



Odpowiedź androgeniczna genotypów *Capsicum frutescens* L. w kulturach *in vitro* pylników

Paweł Nowaczyk, Anna Kucharska, Lubosława Nowaczyk
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Technologiczno-
-Przyrodniczy, Bydgoszcz

The androgenic response of *Capsicum frutescens* L. genotypes in *in vitro* anther culture

Summary

Two soft-flesh *Capsicum frutescens* L. lines were used in the study. The androgenesis process was induced according to the procedure described for *C. annuum* L. In the cultures established in summer, not many anthers forming the callus tissue were observed. Cytometric analysis showed the presence of cells with different content of DNA. Among 1.000 anthers displayed of one line, seven embryos were observed. Four embryos continued the development resulting in obtaining plants. Three of them had the DNA content on 1C level, the fourth one was diploid. The test of an androhaploid induction in autumn cycle, with the genotype of positive response in summer, was not successful.

Key words:

androgenesis, callus, DNA content, haploid.

Adres do korespondencji

Paweł Nowaczyk,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Uniwersytet
Technologiczno-
-Przyrodniczy,
ul. Bernardyńska 6,
85-029 Bydgoszcz.

1. Wstęp

Paprykę roczną (*Capsicum annuum* L.) uprawia się z dużym powodzeniem na całym świecie. W Polsce jest aktualnie jedynym gatunkiem uprawnym z rodzaju *Capsicum*. W krajach jej pochodzenia, w Ameryce znane są także odmiany z gatunku *C. frutescens* L. Tam też, wykorzystywane są dzięki jej formy. Papryka stanowi takson charakteryzujący się dużą zmiennością genetyczną (1). Wśród cech użytkowych uwagę zwraca występowanie form

o miękkim miększu (ang. *soft-flesh*) perykarpu po osiągnięciu dojrzałości fizjologicznej. Według Rao i Parana (2) cecha ta związana jest z aktywnością polygalakturonazy. Owoce typu *soft-flesh* stanowiącą mogą interesujący surowiec przetwórczy (3).

Wymieniona papryka roczna jest głównym obiektem badań nad indukowaną androgenezą w kulturach *in vitro* pylników z rodzaju *Capsicum*. Już na początku lat 80. XX w. opracowano metody pozyskiwania androhaploidów. Szczególnie intensywne badania z tego zakresu prowadzono we Francji. Ich efektem były technologie produkcji haploidalnych roślin *C. annuum* L. w kulturach *in vitro* (4-6).

W literaturze światowej brakuje doniesień dotyczących wydajnych sposobów pozyskiwania haploidów u *C. frutescens* L., gatunku, który jak wspomniano charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem fenotypowym. Może być ponadto krzyżowany z *C. annuum* L. dając płodne potomstwo mieszańcowe, wyróżniające się także dużą zmiennością genetyczną. Biorąc pod uwagę wymienione uwarunkowania podjęto próbę oceny przydatności metody pozyskiwania form haploidalnych, opracowaną dla *C. annuum* L., w zastosowaniu do dwóch genotypów *C. frutescens* L., charakteryzujących się cechą miękkiego miąższu.

2. Materiał i metody

Przedmiotem badań były dwie wyselekcjonowane linie typu *soft-flesh Capsicum frutescens* L. Oznaczono je symbolami Cf SF 1/1 i Cf SF 1/3. Różniły się one pod względem cech morfologicznych i użytkowych. Ich ogólną charakterystykę podano w tabeli 1.

Tabela 1

Ogólna charakterystyka badanych linii

Symbol linii	Plon owoców z rośliny (kg)	Średnia masa owocu (g)	Grubość ścian (mm)	Zawartość ekstraktu (%)	Wydajność biotechnologiczna owoców (%)*
Cf SF 1/1	0,84	48	3,79	7,7	64
CF SF 1/3	0,78	43	4,54	11,3	65

* Pod pojęciem wydajności biotechnologicznej należy rozumieć udział miękkiej tkanki perykarpu, uzyskanej w wyniku procesu jej mechanicznej separacji od niejadalnych i balastowych części owocu, w masie technologicznej owocu.

Rośliny będące źródłem pąków kwiatowych uprawiano w nieogrzewanym namiocie foliowym. Stosowane zabiegi agrotechniczne umożliwiły utrzymanie ich w dobrej kondycji zdrowotnej. Kultury pylników prowadzono w dwóch okresach, letnim i jesiennym. Pierwszy zaczynał się wykładaniem pylników w końcu czerwca, drugi przy końcu września. W całym okresie prowadzenia kultur zastosowano procedury opisane przez Chambonneta (4) dla *C. annuum* L.

Jako kryterium przydatności pąków kwiatowych do wyszczepienia pylników przyjęto ogólnie stosowane porównanie długości działek kielicha i płatków korony. Zakłada się, że późnojednojądrowa faza rozwoju mikrospor, najbardziej efektywna w kulturach *in vitro*, jest właściwa dla pąków o jednakowej długości działek kielicha i płatków korony. Proces indukcji androgenyzy obejmował kolejno po sobie następujące etapy. Przez 8 początkowych dni pylniki inkubowano na pożywce CP w ciemności, przy temperaturze +35°C. Kolejne 4 dni kultura przebiegała w warunkach 12-godzinnego fotoperiodu i temperaturze +25°C. Następnym etapem obejmował 20-30-dniowy okres kultury na pożywce R1. Uzyskane rośliny prowadzono na pożywce V3 do czasu ich przeniesienia i aklimatyzacji na stałym podłożu torfowym.

W trakcie kultur na nielicznych pylnikach obserwowano tworzenie się tkanki kalusowej. Grudki tej tkanki zostały opisane i poddane analizie cytometrycznej. Tę samą metodę oceny ploidalności zastosowano dla uzyskanych roślin. Analizy cytometryczne przeprowadzono według metody opisanej przez Galbraitha i wsp. (7) przy użyciu cytometru Partec CCA. Histogramy analizowano za pomocą programu komputerowego DPHC V 2.1.

3. Wyniki i dyskusja

W trakcie prowadzenia kultur obu genotypów zaobserwowano tworzenie się grudek tkanki kalusowej. Liczba pylników z kalusogenezą była niewielka, osiągając poziom 0,5-0,6% ogólnej ich liczby (tab. 2). W cyklu jesiennym, w którym kulturom *in vitro* poddano pylniki genotypu o interesującej odpowiedzi androgenicznej obserwowanej latem, nie stwierdzono inicjacji rozwoju tkanki kalusowej. Nie obserwowano także embriogenezy. Również u *C. annuum* L. opisano zróżnicowaną podatność na tworzenie tkanki kalusowej w zależności od terminu inicjacji kultur (8). Różna była także reakcja badanych genotypów.

Tabela 2

Reakcja genotypów na warunki prowadzenia kultury

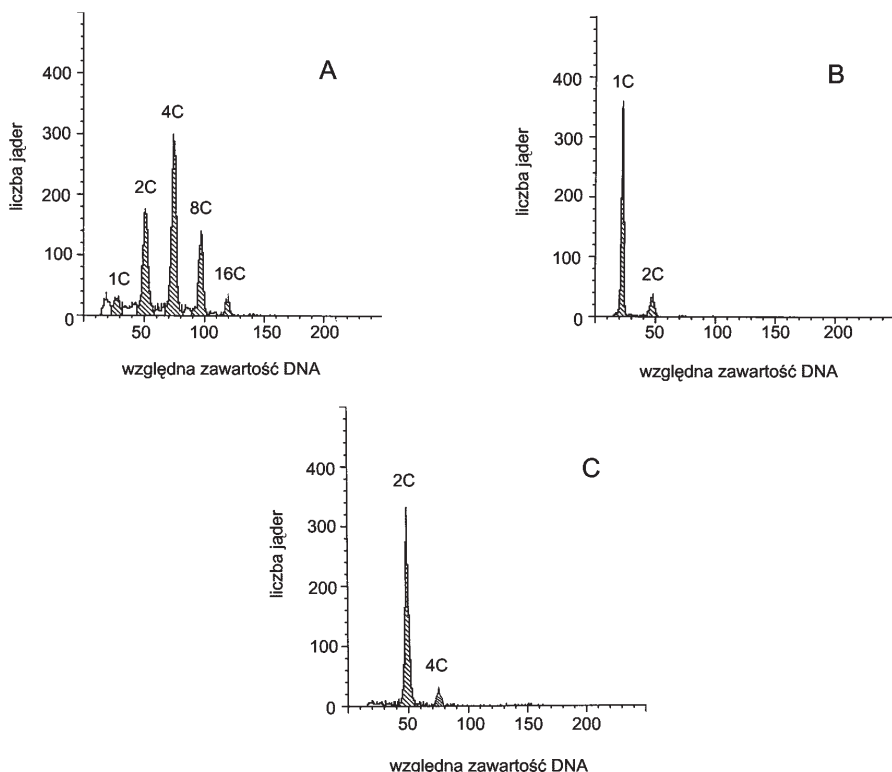
Okres założenia kultury	Liczba i udział pylników			Liczba i udział roślin
	wyłożonych	formujących kalus	formujących zarodki	
termin letni				
25.06.-30.07.				
Cf SF 1/1	1000	5 (0,5%)	0	0
Cf SF 1/3	1000	6 (0,6%)	7 (0,7%)	4 (0,4%)
termin jesienny				
28.09.-30.09.				
Cf SF 1/3	1000	0	0	0

Grudki tkanki kalusowej różniły się pod względem barwy, średnicy oraz struktury, przy czym u obydwu genotypów zakres różnic był zbliżony (tab. 3). Na podstawie analizy cytometrycznej wykazano zróżnicowany poziom zawartości DNA zawierający się w granicach 1C-16C. Tkanka kalusowa miała w każdym z przypadków charakter miksploidalny (rys. 1 A).

Tabela 3

Charakterystyka tkanki kalusowej

Genotyp	Barwa	Średnica (mm)	Struktura
Cf SF 1/1	biała	3	szklista
	pomarańczowa	3-5	zbita
	brązowa	4	zbita i luźna
Cf SF 1/3	biała	3	zbita
	pomarańczowa	3-8	zbita
	brązowa	3	szklista



Rys. 1. Histogramy zawartości DNA w jądrach komórkowych: A – tkanki kalusowej, B – rośliny haploidalnej, C – rośliny diploidalnej.

Z siedmiu zarodków jakie powstały wyłącznie w kulturach pylników linii Cf SF 1/3 uzyskano 4 rośliny (tab. 2). Trzy pozostałe zarodki zamarły w trakcie kolejnych etapów kultury. Tkanki pochodzące z roślin poddano analizie cytometrycznej. Zawartość DNA u trzech z nich była na poziomie 1C, u czwartej natomiast stwierdzono 2C DNA (rys. 1 B, C). Oznaczało to, że trzy pierwsze były haploidami o niewątpliwie androgenicznym pochodzeniu. W odniesieniu do rośliny diploidalnej można sugerować dwie możliwości jej genezy. Jedną z nich jest somatyczna embriogeneza z tkanek pylnika. Druga, bardziej atrakcyjna z praktycznego punktu widzenia, zakładać może androgenezę ze spontaniczną diploidyzacją. Takie możliwości tworzenia androgenicznych diploidów stwierdzono w kulturach *in vitro* u niektórych gatunków roślin (9,10).

Liczba pylników jakie poddano opisanym w metodzie warunkom kultur *in vitro* była na tyle duża, że uzasadnione, jak się wydaje, jest przedstawienie wniosku o różnej potencji androgenicznej badanych linii *Capsicum frutescens* L. Brak danych literaturowych dotyczących omawianego gatunku skłania do poszukiwania analogii u *C. annuum* L. W opracowaniu Regnera (11), podsumowującym stan wiedzy z zakresu androgenезy u *Capsicum* spp., zacytowano 51 pozycji literatury. Tylko jedna dotyczyła innego gatunku niż *C. annuum* L, ściślej zaś mieszańców F₁ *C. annuum* L. x *C. chinense* Jacq. Zarówno w pracy tego autora, jak też w przeglądowym artykule Vagera (12) uwagę zwraca zróżnicowanie reakcji różnych genotypów w zakresie odpowiedzi androgenicznej. W ostatnim czasie bardzo interesującą metodę kultur dwuwarstwowych dla indonezyjskich odmian ostrych *C. annuum* L. zaprezentowali Supena i wsp. (13). Uzyskali bardzo wysoką wydajność dla badanych genotypów. Zwrócili jednak uwagę, że tylko około 20% zarodków można było określić jako normalne i tylko one rozwinęły się w rośliny. Cytowani autorzy wskazują na linie DH jako źródło roślin donorowych. Sugestia ta zrozumiała z metodycznego punktu widzenia jest jednak niepraktyczna. Androgeniczne potomstwo takich linii będzie jednolite genetycznie i identyczne z rośliną donorową.

Na podstawie uzyskanych przez nas wyników wykazaliśmy, że celowe jest dalsze poszukiwanie takich genotypów *soft-flesh* *C. frutescens* L., u których możliwe będzie uzyskanie zadowalającej efektywności w indukowaniu haploidalnej androgenезy. Stworzy to szansę szybkiego pozyskiwania stabilnych genetycznie i interesujących użytkowo linii miękkomięszowych.

Literatura

1. Greenleaf W. M., (1986), *Breeding Vegetable Crops*, Avi Publishing Company Inc. Westport Connecticut. USA, 67-134.
2. Rao G. V., Paran I., (2003), *Plant Mol. Biol.*, 51(1), 135-141.
3. Nowaczyk P., Nowaczyk L., (2004), *Annal. UMCS, Sec. E*, 53, 4, 1823-1828.
4. Chambonnet D., (1988), *Bulletin Interne de la Station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon*, Montfavet, France, 1-10.
5. Pochard E., Vaulx D. R., (1979), *Pflanzenzuchtung*, 65, 23-46.

6. Sibi M., Vaulx D. R., Chambonnet D., (1979), *Ann. Amel. Plantes*, 29, 583-606.
7. Galbraith D. W., Harkins M., Maddox M., Agres N. M., Sharma D. P., Firoozabady E., (1983), *Science*, 220, 1049-1051.
8. Matsubara S., Yamamoto M., Jo M. H., Murakami K., (1998), *Sci. Rep. Of the Faculty Agri. Okayama Univ.*, vol., 87, 117-122.
9. Kamiński P., Dyki B., Krzyżanowska D., Górecka K., (2005), *J. Applied Genet.*, 46, 25-33.
10. Morrison R. A., Koning R. E., Evans D. A., (1986), *J. Plant. Physiol.*, vol. 126, 1-9.
11. Regner F., (1996), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, Kluwer Academic Publisher, vol. 3, 77-89.
12. Vagera J., (1990), *In Vitro Induction of Haploids. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 12, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 374-392.
13. Supena E. D. J., Suharsono S., Jacobsen E., Custers J. B. M., (2004), *Plant Cell. Rep.*, 20, 1-10.