренесува во нова епендорф епрувета и се додава иста количина хлороформ (600 µl).
- Се меша на вортекс околу 30 секунди.

- Се става на центрифуга 15 минути на 13.000 rpm додека не дојде до фаза на раздвојување.
- Се префрлува 400 µl супернатант во нова епендорф епрувета и се додава 400 µl хлороформ.
- Се меша на вортекс 30 секунди.
- Се центрифугира 10 минути на 13.000 rpm.
- Околу 300 µl супернатант се пренесува во нова епендорф епрувета и се додава 2 волумена (600 µl) СТАВ (Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) преципитационен пуфер.
- Лесно се промешува.
- Се инкубира 60 минути на собна температура.
- Потоа се става на центрифуга 10 минути на 13.000 rpm.
- Откако ќе заврши центрифугирањето се отфрла супернатантот, а талогот се раствора во 350 µl 1,2 M NaCl и се додава 350 µl хлороморф.
- Се меша на вортекс 30 секунди.
- Се центрифугира 10 минути на 13.000 rpm.
- Горниот слој се пренесува (300 µl) во нова епендорф епрувета и се додава 0,6 волумен (180 µl) изопропанол.
- Се меша со инверзија неколку пати.
- Се центрифугира 10 минути на 13.000 rpm.
- Се отфрла горниот слој, а талогот се исперува со додавање 500 µl 70 % етанол.
- Внимателно се обраќа неколку пати и се центрифугира 10 минути на 13.000 rpm.
- Се исфрла супернатантот, а талогот се остава на собна температура да се исуши 30-тина минути.
- Талогот на крај се раствора во 35/50 µl стерилна вода.
- Со тоа се добива изолирана DNA од соодветниот примерок.

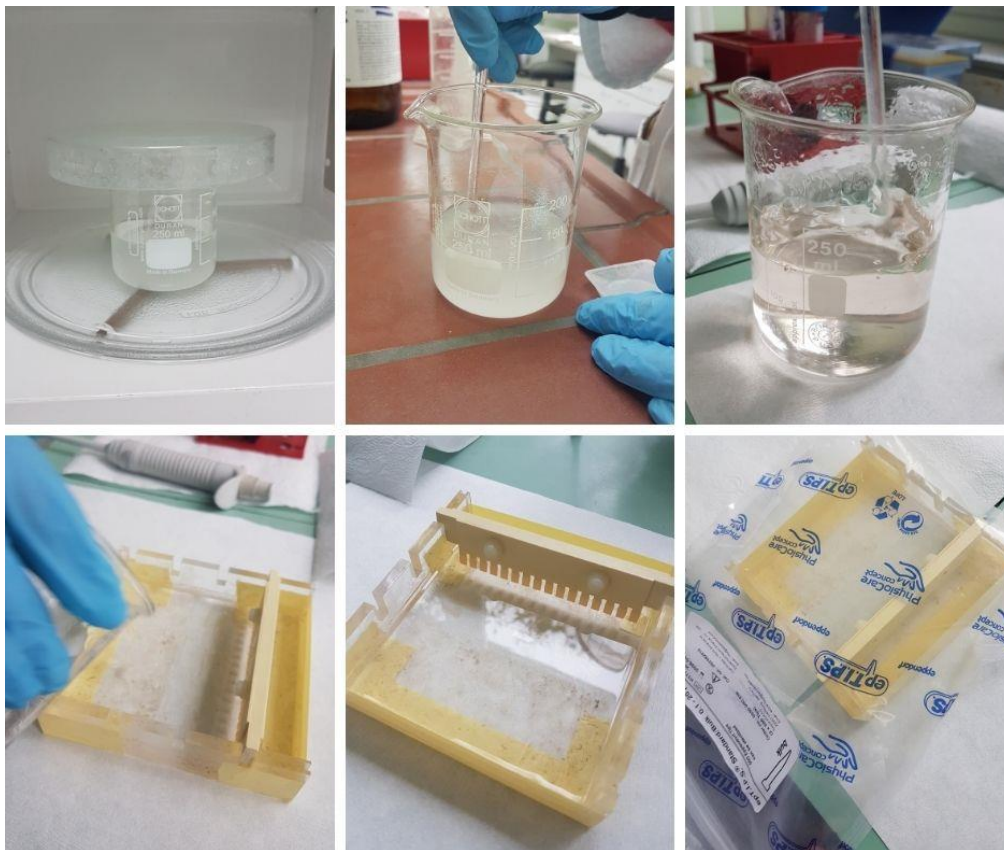


Слика 10. Протокол за изолација на DNA.

Figure 10. DNA isolation protocol.

4.7.2. Подготовка на гел за електрофореза

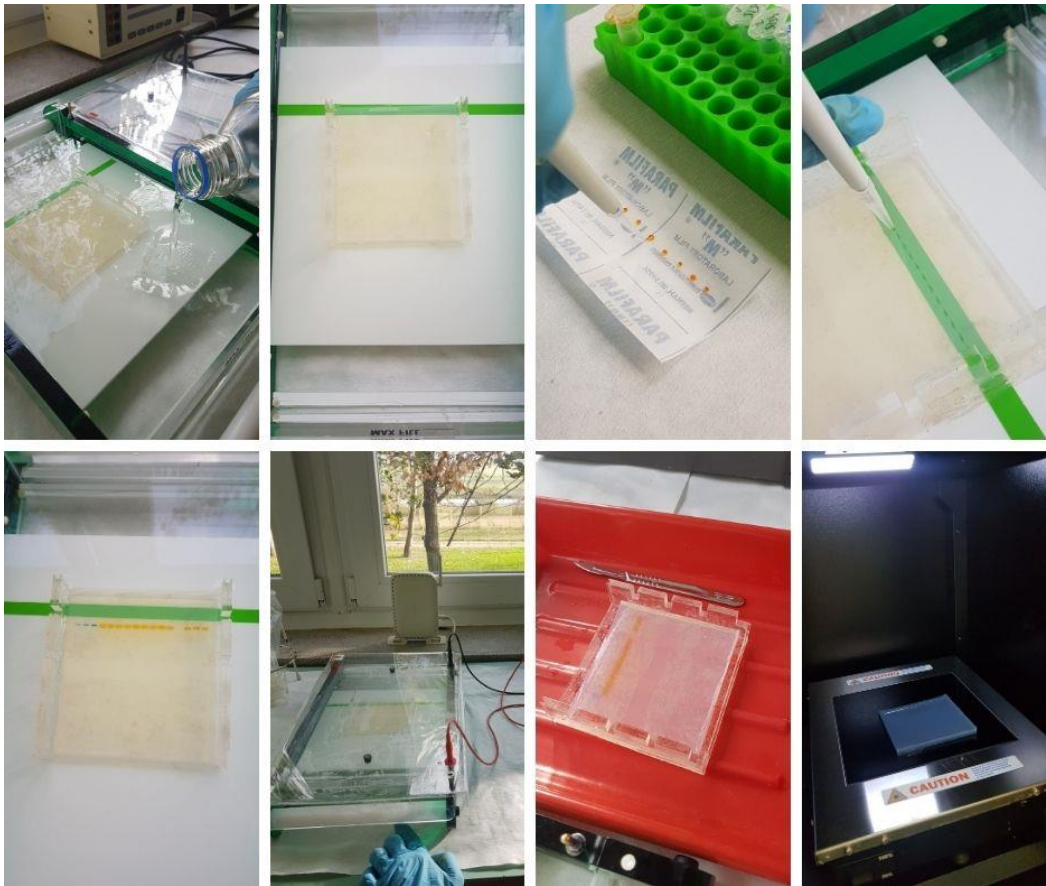
После изолацијата на DNA следува подготовката на гелот (Слика 11). Во стаклена чаша се мешаат 150 ml TAE (Tris Acetate-EDTA) пуфер (50x) и 1,5 g агар и се покрива со стаклен капак па се става во микробранова печка. После 1 минута се промешува и се враќа назад во микробранова печка уште 5 минути. Во гелот се додава и 4 μ l етидиум бромид ($C_{21}H_{20}BrN_3$) и се разлева во калап. Етидиум бромид служи за гелот да добие флуоресцентна боја и да може да се прочита на компјутер. Откако гелот ќе се разлее во калап, во кој не треба да има меури, се меша со пипетна наставка за да остане рамна површината на гелот. Кога ќе почне да се стврдува се става во фрижидер.



Слика 11. Подготовка на гел.

Figure 11. Gel preparation.

Гелот се поставува во електрофореза (Слика 12) и се залива со пуфер да биде целосно покриен. На парафилм се става по 2 μl orange за секој примерок. Покрај нив се додава по 2 μl PCR вода и врз водата се додава примерок од DNA и заедно се промешуваат со orange. Со пипета се зема DNA примерокот и се става на гелот. Првите три бунарчиња на гелот се оставаат за λDNA . Во првото бунарче се става 3 μl λDNA , во второто 5 μl λDNA и во третото 10 μl λDNA . Се вклучува електрофорезата на струја со катода и анода и се чека околу 30 минути. Потоа се вади гелот и се става во апаратот за сликање и се слика на компјутер да се провери дали е изолирана DNA од примероците. Потоа следува анализата на PCR (Polymerase Change Reaction) апаратот.



Слика 12. Гел електрофореза.

Figure 12. Gel electrophoresis.

4.7.3. PCR анализа на андрогенетските регенеранти

Откако беше подготвен гелот за електрофореза следниот чекор беше PCR амплификација. Размножувањето на микросателитски локуси е работено со примена на полимеразна верижна реакција (Polymerase Chain Reaction, PCR) на PCR апарат (T-personal, Biometra, Германија).

Врз основа на достапната литература, за амплификација на избраните SSR (Simple Sequence Repeats) локуси користени се програми за амплификација со одредени модификации и следните прајмери Hpms1-117, Hpms 1-168, Hpms 1-274, EPMS 650 и CAMS 117.

- **Hrms1-117** (според: Lee et al., 2004; Keleşet al. 2015)

forward: ACCCAAATTTGCCTTGTTGAT reverse: AATCCATAACCTTATCCCATAAA
189 bp

Почетна денатурација на 95 °C во времетраење од 30 секунди. Циклусот од 35 повторувања ги опфаќа следните чекори: денатурација на 95 °C во времетраење од 15 секунди, врзување на прајмерите на 56 °C во времетраење од 30 секунди, екстензија на 72 °C во траење од 30 секунди. Финална екстензија на 72 °C 3 минути.

- **Hrms1-168 и Hrms1-274** (според: Hanáček et al., 2010)

Hrms 1-168

forward: GCCCCGATCAATGAATTTCAAC

reverse: TGATTTTTGGGTGGAGAGAAAACC 208 bp

Hrms 1-274

forward: TCCCAGACCCCTCGTGATAG reverse: TCCTGCTCCTTCCACAACCTG 174bp

Почетна денатурација на 94 °C во времетраење од 3 минути. Циклусот од 30 повторувања ги опфати следните чекори: денатурација на 94 °C во времетраење од 1 минута, врзување прајмери на 55 °C со траење од 1 минута и екстензија на 72 °C во времетраење од 2 мин. Финална екстензија на 72 °C 10 минути.

- **EPMS 650** (според Minamiyama et al., 2006; Portis et al., 2007; Parra-Vega et al., 2013)

forward: CATGGGTGAGGGTACATGGT reverse: AGAGGGAAGGGTTATTTGCC 251 bp

Почетна денатурација на 94 °C во времетраење од 3 минути. Циклусот од 35 повторувања ги опфати следните чекори: денатурација на 94 °C во времетраење од 1 минута, врзување на прајмери на 60 °C со траење 1 минута и

екстензија на 72 °C во времетраење од 1 минута. Финална екстензија на 72 °C 10 минути.

- **CAMS 117 (*Touchdown program*)** (според: Minamiyama et al., 2006; Portis et al., 2007; Parra-Vega et al., 2013)

forward: TTGTGGAGGAAACAAGCAAA reverse: CCTCAGCCCAGGAGACATAA 223 bp

Почетна денатурација на 94 °C во траење од 3 минути. Првиот циклус од 10 повторувања ги опфати следните чекори: денатурација на 94 °C 30 секунди, врзување прајмери на 60 °C 1 минута (при што со секој следен циклус температурата на врзување прајмери се намалува за 1 °C) и екстензија на 72 °C во траење од 1 минута. Следниот циклус од 30 повторувања опфаќа: денатурација на 94 °C со времетраење од 30 секунди, врзување прајмери на 55 °C 1 минута и екстензија на 72 °C 1 минута. Финална екстензија на 72 °C 5 минути.

Количината на реакционата смеса (Master Mix) изнесува 23 µl, а анализираната DNA 2 µl. Компонентите на реакционата смеса (Master Mix) за анализа на еден примерок се следните:

H₂O 15,5 µl

10 x B пуфер 2,5 µl

dNTPs (2 mM) 2,5 µl

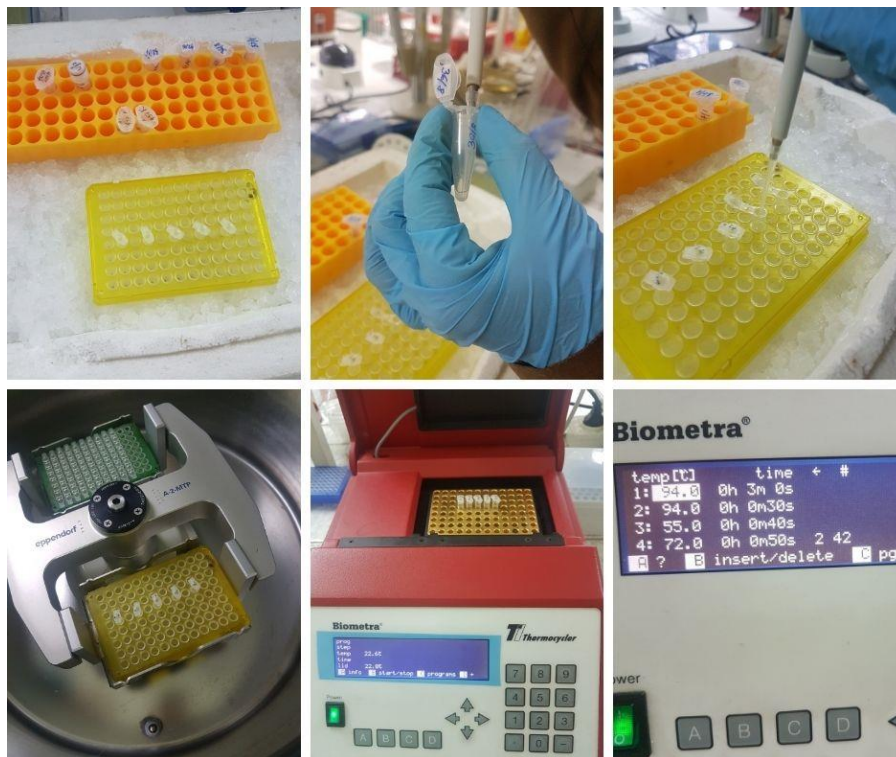
Primer *forward* (10 pmol/µl) 1,0 µl

Primer *reverse* (10 pmol/µl) 1,0 µl

Taq полимераза (5U/ µl) 0,5 µl

За PCR методата се ставаат примероците и нови мали епендорф епрувети за прајмери во лед. На малите епендорф епрувети се пишува шифрата на секој

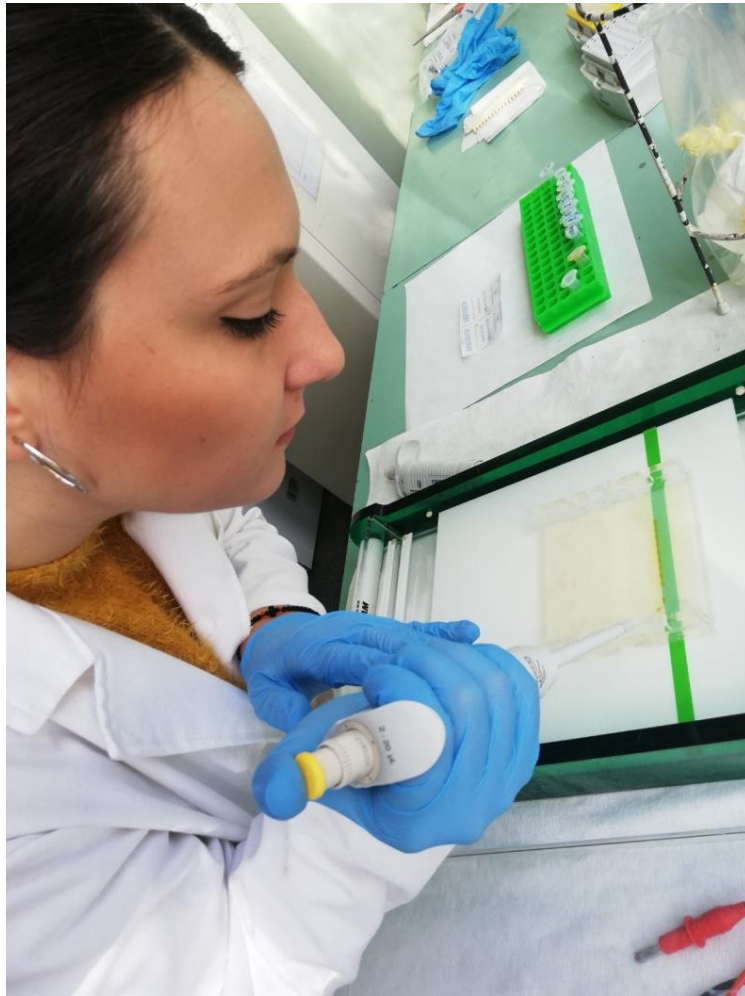
примерок соодветно. Се подготвува Master Mix кој се состои од: прајмер – forward and reverse, пуфер + Mg, DNTP- нуклеотиди, полимераза и PCR вода. Кога е готов Master Mix-от се меша на мешалка и од него во секоја епендорф епрувета се става по 23 μ l и се додава DNA соодветна според шифрите. Сите епендорф епрувети со DNA и Master Mix се ставаат на центрифуга околу 20-30 секунди. По центрифугирањето се вклучуваат на соодветна програма за PCR (Слика 13).



Слика 13. Полимеризирачка верижна реакција (PCR).

Figure 13. Polymerase Chain Reaction (PCR).

На крај од постапката следува електрофореза на PCR продукот. Умножените SSR локуси се анализирани на 2% агарозен гел со помош на хоризонтална електрофореза. Големината на продукот е одредена во однос на скала од 50 bp, односно фрагменти со позната големина. Нанесено е по 10 μ l скала од 50 bp и исто толку PCR продукт на гел, за секој од анализираниите примероци. Агарозен гел е правен со 1xTAE пуфер и агароза. Во гелот е додавана боја DNA Stain G (производител Serva) заради визуелизација на фрагментите, а геловите после електрофорезата се фотографирани под UV светло.



Слика 14. Работа на гел електрофореза (поставување на примероците во гелот).
Figure 14. Work on gel electrophoresis (loading of samples into the gel).

4.8. Статистичка обработка на податоци

Резултати за должина и ширина на изолирани антери од сите испитувани генотипови во ова истражување беа статистички обработени и анализирани со статистичкиот софтвер IBM SPSS Statistics 19 (Statistical Package for the Social Sciences). Добиените средни вредности за различните испитувани параметри беа споредени со One-way ANOVA (Duncan posthoc) тест со ниво на сигнификантност од 0,05 %.

Добиените резултати за содржина на пигменти во плодови од мајчин генотип Edita F1 и регенрант Edita_R₁ статистички се обработени со униваријантна анализа на варијанса ANOVA за утврдување на ефектот на влијание на андрогензата врз содржината на пигменти во плодовите со статистичкиот софтвер Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics Software 19.0).

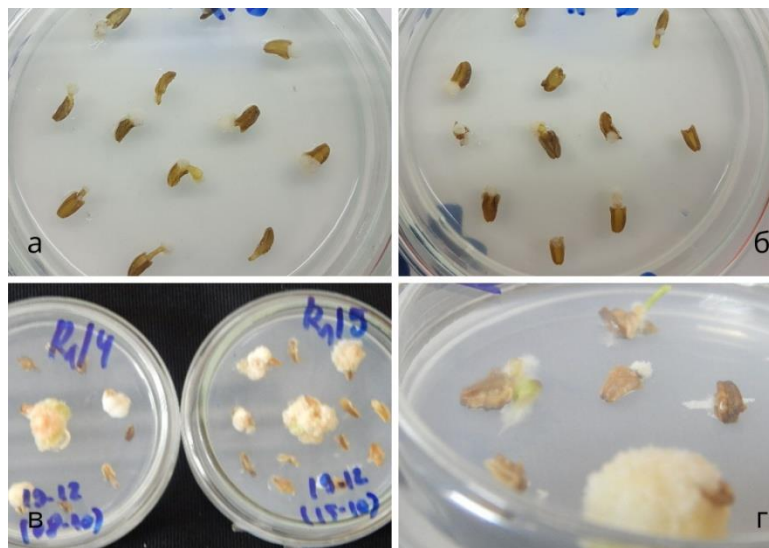
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во текот на две експериментални години од незрели пупки беа изолирани антери од различни генотипови на пиперка, домати и патлиџан и истите беа култивирани на подлоги соодветни за културата со цел преку различни лабораториски методи да се испита нивната андрогенетска способност и потенцијал.

Во оваа поглавје преку табели и слики претставени се добиените резултати од влијанието на различните генотипови врз нивната андрогенетската способност.

5.1. Култивирање на антери на пиперка (*Capsicum annuum* L.)

На Слика 15 и Слика 16 се прикажани експериментални резултати добиени со методот на андрогенезата кај различни генотипови пиперка.



Слика 15. а, б) Култивирани антери на R₁ хранливи подлоги; в, г) Формирање на калуси.

Figure 15. a, b) Anthers cultivated on R₁ medium; c, d) Calli formation.



Слика 16. а, б) Формирање на изданок; в, г) Култивирање на регенерант на V_3 подлога за вкоренување и формирани корења.

Figure 16. a, b) Shoot formation; c, d) Cultivation of regenerant on V_3 rooting medium and formed roots.

Во Табела 10 се претставени вкупниот број на изолирани антери од различните генотипови пиперка за време на двогодишниот експеримент и просечната должина и ширина на антерите. Од Edita F1 се поставени вкупно 1 083 антери со просечна должина 3,45 mm и просечна ширина 1,22 mm. Од генотипот Номера F1 изолирани се 640 антери со просечна должина 3,11 mm и просечна ширина 1,06 mm, додека пак од Bela duga култивирани се вкупно 619 антери со просечна должина 3,45 mm и просечна ширина 1,35 mm. Од генотипот Una култивирани се вкупно 984 антери со просечна должина од 3,85 mm и ширина 1,08 mm. Од генотипот Amfora култивирани се вкупно 784 антери со просечна должина од 2,90 mm и ширина 0,96 mm, додека од Kurtovska капија 567 антери просечно долги 3,20 mm и просечно широки 1,23 mm.

Според статистичката анализа на просечната должина и ширина на антерите од сите испитувани генотипови, генотипот Una се одликува со сигнификантно најдолги антери (3,85 mm), додека Amfora со сигнификантно

најкратки антери (2,90 mm) во однос на другите генотипови. Во однос на просечната ширина на антерите, сигнификатно најшироки антери има Bela duga (1,35 mm), а сигнификатно најтесни генотипот Amfora (0,96 mm).

Табела 10. Број на изолирани антери од пиперка и култивирани на индуктивен Ср медиум.

Table 10. Number of cultivated pepper anthers placed on inductive Ср medium.

Генотип	Број на изолирани антери	Должина на антери (mm)	Ширина на антери (mm)
Edita F1	1083	3,45 b	1,22 b
Homera F1	640	3,11 c	1,06 cd
Bela duga	619	3,45 b	1,35 a
Amfora	784	2,90 d	0,96 d
Una	984	3,85 a	1,08 c
Kurtovska kapija	567	3,20 c	1,23 b

Во Табела 11 се прикажани резултатите од влијанието на андрогенетскиот третман врз изолираните антери од сите генотиповите во текот на експериментот. Може да се воочи дека најголем број на формирани калуси, како и најголем процент на калусирање има кај генотипот Homera F1 (11,4 %), а најмал процент на калусирање е забележан кај Amfora (3,8 %). Андрогенезата кај генотипот Edita F1 резултираше со формирање на 74 калуси, односно калусогенеза на 6,8 % од вкупниот број на антери, со формирани 9 ембриоиди и едно целосно регенерирано растение. Антерите од генотипот Bela duga имаат формирано 51 калус, односно 8,2 % калусогенеза и еден ембриоид (0,2 % ембриогенеза), без успешно да биде регенериран во растение. Останатите генотипови се одликуваат со различен процент на калусирање, но немаат потенцијал за ембриогенеза.

Табела 11. Резултати од изолираните антери на пиперка култивирани на Ср хранлива подлога.

Table 11. Results of pepper anthers cultivated on inductive Cp medium.

Генотип	Број на формиран калуси	% на калусирање	Број на формиран ембриоди	% на ембриогенеза	Број на регенерирани растенија
Edita F1	74	6,8	9	0,8	1
Homera F1	73	11,4	/	/	/
Bela duga	51	8,2	1	0,2	/
Amfora	30	3,8	/	/	/
Una	82	8,3	/	/	/
Kurtovska карија	11	1.9	/	/	/

Од прикажаните резултатите се гледа дека генотипот е еден од факторите кои имаат големо влијание врз способноста за андрогенеза. Во текот на двегодишниот експеримент ембриоди и регенерирани растенија се добиени само од еден генотип – Edita F1. Другите генотипови одговорија со калусогенеза и формирање на ембриоди (Bela duga), но без успешна регенерација и аклиматизација на истите. Кај Homera, како единствена лута пиперка во истражувањето, немаше формирано ембриод, но пак истата се одликува со најголем процент на формиран калуси во однос на другите генотипови.

Има повеќе научни трудови каде се прикажани успешни протоколи за култура на антери кај пиперка. Резултатите од нашите истражувања се во согласност со истражувањата на Dolcet-Sanjuan et al. (1997), Колева Гудева и Спасеноски (2002), Supena et al. (2006), Rodeva et al. (2007), Rodeva et al. (2011), Колева Гудева и Трајкова (2012), кои користеле хранливи подлоги исто според Dumas de Vaulx et al. (1981). Тие во своите истражувања добиле ембриоди и регенеранти, во различен процент од различните генотипови.

Исто така, во нашето истражување единствената лута пиперка не покажа способност за андрогенеза и формирање ембриоиди и оваа соодветствува на резултатите кои ги добиле Mutiko & Fari (1996) и Колева Гудева и Трајкова (2012) кои во своите истражувања заклучиле дека лутите сорти имаат најнизок андрогенетски потенцијал или воопшто немаат андрогенетски потенцијал.

Во многу истражувања е докажано дека генотипот има големо влијание врз способноста за андрогенеза. Mutiko & Fari (1996), Al Remi et al. (2014) и Heidari et al. (2017) кои работеле на протоколи за андрогенеза на пиперка покажуваат дека различните геноипови имаат различна андрогенетска способност.

Освен од генотипот големо влијание врз андрогенетската способност има и хранливата подлога (Колева Гудева и Спасеноски, 2002; Supena et al., 2006; Al Remi et al., 2014; Roshany et al., 2013).

5.2. Култивирање на антери на домати (*Solanum lycopersicum* Mill.)

Во Табела 12 се претставени бројот на изолирани антери кај различните генотипови домати и нивната просечна должина и ширина. Најголем број изолирани антери има кај Novosadski jabučar (545 антери), потоа кај генотипот Bellfort F1 (80 антери), по кој следуваат Policarpo F1 со 64 антери и Rally F1 (49 антери). Просечната должина на изолираните антери од трите генотипови се движи од 2,72 – 4,10 mm, а просечната ширина од 0,85 - 1,15 mm. Сигнификантно најдолги и најшироки антери има генотипот Novosadski jabučar (4,10 mm и 1,15 mm соодветно), со сигнификантно најкратки антери се одликува Bellfort F1 (2,72 mm), додека најтесни антери од 0,85 mm има генотипот Policarpo F1.

Табела 12. Број на изолирани антери од домати култивирани на индуктивен MS медиум

Table 12. Number of isolated tomato anthers cultivated on inductive MS medium

Генотип	Број на изолирани антери	Должина на антери (mm)	Ширина на антери (mm)
Bellfort F1	80	2,72 c	1,02 b
Rally F1	49	2,91 c	0,98 b
Policarpo F1	64	3,37 b	0,85 c
Novodadski jabucar	545	4,10 a	1,15 a



Слика 17. Изолирани антери од домати и формирање калус.

Figure 17. Isolated tomato anthers and calli formation.

На Слика 17 се прикажани лабораторски резултати од изолирани антери од домати поставени на индуктивен MS медиум и формиран калус кај истите.

Табела 13. Резултати од изолираните антери од домати култивирани на индуктивен MS медиум

Table 13. Results of isolated tomato anthers cultivated on inductive MS medium

Генотип	Број на формираните калуси	% на калусирање	Број на формираните ембриоди	% на ембриогенеза	Број на регенерирани растенија
Belfort F1	51	61,8	/	/	/
Rally F1	14	28,6	/	/	/
Policarpo F1	18	28,1	/	/	/
Novosadski jabučar	35	6,4	/	/	/

Бројот на формираните калуси, односно процентот на калусирање, бројот на формираните ембриоди и број на регенерирани растенија кај секој генотип посебно е прикажан во Табела 13. Најголем процент на калусирање има кај Belfort F1 61,8%, потоа кај Rally F1 28,6 %, кај Policarpo F1 28,1 %, а најмалку кај Novosadski jabučar (6,4 %). Кај ниту еден генотип немаше формираните ембриоди и регенерирани растенија.

Резултатите покажуваат дека андогенетскиот потенцијал кај испитуваните генотипови домати е многу мал. Сите испитувани генотипови се одликуваат со потенцијал за калусогенеза, но кај ниту еден генотип не е утврдено формирање на ембриоди или регенеранти.

Според литературните податоци до сега не постои рутински ефикасен метод за да се добијат дихаплоиди од домати. Возможно е добивање на дихаплоиди од домати преку култура на антери, но со ниска ефикасност и присуството на голем број спорадични и непожелни производи, што ја прават културата на антери од домати непрепорачлива за практични цели. Од друга страна, културата на

изолирани микроспори изгледа применлива, но сè уште треба да се спроведат детални истражувања (Seguí-Simarro et al., 2012).

Според многу научни трудови повеќе фактори влијаат на способноста на андрогенезата кај домотот. Еден од факторите што имаат најсилно влијание врз андрогенетскиот потенцијал е генотипот на домотот (Kao et al. 1980; Ziv et al. 1984; Zagorska et al. 1998; Corral-Martinez et al. 2010). Кај домотот, нереагирањето на генотипот на третмани и подлоги останува голем проблем. Направена е оценка на андрогенетскиот потенцијал кај значителен број генотипови од домот од повеќе автори (Zagorska et al., 1998; Seguí-Simarro & Nuez, 2007). Само 14 генотипови се евалуирани во култура на микроспори (Bal & Abak, 2005; Seguí-Simarro & Nuez, 2007). Од нив, само пет генотипови имаат дадено позитивен одговор. Така, отсуството на минимално реагирачки генотип е главното ограничување за развој на ефикасен протокол за култура на микроспори кај домот. Главната причина за оваа ситуација е тоа што сите култивирани домати делат многу тесна генетска позадина (Foolad, 2007). Всушност, се проценува дека култивираниот домот претставува само 5 % од вкупната генетска варијабилност што може да се најде кај сите видови домати, вклучително и диви роднини (Miller & Tanksley, 1990). Така, очекуван е сличен андрогенетски одговор (многу слаб, доколку има) и кај остатокот од преостанатите генотипови на домот што досега не се вклучени во андрогенетски истражувања. Од друга страна, би било многу интересно да се проценат другите генотипови поврзани со култивираниите домати (нивните диви роднини), но со многу поширока генетска позадина, каде што веројатноста за наоѓање поволни комбинации на гени може да биде поголема. Ова може да биде ветувачка перспектива за идни истражувања за андрогенеза кај домот (Seguí-Simarro et al., 2012).

Составот на хранливата подлога и концентрациите на регулаторите на раст исто така влијаат врз способноста на андрогенеза кај домотот (Brasiliero et al. 1999). Motallebi-Azar (2010) испитувал три различни хранливи подлоги при култура на антери кај домот, од кои само една покажала успешно формирање на

изданоци, додека пак Kumar et al. (2020) користеле MS хранливи подлоги со различни концентрации на ауксини и цитокинини за индукција на калус.

Според Zamir et al. (1980) и Varghese & Sharma (1981) фазата на микроспората се јавува како еден од главните фактори кои влијаат на андрогенетската способност кај домотот. Како оптимална фаза за индукција и раст на калус е профаза 1, што одговара на должина на антери <1,6 mm (Summers et al., 1992).

5.3. Култивирање на антери на патлиџан (*Solanum melongena* L.)

Во Табела 14 е прикажан вкупниот број на изолирани антери од генотипот Домаќи srednje dugi кој изнесува 144, со просечна должина на антерите 2,61 mm и просечна ширина 0,95 mm. На Слика 18 се прикажани изолирани антери од патлиџан, култивирани на индуктивен медиум.



Слика 18. Изолирани антери од патлиџан.

Figure 18. Isolated anthers from eggplant.

Табела 14. Број на изолирани антери од патлиџан култивирани на индуктивен Ct медиум.

Table 14. Number of isolated eggplant anthers cultivated on inductive Ct medium.

Генотип	Број на изолирани антери	Должина на антери	Ширина на антери
Domači srednje dugi	144	2,61	0,95

Во Табела 15 е прикажан процентот на калусирање и ембриогенеза и бројот на регенерирани растенија. Кај единствениот тестиран генотип на патлиџан нема индукција на калус и ембриоиди, со што се докажа дека овој генотип нема андрогенетски потенцијал.

Табела 15. Резултати од изолираните антери од патлиџан култивирани на индуктивен Ct медиум

Table 15. Results of isolated eggplant anthers cultivated on inductive Ct medium

Генотип	Број на формирани калуси	% на калусирање	Број на формирани ембриоиди	% на ембриогенеза	Број на регенерирани растенија
Domači srednje dugi	/	/	/	/	/

Резултатите покажуваат дека изолираните антери од испитуваниот генотип патлиџан култивирани на хранлива подлога според Dumas de Vault & Chambonnet (1982) не покажаа андрогенетски потенцијал.

Андрогенезата кај патлиџанот зависи од генотипот и од развојната фаза на микроспората, како и од условите на културата, вклучувајќи ги температурата, видот и концентрацијата на регулаторите на раст (Rotino., 1996; Rotino et al., 2005).

Според Alpsoy & Seniz (2004), Salas et al. (2011), Basay & Ellialtioglu (2013) генотипот има големо влијание врз андрогенетскиот потенцијал кај патлиџанот. Alpsoy & Seniz (2004) испитувале петнаесет различни генотипови, од кои само кај пет добиле регенерирани растенија. Salas et al. (2011) изолирале антери од дванаесет генотипови патлиџан и само кај пет од нив се формирале ембриоиди, а само кај три генотипови имало регенерирани растенија. Додека пак, Basay & Ellialtioglu (2013) изолирале антери од пет сорти и дванаесет хибридни линии. Од сортите само кај две има формирано ембриоиди, а од хибридните линии само кај две има формирано ембриоиди и регенерирани растенија. Со тоа овие резултати соодветствуваат со резултатите во оваа магистерска теза, бидејќи во сите гореспоменати трудови андрогенетскиот потенцијал кај патлиџанот е многу мал.

Ембриоиди кај патлиџанот може успешно да се индуцираат со изолација на микроспори (Seguí-Simarro et al. 2011). Во овој поглед, многу малку трудови се објавени за успешно производство на дихаплоидни растенија од изолирани микроспори (Miyoshi, 1996; Corral-Martinez et al., 2008; Bal et al., 2009).

5.4. Опис и морфологија на регенеранти добиени од пиперка

Во текот на истражувањето беа извршени мерења и морфолошка анализа на вегетативните и генеративните делови од мајчиниот генотип на Edita F1 и регенерантот Edita_R₁.

Во Табела 16 се прикажани морфолошките мерења на вегетативните органи на андрогенетското регенерирано растение Edita_R₁ во споредба со мајчиниот генотип Edita F1. Од извршените наљудувања и мерења на растенијата може да се утврди дека растенијата морфолошки се разликуваат. Андрогенетското регенерирано растение Edita_R₁ е значително пониско и има помали и потесни листови во споредба со растението од мајчиниот генотип Edita F1.

Табела 16. Морфолошки мерења на вегетативни органи на андрогенетско регнерирано растение Edita_R₁ во споредба со мајчиниот генотип Edita F1.

Table 16. Morphological measurements of vegetative organs of androgenetic regenerated plant Edita_R₁ compared to mother genotype Edita F1.

Генотип	Височина на стебло (cm)	Должина на лист (cm)	Ширина на лист (cm)
Регнерирано растение (Edita_R ₁)	43	6,95	3,24
Мајчин генотип (Edita F1)	77	11,25	5,33



Слика 19. а, б) Плодови од Edita_R₁; в, г) Плодови од мајчин генотип Edita F1.

Figure 19.a, b) Fruits from Edita_R₁; c, d) Fruits from mother genotype Edita F1.

Табела 17. Морфолошки мерења на генеративни органи на андрогенетско регнерирано растение Edita_R₁ во споредба со мајчиниот генотип Edita F1.

Table 17. Morphological measurements of generative organs of androgenetic regenerated plant Edita_R₁ compared to mother genotype Edita F1.

Генотип	Должина на плод (cm)	Ширина на плод (cm)	Маса на плод (g)	Дебелина на перикарп (cm)	Број на комори	Број на семки
Регнерирано растение (Edita_R ₁)	3,06	2	7,23	0,35	/	/
Мајчин генотип (Edita F1)	6,92	3,94	26,4	0,40	3	68,2

Во Табела 17 се прикажани морфолошките мерења на генеративните органи кај андрогенетско регнерираното растение Edita_R₁ и кај мајчиниот генотип Edita F1. Може да се согледа дека генеративните органи од Edita_R₁ имаат помали вредности, односно помали и потесни плодови, масата на плодот и дебелината на перикарпот исто така се помали. Плодовите од мајчиниот генотип имаат по 3 комори со јасни коморни прегради, додека кај Edita_R₁ плодовите немаат јасни коморни прегради. Кај мајчиниот генотип плодовите имаат просечно 68,2 семки, а во плодовите на Edita_R₁ нема семки.



Слика 20. Регнерирано растение Edita_R₁.

Figure 20. Regenerated plant Edita_R₁.

Слика 21. Мајчин генотип Edita F1.

Figure 21. Mother genotype Edita F1.

Иако пиперката е еден од најтешките видови за добивање на регенранти со *in vitro* методите, вклучително и андрогензата, сепак одреден број на автори известуваат за добивање целосно регенерирани спонатани или индуцирани дихаплоидни растенија со генеративни органи. Chunling & Baojun (1995) и Pauk et al. (2010) известуваат дека имаат развиено сорти и F1 хибриди базирани на родителски линии од дихаплоиди. Изолирани се подобрени дихаплоидни линии со одредена варијабилност на карактеристиките на растението и плодот (Shrestha et al., 2011) и андрогенетски линии на пиперка со позитивни карактеристика (Koleva Gudeva & Trajkova, 2012). Kisiała et al. (2011) и Olszewska et al. (2011) известуваат за биометриски карактеристики на дихаплоидни линии пиперка добиени со методот на андрогенза. Трајкова (2013) има споредувано седум андрогенетски линии пиперка и има утврдено дека морфолошки својства на растението и плодот на андрогенетските линии се разликуваат во однос на соодветните изворни генотипови. Некои од андрогенетски линии имаат подобрени својства во однос на родителскиот генотип, посебно во однос на морфологијата и квалитетот на плодовите. Trajkova & Koleva Gudeva (2017, 2017a) имаат презентирano детални резултати од повеќегодишни истражувања на биолошките, морфолошките и производните карактеристики на неколку андрогенетски линии пиперка во однос на родителските генотипови. Grozeva et al. (2020) тестирале 14 дихаплоидни линии добиени од 4 родителски генотипови пиперка. Врз основа на морфолошките карактеристики и проценка на квалитетот на плодовите, 4 линии покажале супериорност во однос на родителските генотипови за истите понатаму да бидат вклучени во програми за селекција.

5.5. Содржина на фотосинтетски пигменти (хлорофили и каротеноиди) на андрогенетски плодови

Извршена е биометриска анализа на содржината на фотосинтетските пигменти (хлорофил и каротеноиди) кај плодови добиени од андрогенетско регенерирано растение Edita_R₁ и кај плодови од мајчиниот генотип Edita F1.

Табела 18. Средни вредности за содржина на фотосинтетските пигменти во плодови од *Edita_R1* и плодови од *Edita F1*.

Table 18. Mean values of content of photosynthetic pigments in fruits from *Edita_R1* and fruits from *Edita F1*.

Пигменти	Средна вредност (mg/g свежа маса) <i>Edita_R1</i>	Стандардна девијација <i>Edita_R1</i>	Средна вредност (mg/g свежа маса) <i>Edita F1</i>	Стандардна девијација <i>Edita F1</i>
Хлорофил а	2,27	0,59	2,37	0,79
Хлорофил б	6,59	1,89	5,74	1,06
Хлорофил а+б	6,12	5,00	6,26	2,20
Каротеноиди	6,28	0,80	1,83	1,34

Во Табела 18 се претставени добиените средни вредности за хлорофил **а**, хлорофил **б**, вкупни хлорофили **а+б** и каротеноиди кај испитуваните плодови од *Edita_R1* и кај *Edita F1*.

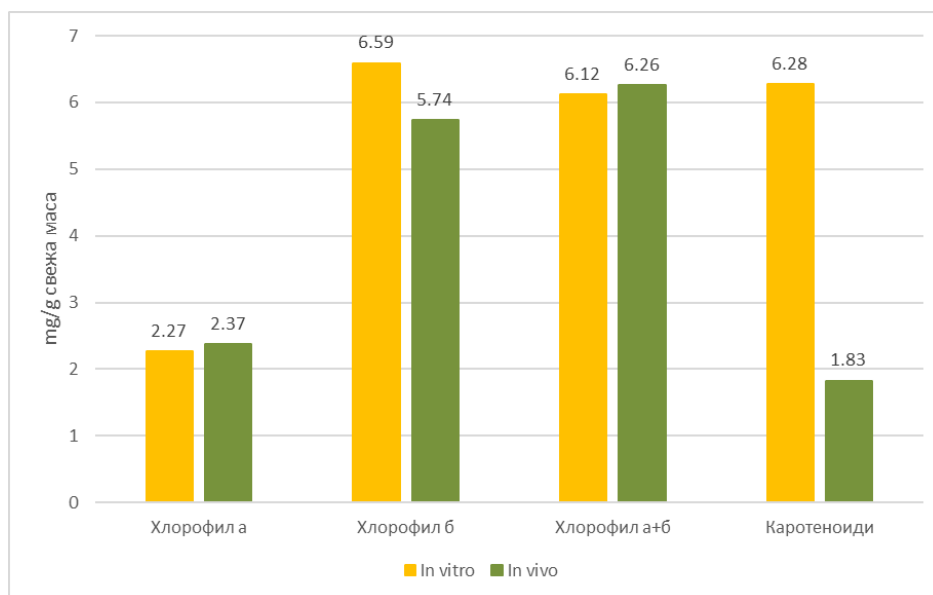
Просечната вредност на содржината на хлорофил **а** во плодовите на регенерираното растение изнесува 2,27 mg/g свежа маса и стандардна девијација 0,59, а кај плодивите добиени од мајчиниот генотип просечната вредност на хлорофил **а** изнесува 2,37 mg/g свежа маса и стандардна девијација 0,79.

Просечната вредност на содржината на хлорофил **б** во плодовите на регенерираното растение изнесува 6,59 mg/g свежа маса и стандардна девијација 1,89, а кај плодовите на мајчиниот генотип просечната вредност изнесува 5,74 mg/g свежа маса и стандардна девијација 1,06.

Просечната вредност на содржината на вкупните хлорофили **а+б** во плодовите на регенерираното растение изнесува 6,12 mg/g свежа маса и стандардна девијација 5,00, а кај плодивите на мајчиниот генотип просечната вредност на хлорофил **а** изнесува 6,26 mg/g свежа маса и стандардна девијација 2,20.

Просечната вредност на содржината на каротеноидите во плодовите на регенерираното растение изнесува 6,28 mg/g свежа маса и стандардна девијација 0,80, а кај плодивите од мајчиниот генотип просечната вредност на хлорофил **a** изнесува 1,83 mg/g свежа маса и стандардна девијација 1,34.

На Слика 22 е прикажан графикон, каде визуелно може да се воочат разликите кај средните вредности на испитуваните фотосинтетски пигменти хлорофил **a**, хлорофил **b**, хлорофил **a+b** и каротеноиди кај плодовите од Edita_R₁ и плодови од Edita F1.



Слика 22. Средни вредности за фотосинтетските пигменти кај плодови од Edita_R₁ и плодови од Edita F1.

Figure 22. Mean values of photosynthetic pigments in fruits from Edita_R₁ and fruits from Edita F1.

5.5.1.1. Хлорофил а

Во Табела 19 е претставена униваријантна анализа на влијанието на *in vitro* третманот на просечната вредност на содржината на хлорофил **a** во плодовите од андрогенетско регенерирано растение Edita_R₁ и кај мајчиниот генотип Edita F1.

Униваријантна анализа помеѓу содржината на хлорофил **a** кај плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 е прикажана на Табела 19. Од табелата може да се види дека влијанието на третманот, т.е. процесот на андрогенза врз содржината на хлорофил **a** во плодовите е $\eta^2 = 0,005$, без статистички сигнификантна разлика во однос на содржината на хлорофил во плодовите на мајчиниот генотип и регенерантот Edita_R₁.

Табела 19. Униваријантна анализа за влијанието на третманот на просечната вредност на содржината на хлорофил **a** кај плодови добиени од *in vitro* и *in vivo* услови.

Table 19. Univariate analysis of the influence of the treatment on the mean value of chlorophyll **a** content in fruits obtained from *in vitro* and *in vivo* conditions.

Фактор	Сума на квадрати	Степен на слобода	Просек на квадрат	F тест	Сигнификантност	Сила на фактор	Утврдено влијание
Корегиран модел	0,085	1	0,085	0,185	0,670	0,005	0,070
Интерцепт	187,959	1	187,959	407,979	0,000	0,923	1,000
Третман	0,085	1	0,085	0,185	0,670	0,005	0,070
Грешка	15,664	34	0,461				
Вкупно	207,710	36					
Корегирано вкупно	15,749	35					

Компаративната анализа на просечната содржина на хлорофил **a**, кај плодовите добиени во *in vivo* и *in vitro* услови покажува дека плодовите добиени од Edita_R₁ имаат за 0,099 mg/g свежа маса повисока просечна содржина на

хлорофил **a**, од плодовите добиени од растенијата на мајчиниот генотип, со пресметана статистички незначајна сигнификантност (Табела 20).

Табела 20. Компаративна анализа на просечната содржина на хлорофил **a** кај испитуваните плодови.

Table 20. Comparative analysis of the mean chlorophyll **a** content of the examined fruits.

Потекло на анализиран материјал (A)	Третман А	Третман Б	Разлика на просечни вредности (А-Б)	Стандардна грешка	Сигнификантност ^a
<i>Регенерант Edita_R₁</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	-0,099*	0,229	0,670
<i>Мајчин генотип Edita F1</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	0,099*	0,229	0,670

a. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the .05 level.

5.5.1.2. Хлорофил б

Во Табела 21 е претставена униваријантна анализа на влијанието на генотипот на просечната вредност на содржината на хлорофил **b** во плодовите од Edita_R₁ и во плодовите од мајчиниот генотип Edita F1.

Униваријантната анализа помеѓу содржината на хлорофил **a** во плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 е прикажана на Табела 21. Од табелата може да се види дека влијанието на третманот, т.е. процесот на андрогенеза врз содржината на хлорофил **a** во плодовите е $\eta^2 = 0,069$, без статистички сигнификантна разлика во однос на содржината на хлорофил во плодовите на мајчиниот генотип и регенерантот Edita_R₁.

Табела 21. Униваријантна анализа за влијанието на третман на просечната вредност на содржината на хлорофил **б** во плодови добиени од *in vitro* и *in vivo* услови.

Table 21. Univariate analysis of the influence of treatment on the mean value of chlorophyll **b** content in fruits obtained from *in vitro* and *in vivo* conditions.

Фактор	Сума на квадрати	Степен на слобода	Просек на квадрат	F тест	Сигнификантност	Сила на фактор	Утврдено влијание
Корегиран модел	6,411	1	6,411	2,507	0,123	0,069	0,337
Интерцепт	1331,836	1	1331,836	520,833	0,000	0,939	1,000
Третман	6,411	1	6,411	2,507	0,123	0,069	0,337
Грешка	86,942	34	2,557				
Вкупно	1495,107	36					
Корегирано вкупно	93,354	35					

Компаративната анализа помеѓу содржината на хлорофил **б** во плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 е прикажана на Табела 22.

Компаративната анализа на просечната содржина на хлорофил **б**, во плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 покажува дека плодовите од Edita_R₁ имаат за 0,856 mg/g свежа маса повисока просечна содржина на хлорофил **б**, од плодовите од мајчиниот генотип, со пресметана статистички незначајна сигнификантност (Табела 22).

Табела 22. Компаративна анализа на просечната содржина на хлорофил **b** кај испитуваните плодови.

Table 22. Comparative analysis of the mean chlorophyll **b** content in the examined fruits.

Потекло на анализиран материјал (A)	Третман А	Третман Б	Разлика на просечни вредности (А-Б)	Стандардна грешка	Сигнификантност ^a
<i>Регенерант Edita_R₁</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	0,856*	0,541	0,123
<i>Мајчин генотип Edita F1</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	-0,856*	0,541	0,123

a. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the .05 level.

5.5.1.3. Вкупни хлорофили **a+b**

Во Табела 23 е претставена униваријантна анализа на влијанието на генотипот на просечната вредност на содржината на вкупни хлорофили **a+b** во плодовите од андрогенетско регенерираното растение Edita_R₁ и кај мајчиниот генотип Edita F1.

Униваријантната анализа помеѓу содржината на вкупни хлорофили **a+b** кај плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 е прикажана на Табела 23. Од табелата може да се види дека влијанието на третманот, т.е. процесот на андрогенеза врз содржината на вкупните хлорофили **a+b** во плодовите е $\eta^2 = 0,000$, без статистички сигнификантна разлика во однос на содржината на хлорофил во плодовите на мајчиниот генотип и регенерантот Edita_R₁.

Табела 23. Униваријантна анализа за влијанието на третман на просечната вредност на содржината на вкупни хлорофили **a+ б** во плодови добиени од *in vitro* и *in vivo* услови.

Table 23. Univariate analysis of the influence of the treatment on the mean value of the content of total chlorophyll **a + b** in fruits obtained from *in vitro* and *in vivo* conditions.

Фактор	Сума на квадрати	Степен на слобода	Просек на квадрат	F тест	Сигнификантност	Сила на фактор	Утврдено влијание
Корегиран модел	0,176	1	0,176	0,011	0,919	0,000	0,051
Интерцепт	1339,805	1	1339,805	80,118	0,000	0,702	1,000
Третман	0,176	1	0,176	0,011	0,919	0,000	0,051
Грешка	568,582	34	16,723				
Вкупно	1941,584	36					
Корегирано вкупно	568,758	35					

Компаративната анализа помеѓу содржината на вкупни хлорофили **a+б** кај плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 е прикажана на Табела 24.

Компаративната анализа на просечната содржина на вкупните хлорофили **a+б**, кај плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите добиени од мајчиниот генотип Edita F1 покажува дека плодовите добиени од андрогенетски регенерираното растение имаат за 0,142 mg/g свежа маса повисока просечна содржина на хлорофил **a+б**, од плодовите добиени од растенија на мајчиниот генотип, со пресметана статистички незначајна сигнификантност (Табела 24).

Табела 24. Компаративна анализа на просечната содржина на вкупни хлорофили **a+b** кај испитуваните плодови.

Table 24. Comparative analysis of the average content of total chlorophyll **a + b** in the examined fruits.

Потекло на анализиран материјал (A)	Третман А	Третман Б	Разлика на просечни вредности (А-Б)	Стандардна грешка	Сигнификантност ^a
<i>Регенерант Edita_R₁</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	-0,142*	1,382	0,919
<i>Мајчин генотип Edita F1</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	0,142*	1,382	0,919

a. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the .05 level.

5.5.1.4. Каротеноиди

Во Табела 25 е претставена униваријантна анализа на влијанието на генотипот на просечната вредност на содржината на каротеноиди во плодови од Edita_R₁ и мајчиниот генотип Edita F1.

Униваријантната анализа на содржината на каротеноиди кај плодовите добиени од андрогенетско регенерирано растение и плодовите од мајчиниот генотип е прикажана на Табела 25. Од табелата може да се види дека влијанието на третманот, т.е. процесот на андрогенеза врз содржината на каротеноиди во анализираните плодови е $\eta^2 = 0,821$, без статистички сигнификантна разлика во однос на содржината на каротеноиди во плодовите на мајчиниот генотип и регенерантот Edita_R₁.

Табела 25. Униваријантна анализа за влијанието на третман на просечната вредност на содржината на каротеноиди во плодови добиени од *in vitro* и *in vivo* услови.

Table 25. Univariate analysis of the influence of treatment on the mean value of carotenoid content in fruits obtained from *in vitro* and *in vivo* conditions.

Фактор	Сума на квадрати	Степен на слобода	Просек на квадрат	F тест	Сигнификантност	Сила на фактор	Утврдено влијание
Корегиран модел	173,472	1	173,472	155,899	0,000	0,821	1,000
Интерцепт	574,736	1	574,736	516,512	0,000	0,938	1,000
Третман	173,472	1	173,472	155,899	0,000	0,821	1,000
Грешка	37,833	34	1,113				
Вкупно	915,676	36					
Корегирано вкупно	211,305	35					

Компаративната анализа помеѓу содржината на каротеноиди во плодовите добиени од Edita_R₁ и плодовите од мајчиниот генотип Edita F1 е прикажана во Табела 26. Компаративната анализа на просечната содржина на каротеноиди, во плодовите добиени од Edita_R₁ и плодови од мајчиниот генотип, покажува дека плодовите добиени од Edita_R₁ имаат за 4,453 mg/g свежа маса повисока просечна содржина на каротеноиди, од плодовите добиени од мајчиниот генотип, со пресметана статистички значајна сигнификантност (Табела 26).

Табела 26. Компаративна анализа на просечната содржина на каротеноиди кај испитуваните плодови.

Table 26. Comparative analysis of the average carotenoid content of the examined fruits.

Потекло на анализиран материјал (A)	Третман А	Третман Б	Разлика на просечни вредности (А-Б)	Стандардна грешка	Сигнификантност ^a
<i>Регенерант Edita_R₁</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	4,453*	0,357	0,000
<i>Мајчин генотип Edita F1</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	-4,453*	0,357	0,000

a. Прилагодување за повеќекратни споредби: најмала значајна разлика (еквивалентно да нема прилагодувања).

*. Средната разлика е значајна на ниво од 0,05.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Фотосинтетските пигменти како хлорофилите и каротенодите се присутни постојано или привремено во сите надземни делови на растението. Нивната содржина и концентрација се менуваат во текот на зреењето, заедно со промена на формата и бојата на плодот (Deli et al. 1996).

Од достапната литература не се најдени други истражувања и резултати за компаративна содржината на фотосинтетски пигменти во плодови од пиперка помеѓу мајчинот генотип и андрогенетски регенеранти. Но, одреден број на истражувања покажуваат дека од дихаплодни линии на пиперка се добиени плодови со подобрена содржина на суви материи (Kisiata et al. 2011), содржина на вкупно растворливи цврсти материи, содржина на феноли и антиоксидантна активност (Luitel & Kang 2013). Сите наведени карактеристики се во врска со содржината и составот на фотосинтетските пигменти во плод од пиперка кај дихаплоидните добиени со андрогенза.

Фактот дека просечната содржина на каротеноиди кај плодовите добиени од андрогенетското регенерирано растение Edita_R₁ содржи 4,453 mg/g свежа маса повеќе каротеноиди од плодот на изворниот генотип Edita F1, оди во прилог

на тврдењата дека андрогенезата е метод што се користи за подобрување на генотиповите, како и овозможување на примена на дополнителни истражувачки методи за откривање на нови соединенија или разјаснување на патеките за биосинтеза на растителни пигменти (Deli et al., 1991, 1992).

5.6. Молекуларни анализи на андрогенетски регенеранти

Резултатите од молекуларните анализи, кои беа направени за уврдување на генетскиот полимофризам кај добиените регенеранти Edita_R₁, Edita_R₂, Edita_R₃ и Edita_R₄ во однос на на мајчиниот генотип – Edita F1, како контрола, се прикажани на Слика 23.

Поради расположливите финансиски ресурси направени се испитување на андрогенетските примероци само во однос на пет маркери.

Од резултатите може да се види дека сите примероци имаат иста трака (исти алел) за испитување микросателитски (SSR) локуси што е и очекувано бидејќи сите се регенеранти по потекло од Edita F1. Генотипизацијата на полиморфизмот за сите примероци и за сите испитувани пет маркери покажа дека сите регенеранти се хомозиготни (100 %).

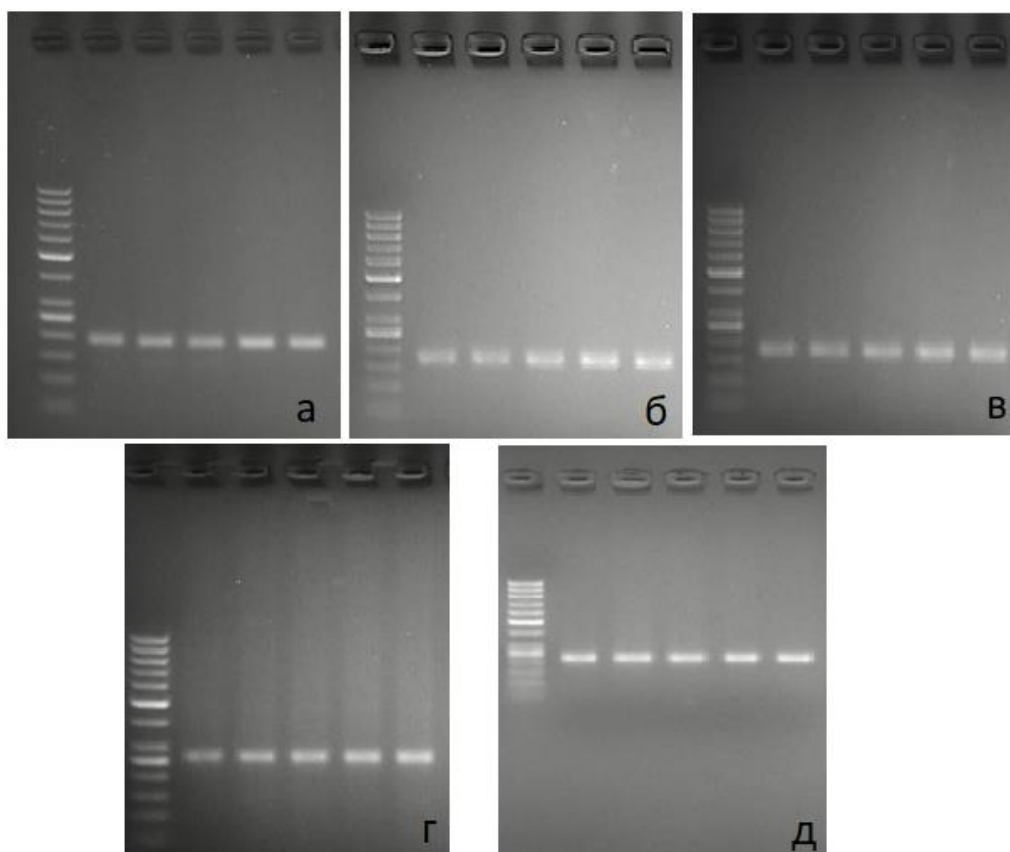
Во текот на истражувањето не е утврдено нивото на пloidност на добиените андрогенетски регенеранти. Најдобар метод за утврдување на пloidноста на андрогенетските регенрати е течната цитометрија (Loureiro et al., 2006; Suda & Travnicek, 2006). Доколку постојат технички и финансиски услови, во идните истражувања е пожелно да се направат цитогенетски анализи на регенераните со што ќе се добијат детални информации за нивото на нивната пloidност. Од друга страна, иако течната цитометрија го категоризира нивото на пloidија на растенијата, овој метод не е во состојба да утврди дали диплоидните растенија се двојно хаплоиди или растенија добиени од соматско ткиво. Така, молекуларната карактеризација со кодоминантен систем на маркери е неопходна за да се одреди хомозиготноста на растенијата (Keleş et al., 2015). Сето претходно

наведено укажува на фактот дека двете методи за анализа на хомозиготноста на андрогенетските регенеранти се надополнуваат.

Gemesne et al. (2000) со анализата на растенијата-донори во споредба со дихаплоидните-потомци покажала неочекувано широк спектар на молекуларен полиморфизам. Нивните резултати утврдиле дека генетските промени кои се случуваат за време на миотичката рекомбинација се повисоки од оние што се јавуваат за време на геномското дуплирање предизвикано со колхицин.

Niklas - Nowaket et al. (2012) во нивната анализа добиле присуство на хаплоидни и дихаплоидни растенија помеѓу регенерантите од сите испитувани генотипови. Al Remi et al. (2014) во своето истражување покажале дека 94 % од растенијата формирани од ембриониди имале хаплоиден број хромозоми, а само 6 % биле бележани како спонтани дихаплоиди.

Keleş et al. (2015) употребиле повеќе од 20 SSR маркери базирани на Hrms1-117 за анализа на регенеранти од различни генотипови пиперка и утврдување на типот на ембрион од кој потекуваат (диплоиден / дихаплоид) во комбинација со употреба на течна цитометрија за утврдување на нивото на плоидност. Направените тестирања покажале дека сите дихаплоидни растенија се хомозиготни со висока стапка на дихаплоиди кај сите генотипови пиперка.



Слика 23. Визуелизација на полиморфизам: а) Hrms1-117, големина на продуктот околу 190 bp, б) Hrms1-168, големина на продуктот околу 170 bp, в) Hrms1-274, големина на продуктот околу 170 bp, г) EPMS-650, големина на продуктот околу 260 bp, д) CAMS 117, големина на продуктот околу 220 bp.

Figure 23. а) Hrms1-117, size of the product 190 bp, б) Hrms1-168, size of the product 170 bp, в) Hrms1-274, size of the product 170 bp, г) EPMS-650, size of the product 260 bp, д) CAMS 117, size of the product 220 bp.

6. ЗАКЛУЧОК

Од целокупното истражување за одредување на андрогенетскиот потенцијал на некои генотипови пиперка (*Capsicum annuum* L.), домати (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и патлиџан (*Solanum melongena* L.) можат да се донесат следните заклучоци:

1. Изолираните антери од шест генотипови пиперка поставувани на соодветни медиуми со соодветни комбинации на хормони и соодветни третмани резултираа со калусогенеза (1,9 - 11,4 %) и ембриогенеза (0,2 % и 0,8 %).
2. Како резултат на користениот протокол за андрогенеза на пиперка, од сите испитувани генотипови Bela duga и Edita F1 резултираа со формирање на еден и девет ембриоиди, соодветно.
3. Од девет ембриоиди добиени од генотипот Edita F1 беше постигната успешна регенерација на четири ембриоиди (Edita_R₁, Edita_R₂, Edita_R₃ и Edita_R₄) и успешна аклиматизација на едно андрогенетско растение (Edita_R₁).
4. Кај доматиот беа испитувани четири генотипови чии антери беа култивирани на соодветна хранлива подлога според соодветни протоколи. Тие резултираа со калусогенеза (6,4 - 61,8 %) и немаше формирани ембриоиди кај ниту еден од испитуваните генотипови.
5. За утврдување на андрогенетскиот потенцијал кај патлиџанот беше испитуван само еден генотип. Испитуваниот генотип не покажа андрогенетски потенцијал со тоа што немаше ниту успешна калусогенеза, ниту ембриогенеза.
6. Визулено и од направените морфолошките мерења на вегетативните и генеративните органи од мајчиниот генотип Edita F1 и регенерантот Edita_R₁ беше утврдено дека тие се разликуваат меѓусебно.
7. Сите вредности на мерењата кај вегетативните органи (висина на стебло, должина и ширина на листови) беа значително помали кај регенерантот Edita_R₁ во однос на мајчиниот генотип Edita F1.

8. Мерењата на генеративните органи покажаа разлика во однос на должината и ширината на плодот, маса на плодот, дебелина на перикарп, број на комори и број на семки кај регенерантот Edita_R₁ во однос на мајчиниот генотип Edita F1. Вредностите на мерените својства кај регенерантот Edita_R₁ беа помали од оние кај мајчиниот генотип Edita F1. Дополнително, плодовите од регенерантот немаа јасно изразени комори и немаше формирани семки.
9. Просечната содржина на хлорофил **a** кај плодовите на регенерантот Edita_R₁ е за 0,099 mg/g свежа маса пониска од просечната содржина на хлорофил **a** кај плодовите од мајчиниот генотип Edita F1.
10. Просечната содржина на хлорофил **b** кај плодовите од регенерантот Edita_R₁ е за 0,856 mg/g свежа маса повисока од просечната содржина на хлорофил **b** кај плодовите на мајчиниот генотип Edita F1.
11. Просечната содржина на вкупни хлорофили **a+b** кај плодовите на мајчиниот генотип Edita F1 е за 0,142 mg/g свежа маса повисока во однос на просечната содржина на вкупни хлорофили **a+b** кај плодовите од регенерантот Edita_R₁.
12. Просечната содржинана каротеноидите е за 4,453 mg/g свежа маса повисока кај плодовите на регенерантот Edita_R₁ во однос на просечната содржина на каротеноиди во плодовите од мајчиниот генотип Edita F1.
13. Од извршените молекуларни анализи спроведени со пет различни SSR маркери на материјал од добиените регенеранти Edita_R₁, Edita_R₂, Edita_R₃ и Edita_R₄ во однос на на мајчиниот генотип – Edita F1, како контрола, може да се заклучи дека сите примероци имаат иста трака односно исти алел за испитувани SSR локуси, бидејќи сите се регенеранти на истиот мајчин генотип. Сите четири регенеранти за испитуваните маркери се хомозиготни.
14. Сите претходно изнесени заклучоци потврдуваат дека андрогенетскиот потенцијал кај пиперката, домотот и патлиџанот во најголема мера зависи од генотипот.

15. Методите, резултатите и заклучоците презентирани во оваа магистерска теза за испитуваните генотипови пиперка (*Capsicum annuum* L.) се во прилог и ги потврдуваат претходните истражувања вршени во Лабораторијата за растителна биотехнологија при Земјоделскиот факултет, УГД – Штип.
16. Сите анализи спроведени за утврдување на андрогенетскиот потенцијал на домати (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и патлиџан (*Solanum melongena* L.) се направени за првпат во Република Северна Македонија. Земајќи предвид дека се достапни малку литературни податоци за добивање андрогенетски растенија од домати и патлиџан и нивно воведување во понатамошни селекциски програми, овој труд ќе даде значаен придонес во теоретски и практични сознанија за методот на андрогенеза како и за идни истражувања во оваа област.

KORISTENA LITERATURA

- Al Remi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., & Ellialtıođlu, Ş. (2014). Effect of genotype and nutrient medium on anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk. J. Agric. Nat. Sci*, 1, 108-116.
- Alpsoy, H. C., & Şeniz, V. (2004, September). Researches on the in vitro androgenesis and obtaining haploid plants in some eggplant genotypes. In *III Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 729* (pp. 137-141).
- Alremi, F., Taşkın, H., Sönmez, K., Büyükalaca, S., & Ellialtıođlu, Ş. (2014). Biber (*Capsicum annuum* L.) 'de genotip ve besin ortamının anter kùltürüne etkileri. *Türk Tarımve Dođa Bilimleri Dergisi*, 1(2), 108-116.
- Asif, M. (2013). *Progress and opportunities of doubled haploid production* (No. QK981. A85). Cham: Springer International Publishing.
- Bajaj, Y. P. S. (2012). *Haploids in Crop Improvement I: From Fundamentals to Quantum Computing* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.
- Bal, U., & Abak, K. (2007). Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. *Euphytica*, 158(1), 1-9.
- Bal, U., Ellialtıođlu, S., & Abak, K. (2009). Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured in vitro. *Scientia Agricola*, 66, 535-539.
- Başay, S., & Ellialtıođlu, Ş. Ş. (2013). Effect of genotypical factors on the effectiveness of anther culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Turkish Journal of Biology*, 37(4), 499-505.
- Brasileiro, A. C. R., Willadino, L., Carvalheira, G. G., & Guerra, M. (1999). Callus induction and plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. IPA 5) via anther culture. *Ciência Rural*, 29, 619-623.
- Chu, C. C., Hill, R. D., & Brule-Babel, L. (1990). High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Science*, 66(2), 255-262.

- Collins, G. B., Legg, P. D., & Kasperbauer, M. J. (1974). Use of Anther-Derived Haploids in *Nicotiana*. I. Isolation of Breeding Lines Differing in Total Alkaloid Content 1. *Crop Science*, 14(1), 77-80.
- Corral-Martínez, P., Nuez, F., & Seguí-Simarro, J. M. (2008). Recent advances in eggplant microspore culture for production of androgenic doubled haploids. In *Modern variety breeding for present and future needs. Proceedings of the 18th EUCARPIA general congress, Valencia, Spain, 9-12 September, 2008* (pp. 104-108). Editorial Universidad Politécnica de Valencia.
- Corral-Martínez, P., Nuez, F., & Seguí-Simarro, J. M. (2011). Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured ms10 35 tomato anthers. *Euphytica*, 178(2), 215-228.
- Deli, J., Matus, Z., & Szabolcs, J. (1992). Carotenoid composition in the fruits of black paprika (*Capsicum annuum* variety longum nigrum) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2072-2076.
- Deli, J., Matus, Z., & Tóth, G. (1996). Carotenoid composition in the fruits of *Capsicum annuum* cv. SzentesiKosszarvú during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 711-716.
- Deli, J., Mólnar, P., Tóth, G., Baumeler, A., & Eugster, C. H. (1991). Cycloviolaxanthin (= (3S, 5R, 6R, 3' S, 5' R, 6' R)-3, 6: 3', 6'-Diepoxy-5, 6, 5', 6'-tetrahydro- β , β -carotin-5, 5'-diol), ein neues Carotinoid aus Paprika (*Capsicum annuum*). *Helvetica chimica acta*, 74(4), 819-824.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., & Huerta, A. (1997). Androgenesis in *Capsicum annuum* L.—effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(4), 468-475.
- Dumas de Vault, R., & Chambonnet, D. (1982). Culture in vitro d'anthers d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à + 35° C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, 2(10), 983-988.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., & Pochard, E. (1981). In vitro culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35° C treatments.

- Dunwell, J. M., & Sunderland, N. (1973). Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*, 22(2), 317-323.
- Escobar-Guzmán, R. E., Hernández-Godínez, F., De La Vega, O. M., & Ochoa-Alejo, N. (2009). In vitro embryo formation and plant regeneration from anther culture of different cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96(2), 181-189.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, 2007.
- Gémesné Juhász, A., Petus, M., Venczel, G., Zatykó, L., Gyulai, G., & Cséplö, M. (2000, July). Genetic variability of anther donor versus spontaneous doubled haploid descendents and colchicine induced doubled haploid sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. In *IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560* (pp. 149-152).
- Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 283-300.
- Grozeva, S., Tringovska, I., Nankar, A. N., Todorova, V., & Kostova, D. (2020). Assessment of fruit quality and fruit morphology in androgenic pepper lines (*Capsicum annuum* L.). *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 2(1).
- Hanáček, P., Vyhnánek, T., Rohrer, M., Cieslarová, J., & Stavělíková, H. (2010). DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers. *Horticultural Science*, 36(4), 127-132.
- Heidari, A. A., Shariatpanahi, M. E., Mousavi, A., & Kalatejari, S. (2017). Efficient Androgenic Embryo Induction and Plant Regeneration in Different Genotypes of Sweet Pepper via Anther Culture. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(1), 23-29.
- Irikova, T., Grozeva, S., Popov, P., Rodeva, V., & Todorovska, E. (2011). In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype, nutrient medium and duration of cultivation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(4), 2604-2609.
- Jensen, C. J. (1974). Production of monoploids in barley: a progress report. In *Meeting on Mutation and Polyploidy and of a Research Co-ordination Meeting on*

- Improvement of Mutation Breeding Techniques* (pp. 167-179). International Atomic Energy Agency.
- Johansson, L., Andersson, B., & Eriksson, T. (1982). Improvement of anther culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiologia Plantarum*, 54(1), 24-30.
- Kao, H. Y., Wang, C. F., Chin, P., Chia, C. L., & Liu, H. Y. (1980). Plantlets of tomato obtained from anther culture in vitro. *Yuan ihsuehpao.= Acta horticulturaesinica*.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., & Büyükalaca, S. (2015). Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671-1676.
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., & Büyükalaca, S. (2015). Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671-1676.
- Khush, G.S., & Virmani, S.S. (1996). Haploids in plant breeding. In *In vitro haploid production in higher plant* (pp. 11-33). Springer, Dordrecht.
- Kisiala, A., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A., & Nowaczyk, P. (2011). Biometrical characteristics of R₂ generation of anther-derived pepper (*Capsicum* spp.) plants. *Acta Agrobotanica*, 64(3).
- Kisiala, A., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A., & Nowaczyk, P. (2011). Biometrical characteristics of R₂ generation of anther-derived pepper (*Capsicum* spp.) plants. *Acta Agrobotanica*, 64(3).
- Koleva Gudeva, L., & Trajkova, F. (2012). Anther culture of pepper: Morphological characteristics of fruits of androgenetic pepper lines (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Research in Agriculture*, 1(2), 136-145.
- Koleva Gudeva, L., & Spasenoski, M. (2002). Callus induction of pepper anthers. *Годишен зборник 2002, Yearbook*, 2, 22-32.
- Koleva Gudeva, L., Gulaboski, R., Janevik-Ivanovska, E., Trajkova, F., & Maksimova, V. (2013). Capsaicin-Inhibitory Factor for Somatic Embriogenesis in Pepper Anther Culture. *Electronic Journal of Biology*, 9(2), 29-36.

- Kumar, S., Jindal, S. K., Sarao, N. K., & Dhaliwal, M. S. (2020). Callus induction and plant regeneration of tomato through anther culture. *Vegetable Science*, 47(1), 23-27.
- Lee, J. M., Nahm, S. H., Kim, Y. M., & Kim, B. D. (2004). Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(4), 619-627.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679-689.
- Luitel, B. P., & Kang, W. H. (2013). Assessment of fruit quality variation in doubled haploids of minipaprika (*Capsicum annuum* L.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54(3), 257-265.
- Miller, J. C., & Tanksley, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and applied genetics*, 80(4), 437-448.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., & Hirai, M. (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18(2), 157-169.
- Mityko, J., & Fari, M. (1996, June). Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther-and microspore culture. In *III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 447* (pp. 281-288).
- Miyoshi, K. (1996). Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15(6), 391-395.
- Motallebi-Azar, A. (2010). Androgenic response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines and their hybrids to anther culture. *Russian Agricultural Sciences*, 36(4), 250-258.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murovec, J., & Bohanec, B. (2011). Haploids and doubled haploids in plant breeding. *Plant Breeding, Dr. Ibrokhim Abdurakhmonov (Ed.)–2012.–P*, 87-106.

- Niklas-Nowak, A., Olszewska, D., Kisiala, A., & Nowaczyk, P. (2012). Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum* spp.) genotypes. *Folia Hort*, *24*, 141-146.
- Nowaczyk, L., Banach-Szott, M., Olszewska, D., & Nowaczyk, P. (2014). Androgenic response of *Capsicum* interspecific hybrids and capsaicinoid characteristics of DH lines. *Herba Polonica*, *60*(4).
- Olszewska, D., Kisiala, A., & Nowaczyk, P. (2011). The assessment of doubled haploid lines obtained in pepper (*Capsicum annuum* L.) anther culture. *Folia Horticulturae*, *23*(2), 93.
- Palta, J. P. (1990). Leaf chlorophyll content. *Remote sensing reviews*, *5*(1), 207-213.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013). Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *112*(3), 353-360.
- Pauk, J., Lantos, C., Somogyi, G., Vági, P., Ábrahám Táborosi, Z., Gémes Juhász, A., ... & Tímár, Z. (2010). Tradition, quality and biotechnology in Hungarian spice pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding. *Acta Agronomica Hungarica*, *58*(3), 259-266.
- Portis, E., Nagy, I., Sasvári, Z., Stágel, A., Barchi, L., & Lanteri, S. (2007). The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of in silico DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Science*, *172*(3), 640-648.
- Qin, X., & Rotino, G. L. (1993, September). Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. In *International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 1: Vegetable Crops 402* (pp. 313-316).
- Rodeva, V. N., Irikova, T. P., & Todorova, V. J. (2004). Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *18*(3), 34-38.
- Rodeva, V., Gudeva, L. K., Grozeva, S., & Trajkova, F. (2007). Obtaining haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their inclusion in the breeding process. *Journal of Agriculture and Plant Sciences*, *7*(1), 7-18.

- Roshany, G., Kalantarai, S., Naderi, R., & Hassani, M. E. (2013). Callus formation via anther culture in *Capsicum annum* L. with differences in genotypes, media and incubation temperature. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(Special Issue), 3847-3853.
- Rotino, G. L. (1996). Haploidy in eggplant. In *In vitro haploid production in higher plants* (pp. 115-141). Springer, Dordrecht.
- Rotino, G. L., Sihachakr, D., Rizza, F., Valè, G., Tacconi, M. G., Alberti, P., ... & Acciarri, N. (2005). Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. *Acta physiologiae plantarum*, 27(4), 723-733.
- Salas, P., Prohens, J., & Seguí-Simarro, J. M. (2011). Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*, 182(2), 261-274.
- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119-1132.
- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., & González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30(5), 765-778.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 519-534.
- Shrestha, S. L., Luitel, B. P., & Kang, W. H. (2011). Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annum* L. cv. Boogie). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2), 196-203.
- Shrestha, S. L., Luitel, B. P., & Kang, W. H. (2011). Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annum* L. cv. Boogie). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(2), 196-203.
- Suda, J., & Trávníček, P. (2006). Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research. *Cytometry Part A*, 69(4), 273-280.

- Summers, W. L., Jaramillo, J., & Bailey, T. (1992). Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. *HortScience*, 27(7), 838-840.
- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. B. M. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant cell reports*, 25(1), 1-10.
- Touraev, A., & Heberle-Bors, E. (2003). Anther and microspore culture in tobacco. In *Doubled haploid production in crop plants* (pp. 223-228). Springer, Dordrecht.
- Touraev, A., Pfosser, M., Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell.
- Trajkova, F., & Gudeva, L. K. (2017). Assessment of androgenic genotypes obtained from sweet pepper varieties (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-11.
- Trajkova, F., & Gudeva, L. K. (2017a). Assessment of reproductive traits of different androgenic pepper lines (*Capsicum annuum* L.). *Annual Research & Review in Biology*, 1-13.
- Varghese, T. M., & Sharma, D. R. (1981). Studies on anther cultures of tomato—*Lycopersicon esculentum* Mill. *Biologia Plantarum*, 23(6), 414-420.
- Wędzony, M., Forster, B. P., Żur, I., Golemić, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E., & Gotębiowska, G. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants. *Advances in haploid production in higher plants*, 1-33.
- Zagorska, N. A., Shtereva, A., Dimitrov, B. D., & Kruleva, M. M. (1998). Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Influence of genotype on androgenetic ability. *Plant Cell Reports*, 17(12), 968-973.
- Zamir, D., Jones, R. A., & Kedar, N. (1980). Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. *Plant Science Letters*, 17(3), 353-361.
- Ziv, M., Hadary, D., Kedar, N., & Ladizinsky, G. (1984). *Lycopersicon esculentum*: trifoliate plants recovered from anther cultures of heterozygous tff plants. *Plant cell reports*, 3(1), 10-13.

- Велешанова, И. (2019). *Ефектот на регулаторите на растот врз микропропагацијата на некои декоративни видови*. Магистерска теза, Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, стр. 131.
- Димовска Д., Трајкова Ф., Михајлов Љ. (2021). Специјално градинарство, рецензирана скрипта. Универзитет Гоце Делчев, Штип.
- Ѓеорѓиевски М. (2012). Општо градинарство. Универзитет Гоце Делчев, Штип
- Колева Гудева, Л., Трајкова, Ф. (2017). Практикум по физиологија на растенијата: рецензиран практикум, Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип:, 2017, стр. 78.
- Колева Гудева, Л., Трајкова, Ф. Златковски, В. (2008). Биотехнологија и биодиверзитет: Аспекти на подобрување на генетските ресурси на земјоделските култури. *Годишен Зборник на Земјоделски факултет, УГД-Штип, 57-66*.
- Спасова, Д. (2008). Основи на растително производство, интерна скрипта. Универзитет Гоце Делчев, Штип.
- Трајкова, Ф. (2013). Карактеризација и агрономска евалуација на некои линии пиперка (*Capsicum annuum* L.) добиени со методот на андрогенеза. Докторска дисертација, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, стр. 149.

КОРИСТЕНИ ВЕБ СТРАНИЦИ

- Agroleg Varo, домат Policarpo F1, <https://www.agrolegvaro.ro/seminte-de-tomate/seminte-de-tomate-policarpo-f1-p-2711.html>, преземено на 10.5.2021.
- Centar za prirodnu medicine, пиперка
Una, <http://www.centarzaprirodnomedicinu.com/proizvodi/cpm-spajz/stare-sorteseмена/paprika/paprika--una-.html>, преземено на 05.5.2021.
- Food and Agriculture Organization - FAO, <http://www.fao.org/>, преземено на 05.5.2021.
- Gryadka, пиперка Homera F1, <https://gryadka.com.ua/ua/homera-f1-perec-ostryj-enzazaden.html>, преземено на 10.5.2021.

International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, преземено на 05.5.2021.

Kupindo, пиперка Dugabela, https://www.kupindo.com/Seme/51299593_Paprika-DUGA-BELA-seme, преземено на 10.5.2021.

Micro Poliv, домат Belfort

F1, http://micropoliv.com.ua/belfort_f1_belfort_f1_500_sem_indeterminantniy_tomat_enza_zaden, преземено на 10.5.2021.

Oro seeds, домат Novosadski jabučar, <http://oroseeds.rs/proizvod/novosadski-jabucar-paradaiz/>, преземено на 10.5.2021.

Oro Seeds, пиперка Kurovska kapija, <http://oroseeds.rs/proizvod/paprika-kurtovska-kapija/>, преземено на 10.5.2021.

Plant house, пиперка Amfora, <https://planthouse.hr/proizvod/sjeme/sjeme-povrca/paprika-amfora-starinska/>, преземено на 10.5.2021.

Генко Енчев, домат Rally F1, <https://genkoenchev.com/domati-rali-f1-rally-f1>, преземено на 10.5.2021.

Генко Енчев, пиперка Edita F1, <https://genkoenchev.com/piper-edita-f1-edita-f1>, преземено на 10.5.2021.