

AGROMORFOLOGICZNA I MOLEKULARNA OCENA LINII PODWOJONYCH HAPLOIDÓW PAPRYKI (*CAPSICUM ANNUUM* L.)

Dorota Olszewska, Aleksandra Niklas-Nowak, Anna Kisiała,
Monika Dzwonkowska, Paweł Nowaczyk

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

Streszczenie. Celem badań była ocena agromorfologiczna i molekularna pokoleń R_3 ośmiu linii DH papryki (*Capsicum annuum* L.), otrzymanych w kulturach pylników mieszańców międzyodmianowych $(ATZ1 \times PO)F_1$ oraz $(ATZ1 \times CDT)F_1$. Opracowanie statystyczne wyników biometrycznych wykazało zróżnicowanie między badanymi formami, a także bardzo dużą jednorodność fenotypową w obrębie pojedynczej linii. Na szczególną uwagę zasługiwały linia AP10, plonująca na poziomie formy matecznej ATZ1, oraz linia AP15, która przewyższała pod tym względem obydwie formy rodzicielskie. Oceniane linie DH poddano analizie molekularnej za pomocą PCR-RAPD. Osiem starterów generowało produkty polimorficzne, co pozwoliło na rozróżnienie wszystkich ocenianych w doświadczeniu linii. Na podstawie otrzymanych elektroforogramów obliczono współczynniki dystansu genetycznego oraz opracowano dendrogramy ilustrujące zróżnicowanie genetyczne między formami rodzicielskimi i potomnymi liniami DH. Wyróżnione pod względem cech użytkowych linie AP10 i AP15 stanowiły wspólną grupę o najmniejszym współczynniku dystansu genetycznego.

Słowa kluczowe: *Capsicum* spp., androgeneza, linie DH, cechy ilościowe, RAPD

WSTĘP

Krzyżowania wewnątrzgatunkowe i międzygatunkowe stanowią źródło zmienności genetycznej dla ważnych użytkowo cech papryki rocznej (*Capsicum annuum* L.). Uzyskane w ten sposób mieszańce mogą służyć również jako formy wyjściowe do indukcji linii podwojonych haploidów. Zarówno w kulturach pylników, jak i izolowanych

mikrospor papryki wśród regenerantów otrzymuje się rośliny haploidalne i diploidalne. W przypadku diploidalnych regenerantów konieczne jest potwierdzenie ich homozygotyczności [Germana 2011]. Jednorodność fenotypową androgenicznych populacji papryki i zróżnicowanie między nimi określa się na podstawie opisów biometrycznych roślin i owoców. W przypadku dziedziczenia cech ilościowych selekcja prowadzona wyłącznie na podstawie fenotypu nie zawsze pozwala na precyzyjną klasyfikację testowanych roślin. Wykorzystanie markerów obrazujących zróżnicowanie DNA umożliwi określenie polimorfizmu roślin na poziomie molekularnym i pozwala na ich jednoznaczny identyfikację. Technika RAPD-PCR jest powszechnie wykorzystywana do określenia genetycznego zróżnicowania między dzikimi i uprawnymi gatunkami papryki [Thul i in. 2009, Prasad i in. 2013]. Ponadto, istnieje również możliwość wykorzystania reakcji RAPD w identyfikacji blisko spokrewnionych odmian i mieszańców gatunku *C. annuum* L. [Sitthiwong i in. 2005]. Celem niniejszej pracy była ocena wartości użytkowej linii DH-R₃ uzyskanych w kulturach pylników mieszańców *Capsicum annuum* L. z wykorzystaniem analizy biometrycznej oraz ich identyfikacja na poziomie molekularnym.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy

Materiał doświadczalny pochodził z kolekcji Katedry Genetyki, Fizjologii i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. W doświadczeniu wykorzystano linie hodowlane *Capsicum annuum* L.: ATZ1, PO, CDT, oraz rośliny pokolenia R₃ diploidalnych regenerantów uzyskanych w kulturach pylników dwóch mieszańców międzyodmianowych (ATZ1×PO)F₁: linie AP1, AP2, AP10, AP15, AP32, AP40, oraz (ATZ1×CDT)F₁: linie AC5, AC7. Androgeniczne regeneranty otrzymano w doświadczeniu prowadzonym według procedury Dumas de Vaulx i innych [1981] dla *C. annuum* L., z modyfikacją dotyczącą wydłużenia czasu inkubacji pylników na pożywce indukcyjnej [Olszewska i in. 2014]. Ploidalność roślin określono cytometrycznie [Śliwińska 2003]. Z dojrzałych owoców pokolenia R₁ zebrano nasiona, które posłużyły do otrzymania kolejnych dwóch pokoleń regenerantów.

Analiza agromorfologiczna i molekularna

Dla piętnastu roślin z każdego linii oznaczono liczbę owoców oraz całkowity plon. Ponadto, z każdej rośliny do szczegółowych analiz pobrano losowo po trzy owoce. Oznaczono masę owocu z szypułką, długość i szerokość owocu, masę technologiczną, grubość perykarpu, zawartość ekstraktu, suchą masę oraz liczbę nasion z owocu.

Genomowe DNA form rodzicielskich oraz linii DH-R₃ izolowano z młodych liści pobieranych ze zdrowych, dorosłych roślin. 100 mg tkanki homogenizowano w ciekłym azocie. Izolację DNA przeprowadzono za pomocą GenElute™ Plant Genomic DNA Kit (Sigma–Aldrich). Czystość i ilość otrzymanego DNA oceniono spektrofotometrycznie oraz na podstawie wyników elektroforezy przeprowadzonej w 1-procentowym żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny. Reakcję PCR przeprowadzono według Ilbi

[2003], amplifikację prowadzono w końcowej objętości 25 μ l w termocyklerze ATC401 Thermal Cycler. W doświadczeniu wykorzystano zestawy do reakcji PCR (MixPlus, A&A Biotechnology) oraz trzynaście 10-nukleotydowych starterów (Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN) – tabela 1. Każdą reakcję przeprowadzono dwukrotnie. Rozdział produktów reakcji PCR-RAPD prowadzono w 2% żelu agarozowym. Jako marker wielkości mas cząsteczkowych zastosowano GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Litwa).

Tabela 1. Charakterystyka starterów wykorzystanych w reakcji PCR-RAPD

Table 1. Characteristics of primers used in PCR-RAPD reaction

Starter Primer	Sekwencja 5'-3', 5'-3' sequences	Liczba generowanych prażków Total number of bands	Liczba prażków polimorficznych Number of polymorphic bands	Zakres wielkości produktów Band size [bp]
A01	CAGGCCCTTC	7	1	502-1968
A07	GAAACGGGTG	9	1	269-1761
A10	GTGATCGCAG	10	2	271-1182
A11	CAATCGCCGT	8	1	250-1128
A15	TTCCGAACCC	7	0	343-1612
A19	CAAACGTCGG	5	0	372-956
B10	CTGCTGGGAC	8	3	265-2350
D12	CACCGTATCC	6	0	657-1932
E11	GAGTCTCAGG	5	0	116-1796
E19	ACGGCGTATG	11	2	105-1526
F04	GGTGATCAGG	5	0	290-815
F05	CCGAATTCCC	9	1	294-2217
F10	GGAAGCTTGG	10	2	172-1574

Metody statystyczne

Wyniki uzyskane z analiz biometrycznych opracowano statystycznie, wykorzystując program Statistica 8.0 (StatSoft, Polska). Wyrównanie w obrębie każdej z linii określono za pomocą analizy wariancji. Dla każdej z ocenianych cech oznaczono także wartości odchylenia standardowego (SD) i współczynnika zmienności (V). Zróznicowanie fenotypowe pomiędzy liniami wspólnego pochodzenia oceniono na podstawie testu istotności Scheffé'go ($\alpha = 0,05$).

Do archiwizacji i analizy elektroforogramów wykorzystano program komputerowy GenAnalyzer 2010. Dystans genetyczny obliczono korzystając ze wzoru Nei i Li [1979]. Na podstawie otrzymanych wartości wykonano analizę skupień metodą UPGMA (Unweighted Pair – Group Method with Arimethric Averages) z wykorzystaniem programu Trecon (Yves van de Peer, University of Konstanz, Niemcy).

WYNIKI I DYSKUSJA

Diploidalne regeneranty otrzymywane w kulturach pylników są zjawiskiem charakterystycznym dla rodzaju *Capsicum* [Gyulai i in. 2000, Nowaczyk i in. 2009]. Mogą one być efektem spontanicznego podwojenia liczby chromosomów w haploidalnych zarodkach lub rozwijać się z somatycznych tkanek pylnika [Vagera 1990]. W związku z tym istnieje konieczność weryfikacji ich homozygotyczności. Potwierdzenie gametofitycznego pochodzenia regenerantów możliwe jest na podstawie jednorodności fenotypowej pokolenia R_2 , otrzymanego w wyniku samozapylenia diploidalnych regenerantów [Supena i in. 2006].

W przeprowadzonym doświadczeniu ocenę wyrównania otrzymanych linii przeprowadzono na podstawie analizy wariancji najbardziej istotnych cech użytkowych roślin i owoców pokolenia R_3 . Analiza statystyczna potwierdziła jednorodność wszystkich badanych populacji DH pod względem wszystkich ocenianych parametrów roślin i owoców (tab. 2, 3). Test istotności Sheffe'go potwierdził polimorfizm między liniami wspólnego pochodzenia dla siedmiu cech w grupie linii pochodzących od mieszańca (ATZ1×PO). Spośród ocenianych linii AP cztery były czerwono-owocowe: AP1, AP2, AP15, AP40, a dwie żółto-owocowe: AP10, AP32. Linie AP1, AP2, AP15, AP32 i AP 40 charakteryzował kształt owoców typu blok, podobnie jak w przypadku linii ojcowskiej PO, zaś linia AP10 kształtem trójkątnym owoców przypominała linie mateczną ATZ1. Linie w grupie AP miały owoce o masie od 110 do 153 g i grubości perykarpu od 4,74 do 6,64 mm. Analiza statystyczna ocenianych parametrów użytkowych linii DH wykazała charakterystyczna dla cech ilościowych zmienność ciągłą. Ze względu na istotność wysokości plonowania przy ocenie wartości użytkowej linii hodowlanej na szczególną uwagę zasługiwały linie: AP10 – plonująca na poziomie formy matecznej oraz linia AP15, która przewyższała pod tym względem obie formy rodzicielskie. Owoce tych linii miały ponadto grube ściany oraz dużą zawartość suchej masy w owocni.

W grupie linii pochodzących od mieszańca (ATZ1×CDT) oceniane linie różniły się między sobą pod względem czterech z ośmiu analizowanych cech. Linie AC5 i AC7 plonowały na poziomie form rodzicielskich, miały trójkątne owoce o barwie czerwonej, średniej masie przekraczającej 100 g oraz ścianach grubości od 3,91 do 4,03 mm. Obydwie linie AC wykazały pośrednie wartości ocenianych cech użytkowych w stosunku do form rodzicielskich ATZ1 i CDT.

Ze względu na obserwowaną w doświadczeniu małą zmienność wewnątrzliniową (małe wartości CV) oraz znaczną zmienność międzyliniową badane linie DH mogą być wykorzystane w dalszej hodowli odmian populacyjnych i/lub heterozyjnej przy tworzeniu mieszańców F_1 .

Opis biometryczny cech użytkowych jest istotnym kryterium w ocenie przydatności hodowlanej, jednak nie zawsze pozwala na jednoznaczną identyfikację badanych linii. W tym celu najczęściej stosowane są molekularne analizy zróżnicowania na poziomie DNA [Sitthiwong i in. 2005, Sugita i in. 2005]. Markery RAPD zostały wcześniej wykorzystane do określenia odrębności genetycznej populacji papryki rocznej [Lanteri i in. 2003, Sitthiwong i in. 2005]. Istnieje również możliwość zastosowania tej techniki do określenia czystości nasion mieszańcowych papryki [Ilbi 2003, Portis i in. 2004], a także identyfikacji blisko spokrewnionych odmian i mieszańców *C. annuum* L. [Prasad i in. 2013].

Tabela 2. Plon, liczba i charakterystyka owoców linii rodzicielskich i pokolenia R₃ linii DH z grupy AP

Table 2. Yield, fruit number and fruit characteristic of parental lines and R₃ generation of type AP DH lines

Linia – Line	Plon owoców z rośliny per plant [g]		Liczba owoców z rośliny per plant		Masa owoców z szypułką with stalk [g]		Długość owocu [mm]	Szerokość owocu [mm]	Grubość perykarpu Pericarp thickness [mm]	Sucha masa Dry matter [%]	Liczba nasion z owocu Number of seeds per fruit
	Fruit yield per plant [g]	Fruit yield per plant [g]	Number of fruit per plant	Number of fruit per plant	Weight of fruit with stalk [g]	Weight of fruit with stalk [g]					
ATZ1	X	794 ^{abcd*}	11 ^{ab}	69 ^b	113 ^{abc}	52,0 ^f	3,69 ^b	9,45 ^{abc}	174 NS		
	SD	309	2,55	10,7	3,87	0,35	0,98	55,5	32,0%		
AP1	CV	38,9%	22,6%	15,4%	8,40%	7,40%	10,4%	185 NS			
	X	610 ^{cd}	5 ^d	153 ^{bc}	114 ^{abc}	74,0 ^{def}	5,04 ^{def}	7,67 ^{bc}	109		
AP2	SD	277	2,67	46,4	23,0	6,53	0,89	1,97	58,9%		
	CV	45,5%	49,7%	30,3%	20,1%	8,8%	17,6%	25,7%	195 NS		
AP10	X	691 ^{bed}	6 ^d	147 ^{bc}	112 ^{abc}	71,4 ^{de}	5,27 ^{def}	8,18 ^{abc}	106		
	SD	197	1,55	33,7	17,2	7,77	0,85	1,20	60,4%		
AP15	CV	28,5%	27,7%	23,0%	15,4%	10,9%	16,1%	14,7%	178 NS		
	X	844 ^{bed}	9 ^{bc}	117 ^{cd}	86,6 ^{bcde}	65,5 ^{abc}	5,02 ^{def}	9,93 ^{ab}	106		
AP32	SD	355	2,92	22,8	9,10	6,10	0,67	1,47	60,4%		
	CV	42,1%	33,7%	19,6%	10,5%	9,30%	13,3%	14,8%	178 NS		
AP40	X	1455 ^a	10 ^{abc}	150 ^{bc}	101 ^{abcd}	69,5 ^{de}	5,96 ^{bcde}	9,39 ^{abc}	55,8		
	SD	357	2,97	18,7	16,8	7,09	0,60	2,97	31,3%		
AP40	CV	24,6%	28,4%	12,4%	16,6%	10,2%	10,1%	31,6%	195 NS		
	X	560 ^{cd}	6 ^d	110 ^{cd}	92,1 ^{bcde}	62,9 ^{de}	4,74 ^{ef}	9,99 ^{ab}	104		
AP40	SD	204	1,81	34,1	11,5	10,8	0,85	2,97	53,2%		
	CV	36,4%	30,7%	31,0%	12,5%	17,2%	17,9%	31,6%	134 NS		
PO	X	598 ^{cd}	6 ^d	140 ^{bcd}	86,3 ^{de}	81,5 ^{abc}	6,64 ^{bc}	8,89 ^{abc}	77,7		
	SD	183	1,47	25,6	13,4	7,28	1,04	3,10	57,9%		
PO	CV	30,7%	28,4%	18,3%	15,6%	8,92%	15,7%	34,9%	158 NS		
	X	961 ^{bc}	5 ^d	214 ^a	96,9 ^{abcde}	90,3 ^{ab}	7,84 ^a	7,30 ^{bc}	73,9		
PO	SD	195	1,45	38,4	19,6	10,1	1,17	1,79	46,7%		
	CV	20,3%	28,4%	17,9%	20,2%	11,1%	15,0%	24,5%			

\bar{x} – średnia wartość cechy, brak istotnych różnic między wartościami, składającymi się na wartość średnią dla danej linii na poziomie $\alpha = 0,05$ /average value of trait, no significant difference between values composing mean of certain line at $\alpha = 0,05$; SD – odchylenie standardowe/standard deviation; CV – współczynnik zmienności/coefficient of variation.

* Istotne różnice między liniami: wspólnego pochodzenia na poziomie $\alpha = 0,05$ wg testu Scheffego/Significant differences between the lines of the same origin at $\alpha = 0,05$ acc. to Scheffe test.

NS – brak istotnych różnic między liniami: wspólnego pochodzenia na poziomie $\alpha = 0,05$ wg testu Scheffego/lack of significant differences between the lines of the same origin at $\alpha = 0,05$ acc. to Scheffe test.

Tabela 3. Plon, liczba i charakterystyka owoców linii rodzicielskich i pokolenia R₃ linii DH z grupy AC
 Table 3. Yield, fruit number and characteristic of parental lines and R₃ generation of AC type DH lines

Linia – Line	Plon owoców z rośliny per plant [g]	Liczba owoców z rośliny per plant	Masa owocu z szypułką Weight of fruit with stalk [g]	Długość owocu Fruit length [mm]	Szerokość owocu Fruit width [mm]	Grubość perokaru Pericarp thickness [mm]	Sucha masa Dry matter [%]	Liczba nasion z owocu Number of seeds per fruit
ATZ1	X	794 NS	11 ^{ab}	69,9 ^d	113 ^d	3,69 NS	9,45 NS	174 NS
	SD	309	2,55	10,7	9,50	0,35	0,98	55,5
	CV	38,9%	22,6%	15,4%	8,40%	7,40%	9,50%	10,4%
AC5	X	668 NS	8 ^{abc}	108 ^b	152 ^b	4,03 NS	8,05 NS	180 NS
	SD	295	4,38	29,6	18,3	0,52	1,73	84,3
	CV	44,1%	55,2%	27,3%	12,1%	13,0%	13,0%	21,6%
AC7	X	742 NS	8 ^{abc}	104 ^c	135 ^c	3,91 NS	8,12 NS	180 NS
	SD	289	4,69	26,0	25,2	0,54	1,35	81,0
	CV	38,9%	54,5%	25,1%	18,6%	13,2%	13,7%	16,6%
CDT	X	788 NS	6 ^{bc}	132 ^b	181 ^a	3,91 NS	7,84 NS	204 NS
	SD	226	1,68	22,4	23,3	1,04	2,46	34,7
	CV	28,7%	26,1%	17,0%	12,8%	12,8%	26,7%	31,4%

Objaśnienia jak pod tabelą 2/Explanations see Table 2.

W przeprowadzonym doświadczeniu do reakcji PCR-RAPD wykorzystano 13 starterów, które generowały od 5 do 11 produktów o wielkości od 250 do 2350 par zasad. Reakcje przeprowadzone z użyciem A01, A07, A10, A11, B10, E19, F05 i F10 generowały od jednego do trzech prążków polimorficznych, których identyfikacja pozwoliła na rozróżnienie i analizę pokrewieństwa wszystkich ocenianych linii DH-R₃. Stosując wzór Nei i Li [1979] w programie Treecon, obliczono współczynniki dystansu genetycznego dla badanych linii (tab. 4, 5). W obydwu grupach linii DH maksymalne wartości otrzymano dla linii wykorzystanych jako formy rodzicielskie mieszańców.

Tabela 4. Współczynniki dystansu genetycznego między androgenicznymi liniami z grupy AP i ich formami rodzicielskimi

Table 4. Coefficients of genetic distance between AP androgenic lines and their parental forms

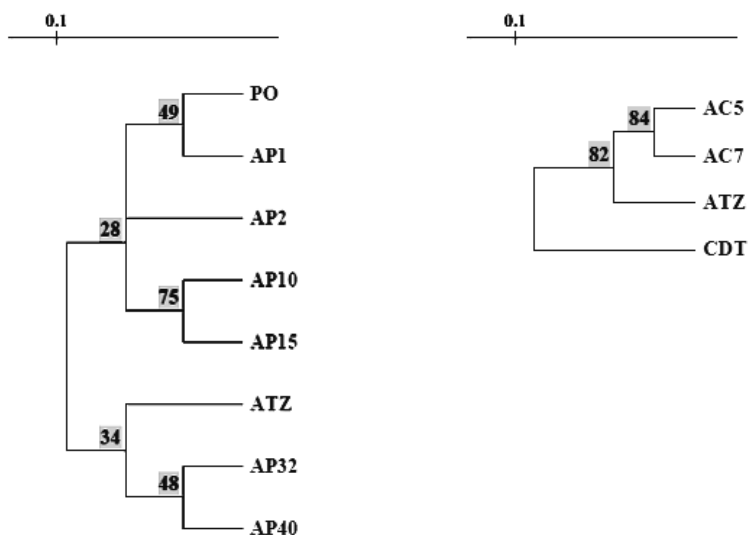
Linia – Line	PO	AP1	AP2	AP10	AP15	AP32	AP40
AP1	1,087	×					
AP2	1,087	2,151	×				
AP10	1,622	2,674	1,604	×			
AP15	2,174	3,226	2,151	0,535	×		
AP32	2,198	2,174	3,261	2,703	2,174	×	
AP40	2,198	2,174	3,261	2,703	3,261	1,099	×
ATZ1	3,825	3,784	3,784	3,226	2,703	1,639	2,732

Tabela 5. Współczynniki dystansu genetycznego między androgenicznymi liniami z grupy AC i ich formami rodzicielskimi

Table 5. Coefficients of genetic distance between AC androgenic lines and their parental forms

Linia – Line	ATZ1	AC5	AC7
AC5	2,151	×	
AC7	1,600	0,530	×
CDT	4,200	3,125	3,665

Na podstawie uzyskanych wyników opracowano dendrogramy ilustrujące stopień zróżnicowania genetycznego między formami rodzicielskimi i potomnymi (rys. 1). W grupie linii AC profil genetyczny obydwu linii DH był zbliżony i wykazywał podobieństwo do matecznej linii ATZ1. W grupie AP linie AP32 i AP40 były zbliżone profilem genetycznym do formy matecznej ATZ1, z kolei linie AP1 i AP2 do formy ojcowskiej, linii PO. Linie AP10 i AP15, wyróżnione pod względem ocenianych cech ilościowych, stanowiły wspólną grupę o najmniejszym współczynniku dystansu genetycznego.



Rys. 1. Dendrogramy przedstawiające zróżnicowanie genetyczne w grupach linii AP i AC otrzymane na podstawie analizy UPGMA

Fig. 1. Dendrograms of genetic variation in the groups of the AP and AC lines by UPGMA cluster analysis

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Opisy agromorfologiczne androgenicznych linii DH pozwoliły na wyróżnienie dwóch linii: żółto-owocowej AP10 – o trójkątnym kształcie owoców i czerwono-owocowej linii AP15 – o owocach typu blok. Obie linie pozytywnie wyróżniały się pod względem plonu owoców, grubości perykarpu i zawartości suchej masy w owocu.

2. Przeprowadzona analiza molekularna RAPD-PCR umożliwiła rozróżnienie i analizę pokrewieństwa wszystkich ocenianych linii DH-R₃ przy użyciu ośmiu markerów RAPD, które generowały od jednego do trzech prążków polimorficznych.

3. Ze względu na małą zmienność wewnątrzliniową (małe wartości CV) oraz znaczną zmienność międzyliniową badane linie DH mogą być wykorzystane w dalszej hodowli odmian populacyjnych i/lub heterozyjnej przy tworzeniu mieszańców F₁.

LITERATURA

- Germana M.A., 2011. Another culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 104, 283–300.
- Gyulai G., Gemesne J.A., Sagi Z.S., Venczel G., Pinter P., Kristof Z., Torjek O., Heszky I., Bottka S., Kiss J., Zatyko L., 2000. Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R₂ paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J. Plant Physiol.* 156, 168–174.

- Ilbi H., 2003. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. *Scientia Hort.* 97, 211–228.
- Lanteri S., Acquadro A., Quagliotti L., Portis E., 2003. RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-west Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50, 723–735.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269–5273.
- Nowaczyk P., Olszewska D., Kisiała A., 2009. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica* 168, 225–233.
- Olszewska D., Kisiała A., Niklas-Nowak A., Nowaczyk P., 2014. Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turk. J. Biol.* 38 (1), 118–124.
- Portis E., Acquadro A., Comino C., Lanteri S., 2004. Effect of farmers' seed on genetic variation of a landrace population of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-West Italy. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51, 581–590.
- Prasad B., Khan R.G., Radha T., Ravi Ch., Venkataiah P., Subhash K., Reuben T.Ch., 2013. DNA profiling of commercial chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr. J. Biotechnol.* 12 (30), 4730–4735.
- Sitthiwong K., Matsui T., Sukprakarn S., Okuda N., Kosugi Y., 2005. Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accessions by RAPD analysis. *Biotechnology* 4 (4), 305–309.
- Sugita T., Konoshita T., Kawano T., Yuji K., Yamaguchi K., Nagato R., Shimizu A., Chen L., Kawasaki S., Todoroki A., 2005. Rapid construction of a linkage map using high-efficiency genome scanning/AFLP and RAPD, based on an intraspecific, doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. *Breeding Science* 55, 287–295.
- Supena E.D.J., Suharsono S., Jacobsen J., 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 Rep.* 25 (1), 1–10.
- Śliwińska E., 2003. Cell cycle and germination of fresh, dried and deteriorated sugarbeet seeds as indicators of optimal harvest time. *Seed Sci. Res.* 13, 131–138.
- Thul S.T., Lal R.K., Shasany A.K., Darokar M.P., Gupta A.K., Gupta M.M., Verma R.K., Khanuja S.P.S., 2009. Estimation of phenotypic divergence in a collection of *Capsicum* species for yield-related traits. *Euphytica* 168, 189–196.
- Vagera J., 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): In vitro induction of haploids. [W:] *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Haploids in Crop Improvement I*. Y.P.S. Bajaj (red.) Springer-Verlag, Berlin, 12, 374–392.
- de Vault D., Chambonnet T., Pochard E., 1981. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.) amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie* 1, 859–864.

AGRO-MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ASSESSMENT OF DOUBLED HAPLOID LINES OF PEPPER (*CAPSICUM ANNUUM* L.)

Summary. The aim of the research was the agro-morphological and molecular analysis of eight DH-R₃ lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). The following lines of *C. annuum* were used in the research – three parental forms: ATZ1, PO, CDT, and R₃ generation of DH lines obtained in anther culture of two hybrids (ATZ1×PO)F₁: lines AP1, AP2, AP10, AP15, AP32, AP40 and (ATZ1×CDT)F₁: lines AC5, AC7. The seeds of R₁ androgenic plants were used to obtain two further generations of regenerants. The assessment of the homogeneity

of the DH-R₃ lines was performed with the use of analysis of variations of the important biometrical traits of plants and fruits. Analysis of variance proved homogeneity of all the examined DH populations and Scheffé's test confirmed polymorphism between the lines of a common origin. The following lines deserved special attention: AP10 line – yielding at the level of the maternal form, and AP15 line, which surpassed both parental forms regarding yield level. Additionally, fruits of these two lines were characterized by thick pericarp and high content of dry matter. As biometrical characteristic of the agronomical traits do not always allow a clear identification of androgenic lines, a RAPD analysis was also performed. Genomic DNA of the tested lines was isolated from young leaves of healthy, adult plants. PCR was conducted according to Ilbi. 13 starters were used, which generated between 5 and 11 products of the size varied between 250 and 2350 base pairs. Reactions conducted with the use of the following starters: A01, A07, A10, A11, B10, E19, F05 and F10 generated between one and three polymorphic stripes, which allowed to distinguish and assess the similarity of all the examined lines. The coefficient of genetic distance for the tested lines was calculated using Nei and Li formula in Treecon. Dendrograms illustrating genetic diversity between the lines revealed similar genetic profile of both tested DH lines in the AC line group that displayed resemblance to the maternal ATZ1 line. In the AP group, AP32 and AP40 lines had a similar genetic profile to the maternal ATZ1 form, while AP1 and AP2 lines resembled the paternal form, PO line. AP10 and AP15 lines, previously distinguished with regards for the biometrical traits, comprised a common group of the lowest coefficient of genetic distance.

Key words: *Capsicum* spp., androgenesis, DH lines, quantitative characteristics, RAPD