

ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЛИНИЯ ПИПЕР С ЦИТОПЛАЗМЕНА МЪЖКА СТЕРИЛНОСТ И ЛИНИЯТА ЗАКРЕПИТЕЛ

ВЕЛИЧКА ТОДОРОВА, ЯНИНА АРНАУДОВА, ВЕСЕЛИНА НИКОЛОВА
Институт по зеленчукови култури „Марица“, Пловдив
E-mail: todorova_vilih@abv.bg

Characterization of Pepper Line with Cytoplasmic Male Sterility and Maintainer Line

V. Todorova, Y. Arnaoudova, V. Nikolova
Maritsa Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv, Bulgaria

Abstract

Pepper line K 587 (*Srfrf*) with cytoplasmic male sterility (CMS) and line K 588 (*Nrfrf*) – maintainer of sterility forming small hot fruits were studied on the experimental plot of the Maritsa Vegetable Crops Research Institute, Plovdiv during the period 2006 – 2007. These lines were estimated by the significant morphological traits: plant and stem height, number of branches from first order, fruit length, fruit diameter at the bottom, pericarp thickness, average fruit weight. The CMS line is described with higher plants (129.95 cm), greater number of branches from first order (3.75), shorter (6.62 cm) and narrow (1.10 cm) fruits with thinner pericarp (1.57 mm) and with smaller average fruit weight (6.19 g). The parietal layer of the two lines was studied by electronic-microscopy analysis. It was established that in the CMS line strong vacuolization of the tapetal cells occurred before the meiotic division while in the line-maintainer this process was observed in telophase second.

Key words: *Capsicum*, traits, plant, fruit, electron microscopy

През последните години се наблюдава засилено създаване и предлагане на хибридни сортове пипер в редица страни по света – Корея, Китай, Унгария и др, които на базата на хетерозисния метод сполучливо съчетават ценни стопански признаци. Една възможност за успешно създаване на F_1 хибриди е използването на ядрената и цитоплазмената мъжка стерилност (ЦМС) налага търсенето на източници със стабилна експресия на стерилността и разработването на специфични селекционни програми и изследвания (Dash et al., 2001; Jo, 2007; Min et al., 2011). Повечето изследвания на ЦМС при този вид предполагат, че различни аномалии възникнали в тапетума са причина, детерминираща стерилност (Krouleva and Daskalov, 1978; Horner and Palmer, 1995, Wang et al., 2004; Dong et al., 2006; Li et al., 2006).

Целта на изследването беше да се охарактеризират линия K587 с цитоплазмена мъжка стерилност и линия K588 закрепител на стерилността по значими морфологични признаци на растението и плода и по цитоморфологичен статус на клетките от париеалния слой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучени са линии K 587 (*Srfrf*) с цитоплазмена мъжка стерилност и K 588 (*Nrfrf*) закрепител на стерилността. Изпитването е проведено през периода 2006 – 2007 г. в опитното поле на Институт

„Марица“ – Пловдив. Оценени са признаците: височина на растение (cm), височина на стъбло (cm), разклонения от първи порядък (брой), дължина на плода (cm), диаметър при основата (cm), дебелина на перикарпа (mm) и тегло на плода (g). Биометричните измервания на признаците на растението са проведени след приключване на вегетативния растеж на 10 растения от всеки генотип, а тези на плода – в техническа зрялост на 10 плода от всяка линия. Данните са подложени на едно- и двуфакторен дисперсионни анализ (Лидански, 1988). Оценена е и силата на влияние на факторите на вариране (%) по Плохинский (1970).

Характеризирането на генотиповете включва и оценка по цитоморфологичен статус на клетките от париеалния слой. За целта при двете линии от цветни бутони с различна големина са изготвени ултратънки срези (300 nm) на ултрамикротом Reichert U2. Наблюдението е извършено на електронен микроскоп Philips CM12. Фиксирането, дехидратирането и импрегнирането на растителния материал е извършено съгласно методиката на Терзийски и Карагеоргиев (1989), модифицирана в Катедра „Обща и клинична патология“ към Медицинския университет, Пловдив.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изявата на проучваните морфологични признаци на растението и плода доказано се обуславя от

Таблица 1. Двухфакторен дисперсионен анализ на проучваните признаци
Table 1. Two-way analysis of variance of the investigated traits

Фактори на вариране	Степен на свобода	Височина		Разклонения	Плод			
		на растение	на стъбло		дължина	диаметър	дебелина на перикарпа	тегло
		варианс						
Генотип (А)	1	11088,90***	57,60 ^{ns}	8,1**	32,22***	1,02***	4,40***	226,10***
Година (В)	1	7290,00***	1081,60***	6,40**	5,11*	2,30***	3,06**	26,41*
Взаимодействие (А x В)	1	1464,10**	230,40*	4,90*	1,89 ^{ns}	0,01 ^{ns}	4,45***	0,21 ^{ns}
Случайно	36	165,09	38,72	0,75	0,88	0,05	0,32	5,33

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns - not significant.

Таблица 2. Сила на влияние на факторите на вариране върху количествените признаци, %
Table 2. Influence of the variation factors on quantitative traits, %

Фактори на вариране	Височина		Разклонения	Плод			
	на растение	на стъбло		дължина	диаметър	дебелина на перикарпа	тегло
Генотип (А)	43,00	-	17,46	45,53	20,18	18,86	50,84
Година (В)	28,27	39,14	13,79	7,22	45,41	13,12	5,94
Взаимодействие (А x В)	5,68	8,34	10,56	-	-	19,09	-

Таблица 3. Оценка по морфологични признаци на растението
Table 3. Evaluation by morphologic traits of the plant

Признаци; Генотип	Височина на растение, cm			Височина на стъбло, cm			Разклонения, брой		
	2006	2007	средно	2006	2007	средно	2006	2007	средно
К 587	122,50	137,40	129,95	18,00	12,40	15,20	4,50	3,00	3,75
К 588	77,1	116,20	96,65	25,20	10,00	17,60	2,90	2,80	2,85
LSD 0,05	15,58	6,96	11,61	5,62	6,06	5,62	0,81	0,82	0,78
LSD 0,01	21,37	9,54	15,51	7,70	8,32	7,51	1,11	1,12	1,05
LSD 0,001	29,09	12,99	20,40	10,48	11,32	9,88	1,51	1,52	1,37

Таблица 4. Оценка по морфологични признаци на плода
Table 4. Evaluation by morphologic traits of the fruit

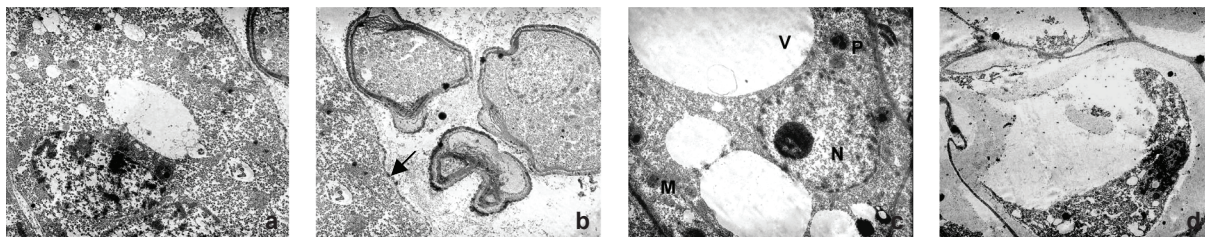
Признаци; Генотип	Дължина, cm			Диаметър, cm			Дебелина на перикарпа, mm			Тегло, g		
	2006	2007	средно	2006	2007	средно	2006	2007	средно	2006	2007	средно
К 587	6,05	7,20	6,62	0,84	1,35	1,10	1,51	1,62	1,57	6,93	5,45	6,19
К 588	8,28	8,56	8,42	1,19	1,64	1,42	2,84	1,62	2,23	11,83	10,06	10,94
LSD 0,05	1,09	0,60	0,85	0,22	0,19	0,20	0,63	0,41	0,51	2,58	1,66	2,09
LSD 0,01	1,50	0,82	1,13	0,31	0,26	0,27	0,86	0,56	0,68	3,53	2,28	2,79
LSD 0,001	2,04	1,11	1,49	0,42	0,35	0,35	1,17	0,77	0,89	4,81	3,11	3,67

въздействието на систематичните фактори – генотип, година и взаимодействието генотип x година (табл. 1). Генотипът няма доказан ефект само върху височината на стъблото, а взаимодействието генотип x година – върху дължина, диаметър и тегло на плода.

Генотипните различия имат определящо влияние върху вариабилността на теглото на плода (50,84%), дължина на плода (45,53%) и височината на растението (43,00%) (табл. 2). Годината на от-

глеждане доминира върху изявата на диаметъра на плода (45,41%) и височината на стъблото (39,14%). Резултатите от това изследване потвърждават установеното от Gurung et al. (2011) преобладаващо влияние на генотипа върху височината на растението, дължината и теглото на плода, но са в противоречие със съобщеното от тях определящо генотипно въздействие при останалите признаци.

Установено е, че линия К 587 формира много високи растения (средно 129,95 cm), които са



Фиг. 1. Електронномикроскопска микрофотография на тапетална клетка: (a, b) при линия K 588 закрепител на стерилността; (c, d) при линия с цитоплазмена мъжка стерилност K 587; (N) ядро; (M) митохондрия; (P) пластид; (V) вакуола; (стрелка) плазмалема, 2950X

Fig. 1. Electron microscopy microphotography of tapetal cell (a, b) in line K 588 maintainer of sterility; (c, d) in line with cytoplasmic male sterility K 587; (N) nucleus; (M) mitochondria; (P) plastid; (V) vacuole; (arrow) plasmalema, 2950X

средно с 15,2 cm височина на стъблото и преобладаващо 4 разклонения от първи порядък (табл. 3). Линията закрепител K 588 се характеризира с доказано по-ниски растения (96,65 cm) и по-малък брой разклонения.

Плодовете и на двата генотипа са дребни, висящи, едновърхни, с гладка повърхност, зелени в техническа зрялост и червени в ботаническа зрялост. Съдържат капсаицин. ЦМС линия K 587 се характеризира с дължина на плода средно 6,62 cm, диаметър при основата на плода – 1,10 cm, дебелина на перикарпа – 1,57 mm и тегло на плода – 6,19 g (табл. 4). Линия K 588, закрепител на стерилността, формира доказано по-дълги (8,42 cm) и с по-голям диаметър при основата (1,42 cm) плодове, с по-дебел перикарп (3,23 mm) и с по-тежки плодове (10,94 g).

ЦМС линията K 587 се характеризира със стабилна експресия на стерилността и би могла да се включи в хибридизационни програми за създаване на F₁ хибриди, съдържащи капсаицин в плодовете си.

При определяне на цитоморфологичния статус на париеталния слой при линия K 588 са наблюдавани някои от основните характеристики на тези клетки, подчертаващи техния характер на жлезиста тъкан. Наблюдавани са огромен брой рибозоми като монозоми. Каналите на ендоплазмената мрежа са по-нагъсто без дилатации и без изключение тя е от грануларен тип. Пластидите са единични с електронно плътна стена и отделни дезориентирани тилакоиди. В отделни хлоропласти се наблюдават ниски грани с пакетирани от два до три тилакоида на граните. Митохондриите са със сравнително малък брой балонирани кристи. Ядрата на тапеталните клетки в стадий прашец в линия K 588 са от хромоцентричен тип и показват характерната за тях морфологична устойчивост. В някои клетки са наблюдавани две ядра, разположени в непосредствен контакт, което свидетелства за висока биохимична и метаболитна активност. Тази картина за ядрата е по-рядко срещана в сравнение с контакта между пластидите (фиг. 1a).

В тичинка от петмилиметров бутон протопластът на тапеталните клетки в линията закрепител (*Nrfrf*) показва характерните признаци на

цитоморфологична деградация. Плазмалемата в много участъци е отделена от клетъчната стена с не еднаква електронна плътност, но в някои зони подчертано електронно плътна (фиг. 1b). Отделни канали от ендоплазмената мрежа са от грануларен тип. Наблюдавани са митохондрии и единични диктиозоми. Изследваното поведение на тапеталните клетки е подобно на установената от Horner and Rogers (1974) субмикроскопична характеристика на тапетума.

Тапеталните клетки в ранен стадий на развитие в тичинката при растения от линия K 587 с цитоплазмена мъжка стерилност не се различават съществено по морфологичен строеж от наблюдаваните клетки на линия K 588. Преди мейотичното делене обаче тапеталните клетки при стерилните растения се вакуолизират, като се наблюдават две или три вакуоли и интензивността на оцветяване на клетките намалява. Протопластът изпълва напълно тапеталната клетка. Плазмалемата е много добре очертана, почти черна, като в някои участъци е с гъста инвагинация. Хиалоплазмата е със слаба електронна плътност и изобилства от рибозоми, разположени основно поединично, като се наблюдават и незначителен брой полирибозоми. Тези данни за рибозомния комплекс характеризират високата активност на цитоплазмата и на тапеталните клетки. Митохондриите са със слабо развити кристи. Описват се и единични диктиозоми. Ядрата са с подчертано хромоцентричен тип със слаба електронна плътност на кариоплазмата и силна на ядърцето (фиг. 1в).

По време на мейотичните деления клетките на тапетума имат силно или почти напълно деструктиран протопласт. От него е запазена само хиалоплазмата и лумена на клетката е зает от една огромна вакуола с остатъци от лизиралите органели. В крайния етап на онтогенезата протопластът е почти напълно лизиран (деструктиран) и клетките изглеждат празни (фиг. 1г); от протопласта на клетката не е останало почти нищо освен отделни фрагменти от деструктирани канали на ендоплазмената мрежа и остатъци от двумембранни органели, които не могат да се идентифицират; ядра-

та, които са с най-висока степен на морфологична устойчивост, също са напълно лизирани.

Деструктивните процеси в тичинките на мъжкостерилната линия е част от системата на отклонения, които обуславят липсата на прашец в тичинковите гнезда. В допълнение на този извод е и обстоятелството, че формирането на спорогенната тъкан, протичането на мейозата в ПМК и особено развитието на мъжкия гаметофит в много голяма степен зависят от нормалната структура и функция на тапеталната тъкан.

ИЗВОДИ

Генофондът при пипера е обогатен с източник на цитоплазмена мъжка стерилност и линия закрепител на стерилността, които фенотипно и цитоморфологически са проучени и могат да бъдат използвани в бъдещи хибридизационни програми.

Генотипните различия са с определящо влияние върху вариабилността на теглото на плода (50,84%), дължината на плода (45,53%) и височината на растението (43,00%).

Двете линии формират много високи растения с дребни, едновърхи, с гладка повърхност плодове, съдържащи капсаицин. ЦМС линията К 587 се характеризира с много високи растения (129,95 cm), с къси (6,62 cm) и тесни (1,10 cm) плодове, с тънък перикарп (1,57 mm) и малко тегло на плода (6,19 g).

При ЦМС линия К 587 (*Srfrf*) клетките на тапетума се вакуолизират и дегенерират в ранните фази на мейозата, докато при закрепителя на стерилността К 588 (*Nrfrf*) тези процеси протичат през телофаза втора.

ЛИТЕРАТУРА

Лидански, Т. 1988. Статистически методи в биологията и селското стопанство. *Земиздат*, София, 375 с.

Терзийски, Д. и С. Карагеоргиев. 1989. Ръководство по основи на електронната микроскопия. *ВСИ „В. Коларов“* – Пловдив, с. 93

Плохинский, Н. А. 1970. Биометрия. *Колос*, Москва, 334 с.

Dash, S. S., S. Kumar and J. N. Singh. 2001. Cytomorphological characterization of a nuclear male sterile line of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Caryologia*, 66: 365-371

Dong, L. H., G. Zh. Hui, W. H. Min, Wei H. and L. M. Hui. 2006. Cyto-morphological observation of the microsporogenesis of male sterility materials in pepper *Capsicum annuum* L. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (9): 1842-1845

Gurung, T., S. Techawongstein, B. Suriharn and S. Techawongstein. 2011. Growth, yield and capsaicinoid contents of 14 cultivars of hot pepper (*Capsicum* spp.) at two elevations of Thailand. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 43 (2), 130-143

Horner, H. T. and M. Rogers. 1974. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male sterile pepper *Capsicum annuum*. *Can. J. Bot.*, 52: 435-441

Horner, H. and R. G. Palmer. 1995. Mechanisms of genic male sterility. *Crop Science*, 35: 1527-1535

Jo, Y. D. 2007. Comparative analysis of DNA structure containing *cox2* and *atp6-2* genes between fertile and CMS chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). MS Thesis, Seoul Natl. Univ. Seoul, Korea.

Krouleva, M. and S. Daskalov. 1978. Comparative cytoembryological studies of cytoplasmic and gene male sterility in the pepper *Capsicum annuum*. *C. R. Acad. Sci. Bulg.*, t. 31, 8: 1073-1076

Li, Y. Y., Y. Wei, R. H. Zhang and J. Lu. 2006. Cytological investigation on microsporogenesis of male sterility of pepper. *Bulletin of Botanical Research*, 26, 4: 411-415

Min, W. K., B. D. Kim, S.G. Kim and S. H. Lee. 2011. Development of new molecular markers for the identification of male sterile cytoplasm in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 29, 1, p. 53-60

Wang, S. B., X. D. Luo, L. F. Dai, CH. T. Qian, J. F. Chen, J. B. Liu and B. G. Pan. 2004. Meiotic observation and male gametes development in cytoplasmic male sterile of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Horticulturae Sinica*, 31, 6, p. 807-810