

Год.зб.,Биол	кн. 48 tome	с. 21-32	Скопје	1995
God.zb.,Biol		р.	Skopje	

ISSN 0353 - 0493

CODEN: GZPBEJ

УДК:635.649-153.02
:581.4.086.83

Оригинален научен труд

**IN VITRO ОРГАНОГЕНЕЗА НА ХИПОКОТИЛИ
И КОТИЛЕДОНИ ОД ПИПЕРКА
(*Capsicum annuum L.* сорта Куртовска капија)**

Мирко Спасеноски и Лилјана Колева

*Институт за биологија, Природно математички факултет
91000 Скопје, Македонија*

M. Spasenoski and L. Koleva (1995). In vitro organogenesis of hypocotyls and cotyledones from pepper (*Capsicum annuum L.* cv. Kurtovska kapija) - Ann., Biol., Skopje, 48

Hypocotyls and cotyledones were isolated from aseptically grown seedlings, on 1/2 MS medium. Then they were cultivated on the MS mineral solution with 3% sucrose, 0,7% agar and hormones IAA, IBA, GA3, NAA, BAP and KIN added in different combinations and concentrations.

After 4 weeks callus and root formation obtained from hypocotyls and callus and leaf rosettes formation obtained from cotyledones.

ВОВЕД

Првите трудови за органогенеза и регенерација на пиперка во услови in vitro почнуваат да се објавуваат кон крајот на седумдесетитте и почетокот на осумдесетитте години, и претежно се од фундаментален карактер.

Во истражувањата на Gunai и Rao (1978), добиена е регенерација на црвена пиперка (*C. Annuum L.*) и тоа на сортите *California Wonder*, *Pimentio* и на еден хибрид од видот *C. Frutescens* (Barath), од хипокотили и од котиледони. Исто така испитуван е и морфогенетскиот потенцијал за органогенеза во услови in vitro од различни експлантати на пиперка, а при тоа докажано е дека степенот на калусирање е различен за различни експлантати (Mathews, 1984).

Покасно била добиена целосна регенерација, до адултни форми, кај повеќе видови на пиперки (*C. Annuum L.*), од различни видови на експлантати: од котиледони (Kisaburo, 1988; Kenij, 1991), од хипокотили (Fari, 1981; Garcija, 1990), од врвни меристеми (Fitchet, 1990; Conjeo, 1992; Philip, 1992) и од сегменти на стебло (Gracija, 1990 и Sim, 1986).

Според, Skoog и Miller (1957), образувањето на калусот како и органогенезата се регулирани од соодносот на ауксините и цитокинините во медиумот.

Органогенезата и регенерацијата на оваа култура во Р. Македонија воопшто не е проучувана, затоа нашиот приод кон овој проблем беше да се постави култура од хипокотили и котиледони и да се следи влијанието на одредени регулатори на растот врз степенот на органогенезата на експлантатите.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

Како почетни експлантати беа користени хипокотили со големина од 2-3 mm и котиледони со големина од 8-10 mm, изолирани од семиња од пиперка кои се изртени во асептички услови. Семето беше стерилизирано 15 секунди во 70% алкохол, 15 минути во 5% натриум хипохлорид, 10 минути во 1% Izosan - G и на крај беше испирано неколкупати во стерилна вода и засеано во ерланмаерки на 1/2 MS минерален раствор.

После 20 дена, од младите поници беа изолирани почетните експлантати и култивирани на MS минерален раствор со 3% сахароза,

0,7% агар, 100 mg/l инозитол, 200 mg/l казеин хидролизат, а од витамините вит. Б1 (тиамин) 0,1 mg/l, Б6 (пиридоксин) 1,0 mg/l и никотинска каиселина 0,5 mg/l. Од фитохормоните се употребени:

- IAA (индол-3-оцетна киселина), од 0,01-1,0 mg/l
- NAA (нафтил-1-оцетна киселина од 0,1-1,0 mg/l
- GA₃ (гиберелинска киселина) од 0,05-0,2 mg/l
- BAP (N6-бензиламинопурин) од 0,1-2,0 mg/l
- KIN (6-фурфуриламинопурин) од 1,0-10,0 mg/l.

Стерилизацијата на подлогата се вршеше 20 минути во автоклав, при температура од 120°C и притисок од 121,590 kPa, а pH вредноста на медиумот пред автоклавирањето беше 5,8.

После секој извршен пасаж културите се чуваа во стерилни услови: на температура од 25°C, фотопериодизам од 16/8 часа светло/темно, и интензитет на осветлување од 2000 - 3000 Lux.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Изолираните хипокотили беа поставени на MS подлога во присуство на IAA и KIN, а влијанието на различните концентрации на овие фитохормони е дадено во табела 1.

Табела 1. Изолирани хипокотили од пиперка на MS медиум во присуство на IAA и KIN, по 40 дена.

Table 1. Isolated hipokotyls of pepper on MS medium with IAA and KIN, after 40 days.

хормони mg/l hormones mg/l		експлантати explants		калусирање callused		лени розети leaf rosettes		вкоренување rooted		корени roots	
IAA	KIN	вк. бр No	cm	бр. No	%	бр. No	%	бр. No	%	бр. No	cm
0,1	1,0	41	0,66	40	97,56	/	/	1	2,43	2,31	0,96
0,1	3,0	64	1,09	61	95,31	/	/	6	9,37	2,57	1,02
0,05	5,0	44	0,49	34	77,27	/	/	5	11,36	5,25	1,10
0,1	5,0	178	0,92	117	65,73	11	6,18	18	11,11	3,39	3,70
0,1	10,0	100	0,64	40	40,00	15	15,00	12	12,00	4,21	2,06

Промени на експлантатите беа забележани уште во првите десетина дена од поставувањето во култура (Слика 1). Образовањето на калусот беше забележано на местата на пресекот на експлантатот, и

истиот се одликуваше со компактна и цврста структура и со светло зелена боја (Слика 2).

Од табела 1. јасно се гледа дека со зголемувањето на концентracијата на кинетинот во медиумот опаѓа процентот на калусираниите хипокотили. При концентрација од 10,0 mg/l KIN калусирале 40% од експлантатите, а при 1,0 mg/l KIN во медиумот калусирале 97,56% од поставените хипокотили. Формирањето на лисни розети беше присутно само во средини со поголема концентрација на кинетин.

Оваа укажува на фактот дека поголеми концентрации на кинетин во медиумот ја инхибираат калусогенезата. Со зголемување на концентрацијата на кинетин незначително се зголемува процентот на вкоренетите експлантати.

Табела 2. Растење на хипокотили по 4 недели во присуство на IAA GA₃ и KIN на MS медиум.

Table 2. Growth of hipokotylys after 45 days on MS medium with IAA GA₃ and KIN.

хормони mg/l hormones mg/l			експлантати explants		калусирање callused		лисни розети leaf rosettes		вкоренување rooted		корени roots	
IAA	GA ₃	KIN	вк. бр No	cm	бр. No	%	бр. No	%	бр. No	%	бр. No	cm
0,1	0,2	1,0	54	1,31	54	100,0	/	/	/	/	/	/
0,05	0,05	1,0	134	0,78	121	90,29	3	2,23	14	10,44	3,36	1,25
0,1	0,1	1,0	100	1,30	75	75,00	16	16,00	12	12,00	3,96	1,25
0,1	0,2	2,0	205	1,11	165	80,48	28	13,65	/	/	/	/
0,05	1,0	2,0	39	0,73	36	92,50	/	/	/	/	/	/

Влијанието на гиберелинската киселина во комбинација со кинетин и IAA е дадено во табела 2. Присуството на GA₃ во медиумот, дури и во многу ниски концентрации ја интензивира калусогенезата. Процентот на калусирани експлантати е 100% во присуство на само 0,2 mg/l GA₃ во подлогата. Ваквите резултати се во согласност со тие на Murashige (1965), кои покажале дека и најниски употребени концентрации на GA₃ го редуцираат формирањето на меристемоиди во калусот што е предуслов за секоја регенерација (цит. по Цветаноска и Спасеноски, 1992). GA₃ го инхибира и формирањето на корени, што се потврдува и во нашите резултати.

Влијанието на цитокининот BAP, кога истиот е додаден во MS медиумот наместо KIN, врз органогенезата на хипокотили е дадено во наредната табела.

Табела 3. Хипокотили на MS медиум во присуство на IAA, GA₃ и BAP, по 40 денаTable 3. Hipokotyls on MS medium with IAA, GA₃ and KIN, after 40 days.

хормони mg/l hormones mg/l			експлантати explants		калусирање callused		лисни розети leaf rosettes	
IAA	GA ₃	BAP	вк. бр. No	cm	бр. No	%	бр. No	%
0,1	0,1	1,0	60	0,50	20	33,33	/	/
1,0	/	2,0	27	0,41	9	33,33	1	3,70

Во присуство на BAP во медиумот калусирањето значително се намалува, кога се споредува со истата концентрација на кинетин. Така на пример за 1,0 mg/l кинетин калусирале 75% од експлантатите, а за 1,0 mg/l BAP 33,33%, при ист состав на другите компоненти 0,1 mg/l GA₃ и 0,1 mg/l IAA. На MS медиум со 1,0 mg/l IAA и 2,0 mg/l BAP, Garcia (1990), добил диференцијација на изданок од хипокотилни експлантанти на *C. annuum* cv. *Pico* и cv. *Piquillo*. Меѓутоа, испитуваните концентрации, во нашиот случај за Куртовската капија, не се доволни за да се фаворизира формирање на лисни розети, и да се образуваат меристемоеиди на калусот со што би се овозможила комплетна регенерација на пиперката од хипокотили.

Табела 4. Изолирани котиледони од пиперка и поставени на MS медиум обогатен со 0,1 mg/l IAA и KIN 1,0-10,0 mg/l, по 4 недели.

Table 4. Cotyledonnes isolated of pepper on MS medium with 0,1 IAA and 1-10 KIN, after 4 weeks.

хормони mg/l hormones mg/l		експлантати explants		калусирање callused		лисни розети leaf rosettes	
IAA	KIN	вк. бр. No	cm	бр. No	%	бр. No	%
0,1	1,0	130	1,99	130	100,00	21	16,75
0,1	3,0	140	2,00	70	50,00	84	60,00
0,1	5,0	180	2,69	80	44,44	132	73,33
0,1	10,0	128	2,75	6	4,66	128	100,00

Во наредните две субкултивирања се добиваше исклучиво калус, дури и на подлоги со поголема концентрација на цитокинини (10 mg/l KIN), а калусот се одликуваше со светло зелена боја и цврста конзистенција. Образуваните коренчиња, во првото пасажирање, во наредните две субкултивирања некротизираа. Тоа зборува дека, со

користените комбинации и концентрации на споменатите хормони во MS медиумот, органогенезата од хипокотилите на пиперката, беше добиена само во првиот пасаж а во секое наредно субкултивирање истата значително опаѓаше.

Влијанието на IAA и кинетинот врз органогенезата на котиледоните од пиперка е дадено во табела 4. После десетина дена беа забележани првите промени на експлантатот (Слика 3). За тоа време котиледоните добиваа темно зелена боја и градба на типичен лист, а вакви промени се забележани и кај котиледони од патлиџан во испитувањата на Цветаноска и Спасеноски (1992).

Евидентно е дека со зголемување на концентрацијата на кинетинот во медиумот се зголемува процентот на формирање на лисни розети, додека процентот на калусирани експлантати опаѓа (Таб. 4). Оваа зависност правопрпорционална за процентот на формирањето на лисни розети, а обратнопрпорционална за процентот на калусирањето на котиледоните, во однос на концентрацијата на кинетинот во медиумот, укажува дека поголеми концентрации на кинетин се попогодни за органогенезата на котиледони од пиперка.

Споредувајќи ги резултатите од таб. 1 и таб.4, на медиум со 0,1 mg/l IAA и кинетин од 1,0 -10,0 mg/l кај хипокотилите и котиледоните, може да се констатира различен процент на калусирање и формирање на лисни розети. На истиот медиум повисок е процентот на калусирани хипокотили, за разлика од котиледони, кои пак на сите испитувани медиуми формирале лисни розети. Оваа може да се толкува така да котиледоните на MS медиум во присуство на IAA и кинетин покажуваат поголема регенеративна моќ од хипокотилите.

Табела 5. Изолирани котиледони од пиперка на MS медиум во присуство на IAA, GA₃ и кинетин, по 4 недели.Table 5. Cotyledonnes isolated of pepper on MS medium with IAA, GA₃ and KIN, after 4 weeks.

хормони mg/l			експлантати		калусирање		лисни розети	
GA ₃	IAA	KIN	вк. бр.	сп	бр.	%	бр.	%
0,2	0,1	1,0	75	3,36	68	90,66	/	/
0,1	0,1	1,0	100	2,46	50	50,00	50	50,00
0,05	0,05	1,0	30	2,36	21	70,00	14	46,66
0,2	0,1	2,0	197	2,75	67	34,01	87	44,16
0,1	0,05	2,0	24	2,56	/	/	12	50,00

Влијанието на гиберелинската киселина врз органогенезата на котиледоните во комбинација на кинетин и IAA во медиумот е прикажано во следната табела.

Гиберелинската киселина во комбинација со кинетин и IAA на MS медиум, покажува скоро ист ефект како и кај хипокотилите. И кај котиледоните се покажа дека гиберелинската киселина го фаворизира калусирањето на експлантатите, со што ја спречува натамошната органогенеза на котиледоните.

Што се однесува до процентот на формирањето на лисни розети, на испитуваните медиуми во присуство на GA₃, се движи од 44,16% - 50,00%, а на MS медиумот во присуство на 1,0 mg/l кинетин, 0,1 mg/l IAA и 0,2 mg/l GA₃, каде концентрацијата на GA₃ е поголема, формирањето на лисни розети отсуствува. Лисните розети и калусот се формираат на местото на пресекот на котиледонот (Слика 4), што укажува на тоа дека котиледоните имаат поголема способност за органогенеза во својот проксимален дел, што е во согласност со испитувањата на Kisaburo и соработници (1988).

Во следните 1-2 субкуливирања способноста за органогенеза на котиледоните осетно се намалува, исто како и кај хипокотилите. Калусот има тенденција за зголемување, а формираните лисни розети некротизираат први во случај кога беа отсечени од котиледонот и поставени на MS медиум, но исто така и ако се во склоп на котиледоните. За период од околу 6 недели некротизата е присутна и кај котиледоните.

Според Swart (1993), со зголемувањето на престојот на експлантати во култура и со зголемувањето на бројот на субкултивирањата, опаѓа степенот за органогенеза, а се зголемува можноста за мутации т.е. најчесто настануваат полиплоидии и други хромозомски промени на поставениот експлантат.

ЗАКЛУЧОЦИ

Во врска со можностите за органогенеза во услови in vitro, кога како почетни експлантатите се користат котиледони и хипокотили од пиперка, сорта Куртовска капија, може да се дадат следните заклучоци:

Органогенезата на пиперка, сорта Куртовска капија, од хипокотили и котиледони зависи од концентрацијата на регулаторите на растот во медиумот. Така на MS медиум во присуство на кинетин од 1,0-10,0 mg/l и IAA од 0,1 mg/l органогенезата на хипокотили се одвива исклучиво во правец на калусогенеза и ризогенеза, додека на истиот медиум котиледоните формираат лисни розети и калус.

Способноста за органогенеза на иницијалните експлантати од пиперката, сорта Куртовска капија е поголема кај котиледоните од хипокотилите.

Цитокинините, во присуство на ауксини, и кај котиледоните и кај хипокотилите стимулативно делуваат на органогенезата, намалувајќи ја калусогенезата, а во тој поглед BAP има поголем ефект од кинетинот. Гиберелинската киселина, аплицирана во MS медиумот дури и во многу ниски концентрации (0,05-0,2 mg/l) ја фаворизира калусогенезата.

Калусот и кај котиледоните и кај хипокотилите е со компактна и многу цврста структура, а со зголемување на бројот на субкултивирањата и кај двата експлантати способноста за органогенеза на MS медиумот се намалува.

ЛИТЕРАТУРА

- Conejo, B. A., Palma Zuniga, T. (1992). In vitro micropropagation of pepper (*Piper nigrum*), *Tecnologia en Marcha*, V., 11 (3), 23 - 30.
- Fari, M., Czako, M. (1981). Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypokotil explants cultured in vitro, *Scientia Horticulturae*, V. 5 (3), 207 - 213.
- Fitcher, M. (1990). Establishment of *Piper nigrum* in vitro, *Acta Horticulturae*, (275), 285-291.
- Garcija, R.A. (1990). Tissue and cell culture of pepper (*Capsicum annuum L. cv. Pico and cv. Piquillo*), *APHF / SECH*, 249 - 254.
- Gunay, L., Rao, P. S. (1978). In vitro plant regeneration from hipokotyles and cotyledones of red pepper (*Capsicum*), *Plant Science Lettera*, 11, 365-372.
- Kenij, K., Yoko, S., Tomoyuki, N., Kisaburo, H. (1991). Effect of Interaction between Variety and Culture Medium on Induction Capacity of Adventitious Bud from Cotyledones in Pepper *Capsicum annuum L.*, *Agricultural Science*, Vol. 40, 19-32.
- Kisaburo, H., Zhiqing, Y., Kenij, K. (1988). The Effects of Cotyledon Explant and Culture Condition on in vitro Formation of Adventitious Buds in Red Pepper *Agricultural Science*, V. 37, 153 - 159.
- Mathewas, H. and Rao, P.S. (1984). In vitro responses of Black Pepper (*Piper Nigrum*), *Current Science*, Vol. 53, No 4, 183-185.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A Revised Medium from Rapid Growth and Bio Assay, with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum* Vol. 15, 473-497.
- Philip, V.J., Joseph, D., Triggs, G.S., Dickinson, N. M. (1992). Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum Linn.*) triught shoot tip cultures, *Plant cell reports*, V. 12 (1), 41- 44.
- Sim, S. L. (1986). Propagation of single-node pepper *Piper nigrum* cuttings, *Journal Announcement*, 105 - 113.
- Swart, H.J. (1993). Genetic and epigenetic effects, Post culture behavior, pp 95- 121.
- Цветановска, Л., Спасеновски, М. (1992). Хормонална регулација и развиток на котиљедони кај патлиџан (*Licopersicum Esculentum* сорта Балка) во услови in vitro, *Год. зб. Биол.* кн. 45, с. 213-221.

**IN VITRO ORGANOGENESIS OF HIPOCOTYLS AND
COTYLEDONES FROM PEPPER (*Capsicum annuum L.*
cv. Kurtovska Kapija)**

Mirko Spasenoski and Liljana Koleva

*Institute of biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
91 000 Skopje, Macedonia*

SUMMARY

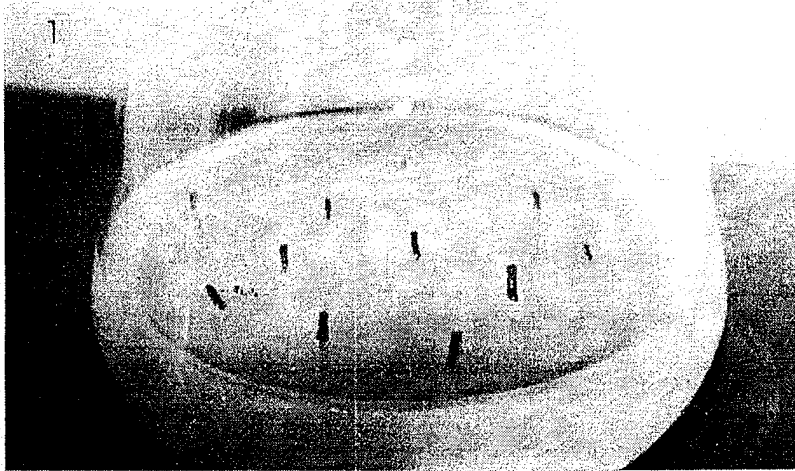
Hipocotyls and cotyledones were taken as initial explants, from aseptically grown seedlings on 1/2 MS mineral solution, of pepper *Capsicum annuum L. cv. Kurtovska kapija*. They were cultivated on MS (Murashige and Skoog 1962) mineral solution with 3% sucrose, 0,7% agar, and hormones IAA, GA₃, NAA, BAP, and KIN added in different combinations and concentrations.

All cultures were incubated in climate room conditions with relative humidity of 70%, photoperiod 16/8 light/dark, 25°C temperature and illumination of 2 000 - 3 000 Lux.

After 4 weeks, callus and root formation were obtained from hipocotyls, and callus and leaf rosettes formation were obtained from cotyledones.

GA₃ had an inhibitor influence on organogenesis of hipocotyls and cotyledones because this hormone caused big callus formation, especially on MS + 0,2 mg/l GA₃ + 0,1 mg/l IAA + 1,0 mg/l KIN.

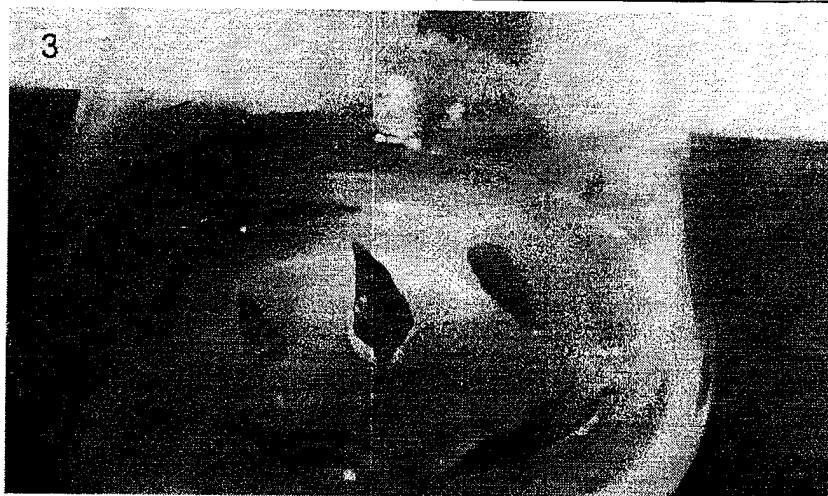
Cotyledones and hipocotyls had faster organogenesis when they were cultivated on MS + 1,0-2,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA, then others which were cultivated on MS + 1,0-5,0 mg/l KIN + 0,2 mg/l GA₃ + 0,1 mg/l IAA.



Сл. 1. Хипокотили од пиперка на MS медиум со KIN и IAA, по 10 дена.
Fig. 1. Hipocotyly of pepper on MS medium with KIN and IAA, after 10 days.



Сл. 2. Калус од хипокотили на MS медиум во присуство на 0,1 mg/l IAA, 0,2mg/l GA₃ и 1,0 mg/l KIN.
Fig. 2. Callus of hipocotyly on MS medium with 0,1 mg/l IAA, 0,2 mg/l GA₃ and 1,0 mg/l KIN.



Сл.3. Котиледони од пиперка на MS медиум, по неколку дена.
Fig. 3. Cotyledones of pepper on MS medium, after several days.



Сл. 4. Калус и лисна розета од котиледони, формирани на MS медиум во присуство на KIN, GA₃ и IAA.
Fig.4. Callus and leaf rosette from cotyledones, formed on MS medium with KIN, GA₃ and IAA.