

UDC: 631.53.12:57.085:581.33:635.64

Оригинален научен труд
Original research paper

ДОБИВАЊЕ НА СЕМЕ ОД ПИПЕРКА ДОБИЕНА ВО *IN VITRO* КУЛТУРА ОД АНТЕРИ

Колева-Гудева Лилјана* и Трајкова Фиданка*

Краток извадок

Цел на овие истражувања беше да се постигне ефективна *in vitro* технологија за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти; индукција на ембриогенеза во култура на антери од пиперка *in vitro*; развој на ембрионите во регенеранти, како и успешна адаптација и аклиматизација на добиените регенеранти од стерилни во оранжериски услови. Индуцирана е соматска ембриогенеза во култури на антери кај дванаесет генотипови, од деветнаесет различни испитувани генотипови на пиперка.

По успешната аклиматизација на регенерантите во оранжериски услови колекциониран е семенски материјал од четири генотипови на пиперка и тоа: *џиран*, *курџовска каџија CP*, *злаџен медал CP* и *фехерозон*. Колекционираниот семенски материјал претставува одлична можност за вклучување на истиот во селекционите процеси на пиперката, како и база за понатамошни цитогенетски и други истражувања на молекуларно ниво.

Клучни зборови: *андрогенеза, in vitro, антери, пиперка (Capsicum annuum L.)*

SEED PRODUCTION FROM PEPPER OBTAINED IN *IN VITRO* ANTHER CULTURE

Koleva-Gudeva Liljana and Trajkova Fidanka

* Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, "Гоце Делчев" б.б.,
2 400 Струмица, Македонија

* Institute of Southern Crops-Strumica, Goce Delcev b.b., 2 400 Strumica, Macedonia

Abstract

The aim of these examinations was establishment of effective *in vitro* technology for study of haploid and diploid plant regenerants; induction of embryogenesis in pepper anther culture; development of the embryos into regenerants as well as successful adaptation and acclimatization of regenerants from sterile to greenhouse conditions. Induction of somatic embryogenesis in anther culture in 12 from 19 exanimate genotypes of pepper was achieved.

After successful acclimatisation of the regenerants under greenhouse conditions seed material from four pepper genotypes was collected: Piran, Kurtovska Kapija Sr, Zlatan Medal Sr and Féherözön. The collected seed material is excellent possibility for further breeding processes, cytogenetics and other molecular level research.

Key words: *androgenesis, in vitro, anthers, pepper (Capsicum annuum L.)*

1. Вовед

Создавањето на хаплоиди и спонтани дихаплоиди во култура на антери е добро развиен и корисен метод во растителната генетика, како и во селекцијата на растенијата. Првата хаплоидна пиперка во култура на антери е добиена во 1973 год од Wang et al. Хаплоидната морфогенеза на видови од родот *Capsicum* е истражувана од George и Narayanaswamy (1973) и Kuo et al. (1973), иако продукцијата на хаплоидни индивидуи била многу ниска.

Првиот репродуктивен метод за продукција на хаплоиди од пиперка е развиен во 1981 од Dumas de Valux et al., а истражувањата за андрогенезата на пиперка биле интензивни и кон крајот на дваесеттиот век, но добиените регенеранти главно биле мешавина од хаплоиди и диплоиди растенија (Kararakis, 1999). Во понатамошните истражувања користени се разни стрес-третмани, со цел да се зголеми соматската ембриогенеза, од една страна, и да се зголеми продукцијата на хаплоиди, од друга страна (Mityko et al., 1993, 1995, 1999). Сега, андрогенезата во *in vitro* услови, базирана на 30 годишно истражување, претставува ефективен метод за индукција на хаплоиди (Koleva-Gudeva, L. et al., 2007)

Во култура на антери кои содржат микроспори во стадиум на првата поленова делба ($n=x$), ако успешно се индуцира соматска ембриогенеза, се добива хаплоидни или дихаплоидни регенеранти (Колева-Гудева, Л., 2003).

2. Материјал и метод на работа

Како материјал за индукција на андрогенеза во култура на антери се користени незрелите пупки од пиперка, кои содржат антери со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата. Испитувањата се изведени со деветнаесет различни генотипови на пиперка (Табела 1). Стерилизацијата на пупките се одвиваше на следниот начин: најпрво пупките се промиваат во водоводна вода; потоа следи промивање во дестилирана вода; потоа 15 секунди во 70% C_2H_5OH ; па 10 минути во 5% $Ca(ClO)_2$ со 2-3 капки Tween 20, и на крај пупките се промиваат неколкупати во стерилна вода.

Потоа, изолирани антери од 3 пупки беа поставени во петриеве садови со пречник од 5 cm и тоа со конкавната страна да го допираат индуктивниот медиум. Стадиумот на делбата на микроспората беше одредуван микроскопски со обојување на антерите неколку минути со ацето-кармин, а потоа истите беа микроскопирани. Тоа обично е фаза на цветната пупка кога должината на цветните и венечните ливчина е еднаква и кога слободниот крај на антерата почнува да се обојува бледо виолетово. На изолираните антери се капнува од ацето-карминот и по неколку минути истите се мацерираат на микроскопско предметно стакло и се набљудуваат во кој стадиум е микроспората.

Истражувањата за андрогенетскиот потенцијал на испитуваните сорти пиперка се изведуваат според методот на Dumas de Valux et al., 1981. Според методот на овој автор, најпрво антерите се култивираат на медиумот $CP + 0,01 \text{ mg/l KIN} + 0,01 \text{ mg/l 2,4D}$, со инкубација на темно 8 дена и на $+35 \pm 2^\circ C$, следните 4 дена во клима комора на $+25 \pm 2^\circ C$ со фотопериодизам 12 h светло / 12 h темно, а потоа истите се пренесуваат на медиумот $R_1 + 0,01 \text{ mg/l KIN}$ на $+25 \pm 2^\circ C$, со фотопериодизам 12 часа светло и 12 часа темно.

Аклиматизацијата на добиените хаплоиди се одвиваше етапно, најпрво во клима комора каде регенерантите беа засени во стерилна мешавина на перлит : тресет : песок (1:1:1) (Слика 1b), а потоа во оранжериски услови покриени со акрилно платно заради спречување на странооплодност од другите генотипови.

3. Резултати и дискусија

Пиперките се непредвидливи култури во услови *in vitro* и поради тоа, резултатите кои се добиваат со култура на клетки и

тквива се умерени, а културата на антери по сè изгледа дека е единствен исклучок од ова правило (Mityko и Fari, 1997).

Врз основа на добиените резултати може да се каже дека, сите испитувани сорти не се способни за формирање на хаплоидни ембриоиди. По индуктивниот период на СР медиум од 12 дена, антерите беа префрлувани на R₁ медиум. На овој медиум ембриоидите уште на самиот почеток покажуваат тотипотентност, напредуваат во својот раст и развој и формираат изданок.

Формираниот изданок го продолжува својот развој на V₃ медиум, каде без присуство на фитохормони се оформуваат млади растенија на хаплоидна пиперка (Слика 1a). Вкоренувањето настанува, исто така, на V₃ медиум, а добро вкоренетите изданоци се префрлуваат во стерилна мешавина на песок : перлит : тересет во сооднос 1 : 1 : 1 и се подготвени за вообичаената адаптација и аклиматизација на нестерилни услови.

Од сите испитувани 17 генотипови на пиперка, 12 имаат способност за формирање на директни соматски ембриоиди. Само лутите генотипови (со исклучок на *ројунд*, *куршовска кајиџа* TU и *куршовска кајиџа* МК), немаат андрогенетска способност т.е. во култура на антери не формираат хаплоидни изданоци (Табела 2). Семенски материјал беше добиен само од четири генотипови и тоа: *куршовска кајиџа* СР, *злаиен медал* СР, *џиран* и *фехерозон* (Табела 3, Слика 1 с- f).

4. Заклучок

Според класификацијата на Mityko и Fari (1997), за андрогенетскиот потенцијал одредуван според процентот на антери кои формираат ембриоиди, типовите на пиперка се делат на:

- со слаб андрогенетски потенцијал - до 5% ембриогенетски антери;
- со просечен потенцијал - 5-10% ембриогенетски антери;
- со добар потенцијал- 15 - 30% ембриогенетски антери и
- со одличен андрогенетски потенцијал - над 30% ембриогенетски антери.

Резултатите од овие истражувања покажаа дека соматски ембриоиди се формираа на СР медиум со топол температурен стрес (+35°C), што е во согласност со истражувањата на De Valux et al. (1981). Од сите 17 испитувани генотипови, 12 покажаа способност за формирање на ембриоиди, и тоа:

- 2 генотипови со многу добар андрогенетски потенцијал:

фехерозон и *џура*;

- 4 генотипа со добар андрогенетски потенцијал:
џриџавиџ F1, златен медал CP, калифорниско чудо и мајори;
- 6 генотипови со слаб андрогенетски потенцијал:
џиран, домаџовидна блаџа, златен медал ШТ, куриџовска кайџија МК, куриџовска кайџија BG и слаџико луџа;
- 7 генотипови немаат андрогенетски потенцијал:
феферона, роџунд, везена луџа, бонбона, сиврија, куриџовска кайџија TU и куриџовска кайџија МК

Литература

- Dumas de Valux, 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. *Agronomie 1(10): 859-864.*
- George, L., Narayanaswamy, S., 1973. Haploid capsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma 78: 467-470.*
- Kaparakis, G. (1999): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), *PhD theses - Kaparakis Georgis, Aristotle Univ. Hellas, submitted Univ. Nottingham, UK.*
- Колева-Гудева, Лилјана (2003): Култура на антери од пиперка (*Capsicum annuum* L.), Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури, Год 3: 95-102.
- Koleva-Gudeva, Liljana, Spasenovski, M., Trajkova Fidanka (2007): Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae 111:114-119*
- Kuo, J.S., Wang, Z.Z., Chien, N.F., Ku, S.J., Kung, M.L., Hsu, H.C., 1973. Investigation of the anther culture in vitro of *Nicotiana* and *Capsicum annuum* L. *Acta Bot. Sin.* 15 (1), 43-47.
- Mityko, Judit, and Fari, M., (1997): Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture, *Hort. Biotech and breeding, ISHS 1997, Acta Hort. 447: 281-287.*
- Mityko, Judit, Andrasfalvy, G., Csillery, G., Fary, M. (1995): Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Breeding 114, 78-80.*
- Mityko, Judit (1993): Obtention of Anther derived homozygous plants in pepper (*Capsicum annuum* L.), *OMFB, Hungary No. 93-97-44-0468.*
- Wang, J.J., Sun, C.S., Wang, C.C., Chein, N.F., 1973. The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sinica XVI (1), 147-151.*

Табела 1. Листа на различни генотипови на пиперка користени во истражувањето

Table 1. List of different pepper genotypes used in the examination

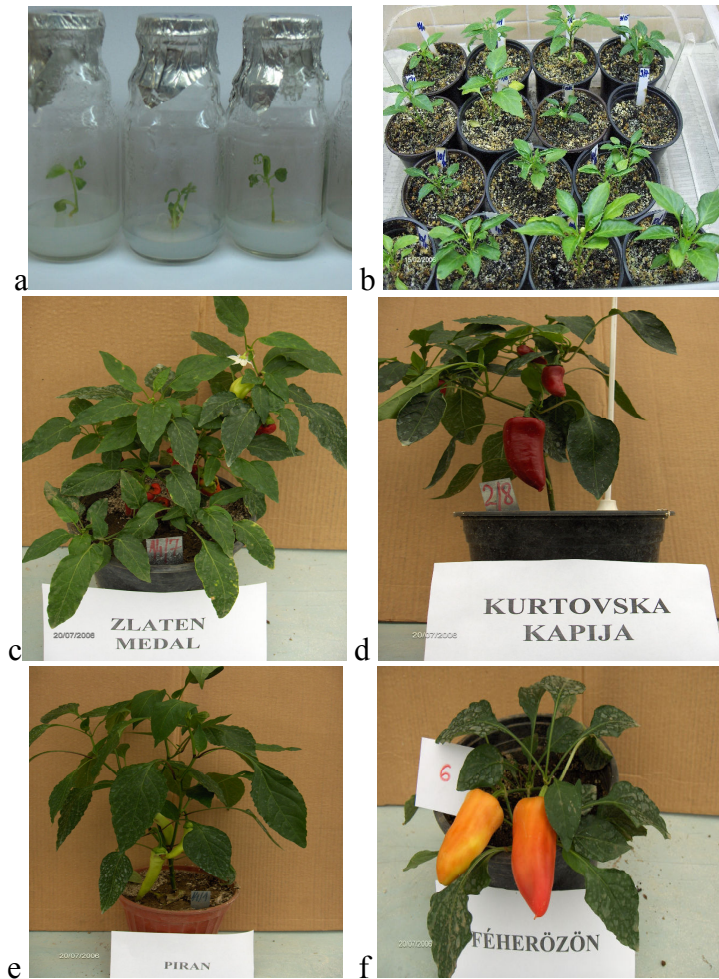
Бр. Nr.	Шифра Code	Генотип пиперка Pepper genotypes	Потекло на производството Origin of production
1	МК1	<i>џиран</i> Piran	Македонија Macedonia
2	МК2	<i>курџовска кајџија</i> BG Kurtovska Kapija BG	Бугарија Bulgaria
3	МК3	<i>курџовска кајџија</i> TR Kurtovska Kapija TR	Турција Turkey
4	МК4	<i>златен медал</i> ШТ Zlaten Medal Št	Македонија - Штип Macedonia - Štip
5	МК5	<i>курџовска кајџија</i> МК Kurtovska kapija MK	Македонија Струмица 2002 Macedonia Strumica 2002
6	МК6	<i>бонбона</i> Bonbona	Македонија - Струмица Macedonia - Strumica
7	1	<i>слајко луџа</i> Slatko Luta	Македонија Macedonia
8	3	<i>луџа везана</i> Luta Vezana	Македонија Macedonia
9	4	<i>сиврија</i> Sivrija	Македонија Macedonia
10	5	<i>феферона</i> Feferona	Македонија Macedonia
11	7	<i>златен медал</i> СР Zlaten Medal Sr	Македонија - Струмица Macedonia - Strumica
12	8	<i>курџовска кајџија</i> СР Kurtovska Kapija Sr	Македонија - Струмица 2000 Macedonia Strumica 2002
13	9	<i>калифорниско чудо</i> Californnia Wonder	Србија Serbia
14	15	<i>фехерозон</i> Féherözön	Унгарија Hungary
15	16	<i>ројунд</i> Rotund	Македонија Macedonia
16	1Н	<i>пратиавит</i> F1 Pritavit F1	Унгарија Hungary
17	2Н	<i>доматовидна блаџа</i> Tomato shaped sweet	Унгарија Hungary
18	3Н	<i>џура</i> Tura	Унгарија Hungary
19	4Н	<i>мајори</i> Majori	Унгарија Hungary

Табела 2. Индукција на хаплоидни ембриоиди од антери на пиперка
 Table 2. Haploid embryo induction from pepper anthers

Генотипови пиперка Pepper genotypes	Бр. на антери Nr. of anthers	Ембриогенетски антери (%) Embryogenetic anthers (%)	Бр. на ембриоиди на 100 антери Nr. of embryos per 100 anthers	Ембриогенетски потенцијал Embryogenetic response
<i>фехерозон</i> Féherözön	500	17.39	36.91	Многу добар Very good
<i>џура</i> Tura	300	17.05	17.05	Многу добар Very good
<i>притавит F1</i> Pritavit F1	330	9.23	9.39	Добар Good
<i>златен медал CP</i> Zlaten medal Sr	343	6.83	10.29	Добар Good
<i>калифорниско чудо</i> California Wonder	151	6.16	5.66	Добар Good
<i>мајори</i> Majori	330	5.83	6.73	Добар Good
<i>пиран</i> Piran	412	5.03	34.05	Слаб Poor
<i>доматовидна блага</i> Tomato shaped sweet	360	4.17	4.54	Слаб Poor
<i>златен медал ШТ</i> Zlaten medal Št	362	3.64	14.35	Слаб Poor
<i>куртовска капија CP</i> Kurtovska kapija Sr	242	3.14	10.91	Слаб Poor
<i>куртовска капија BG</i> Kurtovska kapija BG	310	2.9	50.55	Слаб Poor
<i>слајко луџа</i> Slatko luta	140	2.43	3.33	Слаб Poor
<i>феферона</i> Feferona	237	-	-	Нема No
<i>ротунд</i> Rotund	220	-	-	Нема No
<i>везена луџа</i> Vezena luta	221	-	-	Нема No
<i>бонбона</i> Bonbona	270	-	-	Нема No
<i>сиврија</i> Sivrija	254	-	-	Нема No
<i>куртовска капија TU</i> Kurtovska kapija TU	236	-	-	Нема No
<i>куртовска капија МК</i> Kurtovska kapija MK	122	-	-	Нема No

Табела 3. Семенски материјал собран од четири генотипови на пиперка добиени во *in vitro* култура од антери
Table 3. Seed material collected from four pepper genotypes obtained in *in vitro* anther culture

Генотипови пиперка Pepper genotypes	Број на растенија Number of plants	Број на семки по плод Nr. of seeds per fruit	Вкупен број на семки Total number of seeds
<i>куртџовска капија</i> CP Kurtovska kapija Sr	9	31.33	282
<i>златен медал</i> CP Zlaten medal Sr	4	72.50	290
<i>пиран</i> Piran	8	26.87	215
<i>фехерозон</i> Féherözön	11	38.54	424



Слика 1. а. Развој на ембрионите во регенеранти поставени на V3 медиум б. Аклиматизација на регенерантите во клима комора со контролирани услови с.- ф. Целосно развиени растенија од различни генотипови на пиперка добиени со андрогенеза во оранжериија.

Figure 1. a. development of the embryos into regenerants on V3 medium. b. Acclimatization of the regenerants in climate chamber under controlled conditions c.- f. Fully developed plants of different pepper genotypes created via androgenesis under greenhouse conditions.