

Regeneracja roślin papryki (*Capsicum annuum* L.) w kulturach in vitro

Andrzej Borychowski, Monika Delis, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166, 01-787 Warszawa

Słowa kluczowe: papryka, regeneracja roślin, regulatory wzrostu, organogeneza, somatyczna embriogeneza, kultury pylników, protoplasty

Wstęp

Papryka (*Capsicum annuum* L.) należy do rodziny *Solanaceae*. Uważana jest za gatunek ważny ekonomicznie. Papryka słodka (wielkoowocowa) wykorzystywana jest do bezpośredniego spożycia oraz do przetwórstwa. Owoce papryki ostrej (drobnoowocowej) są stosowane jako przyprawy i do celów leczniczych. Specyficzny smak papryki ostrej uwarunkowany jest wysoką zawartością kapsaicyny. Owoce papryki są bogate w kwas askorbinowy, witaminy B₁, B₂ i E, prowitaminę A i karotenoidy oraz w kwasy organiczne (np. kwas cytrynowy, jabłkowy).

Papryka jest podatna na infekcje grzybowe i wirusowe. Hodowla odpornościowa jest długa i pracochłonna. Otrzymywanie odmian odpornych można przyspieszyć, stosując techniki transformacji genetycznej. Wprowadzenie transgenów powodujących podniesienie odporności na patogeny może skrócić okres otrzymywania materiału wyjściowego do hodowli. W procesie transgenezy można też wprowadzić geny z organizmów, które nie krzyżują się z *Capsicum annuum*.

Efektywna metoda regeneracji roślin w kulturach in vitro jest podstawowym warunkiem opracowania systemu transformacji. Mimo wielu wysiłków przykłady uzyskania transgenicznych roślin papryki nie są liczne [10, 12, 35, 36, 41, 60, 62]. Uważa się, że powodem opóźnienia w uzyskiwaniu transgenicznych roślin papryki jest brak przydatnej do celów transformacji wydajnej metody regeneracji [9, 16, 19, 38]. Warto przeprowadzić analizę wyników licznych prac i określić najlepsze warunki regeneracji roślin z różnych typów eksplantatów papryki.

Eksplantaty liścieniowe, hipokotylowe i liściowe

Rodzaj eksplantatu i różnice odmianowe

Do doświadczeń, których celem jest opracowanie efektywnej metody regeneracji roślin papryki, wykorzystywano najczęściej eksplantaty liścieniowe, hipokotylowe lub liściowe. Pobiera się je z młodych siewek papryki. Siewki takie otrzymuje się, umieszczając odkażone nasiona na ubogiej w składniki mineralne pożywce agarowej lub na sterylnej bibule filtracyjnej nasączonej wodą.

W wielu doświadczeniach próbowano określić, który z wymienionych wyżej eksplantatów ma wyższy potencjał morfogenetyczny [11, 16, 24, 34, 61]. Christopher i Rajam [11] wykorzystali eksplantaty liścieniowe, hipokotylowe i liściowe, jednak najwięcej rozwijających się pędów uzyskali z eksplantatów liściowych. Zhu i in. [62] pobierali do transformacji tkanki pochodzące z różnych organów trzytygodniowych siewek. Najwyższą efektywność indukcji pąków i późniejszego rozwoju roślin uzyskali dla eksplantatów pochodzących z młodych liści, natomiast eksplantaty hipokotylowe były najmniej przydatne do regeneracji. W doświadczeniu, w którym próbowano zregenerować pędy z eksplantatów liściowych i liścieniowych pochodzących z polskiej odmiany Bryza, zaobserwowano, że na tych samych pożywkach pąki pędowe formowały się liczniej na liścieniach niż na eksplantatach liściowych. Zaindukowane pąki rozwijały się głównie w struktury liściopodobne. Wyższy potencjał morfogenetyczny liścieni niż liści można tłumaczyć tym, że liścienie są bogatszym źródłem substancji odżywczych [24]. Z innych publikacji wynika, że najwyższą efektywność organogenezy pąków pędowych można uzyskać z eksplantatów hipokotylowych i liścieniowych [16, 34, 61].

Primordia powstawały na rozrastającej się części bazalnej eksplantatów hipokotylowych i różnicowały się wokół powierzchni cięcia, która miała bezpośredni kontakt z pożywką [17, 20]. Podobnie eksplantaty liścieniowe wytwarzały primordia pędów w miejscu cięcia przylegającym do pożywki. Makroskopowo widoczne były deformacje eksplantatów i wyraźnie jaśniejsze miejsca cięcia, na których pojawiły się ciemniejsze punkty primordiów [3, 9, 21, 46]. Korzenie młodych siewek uznano za materiał, z którego regeneracja pąków pędowych jest niemożliwa. Na eksplantatach korzeniowych nie obserwowano tworzenia primordiów i kalusa, a jedynie rozwój nowych korzeni. Liczba powstających korzeni zależna była od stężenia auksyn w pożywce. Po upływie około jednego miesiąca korzenie zaczynały brązowieć i obumierały [16].

Na właściwy przebieg organogenezy ma wpływ wiek roślin, z których pobiera się eksplantaty. Ogólnie można stwierdzić, że wraz ze starzeniem się roślin następuje obniżenie zdolności do formowania pąków i pędów [53, 57]. Gdy do doświadczenia wykorzystano siewki w fazie zakrzywionego hipokotyła (9 dni od wyłożenia nasion na pożywkę), wówczas uzyskano najwyższy procent wytworzonych pąków i pędów na eksplantatach hipokotylowych [53].

Zauważono różnice w zdolności do organogenezy dla poszczególnych segmentów tego samego organu. Jeżeli liście i liścienie papryki podzielono na trzy części: górną (dystalną), środkową i dolną (proksymalną), to najwyższą liczbę formujących się pąków obserwowano na segmencie środkowym. Wraz ze wzrostem koncentracji BAP (6-benzyloaminopuryna) w pożywce otrzymano różnicowanie pąków w dużo większej liczbie eksplantatów na dystalnych częściach liści i liścieni [18]. W wypadku podziału liścieni na dwie części, dystalną i proksymalną, większą efektywność organogenezy pąków przybyszowych i korzeni zanotowano dla części proksymalnej [4, 23]. Różnice w zdolności do organogenezy poszczególnych segmentów opisano również dla eksplantatów hipokotylowych, które cięto na sześć części. Po dwóch tygodniach kultury pierwsze dwa segmenty produkowały primordia pędowe przy słabym wzroście kalusa i korzeni, na segmentach środkowych występowała dominacja korzeni i kalusa, natomiast pędy rozwijały się rzadko. Dolne partie hipokotyła (dwa ostatnie segmenty) tworzyły wiele korzeni i jednocześnie tkankę kalusową. Fakt ten autorzy wytłumaczyli zróżnicowanym poziomem endogennych auksyn w poszczególnych segmentach hipokotyła [20].

Czynnikiem mającym istotny wpływ na efektywność regeneracji jest odmiana lub forma botaniczna. Każda odmiana charakteryzuje się właściwościami, do których należy także odpowiedź morfogenetyczna w kulturach *in vitro* [46]. Nie zawsze pobranie takiego samego eksplantatu z różnych genotypowo roślin w obrębie tego samego gatunku i umieszczenie w tych samych warunkach stymulujących różnicowanie i regenerację daje ten sam wynik [4].

Jacobs i Stephens [32] badali 63 formy i odmiany i uzyskali regenerację roślin dla jedenastu. Rogozińska i Tobolewska [55] w badaniach nad regeneracją papryki wykorzystywały sześć odmian. Pomimo zastosowania takich samych warunków kultury wystąpiły znaczne różnice w odpowiedzi morfogenetycznej eksplantatów badanych odmian. Najwyższą wydajność regeneracji uzyskano dla odmiany Bryza. Szasz i in. [58] badali zdolność do regeneracji 17 form. Regenerację pędów z eksplantatów hipokotylowych uzyskali dla większości z nich. W wypadku eksplantatów liścieniowych regenerację uzyskano jedynie dla dwóch odmian, a po zastosowaniu pożywki z TDZ dla czterech.

Ezura i in. [17] opisali system regeneracji roślin papryki na pożywkach bez regulatorów wzrostu. Otrzymanych wyników nie udało się powtórzyć w wypadku innych odmian papryki. Fakt ten wytłumaczono różnicami odmianowymi [52].

Pożywki i regulatory wzrostu

Badania wpływu regulatorów wzrostu i ich stężeń na indukowanie procesu różnicowania eksplantatów i rozwój roślin prowadzi się najczęściej na podstawowej pożywce MS [42]. W przeprowadzonym doświadczeniu Lim i in. [36] zastosowali pożywkę MS z uzupełnieniem witaminowym opracowanym dla pożywki B5 [22]. W

Tabela 1. Wyniki regeneracji z eksplantatów liścieniowych, hipokotylowych i liściowych papryki (od 1994 roku) na podstawie wybranych (dobrze udokumentowanych) doświadczeń

Odmiana/forma	Eks-plantat	Substancję wzrostowe [mg · dm ⁻³]	Regene-racja	Rok/źródło
<i>Capsicum annuum</i> — Bryza	C	5 BAP + 0,2 IAA	P	1994 [23]
<i>Capsicum annuum</i> — Bryza	C*, L	5–10 BAP + 1 IAA	P → PE	1994 [24]
<i>Capsicum annuum</i> — Kujawianka	C	2 BAP	P	1995 [21]
<i>Capsicum annuum</i> — Sivriya, <i>C. baccatum</i> v. <i>pendulum</i>	C*, H	1–1,5 TDZ 1–1,5 TDZ + 0,5 IAA	P	1995 [48]
<i>Capsicum annuum</i> — Cuneo, Nocera, Suptol, Rapiers F ₁ (27 odmian)	C, H*	2–5 BAP + 0,3–1 IAA	P → PE	1995 [58]
<i>Capsicum annuum</i> — 5 odmian <i>C. baccatum</i> , <i>C. praetermissum</i>	C, H, L*	5 BAP 3 BAP + 1 IAA	P → PE	1996 [11]
<i>Capsicum annuum</i> — Jolo Wonder, Early California Wonder, Jupiter, Liberty Bell i inne	C, H, L	2 lub 10 BAP + 1 IAA	P	1996 [38]
<i>Capsicum annuum</i> — Sweet Banana	H	5 BAP	P	1996 [52]
<i>Capsicum annuum</i> chilli — Mulato Bajio	H		P → PE	1996 [53]
<i>Capsicum annuum</i> — Bryza	C*, H* (pn)	10 BAP + 0,1 NAA	P → PE	1996 [54]
<i>Capsicum annuum</i> — Zhong Hua #2	H, L*	8 BAP + 2 IAA	P	1996 [62]
<i>Capsicum annuum</i> — Pusa Jwala	C	0,5 TDZ; 0,5 IAA	P → PE	1998 [41]
<i>Capsicum annuum</i> chilli — Holiday Cheer, Fiesta	C	5–7 BAP + 2 PAA	P → PE	1999 [30]

C — liścienie; H — hipokotyle; L — liście; P — pąki przybyszowe; PE — pędy, rośliny; pn — połówki nasion; * najlepiej regenerujący eksplantat.

wypadku regeneracji papryki na pożywce MS, niezawierającej regulatorów wzrostu, nie obserwowano rozwoju pąków pędowych [9] lub tylko niewielkie powiększenie eksplantatów [23].

Ważnym składnikiem pożywek regeneracyjnych są cukry. Najczęściej stosuje się sacharozę. Dostarczenie sacharozy eksplantatom hipokotylowym jest szczególnie ważne w ciągu pierwszych dni kultury, kiedy następuje indukcja primordiów pędu. Prowadzenie kultury eksplantatów papryki przez 72 godziny na pożywce bez sacharozy powodowało zmniejszenie zdolności do inicjacji pąków. Po 8 dniach bez sacharozy traciły zdolność do regeneracji [52]. Stężenie sacharozy w pożywkach wynosiło 3% [5, 30, 49, 52]. Według niektórych autorów, w procesie regeneracji pędów papryki glukoza jest lepszym źródłem węgla niż sacharoza [29, 37, 49].

Ważnym składnikiem pożywek, na których następuje indukcja rozwoju primordiów, są substancje wzrostowe. Pod wpływem cytokinin i auksyn następowała indukcja primordiów, która prowadziła do rozwoju struktur liściowych i pędowych (tab. 1).

Dane dotyczące składu substancji wzrostowych stosowanych w doświadczeniach wcześniejszych, zebrane w pracy przeglądowej Fari i Andrasfalvy [19], jak również późniejsze, zestawione w tabeli 1, wskazują, że najlepsze wyniki otrzymywano stosując BAP (6-benzyloaminopuryna) i IAA (kwas indoliloctowy). W obecności tych hormonów wzrostu eksplantaty miały zdolność do inicjacji pędów i korzeni przy ograniczonym wzroście kalusa [56]. W początkowych badaniach nad regeneracją papryki Gunay i Rao [27] stwierdzili, że optymalne koncentracje to $2 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $1 \text{ mg IAA} \cdot \text{dm}^{-3}$. Wzrost stężenia auksyny (do $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) powodował zahamowanie rozwoju pąków i jednocześnie stymulację wzrostu tkanki kalusowej [56]. Zauważono też, że BAP w wyższych koncentracjach, tj. $3\text{--}7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, wpływała na wytwarzanie większej ilości pąków pędowych [16, 56]. Jeszcze wyższe stężenie tego hormonu ($10, 15, 25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) częściowo lub całkowicie hamowało ryzogenezę, a także obniżało procentowy udział eksplantatów z pąkami pędowymi, szczególnie przy niskich stężeniach IAA ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) [23]. Stwierdzono również, że $10 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$ w porównaniu z $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ miało wpływ na indukcję większej liczby pąków, ale znacznie mniejszych rozmiarów [5, 38].

Aktywność indukcyjną poszczególnych cytokinin można przedstawić w następującej kolejności: BAP, kinetyna, zeatyna, 2iP (6- γ,γ -dimetyloalliloaminopuryna) [53]. Porównując wpływ kinetyny i BAP stwierdzono, że pierwszy z tych regulatorów stymulował przede wszystkim wzrost kalusa, natomiast drugi organogenezę [27, 53]. Kinetyna wpływała na organogenezę w nieznacznym stopniu [3, 27, 53, 56]. Autorzy publikacji dotyczących regeneracji papryki wykazali, że BAP jest niezbędne do zainicjowania rozwoju pąków i pędów [46, 56]. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych dla odmiany Sweet Banana stwierdzono, że BAP była niezbędna do formowania pędów z eksplantatów hipokotylowych [51]. BAP była potrzebna do indukcji organogenezy pędów w pierwszych tygodniach kultury, ale okres przebywania eksplantatów na pożywce indukcyjnej zależał od odmiany. Na pożywce zawierającej zeatynę pąki pędowe były formowane sporadycznie i poprzedzone wzrostem kalusa [27]. W doświadczeniach z 2iP obserwowano tylko biało-zielony kalus [45]. Odmienne wyniki uzyskała Binzel i in. [5] — na pożywkach z zeatyną lub 2iP obserwowali więcej formujących się pąków pędowych niż na pożywkach z dodatkiem kinetyny lub BAP.

Związkiem o działaniu podobnym do cytokinin jest tidiazuron (TDZ). Pozytywny wpływ tidiazuronu na wydajność regeneracji obserwowano w kulturach grochu [7], fasoli [40], tytoniu [25] i wielu innych. W wypadku papryki wykazano, że eksplantaty liścieniowe pewnych odmian nie wykazywały indukcji po dodaniu BAP, a wytwarzały pędy po traktowaniu tidiazuronem [57]. Do regeneracji pędów papryki z eksplantatów liścieniowych Manoharan i in. [41] wykorzystali pożywki zawierające IAA i BAP lub TDZ. Najwięcej pąków pędowych formowało się na pożywkach z tidiazuronem, a udział tkanki kalusowej był niższy niż na pożywce z BAP.

Ryzogeneza następowała po dodaniu do pożywki IAA [3, 16, 21]. Optymalna pożywka dla procesu ryzogenezy to MS zawierająca $0,5 \text{ mg IAA} \cdot \text{dm}^{-3}$ [16, 21] lub $1 \text{ mg IAA} \cdot \text{dm}^{-3}$ [24]. Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) hamował rozwój korzeni, powodował powstawanie luźnego kalusa na powierzchni cięcia eksplantatu. W obecności BAP i 2,4-D eksplantaty wytwarzały zbity kalus przy jednoczesnym hamowaniu organogenezy pędów i korzeni [45]. Dodanie do pożywki, zawierającej IAA z BAP, gibereliny (GA_3) powodowało silny wzrost kalusa. Zastąpienie IAA inną auksyną, np. NAA (kwas α -naftaleno-octowy), hamowało organogenezę całkowicie [2, 27] lub częściowo [45], a sprzyjało wzrostowi kalusa. Husain i in. [30] porównywali wpływ dwóch auksyn, IAA i PAA (kwas fenylooctowy), na indukcję pąków i rozwój roślin papryki. Pąki indukowane na pożywce zawierającej BAP i IAA były często zniekształcone i nie rozwijały się w normalne pędy. Pod wpływem BAP i PAA następował wzrost efektywności regeneracji, przejawiający się zwiększoną liczbą pąków, które następnie rozwijały się w normalne rośliny.

W początkach lat dziewięćdziesiątych ukazały się prace, w których wskazywano na pozytywny wpływ azotanu srebra na organogenezę w kulturze tkanek papryki. Jacobs i Stephens [32] testowali pożywki zawierające azotan srebra ($10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), uzyskując różnicowanie pędów i jednocześnie formowanie kalusa. Lim i in. [36] stwierdzili, że po dodaniu do pożywki AgNO_3 ($5\text{--}10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) wydajność regeneracji wzrastała o około 10%. Hyde i Phillips [31] uznali azotan srebra za niezbędny do indukcji morfogenezy pędów z eksplantatów liścieniowych oraz kontynuacji wzrostu odróżnicowanych organów.

Indukowanie somatycznej embriogenezy i kultury pylnikowe

System regeneracji roślin papryki w kulturach *in vitro* opiera się głównie na formowaniu pąków przybyszowych i rozwoju pędów w wyniku organogenezy z eksplantatów. Najwięcej publikacji dotyczy tego typu kultur.

Dobrze opracowany system somatycznej embriogenezy mógłby być wykorzystany dla celów transformacji. Somatyczna embriogeneza polega na rozwoju bipolarnych struktur z komórek somatycznych. Somatyczne zarodki można uzyskiwać z kalusa lub bezpośrednio z eksplantatów z pominięciem fazy kalusa [1, 28]. Na pożywce MS zawierającej 2,4-D ($4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), TDZ ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i wysokie stężenia sacharozy (6–10%) somatyczne zarodki formowały się bezpośrednio na wierzchołkach zarodków zygotycznych. Badania histologiczne wykazały, że embriogeneza drugorzędowa następowała bezpośrednio z pierwszorzędowych somatycznych zarodków. Różnicowanie zarodków było niezsynchronizowane [6]. Harini i Sita [28] również wykazali, że formowanie i rozwój zarodków somatycznych może zachodzić na pożywkach zawierających 1–5 2,4-D $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i 8–10% sacharozy. Przy niższych stężeniach sacharozy nie następowała inicjacja zarodków somatycznych. Według Fari [18], najbar-

dziej odpowiednia dla kultur zarodków była pożywka zawierająca $0,1 \text{ mg BAP} \cdot \text{dm}^{-3}$, $0,5 \text{ mg IAA} \cdot \text{dm}^{-3}$ i $0,5 \text{ mg GA}_3 \cdot \text{dm}^{-3}$.

Buyukalace i Mavituna [8] opisali regenerację roślin papryki z embriogenicznego kalusa, stosując pożywki płynne zawierające m.in. 2,4-D i 3% sacharozy.

Na podstawie własnych doświadczeń (nieopublikowane) jak również najnowszych doniesień [59] należy stwierdzić, że brak jest procedury prowadzącej do efektywnej i powtarzalnej somatycznej embriogenezy u papryki.

Kultura pylników papryki na sztucznych pożywkach jest dobrze poznana i stosowana w wielu ośrodkach [15, 33, 39]. Można zapytać, czy pylniki nie byłyby dobrym eksplantatem do transformowania i regeneracji?

Technika kultur pylnikowych opiera się na indukcji sporofitycznego rozwoju komórek gametofitu w warunkach *in vitro*. W wyniku kultury pylników uzyskuje się haploidalne bądź diploidalne rośliny (spontaniczna diploidyżacja lub regeneracja z komórek somatycznych pylnika).

Z licznych publikacji wiadomo, że istotny wpływ na efektywność kultur pylnikowych mają warunki wegetacji roślin donorowych. Temperatura i wiek roślin wpływały na różnicowanie zarodków z pylników papryki. Temperatura w fitotronie lub szklarni powinna wynosić 26°C , szczególnie w ostatnim tygodniu przed pobraniem pylników. Natomiast długość dnia nie miała znaczenia dla procesu androgenezy [33]. Dla pylników zebranych w maju lub w czerwcu regeneracja była bardziej wydajna niż poza naturalnym sezonem wegetacji [44]. Ważna była również faza rozwoju pąka kwiatowego i odpowiadająca temu faza rozwoju mikrospor. Za kryterium przyjmowano podobną długość płatków korony i działek kielicha, odpowiada to późnej fazie jądrowej mikrospory [26, 39].

Warunkiem większej wydajności regeneracji było umieszczenie w pierwszych 2–8 dniach kultur pylnikowych w ciemności, w temperaturze 35°C [15]. Najczęściej były stosowane pożywki (C i R) opracowane przez Dumasa de Vaulx i in. [15]. Ich modyfikacje dotyczyły głównie składu i stężenia regulatorów wzrostu. Najczęściej stosowane substancje wzrostowe stymulujące androgenezę to 2,4-D i kinetyna. Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy może indukować regenerację form haploidalnych [44]. Niższą efektywność regeneracji w kulturach pylnikowych papryki uzyskano na pożywce zawierającej BAP, aczkolwiek w wypadku dwóch odmian zarodki formowały się jedynie w obecności BAP [49].

Opracowane techniki kultur pylników papryki pozwalają uzyskiwać rośliny haploidalne ze zmienną wydajnością [14, 44]. Ltifi i Wenzel [39] otrzymali średnio 3,49 roślin papryki na 100 pylników. Z ośmiu form wykorzystanych w tym doświadczeniu zdolność do regeneracji wykazało sześć. Qin i Rotino [50] uzyskiwali 1,3–20 roślin na 100 pylników. Zależność odmianowa, długi okres regeneracji roślin, a także konieczność zapewnienia optymalnych warunków wzrostu roślinom — dawcom pylników — powoduje, że pylniki nie są stosowane jako eksplantaty do transformacji papryki.

Kultury protoplastów

Do uzyskiwania regenerantów papryki w kulturach *in vitro* zastosowano także kultury protoplastów. Protoplasty wielu gatunków roślin były wykorzystywane do transformacji. Można postawić pytanie, czy protoplasty papryki nie byłyby lepszym obiektem do transformacji niż eksplantaty siewkowe.

Materiałem do izolacji protoplastów były tkanki liści [43, 54] lub pędów [13]. W celu wywołania plazmolizy komórek tkankę inkubowano w roztworze mannitolu. Diaz i in. [13] stosowali stałe stężenie mannitolu dla kilku badanych linii *Capsicum*. Natomiast Murphy i Kyle [43] stwierdzili, że stężenie roztworu mannitolu powinno być dobrane indywidualnie dla każdej odmiany, a nawet rodzaju tkanki. Jednym z etapów izolacji protoplastów było trawienie w roztworze enzymów celulazy (1%) i macerazy (0,25%) [13] lub celulazy (1%), macerazy (1%) i pektolizazy (0,25%) [43]. Pektolizaza znacząco skraca czas potrzebny do uwolnienia komórek, a brak tego enzymu w roztworze obniża jakość protoplastów [43].

W celu zainicjonowania podziałów komórkowych protoplasty powinno umieścić się pomiędzy warstwami agaru lub agarozы [13, 55]. W trakcie prowadzenia kultury do podłoża uwalniane są związki fenolowe, które mogą uniemożliwiać podziały i rozwój protoplastów. Obecność agarozы obniża zawartość polifenoli [13]. Diaz i in. [13] uzyskali regenerację roślin dla jednej z czterech badanych odmian.

Na podstawie wcześniejszych publikacji oraz publikacji cytowanych wyżej można stwierdzić, że prace doświadczalne nad kulturą protoplastów nie dały efektywnej procedury regeneracji roślin. Oznacza to, że obecnie ten system nie powinien być polecany do produkcji roślin transgenicznych papryki.

Podsumowanie

W ciągu ostatnich kilkunastu lat ukazało się wiele publikacji, w których autorzy donoszą o próbach opracowania metody regeneracji roślin papryki w kulturach *in vitro*. System regeneracji papryki opiera się głównie na formowaniu pąków przybyszowych i rozwoju pędów z eksplantatów liścieniowych, hipokotylowych i liściowych. Znaczący wpływ na organogenezę pędów z eksplantatów siewkowych ma zawartość substancji wzrostowych w pożywce. Także czynniki endogenne, takie jak odmiana i typ eksplantatu, mają istotny wpływ na efektywność tego procesu [11, 17, 46, 49, 55, 58]. Tylko w w niewielkich doświadczeniach otrzymano rośliny z wybranych odmian [4, 11, 31, 57, 61].

Znane są również próby regeneracji roślin papryki w kulturach protoplastów [13, 56], kulturach pylników [15, 33] oraz w wyniku somatycznej embriogenezy [6, 28].

Jednak, jak dotąd, nie opisano wydajnego i uniwersalnego systemu, który z powodzeniem można by zastosować dla większości odmian. Dlatego też istnieje niewiele publikacji dotyczących transformacji papryki zakończonej pozytywnym wynikiem.

Uzyskano transgeniczne rośliny papryki odporne na herbicydy [60], rośliny z wprowadzonym genem CMV-CP, warunkującym odporność na wirusa mozaiki ogórka [62], lub genem ADA (Mouse Adenosine Deaminase) [35, 36]. Poza tym wprowadzono gen reporterowy uid A, a testy histochemiczne wykazały aktywność tego genu w organach zregenerowanych roślin [10, 12, 41].

Literatura

- [1] Agrawal S., Chandra N. 1983. Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. *mathania*. *Current Science* 52: 13.
- [2] Agrawal S., Chandra N., Kothari S.L. 1988. Shoot tip culture of pepper for micropropagation. *Current Science* 57: 24.
- [3] Agrawal S., Chandra N., Kothari S.L. 1989. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *mathania*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 47–55.
- [4] Arroyo R., Revilla M.A. 1991. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports* 10: 414–416.
- [5] Binzel M.L., Sankhla N., Sangeeta J., Daksha S. 1996. In vitro regeneration in chille pepper (*Capsicum annuum* L.) from „half-seed explants”. *Plant Growth Regulation* 20: 287–293.
- [6] Binzel M. L., Sankhla N., Sangeeta J., Daksha S. 1996. Induction of direct somatic emryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* 15: 536–540.
- [7] Böhmer P., Meyer B., Jacobsen H.J. 1995. Thidiazuron-induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus. *Plant Cell Reports* 15: 26–29.
- [8] Buyukalace S., Mavituna F. 1996. Somatic emryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46(3): 227–235.
- [9] Christopher T., Rajam M.V. 1994. In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38: 25–29.
- [10] Christopher T., Rajam M.V. 1995. *Agrobacterium* — mediated genetic transformation of red pepper (*Capsicum annuum*). *In Vitro* 31(4): 225.
- [11] Christopher T., Rajam M.V. 1996. Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 245–250.
- [12] Christopher T., Rajam M.V. 1997. In vitro plant regeneration and *Agrobacterium* — mediated transformation in red pepper. *In Vitro* 33, 3, Pt 2, 37A.
- [13] Diaz I., Moreno R., Power J.B. 1988. Plant regeneration from protoplasts *Capsicum annuum*. *Plant Cell Reports* 7: 210–212.
- [14] Dumas de Vault R 1990: Haploidy and pepper breeding: a review. *Capsicum Newsletter* 8–9: 13–17.
- [15] Dumas de Vault R., Chambonnet D., Pochard E. 1981 Culture in vitro d’antheres de piment (*Capsicum annuum* L.): amelioration des taux d’obtention de plantes chez differents genotypes par des traitements a +35°C. *Agronomie* 1(10): 859–864.

- [16] Ebida A.I., Hu A.C. 1993. In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports* 13: 107–110.
- [17] Ezura H., Nishimiya S., Kasumi M. 1993. Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* 12: 676–680.
- [18] Fári M. 1986. Pepper (*Capsicum annuum* L.). W: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 2: Crops (Ed. By Y. P. S: Bajaj) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 345–362.
- [19] Fári M., Andrasfalvy A. 1994. Regeneration and cloning of pepper (*Capsicum* spp.) in vitro: a review. *Hort. Sci.* 26(2): 9–19.
- [20] Fári M., Czako M. 1981. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 15: 207–213.
- [21] Fraś A., Nowak K. 1995. Response of cotyledon explants of *Capsicum annuum* L. cv. Kujawianka to chosen plant growth regulators in in vitro culture. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64: 5–11.
- [22] Gamborg O., Miller R., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151–158.
- [23] Gatz A. 1994. Tworzenie kalusa i organogeneza z liścieni papryki w kulturach in vitro. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 414: 379–386.
- [24] Gatz A., Rogozińska J. 1994. In vitro organogenetic potential of cotyledon and leaf explants of *Capsicum annuum* L., cv. Bryza. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63: 255–258.
- [25] Gill R., Saxena K. 1993. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports* 12: 154–159.
- [26] Gonez O., Chambonnet D. 1992. In vitro androgenesis in Cuban F₁ hybrids of sweet pepper. *Capsicum Newsletter* 11: 26.
- [27] Gunay A.L., Rao P.S. 1978. In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Science Letters* 11: 365–372.
- [28] Harini I., Sita L. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 89: 107–112.
- [29] Hilliard J.C., Stephenes C.T. 1989. Factor affecting the formation of shoot primordia from primary leaf explants of *Capsicum annuum* cultivars. *In Vitro* 25(3), streszczenie 28A.
- [30] Husain S., Jain A., Kothari S.L. 1999. Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Reports* 19: 64–68.
- [31] Hyde C., Phillips G. 1996. Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro* 32: 72–80.
- [32] Jacobs J. L., Stephens C.T. 1990. Factors affecting the regeneration of pepper (*Capsicum annuum* L.). *HortScience* 25(9): 1120.
- [33] Kristiansen K., Andersen S.B. 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on another culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67: 105–109.
- [34] Lee S.P., Chen T.H., Fuchigami L.H. 1988. In vitro organogenesis of bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *HortScience* 23(3): 786.
- [35] Lim H.T., Lee K., Yoo Y.S., Yang D.C. 1996. Plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) and expression of Mouse Adenosine Deaminase (ADA) gene via *Agrobacterium* — mediated transformation. *HortScience* 31(4): 572.

- [36] Lim H.T., Lee G.Y., You Y.S., Park E.J., Song Y.N. 1999: Regeneration and genetic transformation of hot pepper plants. *Acta Hort.* 483: 387–396.
- [37] Linderman S.D., Neidz R.P., Murakishi H.H. 1988. Plant regeneration of four *Capsicum* species from leaf explants. *In Vitro* 24, 3, Pt 2, 40 A.
- [38] Liu W., Parrott W.A., Hildebrand D.F., Collins G.B., Williams E.G. 1990. *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Reports* 9: 360–364.
- [39] Ltifi A., Wenzel G. 1994. Anther culture of hot and sweet (*Capsicum annuum* L.): influence of genotype and plant growth temperature. *Capsicum Newsletter* 13: 74–77.
- [40] Malik K., Saxena P. 1992. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta* 186: 384–389.
- [41] Manoharan M., Sree Vidya C.S., Lakshmi Sita G. 1998. *Agrobacterium* — mediated genetics transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala). *Plant Sci.* 1131: 77–83.
- [42] Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473–479.
- [43] Murphy J.F., Kyle M.M. 1994. Isolation and viral infection of *Capsicum* leaf protoplasts. *Plant Cell Reports* 13: 397–400.
- [44] Nowaczyk P., Nowaczyk L. 2001. Źródła haploidów w rodzaju *Capsicum*. *Folia Hort.* 13/1A, 31–38.
- [45] Ochoa-Alejo N., Garcia-Bautista M.A.R. 1990. Morphogenetic responses in vitro of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) to growth regulators. *Turrialba* 40: 3, 311–318.
- [46] Ochoa-Alejo N., Ireta-Moreno L. 1990. Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Hort.* 42: 21–28.
- [47] Pundeva R., Siemeonova N.V. 1993. In vitro morphogenetic response of two *Capsicum* species. *In Vitro* 29: 3.
- [48] Pundeva R., Simeonova N.V., Evtimova Z.S. 1995. Effect of thidiazuron on in vitro morphogenetic response of two *Capisucum* genotypes. Proceedings of IXth meeting on genetics and plant breeding on capsicum and eggplant. Budapest (Hungary) August 21–25 1995: 68–71.
- [49] Philips G., Hubsenberger J. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 4: 261–269.
- [50] Qin X., Rotino G.L. 1993. Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 12: 59–62.
- [51] Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S. 1990. Wpływ czynników genetycznych na regenerację roślin w kulturach in vitro. *Postępy Biologii Komórki* 17: 13, 247–257.
- [52] Ramage C., Leung D. 1996. Influence of BA and sucrose on the competence and determination of pepper (*Capsicum annuum* L. var. Sweet Banana) hypocotyl cultures during shoot formation. *Plant Cell Reports* 15: 974–979.
- [53] Ramirez-Malagon R., Ochoa-Alejo N. 1996. An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Reports* 16: 226–231.

- [54] Rogozińska J., Drozdowska L. 1996. In vitro culture of bell pepper (*Capsicum annuum* cv. Bryza) and its greenhouse performance. *J. Appl. Genet.* 37(4): 357–366.
- [55] Rogozińska J., Tobolewska G. 1992. Genotypic variations in organogenesis of six cultivars of pepper, *Capsicum annuum* L. *Genetica Pol.* 33(3): 213–217.
- [56] Saxena P.K., Gill R., Rashid A., Maheshwari S.C. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering in vitro. *Protoplasma* 108: 357–360.
- [57] Sripichitt P., Nawata E., Shigenaga S. 1987. In vitro shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). *Jap. J. Breeding* 37: 133–142.
- [58] Szász A., Nervo G., Fári M. 1995. Screening for in vitro shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant Cell Reports* 14: 666–669.
- [59] Steinitz B., Wolf D., Matzevitch-Josef T., Zelcer A. 1999. Regeneration in vitro and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.): The current state of the art. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 18: 9–15.
- [60] Tsafaris A. 1996. The development of herbicide — tolerant transgenic crops. *Field Crops Research* 45: 115–123.
- [61] Valera-Montero L.L., Ochoa-Alejo N. 1992. A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Sci.* 84: 215–219.
- [62] Zhu Y.X., Ou-Yang W.J., Zhang Y.F., Chen Z.L. 1996. Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Reports* 16: 71–75.

Regeneration in vitro of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants

Key words: pepper plant regeneration, growth regulators, organogenesis, shoot buds, somatic embryogenesis, anther culture, protoplasts

Summary

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is an important crop plant worldwide used as a spice and vegetable. Unlike other species of the *Solanaceae* family, pepper was a recalcitrant species with regard to its capacity to in vitro regeneration. In many cultivars of pepper, the regeneration was reported via organogenesis of shoot buds from cotyledons and hypocotyl explants, anther culture, somatic embryogenesis and via protoplast culture. However, plant regeneration in the pepper is limited to formation of distorted buds or shoot-like structures that do not produce the normal shoots. Pepper is susceptible to fungal and viral pathogens. One of the solutions to this problem is the development of pathogen-resistant pepper varieties using genetic transformation techniques. Development of an efficient plant regeneration procedure is the first step in optimizing a transformation system.