



**Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“
Биологически факултет**

Катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“

Николай Пламенов Аначков

**Използване на растителни микроспорови култури
в молекулярно-биологични изследвания**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за придобиване на
образователна и научна степен „доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: Молекулярна биология

Научни ръководители:

Проф. д-р Алишер Тураев

Проф. д-р Галина Яхубян

Пловдив, 2017

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „П. Хилендарски“.

Изследванията от дисертационния труд са извършени в катедра „Физиология на растенията и молекулярна биология“, Биологически факултет, Пловдивски университет „П. Хилендарски“, Университетът във Вагенинген, Холандия, и Изследователския Център за Ядрени Изследвания Сарайкой в Анкара, Турция.

Проведените в дисертационния труд научни изследвания са част от реализирането на проект ЕС FP7 (BIOSUPPORT).

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 30 юни 2017 г. от 10 ч. в Биологическия факултет на Пловдивски университет „П. Хилендарски“, гр. Пловдив.

ВЪВЕДЕНИЕ

Жизненият цикъл на растенията преминава през редуващи се поколения на спорофити и гаметофити (Фигура 1). Доминантната, и най-видна форма на висшите растения, е свободно живеещият спорофит. Дороти Бергнер първа описва природната проява на спорофитни хаплоиди при тревния вид татул (*Datura stramonium*) през 1922 (1). Скоро след това се докладва за спорофитни хаплоиди при тютюн (*Nicotiana tabacum*) (2), пшеница (*Triticum aestivum*) (3) и по-късно при няколко други вида (4, 5). Ембрио културите могат да скъсят размножителните циклите чрез избягване на латентността при семената. Чрез процеса на андрогенеза, при който се получават хаплоиди и двойни хаплоиди чрез хромозомно удвояване е възможно да се получат изключителни мъжки растения. Мъжките растения за изключително полезни защото тяхната продуктивност и приложения са много повече в сравнение с женските. Хаплоидите са полезни в няколко области на цитологичните изследвания. Това включва производството на анеуплоиди, определяне на природата на пloidността, определяне на основния хромозомен номер, определяне на произхода на хромозомите.

Във връзка с това настоящият дисертационен труд е насочен към оптимизиране на критични фактори за репрограмиране на микроспори от гаметофитен път на деление към спорофитен. Крайната цел беше формиране на здрави ембриони с хаплоидна природа и прорастване на нови хаплоидни и двойно хаплоидни растения. Обект на изследване са сорт MoneyMaker при домати, сорт Toras 4079 при рапица, както и сортове AAL и Тайландски Декоративен от пипер в това число и три Български сорта с важно икономично значение – Хебър, Куртовска Капия и Джолюнска шипка.

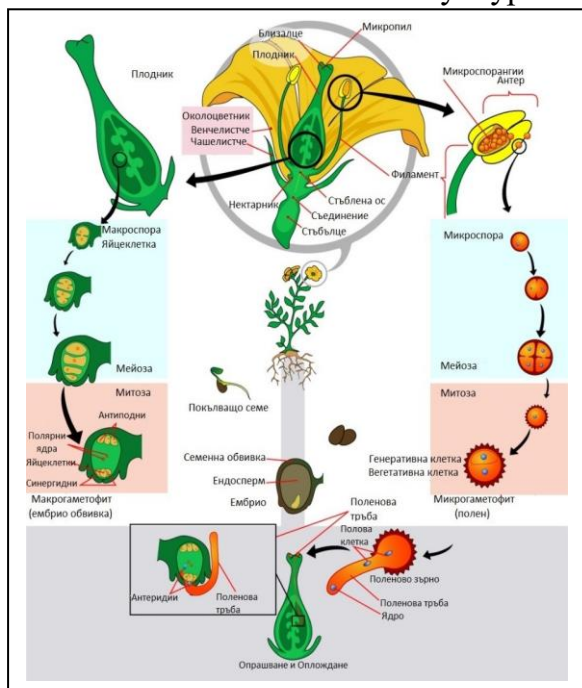
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В днешно време съществуват успешни протоколи за получаване на хаплоиди и двойни хаплоиди за повече от 200 растителни вида, принадлежащи към почти всички семейства от растителното царство като за целта се използват различни спонтанни и индуцирани методи. Такъв метод е получаването на хаплоиди от изолирани и *in vitro* култивирани микроспори. Изолираните едноклетъчни микроспори могат да бъдат изучавани с помощта на техники от клетъчната биология, микробиологията и функционалната геномика (6). Култури от синхронизирани микроспори с висока плътност могат да съдържат повече от 1000 ембриона на милилитър. Развитието на микроспорите е независимо от спорофитната диплоидна антерна стена, а по този начин компонентите на средата и третирането се осъществява директно върху микроспорите. В богата хранителна среда с високо съдържание на захароза, изолираните микроспори се развиват и формират зрели поленови зърна, които са фертилни, докато различна стресови третирания водят до превръщане на микроспорите или незрелите полени в ембриогенни микроспори или поленови зърна, които след прехвърляне на богата среда се развиват в ембриони (6).

I. ПРИЛОЖЕНИЯ НА ДВОЙНИТЕ ХАПЛОИДИ

1. Използване на двойни хаплоиди за подобряване на културни растения

Шерът Чейс пръв въвежда използването на хаплоиди в растителната селекция: през 1946 той използва спонтанна партеногенетична система за да произведе първите царевични двойно хаплоидни инбредни линии (7). ДХ сортове сега са важна част от много културни видове, така например около 50% от



съвременните сортове ечемик, използвани в Европа, се произвеждат чрез система за двойни хаплоиди. При зеленчуците, често се използват ДХ като родители за F1 хибридни семена. Има голям интерес в разширяването на производството на ДХ за получаване на F1 хибриди при видове с висока стойност, каквито са ароматни растения и видове с медицинска стойност. Двойно хаплоидните растения представляват интегрална част от обратното кръстосване, наскоро създадена технология (8). Тази технология включва възстановяване на двойно хаплоидни растения от микроспори на растения, при които не се е осъществила или се е осъществила ограничена рекомбинация.

Фигура 1. Жизнен цикъл на покритосеменните растения

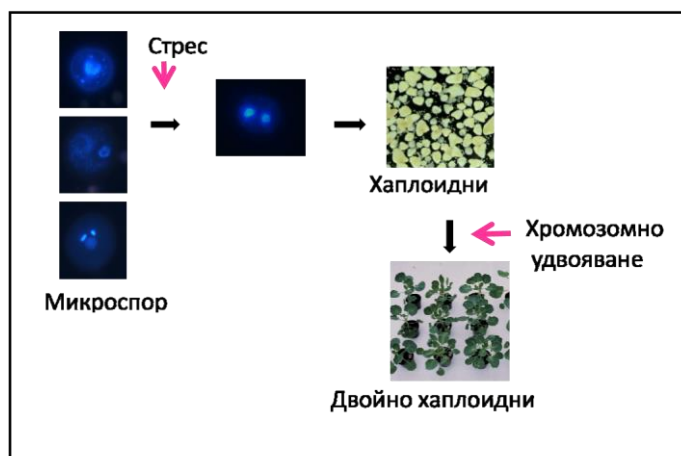
2. Използване на двойни хаплоиди в генетиката

Двойните хаплоиди са от важно значение за определяне на хромозомните карти на редица видове, в това число ечемик, ориз, рапица и пшеница (9); те също така са доставили голямо число от картиращите генетични маркери, > 90% при някои видове. Появата на високо производително генотипиране означава, че генетичните карти могат да бъдат създадени в рамките на няколко седмици след произвеждане и изолиране на ДНК от сегрегираща ДХ популация. При външно опрашващи видове, генетични анализи могат да бъдат опростени чрез използването на поне един ДХ родител в началното кръстосване за получаване на сегрегираща популация – това е било успешно при зеленчуци, включващи зеле, броколи, карфиол и брюкселско зеле (10), както и фуражната трева *Lolium perenne* (11). Към момента ДХ имат важна роля в геномиката при интегрирането на генетични и физични карти, следователно предоставят прецизност при насочването към гените (12, 13). Индуцираните мутации предоставят друг метод за свързване на гени към фенотипове. Подобно на мутагенезата, тотипотентната микроспора е основен обект за трансформация: тя е лесно достъпен едноклетъчен обект, който може да бъде манипулиран при голям брой растителни видове (6).

II. МИКРОСПОРОВА ЕМБРИОГЕНЕЗА

1. Основна характеристика на микроспоровата ембриогенеза

Микроспоровата ембриогенеза е процес, при който незрелия мъжки гаметофит се индуцира към преминаване от гаметофитно към ембриогенно развитие в *in vitro* култура (Фигура 2). Получените чрез този метод хаплоидни ембриота могат да се конвертират в хомозиготни двойно хаплоидни (ДХ) растения, спонтанно или след третиране с удвояващи хромозомния набор агенти. Тази технология позволява на селекционерите получаването на хомозиготни растения след само едно поколение, пестейки усилия и време. Освен това, микроспоровата ембриогенеза предлага алтернатива система за изучаване на ембрионалното развитие и клетъчната тотипотентност при растенията извън влиянието на заобикалящата тъкан.



Фигура 2. Схематично представяне на микроспорова ембриогенеза

2. Фактори, повлияващи ембриогенезата

2.1 Донорно растение

Физиологичното състояние на донорните растения може да повлияе развитието на антерите и следователно броя на преминалите към ембриогенеза микроспори (14). Факторите, които влияят на физиологичния статус на

растенията, включват подходящи условия за развитие: светлина, температура, влажност и хранителни елементи. Температурата на отглеждане на донорните растения повлиява ембриогенния потенциал на културата (15). Генотипът на донорните растения оказва влияние както върху възможността за ембриогенна индукция, така и върху честотата и качеството на получените ембриони, при много видове (16, 17).

2.2 Фаза на развитие

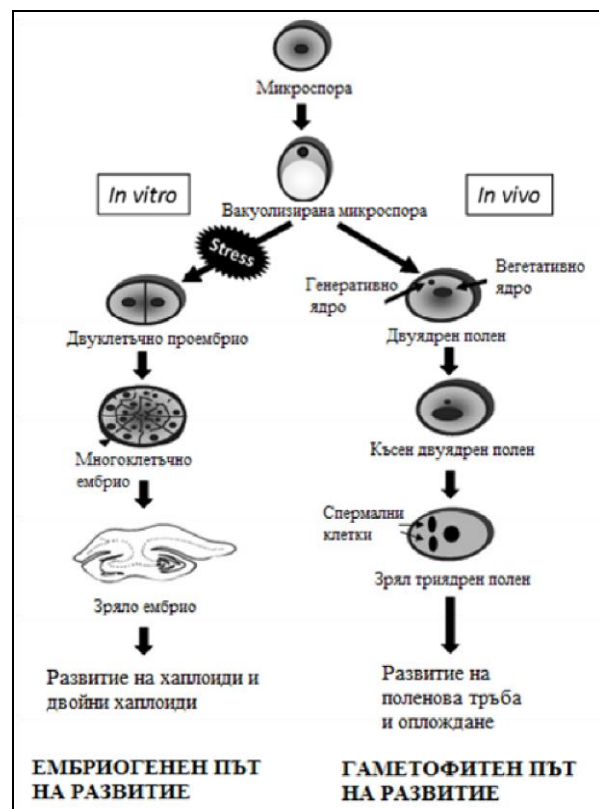
Фазата на развитие на микроспорите е един от ключовите фактори за микроспоровата ембриогенеза. Етапът от развитието на микроспорите, в който те са способни да преминат към ембриогенно развитие е много кратък (18). Различните видове и сортове могат да инициират ембриогенеза по различни начини чрез симетрично или асиметрично делене на ядрото.

2.3 Стресов фактор

За индукцията на микроспорова ембриогенеза е необходимо въздействието на стресов фактор (Фигура 2). Това може да включва различни абиотични и химични фактори (19). Най-широко използваните абиотични фактори са ниска и висока температура и липса на въглероден източник. Химичните фактори включват колхицин, агенти, които повишават осмотичното налягане и алкохоли (20).

2.4 Състав на средите

Съставът на средата е от особено значение за ембриогенезата. Използват се различни комбинации от витамини и минерали, като най-важен е баланса между компонентите на средата. Въглехидратния източник, който дава енергията за развитие на микроспорите, е решаващ. При пипер са изпробвани захароза, глюкоза и малтоза, в различни концентрации, с вариращи резултати (19, 21). При провеждане на първоначални опити с антерни култури са използвани сравнително прости среди, несъдържащи хормони (22). По-късно, при въвеждане на методики за изолиране на микроспорите, състава на средите се променя, за да компенсират изхранващата функция на прашниковата стена (23). Манипулирането на другите компоненти на средата, като азотния източник, рН, растителни хормони и др. също повлиява ембриогенезата (24).



Фигура 3. Път на развитие на микроспората (източник Serrano 2011)

2.5 Удвояване на хромозомния набор

Растенията, получени чрез микроспорова ембриогенеза могат са бъдат хаплоидни, двойно хаплоидни, полиплоидни и анеуплоидни, като най-голяма част са хаплоидни. Хаплоидните растения са стерилни и е необходимо удвояване на хромозомния набор за получаване на фертилни хомозиготни растения. Неэффективните методи за удвояване на хромозомния набор са една от пречките за получаване на двойно хаплоидни растения (25). Удвояването на хромозомите включва три механизма – ендоредупликация, сливане на ядрата и с-митоза (26). При някои растения, като пшеница, ечемик и царевича, процента на спонтанно хромозомно удвояване е сравнително висок (до 80%) и включва сливане на ядрата. При други растения, включително пипера, този процент е доста нисък. Антимикротубулните агенти колхицин и трифлуралин са използвани за повишаване честотата на хромозомно удвояване. Колхицинът индуцира деполимеризацията на микротубулите, като по този начин нарушава разделянето на хромозомите по време на митоза, в резултат се удвоява хромозомния набор.

2.6 Отглеждане на хаплоидните и двойно хаплоидни растения

Отглеждането на нормални, здрави растения от микроспоровите ембриони е важна и трудоемка стъпка в продукцията на хаплоидни и двойно хаплоидни хомозиготни растения. За разлика от нормалното развитие, микроспоровите ембриони не преминават типичните процеси на съзряване. Това е сложен процес и засега честотата на получените здрави растения все още е ниска за много видове. От особено значение са етапът на развитие на ембрионите, средата, използвана за покълване и условията, в които се намира културата. Развиват се методи за оптимизиране на условията, които включват прибавянето на различни вещества към средата, като брасиностероиди (група полихидрокси стероиди, изолирани в полен от *Brassica napus*, участващи в отговора на стресови фактори), абсцисинова киселина (ABA)(27), полиетилен гликол (PEG)(28) и бутионин сулфоксимин (BSO), който променя редокс статуса на клетката.

III. МИКРОСПОРОВА ЕМБРИОГЕНЕЗА НА ВАЖНИ СТОПАНСКИ КУЛТУРИ

1. Пипер

Пиперът (*Capsicum L.*) е култура от голямо икономическо значение, разпространена в целия свят и се използва като храна, подправка и хранителна добавка. Принадлежи към семейство *Solanaceae*, което включва някои от икономически най-значимите зеленчукови видове, включително картоф (*Solanum tuberosum*), домати (*Solanum lycopersicon*), патладжан (*Solanum melongena*) и пипер (*Capsicum spp.*). Род *Capsicum* е тясно свързан с други представители на семейството, като домата, и включва 22 диви и 5 култивирани вида – *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, и *C. pubescens*. *Capsicum spp.* са диплоиди ($2n = 2x = 24$) с множество вариации в цвета, размера, вкуса и формата на плодовете. Пиперът е втората най-отглеждана зеленчукова култура в развитите страни, след домата, като най-често се отглеждат *Capsicum annuum* и *C. frutescens*. В България има създадени сортове, устойчиви на болести и вредители, сред които са: Аманда,

Амфора, Асти Жълт, Асти Червен, Белканто F1, Български Ратунд, Бяло Ухо, Гороглед и Шипка, Калинков, Сиврия и др.

2. Домат

Доматът (*Solanumlycopersicum*) е растение от семейство картофови (*Solanaceae*). Той е многогодишно растение с кратък живот, отглеждано като едногодишно растение, обикновено достигащо 1 – 3 м височина със слабо дървесно стъбло, което обикновено лази по други растения. В момента доматиът като култура се среща много често във целия свят и е от голямо икономическо значение. Освен това се използва и като моделен вид за въвеждане на агрономически важни гени при двусемеделните растения. Доматът има особено хранителна стойност, осигурява важни хранителни вещества като ликопен, бета-каротен, флаваноици, витамин С. Освен това, тази култура е постигнала огромна популярност, особено през последните години с откриването на анти-оксидативните свойства на ликопена и противоракови функции (29). По този начин, производството и потреблението на домати се увеличава непрекъснато. Доматът се нарежда на 7мо място в световен мащаб по производство.

3. Рапица

Brassicanapus L. – рапицата, принадлежаща към семейство *Cruciferae* е едно от култивираните, лечебни растения със стопанско значение в Средна Азия, Северна Африка и Западна Европа. Рапицата сега е третият най-важен източник на растително масло (за хранителни цели) в света след соята и палмовото масло. Обработката на рапицата за получаване на маслото дава като страничен продукт растителна маса/силаж, която служи за изхранване на добитък, тя е с високо съдържание на протеини което я прави конкурент на соята (30).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е индуциране на микроспорова ембриогенеза и получаване на хаплоидни растения от важни стопански култури като предпоставка за инициране на молекулярно-биологични анализи. Във връзка с това бяха формулирани следните задачи:

1. Отглеждане на здрави донорни растения от сортове пипер, домати и рапица.
2. Оптимизиране на протокол за изолация на микроспори чрез подбор на фаза на развитие на микроспората, която е най-подходяща за преминаване към спорофитен път на деление
3. Оптимизиране на хранителни и ембриогенни среди за постигане на симетрично деление на микроспорите
4. Индуциране на ембриогенеза в изолираните микроспори
 - 4.1. Температурен стрес
 - 4.2. Култивиране върху бедни хранителни среди (гладуване)
 - 4.3. Гама радиация
 - 4.4. Колхицин
5. Оценка на спорофитното деление

6. Формиране на ембриони от репрограмираните микроспори

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

- *Растителен материал* сортове пипер (*Capsicum annuum* L.), от които – 3 български сорта (Хебър, Джолюнска Шипка и Куртовска Капия), холандския сорт ALL щедро предоставен от Rijk Zwaan (Холандия) и Тайландски Декоративен лют пипер (ТД), домати (*Solanum lycopersicum* L), сорт Monney maker и рапица (*Brassica napus*), сорт Топаз 4079.

- *Отглеждането на донорни растения*

Пипер и домати са отглеждани в условия на дълъг ден при температура от 20 – 23°C и 25 – 27°C, респ.

Рапица е отглеждана в условия на дълъг ден при 24 – 25°C до формиране на цветни пъпки, след което температурата е фиксирана на 10 – 11°C.

- *Изолване и култивиране на микроспорите* Стерилизация на цветни пъпки

Изолване на микроспори

Индукция на микроспорите към ембриогенеза в среда BS7 (пипер) или NLN13 (домати и рапица) при 33°C

Прилагане на стресово въздействие (гладуване, висока температура, рН, колхицин)

Култивиране на микроспорите за спорофитно делене при различни варианти на хранителни среди, въглеводороден източник, растителни хормони и плодници на тъмно

- *Хранителни среди*

Бедни хранителни среди за индукция – BS7 и BM7.

Богати хранителни среди за спорофитно делене – P1, NLN, NLN1/2, MS, B5, NN, NLN13

Среда за регенерация – B5 + 2% захароза

- *Облъчване с гама радиация*

Цветни пъпки от пипер се облъчват с Cs60 гама източник на радиация с дози йонизиращо лъчение – 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 и 90 грея, а силата на облъчване беше 491 грея.

- *Оцветяване с DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол) и селекция на микроспорите*

За установяване на подходящата фаза на развитие, изолираните микроспори са оцветявани с DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол), приготвен в работен разтвор – 0,5 DAPI µg/ml, 0,05% Tween 20, 1X PBS.

- *Оцветяване с FDA (Fluorescein diacetate) и PI (Propidium Iodid) за оценка на жизнени/нежизнени микроспори*

Микроспорите са оцветявани с FDA (5 mg/ml ацетон) и PI (2 mg PI/1 ml PBS)

- *Определяне честотата на вакуолизирани и дялящи се микроспори*

Честотата на репрограмирани микроспори с увеличен размер, вакуолизирани и дялящи се микроспори е изчислена в проценти (%) на базата на всички клетки в *in vitro* културата. Броя на калусните структури, абнормални и нормални ембриони е изчислен за петри.

- *Определяне на пloidността чрез метода на устичните клетки*

Долният епидермис от лист на напълно развити регенеранти се обелва със скалпел и се поставя на предметно стъкло за микроскопиране. Фиксира се с няколко капки от разтвор на 1% сребърен нитрат. Броят на хлоропластите в устичните клетки от поне 4 различни листа на 4 различни растения беше изброен на светлинен микроскоп.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Микроспорова ембриогенеза при рапица

1. Селекция на микроспори според оптималната фаза на развитие, подходяща за преминаване към спорифитен път на деление при рапица.

За да определим коя е най-подходящата фаза на развитие на микроспори от рапица за репрограмиране към ембриогенеза ние използвахме цветни пъпки, като ги разфелихме на три групи. Първата група беше с големина на цветните пъпки от 1 – 2 mm, а микроспоровата популация от тях беше съставена основно от ранни едноядрени микроспори. Втората група беше с цветни пъпки с големина 3-4 mm, а микроспорите в тях отговаряха на късни едноядрени и ранни двуядрени. Третата група съдържаше основно цветни пъпки с големина 6-7 mm, а микроспорите отговаряха на късни двуядрени и триядрени полени. За да потвърдим фазата на развитие използвахме флуоресцентното багрило DAPI. След изолация микроспоровата популация от всяка група беше култивирана в ембриогенна среда NLN-13 за 3 дни при температура 33°C с цел репрограмиране към ембриогенеза. Това изследване показва, че най-подходящи за последваща работа ще са цветни пъпки с големина 3-4 mm, които съдържат максимален брой потенциално ембриогенни микроспори (Фигура 4).



Фигура 4. Микроспори от рапица оцветени с DAPI. А, късна едноядрена микроспора. Б, ранна двуядрена микроспора.

2. Оптимизиране на стресовите условия и индуциране на ембриогенеза с цел получаване на конвенционални ембриони или ембриони със суспензори при рапица.

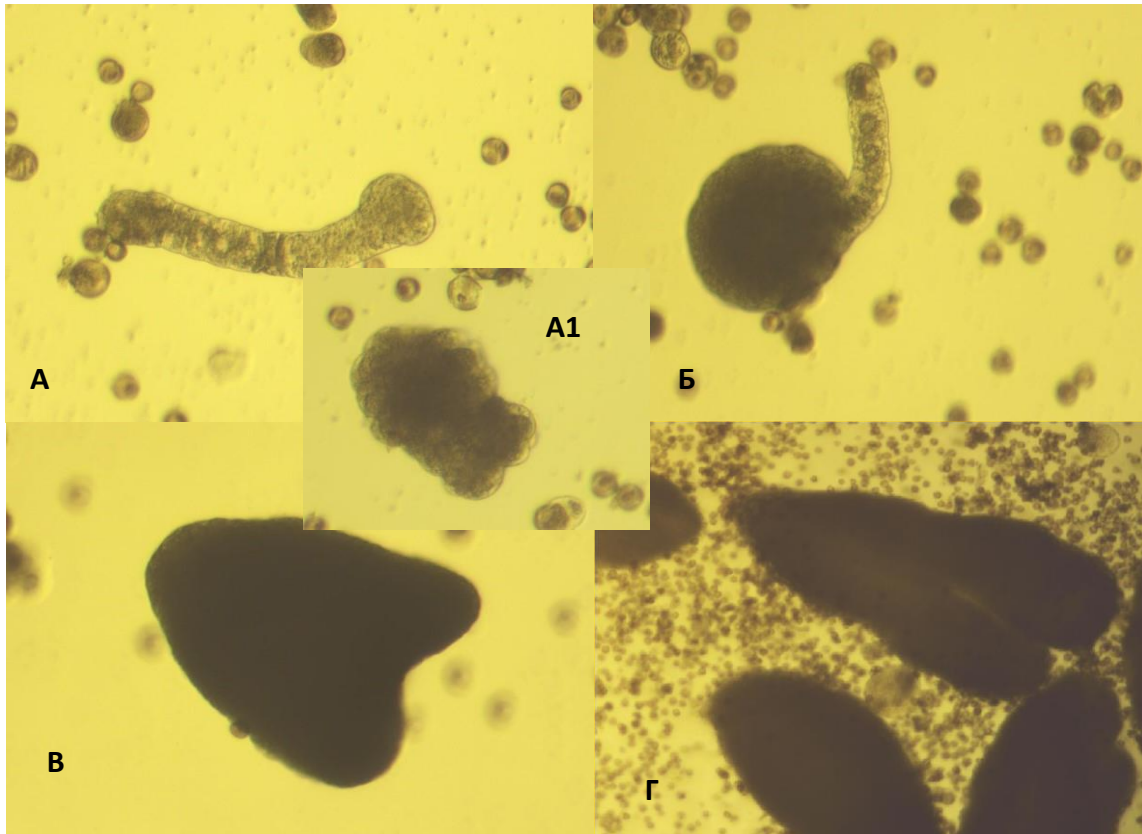
За да проследим как температурният стрес играе роля при формирането на ембриони със или без суспензори ние подложихме изолирани микроспори от рапица на висока температура при 33°C за кратък или дълъг интервал от време съответно за 8 часа, 18 часа, 1 ден или постоянно при 33°C.

При поставяне на микроспори в култура 8 часа в условия на умерен температурен стрес, а именно 33°C се наблюдава значително по-голямо количество ембриони със суспензорни структури (Фигура 5). Тези ембриони наподобяват зиготичните проембриони, и са различни от многоклетъчните структури, които по

нататък ще се развият в глобуларни ембриони (Фигура 5). Общият брой ембриони отчетен след 14 дни в култура е 117, като след прехвърляне на среда за вкореняване почти половината ембриони дават началото на зелени прорастъци (Таблица 1). При по-продължителен температурен стрес (18 часа при 33°C) върху микроспорите, съотношението на ембриони със суспензори към многоклетъчни структури е приблизително еднакво, като предимството е отново за ембрионите със суспензори. След 1 ден при 33°C съотношението на суспензорни към нормални ембриони е почти 1:1, но отново суспензорните ембриони са повече. Броят на конвенционалните ембриони значително надхвърля този на суспензорните, когато микроспорите се отглеждат постоянно при 33°C, но общият брой на ембрионите е значително по-малък, като това наблюдение може да се обясни с по-дългото време на топлинен стрес. В резултат на това само един от 5 прораснали ембриона се развива в зелено растение (Таблица 24).

Таблица 1. Проследяване на етапите от развитието на ембрионите през различни периоди от време при съответната продължителност на температурния стрес.

Температурен стрес 33°C	Етапи на развитие на ембрионите					
	7 дни		14 дни	30 дни	50 дни	70 дни
	Проембриони (%)	Конвенционални (%)	Общ брой ембриони	Прехвърлени ембриони	Прораснали ембриони	Растения
8 часа	91.2%	8.8%	117	60	35	18
18 часа	58.5%	41.5%	121	60	42	13
1 ден	51%	49%	110	60	28	8
30 дни	26.3%	73.7%	67	60	25	5

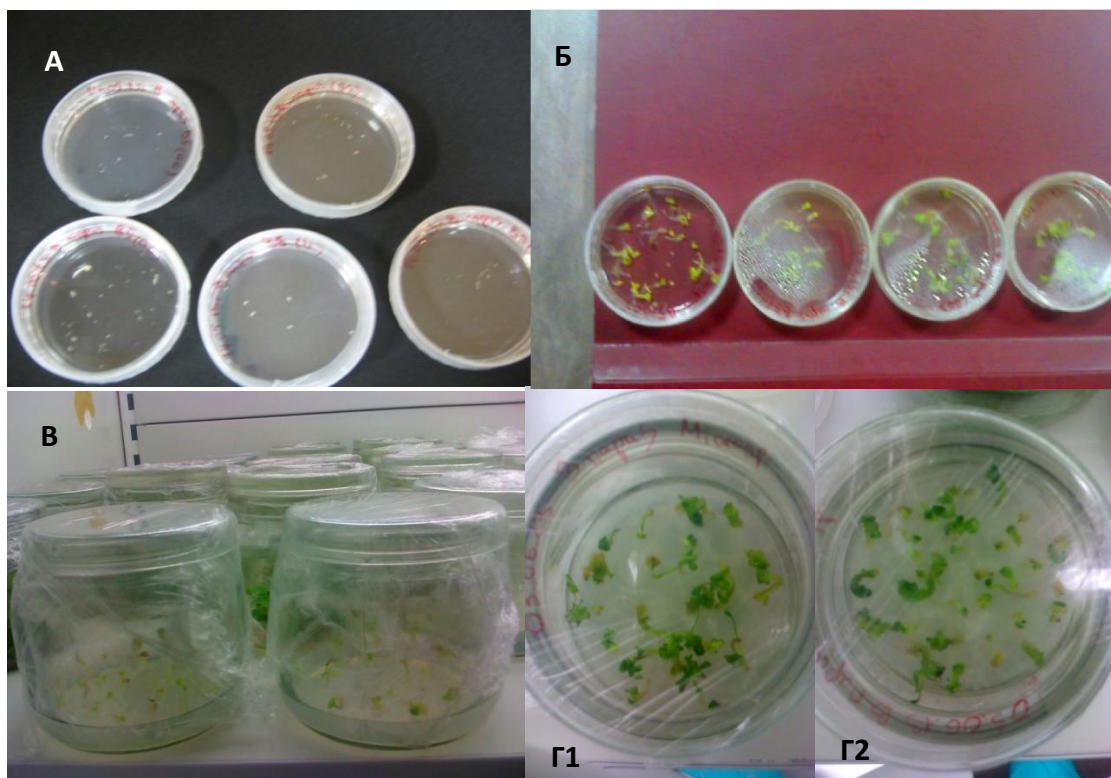


Фигура 5. Етапи от развитието на ембрионите в микроспорова култура от *Brassicanapus*: А ембрион със суспензор, наподобяващ зиготичен проембрион (7 ден); А1, многоклетъчна структура, която в последствие ще се развие в глобуларен ембрион (7 ден); Б, глобуларен ембрион със суспензор (9 ден); В, сърцевиден ембрион в късна фаза (11 ден); Г, ембриони с ясно изразени котиледони (14 ден).

Тенденцията, която се наблюдава е, че колкото по-дълго са изложени на температурен стрес, толкова по-малко микроспори преминават от нормалния гаметофитен път към спорофитен. Броят на ембрионите, получени при постоянно култивиране при 33°C, е значително по-малък и преобладават многоклетъчните структури, освен това тези ембриони спират нормалното си развитие на ранен етап в културалната среда.

3. Прехвърляне на ембрионите на твърда хранителна среда и адаптация към почва.

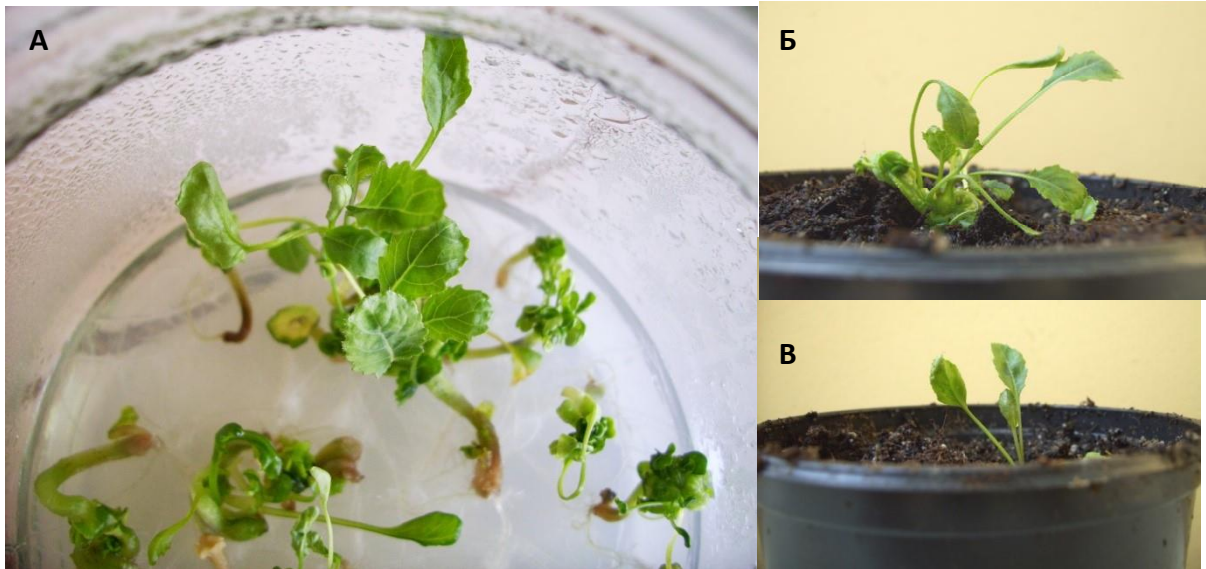
След приблизително тридесет дни в микроспоровата култура от рапица ясно могат да се различат формираните ембриони. Те са достатъчно големи, за да се видят с просто око, като размерът им е около 2 – 3 милиметра. Прехвърлят се с помощта на пинцета. Първоначално ембрионите се трансферират на среда В5 до формирането на първите истински зелени листа. С формирането на прорастъците, ембрионите се трансферират на нова среда за вкореняване – ½ MS20 (Фигура 6).



Фигура 6. Етапи от развитието на ембриони, от микроспори на *Brassicanapus* след прехвърлянето им на твърда среда: А, ембриони прехвърляни на среда В5 (28 дни след изолацията); Б, прорастъци 14 дни след прехвърлянето им на В5 (42 дни след изолацията); В, Прорастъци 20 дни след прехвърлянето им на В5, непосредствено след трансферирането им на $\frac{1}{2}$ MS20 (48 дни след изолацията); Г, (1, 2) Прорастъци 14 дни след прехвърлянето им на $\frac{1}{2}$ MS20 (62 дни след изолацията).

От Фигура 7 става ясно, че са необходими 62 дни от изолирането на микроспорите до получаването на цели растения.

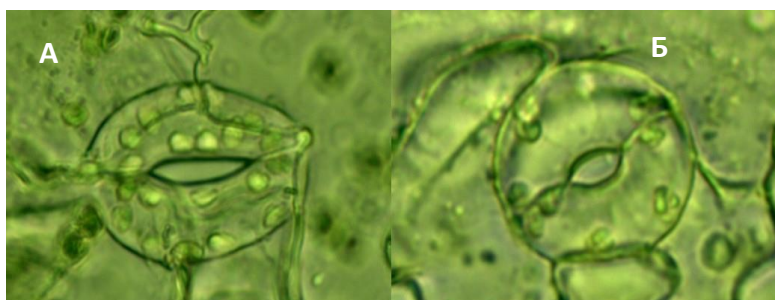
След като растенията са достатъчно големи (70 дни след изолация), след образуването на вторични листа те се прехвърлят на почвен субстрат с цел адаптация (Фигура 7). Растенията се отглеждат при висока влажност и ниска интензивност на светлината в условия на дълъг ден и температура 22°C през деня и 18°C през нощта в полуавтоматична оранжерия.



Фигура 7. Млади растения получени от микроспори на *Brassicanapus*: А, *in vitro* растения от рапица получени чрез микроспорова ембриогенеза (34 дни след прехвърлянето им на твърда среда В5); Б, Б', *ex vitro* растения от рапица получени чрез микроспорова ембриогенеза прехвърлени на почва (70 дни след изолацията).

Краткият температурен стрес върху изолирани микроспори от рапица води до получаване на по-голям брой ембриони със суспензори, докато по-дългият температурен стрес води до получаване на конвенционални ембриони, като заедно с това се намалява и броят на ембрионите в културата, както и възможността им за адаптация на по-късен етап.

Получените растения се очаква да бъдат с хаплоиден хромозомен набор, тъй като растенията са получени от микроспорова култура, а честотата на спонтанна диплоидизация е ниска при *Brassica napus*. Индиректни подходи за проверка на пloidността са сравнение между регенерантите и донорните растения. Хаплоидните растения обикновено са по-малки със забавен растеж и с различна морфология на листа и цвят. Друг много сигурен и индиректен метод е сравнение на броя на хлоропластите в устичните клетки както и морфологията им. Хаплоидните растения имат по-малко на брой хлоропласти в устичните клетки. Този метод се използва рутинно при определяне на пloidността на картофени растения получени чрез антерни култури (31). Супена и колеktiv (2004) доказват надеждността на метода и го определят като бърз, евтин и лесен. За да определим пloidността на регенерантите ние анализирахме хлоропластния брой в устичните клетки (Фигура 8).



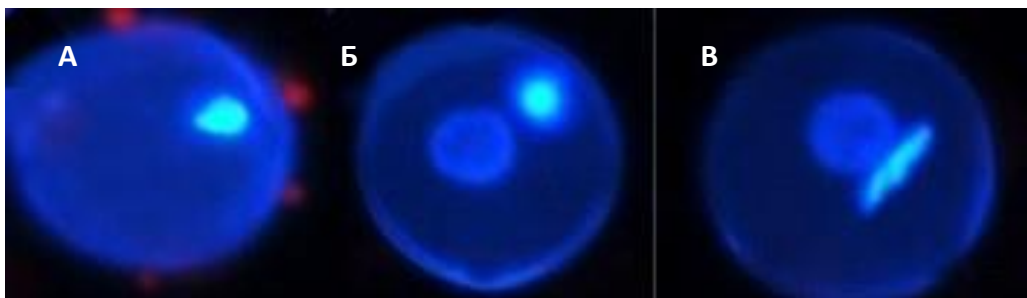
Фигура 8. Устични клетки от лист на рапица. А, устична клетка на диплоидна рапица. Б, устична клетка на хаплоидна рапица.

Ясно се вижда разликата в броя на хлоропластите в тях, като те са два пъти по-малко. С този метод доказваме хаплоидната природа на новополучените регенеранти.

II. Микроспорова ембриогенеза при домати

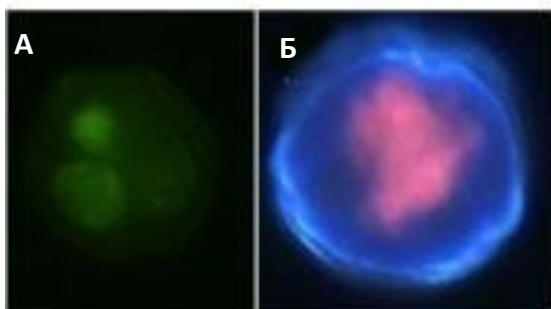
1. Селекция на микроспори според оптималната фаза на развитие, подходяща за преминаване към спорофитен път на деление

За да определим кои са най-подходящите фази на развитие на микроспорите от домати сорт MoneyMaker, ние изолирахме и култивирахме *in vitro* микроспори от три различни фази (Фигура 9). Популацията на микроспори от първата група съдържаше основно едноядрени микроспори. Втората група се състоеше основно от ранни двуядрени микроспори, а третата от късен двуядрен полен.



Фигура 9. Фази на развитие на микроспори от домати. А, едноядрена микроспора. Б, ранна двуядрена микроспора. В, късна двуядрена микроспора.

За да потвърдим фазата на развитие използвахме флуоресцентното багрило DAPI (4', 6-диамино-2 фенилиндол). След изолацията микроспоровата популация от всяка група беше култивирана в среда NLN – 13 (71) и инкубирана при 32°C за 3 дни. Тъй като доматиът спада към културите, които са силно неподатливи към ембриогенеза, нашата основна цел беше първо да постигнем висока жизнеспособност на микроспорите и втори да ги насочим към спорофитни деления. Микроспорите от първата група показва най-добри показатели, като можеха да се отчетат 22.4% жизнени микроспори. За популацията на микроспори от втората група съдържаща основно ранни двуядрени микроспори бяха отчетени 14,1% жизнени микроспори, докато трета група съдържаща основно късен двуядрен полен показва добра жизнеспособност по време на стреса – 32%, но седем дни след изолацията не се откриваха жизнени микроспори. За визуализация на жизнените микроспори използвахме FDA (fluorescein diacetate), а за визуализиране на вече неактивните микроспори използвахме PI (Propidium iodide) (Фигура 10).



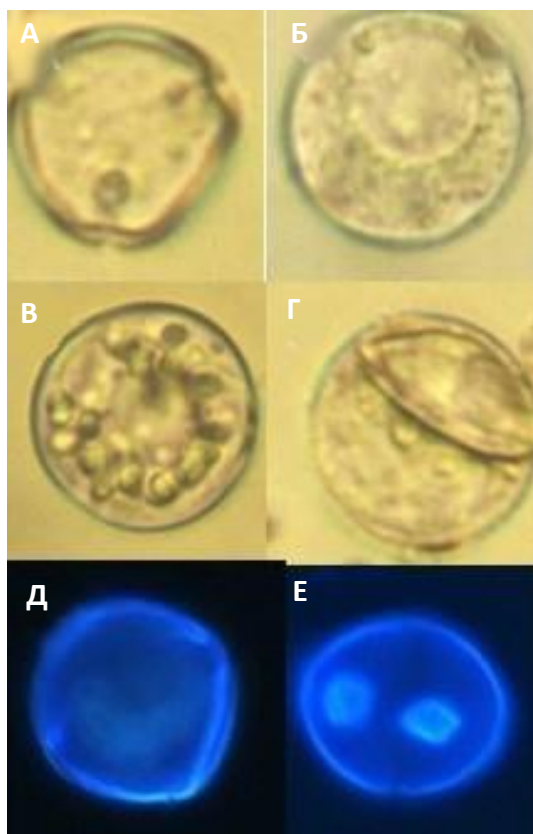
Фигура 10. Визуализация на жизнени и нежизнени микроспори от домати. А, Визуализация с FDA. Б, визуализация с PI.

Това изследване ни показва, че трябва да работим с популация на микроспори изградена основно от едноядрени и ранни двуядрени микроспори. За да оптимизираме условията на стрес, ние изследвахме влиянието на различни температури съответно 32°C и 4°C, както и времето на стрес – 1, 2 и 3 дни в среда NLN13 (Таблица 2). След стресово третиране микроспорите бяха инкубирани при 25°C за 30 дни.

Таблица 2. Влияние на температурата върху жизнеността и ембриогенезата при микроспори от домати сорт Moneymaker.

Състояние на микроспорите	Температура					
	32°C			4°C		
	1 ден	2 ден	3 ден	1 ден	2 ден	3 ден
Жизнени (%)	20.2	25.2	14.4	24.6	23.2	25.9
Вакуолизирани (%)	6.3	7.8	3.5	1.1	0.5	1.2

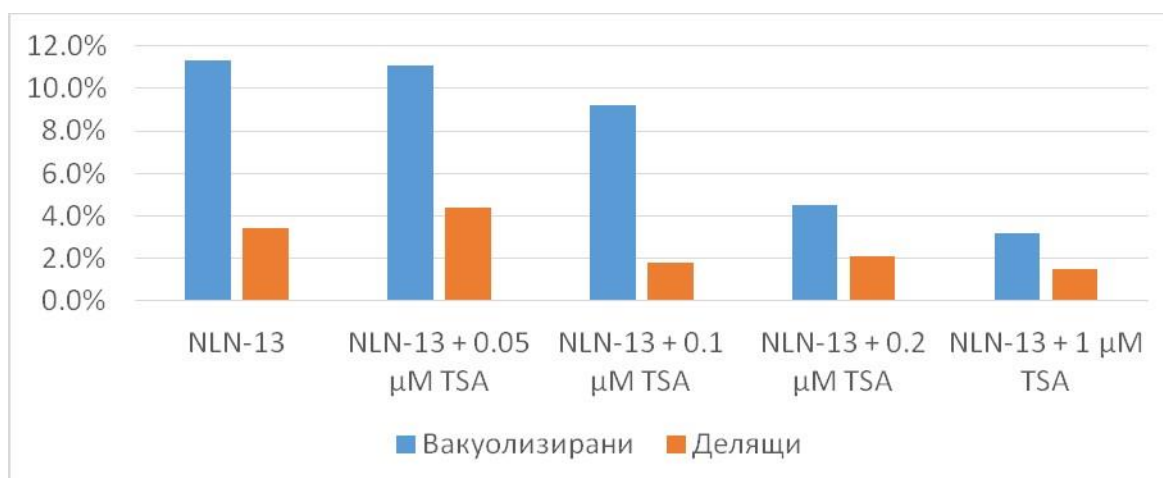
Ниската температура 4°C запази микроспорите от домати жизнени, но седем дни след началото на културата се наблюдаваха само единични клетки увеличили размера си. Студа сам по себе си не е достатъчен фактор за репрограмизиране на микроспори на домати. Висока температура от порядъка на 32°C показва по-добри резултати, като процента на жизнеспособни клетки беше висок, но също така можеха да се наблюдават и вакуолизирани микроспори, които имат потенциал да претърпят спорофитни деления. Най-оптимален се оказа стресът с висока температура за 2 дни при 32°C, като честотата на жизнени микроспори достигна 25.2%, а вакуолизираните клетки бяха приблизително 7.8%. Седем дни след започване на културата можеха дори да се открият единични дялящи се клетки (Фигура 11).



Фигура 11. Развитие на изолирани микроспори от домати след стрес при 32°C за 2 дни. А, жизнеспособна, не издута микроспора. Б, Издута микроспора. В, вакуолизирана микроспора. Г, Деляща се микроспора. Д, Не ембриогенна микроспора оцветена с DAPI. Е, Ембриогенна микроспора оцветена с DAPI показваща симетрично деление.

2. Оптимизиране на хранителните среди и индуциране на ембриогенеза в изолираните микроспори при сорт Moneymaker

Ли и сътрудници (2014)(32) доказват, че стрес с висока температура в комбинация с инхибитора на хистонов деацетилази TSA (trichostatin A) увеличават ембриогенното деление и ембрио формирането при рапица (*B. napus*). За да проверим ефекта на TSA върху развитието на микроспори от домати, добавихме различни концентрации 0.05, 0.1, 0.2, 1, 2 и 5 μM на TSA към ембриогенна среда NLN – 13 (Фигура 12) и инкубирахме за два дни при 32°C на тъмно.



Фигура 12. Ефект на TSA върху развитието на микроспори от домати сорт Moneymaker, 8 дни след изолация.

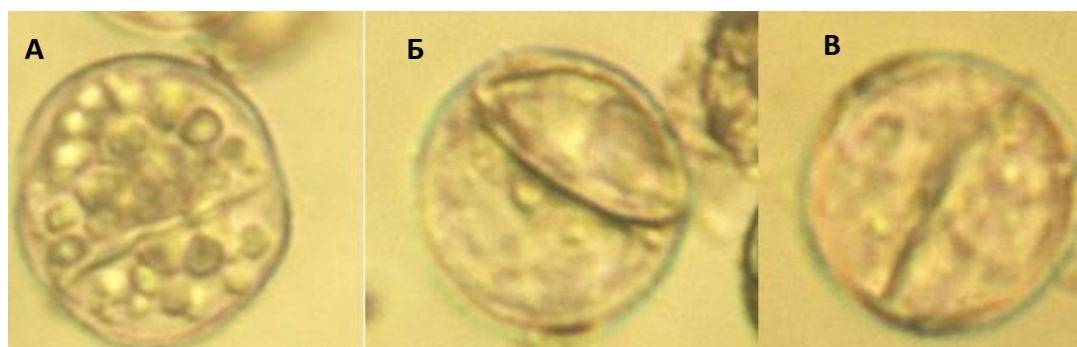
Концентрация на TSA 0.05 μM показва положителен ефект върху развитието на микроспорите. Осем дни след изолацията на микроспорите честотата на вакуолизирани и издути микроспори достигна 11.1%, освен това 4.4% от клетките преминаха към спорофитен път на делене. За сравнение контролата без TSA показва 11.3% клетки с увеличен размери и 3.4% дялящи се клетки. Концентрации на TSA по-високи от 0.05 μM по-скоро инхибираха развитието на микроспорите, като намаляването на вакуолизираните и издути клетки беше правопрпорционално с увеличаване на концентрацията на TSA.

След като установихме, че кратък стрес при 32°C за 2 дни в богатата хранителна среда NLN13 в комбинация с TSA има потенциал да отключи ембриогенността на микроспори от домати, ние се опитахме да оптимизираме условията, като изследвахме влиянието на по-високи концентрации захароза – 20 и 25% (Таблица 3) върху вакуолизирането и спорофитното делене на микроспори от домати сорт Moneymaker.

Таблица 3. Влияние на захарозата върху микроспоровата ембриогенеза при микроспори от домати.

Развитие на микроспорите	Захароза		
	NLN-13 0.05 μM TSA	NLN-20 0.05 μM TSA	NLN-25 0.05 μM TSA
Делящи (%)	3.9	3.5	1.2
Вакуолизирани (%)	9.1	7.3	5.3

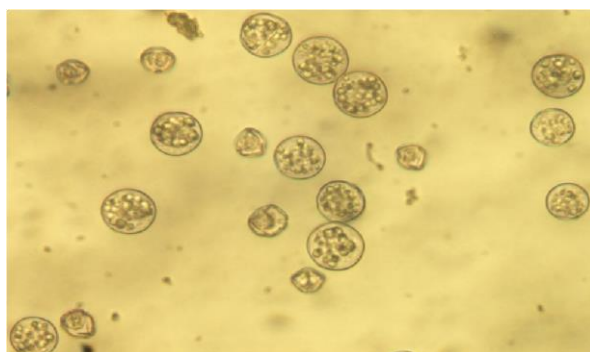
Изследванията показаха че среди NLN – 13 и NLN – 20 създават добри условия за развитие на микроспорите от домати с леко предимство за средата с по-ниско съдържание на захароза. Високата честота на жизнени микроспори корелираше с високия процент вакуолизирани микроспори с 9.1% и 7.3% за среди NLN – 13 и NLN – 20 съответно. Отчетохме почти 4% спорофитно дялящи се микроспори (Фигура 13), когато използвахме по-малко захароза. Микроспорите показаха само едно, най-често симетрично деление, което още веднъж доказа сложността и неподатливостта на микроспорите от домати към ембриогенеза.



Фигура 13. Ефект на ембриогенна среда NLN – 13 върху спорофитните деления на микроспори от домати. А, Б, В, дялящи се микроспори от домати сорт Moneymaker.

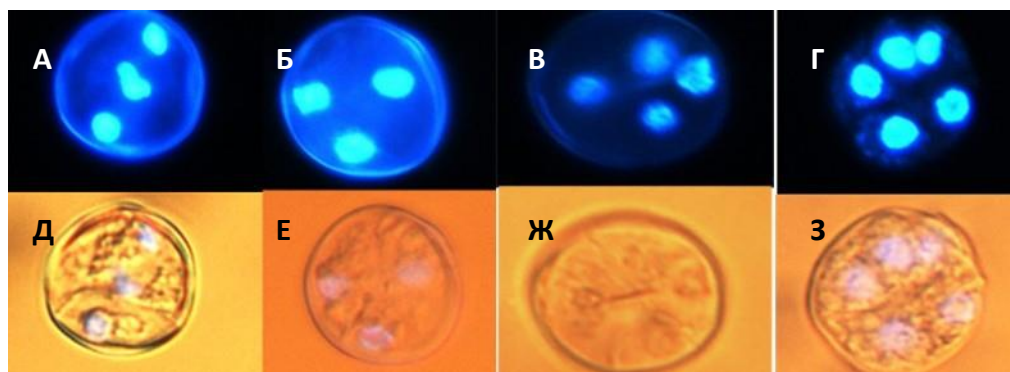
Въпреки, че условията на изолиране, культивиране и стрес на микроспори от домати бяха ефективни за репрограмизиране спрямо ембриогенеза, ние не можехме да отчетем микроспори претърпели повече от 1 спорофитно деление. В опит да оптимизираме условията за развитие на микроспорите ние добавихме ВА (BenzylAlcohol) в концентрации 50 и 100 μM към ембриогенната среда NLN – 13 и инкубирахме микроспоровата култура за 30 дни.

Честотата на дялящи се микроспори при експерименти без ВА достигаше приблизително 4%. Важно е да се отбележи, че микроспорите претърпяваха основно едно спорофитно деление и спираха по нататъшното си развитие. Когато 50 μM ВА беше добавен към среда NLN – 13 съдържаща 0.05 μM TSA не се наблюдаваше положителна промяна в профила на делене на микроспорите. Процентът дялящи се клетки беше приблизително 3.5%, което ни наведе на мисълта, че ВА няма пряко влияние върху културата. Значителна разлика се наблюдаваше, когато повишихме концентрацията на бензил алкохол в средата до 100 μM . Не само, че се увеличи броя на вакуолизирани микроспори (Фигура 14), но и честотата на делене беше по-висока – 4.6%.



Фигура 14. Вакуолизирани микроспори от домати сорт Монеумейкер инкубирани в присъствие на 100 μM ВА

Комбинацията на 100 μM ВА с 0.05 μM TSA в ембриогенна среда NLN – 13, показва много добри резултати за развитие на микроспори от домати сорт Монеумейкер. Две седмици след започване на културата можеха да се открият микроспори с 3, 4 и дори 5 ядра, което е доказателство, че са претърпели повече от 1 спорофитно деление (Фигура 15).



Фигура 15. Комбинаторен ефект на ВА+ TSA върху спорофитните деления на микроспори от домати сорт Монеумейкер. А, Б, В, Г, дялящи се микроспори визуализирани чрез DAPI. Д, Е, Ж, З, дялящи се микроспори визуализирани с Номарски микроскопия.

За съжаление 30 дни след началото на културата не се наблюдаваха допълнителни деления, не се формираха калусни структури или ембриони поради тази причина решихме да използваме среда за MS2, която обикновено се използва за „спасяване“ на ембриони спрели своето развитие. Микроспори от домати бяха култивирани и стресирани в среда NLN -13 и прехвърлени на среда MS2 за последващо развитие на микроспорите съответно на ден 2^{ри}, 4^{ти}, 6^{ти} и 10^{ти} (Таблица 4).

Таблица 4. Ефект на среда за спасяване на ембрио MS2 върху ембриогенезата на микроспори от домати.

Време на трансфер от NLN-13 на MS2 след изолация	Микроспорово развитие		
	Вакуолизирани (%) след температурен стрес	Делящи (%) след 8 дни	Жизнеспособни след 30 дни
2 дни	10.1	0.8	–
4 дни	8.8	1.0	–
6 дни	9.2	3.1	–
8 дни	8.4	3.3	–

Среда MS2 не беше благоприятна за развитие на делящите се микроспори, като 30 дни след изолацията не се наблюдаваха жизнени клетки. Освен това процентът на делящи се клетки беше по-нисък, когато микроспорите се инкубират на MS2 веднага след стреса или 4 дни след изолацията на микроспорите доказвайки неефективността на средата за спасяване на ембрио за развитие на микроспори от домати. Въпреки това проведените експерименти са изключително успешни, като се има в предвид, че има малко надеждни и стандартизирани методи за получаване на двойни хаплоиди при домати (33).

През последните години само две лаборатории са публикували резултати за получаване на домати растения от антери, с хаплоиден или двойно хаплоиден произход (34,35).

Във всички случаи се наблюдава ниска обща ефективност. Доматът се смята за изключително неподатлив и все повече се правят проучвания на факторите които имат съществена роля във андрогенезата на домата за получаването на успешни резултати.

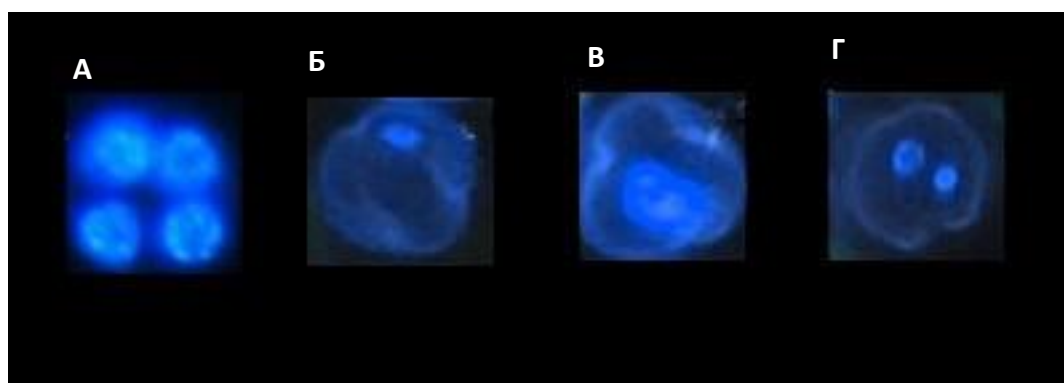
III. Микроспорова ембриогенеза при пипер

1. Селекция на микроспори според оптималната фаза на развитие, подходяща за преминаване към спорифитен път на деление при сортове ALL и ТД.

Фазата на развитие на микроспорите има значителен ефект върху индукцията на андрогенезата, както при антерни, така и при микроспорови култури. Супена и колеktiv (36) докладват за добри резултати при микроспорови култури, когато са използвани късни едноядрени микроспори. По-късно Ким и колеги (2008) (37) докладват, че смесена популация от микроспори в късна едноядрена и ранна

двуйдрена фаза на развитие водят до увеличаване на андрогенезата при микроспорови култури от лют пипер.

За да тестваме коя е оптималната фаза на развитие на микроспорите от пипер сорт ТД с цел преминаване към ембриогенен път на делене, изолирахме микроспори от четири различни фази: 1. микроспори във тетрадна фаза, 2. микроспори, съдържащи основно ранни едноядрени (80%) и късни едноядрени (20%) клетки, 3. микроспорова популация, съставена от късни едноядрени (80%) и ранни двуйдрени (20%) клетки и 4. късни двуйдрени поленови зърна (Фигура 16). За да потвърдим фазата на развитие използвахме флуоресцентното багрило DAPI. След изолация микроспоровата популация от всяка група беше култивирана в бедна хранителна среда BS7 за 3 дни при температура 33°C с цел репрограмизиране към ембриогенеза. След стресовото третиране микроспорите бяха прехвърлени на богата хранителна среда P1 за последващо развитие.

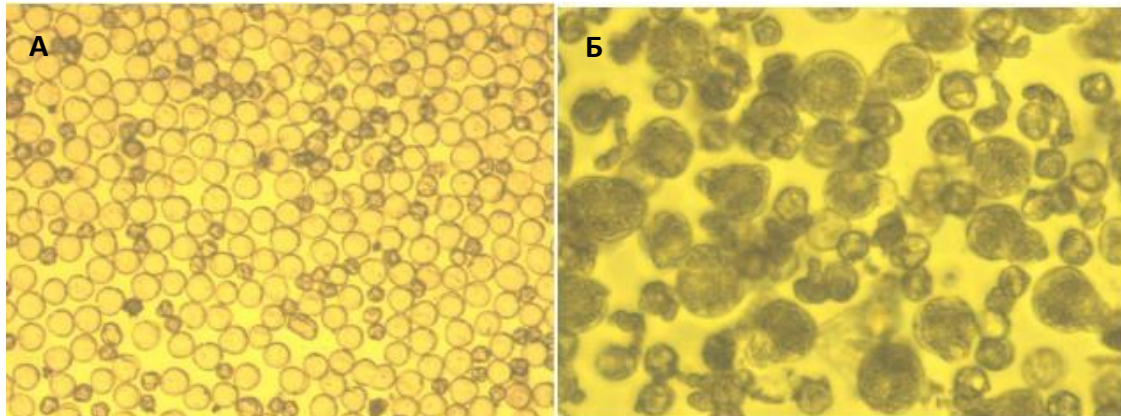


Фигура 16. DAPI оцветени микроспори от пипер в различни фази на развитие. А, тетрада, Б, ранна едноядрена, В, късна едноядрена, Г, ранна двуйдрена.

Първа група, съставена основно от тетради, не показва потенциал за ембриогенеза. Не се наблюдаваше увеличение в размера или делене на клетките, не само това, но след прехвърляне в богата хранителна среда не се наблюдаваха жизнеспособни микроспори. Популацията от микроспорите във втора група, съставена основно от ранни едноядрени (80%) и късни едноядрени (20%) микроспори, показва висока честота на жизнеспособни микроспори, като голяма част от тях дори увеличиха размерите си и големи вакуоли можеха да бъдат наблюдавани след три дена в индуциращата среда BS7. Един от показателите за промяна на пътя на развитие към ембриогенеза е именно увеличаване на размера на микроспорите. Въпреки това след трансфер на богата хранителна среда P1, процентът на дялящи се клетки беше много нисък (2 – 3%). Не се наблюдаваха повече от 3 – 4 деления, а 10 дни след започване на културата се наблюдаваше разкъсване на екзиновата стена и освобождаване на клетъчното съдържимо в средата. Найдобри резултати бяха наблюдавани при трета група, съдържаща късни едноядрени (80%) и ранни двуйдрени (20%) микроспори. Процентът на издути и вакуолизирани микроспори достигаше до 90% (Фигура 17), а след прехвърляне на богата хранителна среда се отчитаха множество деления (симетрични и несиметрични), като 20 дни след започване на културата можеха да се открият множество многоклетъчни структури, както и калусни образувания.

Четвърта група съставена основно от двуядрен полен, не показва промяна в структурата при инкубиране на бедна хранителна среда BS7, но след трансфера на младите поленови зърна на среда за ембриогенеза се наблюдаваше натрупване на скорбелни зърна във цитоплазмата на клетките. Установено беше зреене на полена (Фигура 17).

Оптималната фаза за репрограмизиране на микроспори от пипер ТД сорт е тази при която микроспоровата популацията е съставена от късни едноядрени (80%) и ранни двуядрени (20%) микроспори.



Фигура 17. Изолирани микроспори от пипер ТД сорт. А, Издути и вакуолизирани микроспори три дни след изолация. Б, микроспори/полени натрупващи скорбяла 7 дни след изолация.

2. Оптимизиране на хранителните среди и индуциране на ембриогенеза в изолираните микроспори при сортове ALL и ТД.

След като установихме оптималната фаза на развитие на микроспорите от пипер, се насочихме към оптимизиране на хранителните среди и към основния индуктор на ембриогенезата, а именно стреса под различна форма. Бедната хранителна среда BS7 показва добър потенциал за репрограмизиране на незрелите поленови зърна. За да оптимизираме хранителната среда ние тествахме влиянието на различни концентрации сорбитол и манитол, приложени за различен интервал от време. Сорбитолът и манитолът представляват неметаболизиращи се съединения, които имат основно осморегулаторна функция и могат да бъдат използвани като осмотични стресови фактори. Използването на тези въглехидратни алкохоли индуцира условия на глад, които могат да превключват нормалния гаметофитен път на микроспората към ембриогенеза. „Гладуването“ като индуктор на ембриогенеза беше приложено върху микроспоровите култури в комбинация с висока температура – 33°C, тъй като по литературни данни е установено, че едни от най-често използваните фактори за превключване на микроспорите към ембриогенеза са именно гладуване в това число липсата на захар и азот, както и осмотичния стрес. Микроспори от тютюн преминават успешно към ембриогенеза след азотно и въглехидратно гладуване (38).

- *Ефект на сорбитол и манитол върху микроспоровата ембриогенеза при сортове AAL и ТД.*

За целта бяха тествани различни концентрации на манитол и сорбитол за два различни сорта пипер (AAL и ТД). Изолираните микроспори бяха отгледани в BS7 среда, съдържаща сорбитол в концентрации 0.25 или 0.5М или BM7 среда, съдържаща манитол в концентрации 0.25 или 0.5 М, и инкубирани на тъмно за 3, 6 или 9 дни при 33°C (Таблица 5).

Таблица 5. Ефект на сорбитол и манитол върху микроспоровата ембриогенеза при сортове AAL и ТД.

Период на третиране	Издуги микроспори							
	Сорбитол 0.25 М		Сорбитол 0.5 М		Манитол 0.25 М		Манитол 0.5 М	
	AAL	ТД	AAL	ТД	AAL	ТД	AAL	ТД
3 дни	60,00%	68,00%	55,00%	51,00%	45,00%	55,00%	35,00%	50,00%
6 дни	59,00%	61,00%	62,00%	48,00%	30,00%	37,00%	32,00%	28,00%
9 дни	3,00%	6,00%	1,00%	4,00%	1,00%	2,00%	5,00%	2,00%

Изолираните микроспори показаха най-висок процент на издуги и вакуолизирани микроспори, когато бяха инкубирани за 3 дни при 33°C в среда BS7, съдържаща сорбитол или манитол. Увеличаването на размера на микроспорите е ясен знак за ембриогенния статут на културалните микроспори [39]. Най-добър резултат беше наблюдаван при наличие на 0.25 М сорбитол в средата, където 68% от микроспорите на ТД сорта и 60% при сладкия пипер ALL показаха увеличение на размера. Добри резултати бяха постигнати и при наличие на 0.5 М сорбитол в средата, където 51 и 55% от микроспорите на сорт ТД и сладкия пипер ALL показаха увеличение. Като цяло сорбитолът се доказа като по-добър осмотичен регулатор в сравнение с манитолът за всички тествани варианти. Увеличаването на времето на гладуване е обратно пропорционално на процентът издуги микроспори. След 9 дни гладуване в среда „В“ независимо от концентрацията на сорбитол или манитол, концентрацията на микроспори с увеличен размер беше значително ниска.

- *Ефект на рН, сорбитол и температура върху репрограмизирането на микроспори при сортове ALL и ТД.*

За да тестваме коя температура е оптимална като стресов фактор, ние подложихме изолираните микроспори от сладък пипер ALL и лют пипер сорт ТД на различни температури в комбинация с гладуване в най-добрите варианти от предишния експеримент а именно среда BS7, съдържаща 0.25М или 0.5М сорбитол. В допълнение, изследвахме и различни стойности на рН за оптимизиране на условията на стрес (Таблица 6).

Таблица 6. Различни варианти на среда BS7 с различна концентрация на сорбитол и рН.

Условия на средата	Варианти на BS7					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
pH	5.0	5.0	6.0	6.0	7.0	7.0
Сорбитол	0.25M	0.5M	0.25M	0.5M	0.25M	0.5M

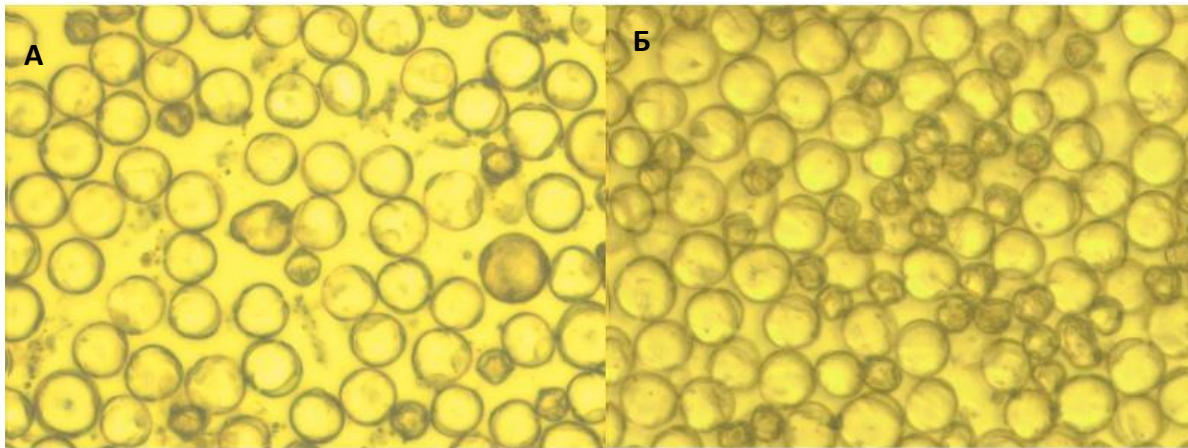
Изследвахме три различни киселинности на средата – pH 5.0, pH 6.0 and pH 7.0 в комбинация с температурно третиране. Барينو̀ва и колеги (2004) докладват, че инвертазната активност силно намалява при високо pH, в резултат на което намалява и усвояването на захарозата, като максималното усвояване е при pH 5.0 определено на базата на инвертазната активност. Микроспорите гладуват при високо pH, а такова гладуване последвано от репрограмиране, може да доведе до спорофитно развитие. pH на средата беше изследвана като стресов и кондиционен фактор.

Стресовото третиране с висока или ниска температура е съществен фактор за репрограмиране на микроспорите (40, 41). В настоящото изследване тествахме ниска температура – 4°C, оптимална температура за развитие на микроспори в богата хранителна среда – 25°C, и висока температура, използвана като стресов фактор – 33°C, приложени за 3 дни на тъмно (Таблица 7).

Таблица 7. Ефект на pH, сорбитол и температура върху репрограмирането на микроспори при сладък пипер ALL и лютив пипер ТД

Варианти	Температура	Микроспори с увеличен размер	
		ААL	ТД
V1	4°C	16,00%	13,00%
	25°C	1,00%	6,00%
	33°C	4,00%	8,00%
V2	4°C	5,00%	22,00%
	25°C	2,00%	3,00%
	33°C	5,00%	8,00%
V3	4°C	61,00%	66,00%
	25°C	39,00%	67,00%
	33°C	45,00%	69,00%
V4	4°C	78,00%	77,00%
	25°C	41,00%	72,00%
	33°C	62,00%	67,00%
V5	4°C	72,00%	89,00%
	25°C	52,00%	62,00%
	33°C	60,00%	68,00%
V6	4°C	71,00%	70,00%
	25°C	48,00%	64,00%
	33°C	55,00%	51,00%

Резултатите показват, че по-високи рН стойности са по-оптимални за микроспорово репрограмизиране към ембриогенеза, като най-добрият резултат за лютивият пипер беше отчетен при рН 7.0. Комбинацията от рН 7.0 и ниска температура (4°C) в среда с 0.25М сорбитол, показва най-добрия ембриогенен отговор. Честотата на жизнеспособни и издути микроспори е почти 90% (Фигура 18). Най-добрият ембриогенен отговор, а именно 72% вакуолизирани и издути микроспори за сладкия сорт ALL, беше отчетен отново при ниска температура (4°C), но при по-висока концентрация от сорбитол – 0.5М и по-ниска рН стойност 6.0. Количеството на издути микроспори е високо, с изключение при вариант 1 и 2, където рН на средата е 5.0. Въпреки това ниската температура при 4°C и високата температура при 33°C отново показват най-високата честота на жизнеспособни и увеличили размера си микроспори. Гладуване при 25°C намалява индукционната честота и при двата генотипа. Наблюдава се и акумулиране на скорбелни зърна, които са индикатор за узряване на полена и гаметофитен път на развитие.



Фигура 18. Изолирани и репрограмизирани микроспори от сортове AAL и ТД. А, микроспори от ТД сорт, инкубирани при 4°C, рН 7.0 и 0.25 М Сорбитол. Б, микроспори от AAL сорт, инкубирани при 4°C, рН 6.0 и 0.5 М Сорбитол.

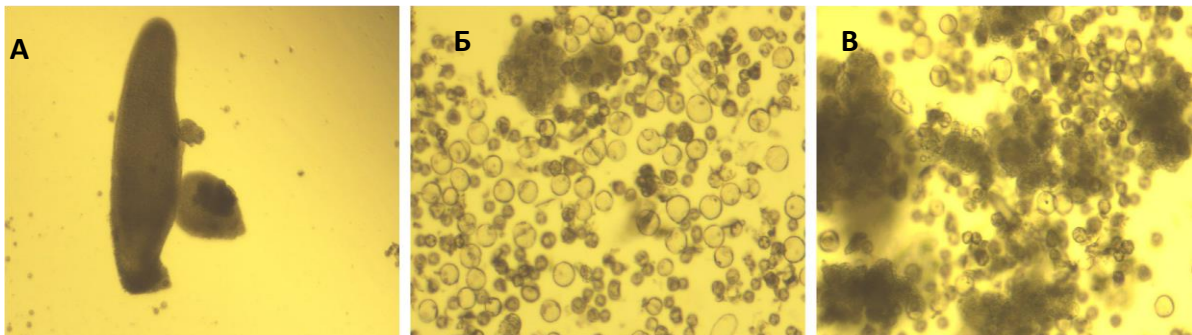
□ *Ефект на колхицина върху микроспоровата ембриогенеза при сортове AAL и ТД.*

В опит да оптимизираме иницирането на честотата на микроспорова ембриогенеза и спорофитните деления, ние подложихме изолираните микроспори на стрес с колхицин. Много проучвания показват, че колхицина води до значително увеличаване на формирането на ембриони и намалява процента на албино растенията при различни видове. Колхицинът представлява алкалоид и диполимеризиращ агент, който нарушава формирането на микротубулите по време на клетъчното деление през метафазата и така инхибира анафазата, като резултат не се намалява хромозомния брой по време на клетъчното деление (42).

За целта добавихме колхицин в концентрация 0.25 μ М или 0.5 μ М към бедната хранителна среда BS7, която показва най-добри резултати в комбинация с гладуване и температурен стрес и инкубирахме микроспорите за 3 дни при 33°C

на тъмно. Освен комбинаторния ефект, ние изследвахме самостоятелният ефект на колхицина като го добавихме в богатата хранителна среда P1 и инкубирахме микроспорите за 40 дни при 25°C на тъмно без допълнителен стрес. Освен това за да тестваме как колхицинът действа за по-дълъг период от време върху развитието на микроспорите ние първо стресирахме микроспорите в бедна хранителна среда BS7 за 3 дни при 33°C, след което добавихме колхицин отново в концентрация 0.25 μM или 0.5 μM към богатата хранителна среда P1 и инкубирахме незрелите поленови клетки за 40 дни при 25°C на тъмно.

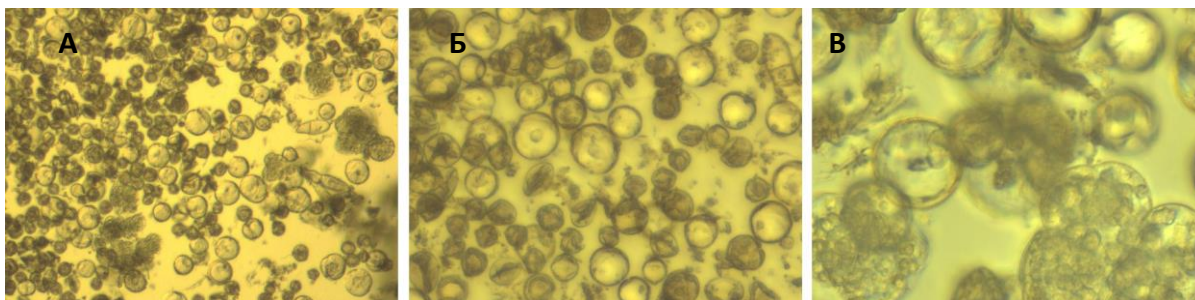
Микроспорите, инкубирани в среда BS7 с 0.25 μM или 0.5 μM колхицин, увеличиха размера си, като бяха отчетени съответно 73,9% и 49.5% жизнени и вакуолизирани микроспори. След като бяха прехвърлени на богата хранителна среда без наличие на колхицин микроспорите претърпяха спорофитни деления. 15 дни след началото на културата бяха отчетени 7.2% дялящи се клетки за варианта с 0.25 μM колхицин и 4.3% дялящи се клетки за варианта с 0.50 μM колхицин. С напредване на културата можеха да се визуализират многобройни калусни структури както и единични аномални ембриони, когато 0.25 μM колхицин беше използван като стресов фактор (Фигура 19) и единични калуси когато 0.5 μM колхицин беше използван заедно със среда BS7. Това наблюдение показва, че високата концентрация колхицин може да има летален ефект върху здравето и развитието на микроспорите, но също така можем да заключим, че колхицинът в тестваните концентрации не повлиява драстично микроспоровата ембриогенеза след като в края на културата се наблюдават основно калусни структури а не нормално развити котиледонови ембриони.



Фигура 19. Комбинаторен ефект на 0.25 μM колхицин висока температура и гладуване върху ембриогенезата на микроспори от пипер сорт ТД . А, Аномално ембрио. Б, Делящи се микроспори и калус. В, калусни структури.

Когато колхицин беше използван самостоятелно като стресов фактор в концентрации 0.25 μM и 0.5 μM в богатата хранителна среда P1, микроспорите не показаха спорофитен профил на делене и не след дълго леталността на микроспорите достигаше 100%. Когато добавихме колхицин в концентрации 0.25 μM и 0.5 μM към вече репрограмирани микроспори за дълъг период от време в богатата хранителна среда P1 забелязахме, че колкото по-дълго микроспорите се инкубират заедно с колхицин толкова по-голям е токсичния ефект на този диплоидизиращ агент. Процентът на дялящи се клетки 15 дни след изолация за вариантът с 0.25 μM колхицин достигна 11.2%, но с времето процентът на

жизнеспособни клетки драстично намаляха и на края на културата можеха да се наблюдават единствено единични калусни структури (Фигура 20). Когато колхицинът беше използван в концентрация 0.5 μM , микроспорите показаха приблизително 3.6% деление, но в края на културата не се наблюдаваха калусни структури или ембриони.



Фигура 20. Ефект на 0.25 μM върху ембриогенезата на микроспори от пипер сорт ТД. А, Б, жизнеспособни, делящи се микроспори. В, единични калусни структури

Колхицинът не беше достатъчно ефективен като стресов фактор за превключване на микроспорите от пипер към ембриогенеза. Дори в комбинация със стресови фактори като гладуване и висока температура, които ефективно променят гаметофитния път на микроспорите към спорофитен, не показва положителен резултат и имаше по скоро токсичен ефект върху развиващите се микроспори. Продължителното инкубиране с колхицин драстично намалява жизнеспособността на културата и не води до формиране на ембриони или голямо количество калусни структури.

□ *Ефект на гама радиация върху индуцирането на микроспоровата ембриогенеза при сорт ТД.*

С цел оптимизация на стресът като критичен фактор за превключването на растителните микроспори към спорофитно деление и формиране на ембриони ние тествахме ефекта на гама радиация. Пехан и колеги (1989)(43) докладват за положителен ефект на гама радиация върху репрограмиране на микроспори от рапица. За целта беше използван лютив пипер сорт ТД, който показва най-висока податливост към ембриогенеза. Цветни пъпки, съдържащи основно късни едноклетрици и ранни двуклетрици микроспори, бяха подбрани и подложени на различни дози гама радиация (Таблица 8), а източникът на радиация беше Со60 (Кобалт 60). Дозите йонизиращо лъчение отговаряха на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 и 90 грея, а силата на облъчване беше 491 грея. След облъчване микроспорите бяха изолирани от цветните пъпки и инкубирани в бедна хранителна среда BS7 за 3 дни при 33°C, след което незрелите поленови клетки бяха прехвърлени на богата хранителна среда NLN1/2 съдържаща 0.3 М малтоза като въглехидратен източник и инкубирани при 25°C на тъмно.

Таблица 8. Ефект на различни дози гама радиация върху ембриогенезата при лют пипер сорт ТД.

Етапи на ембриогенеза	Доза радиация (грея)								
	Контрола	20	30	40	50	60	70	80	90
Жизнени 3 дни	45,2%	43,5%	35,0%	33,6%	22,3%	22,1%	27,2%	10,3%	9,4%
Делящи 10 дни	4,7%	3,2%	3,4%	2,5%	1,5%	0,9%	1,1%	0,3%	0,2%
Ембрио/калус 30 дни	Калус +++	Калус +++	Калус +++	Калус +++	Калус ++	Калус +	Калус +	–	–

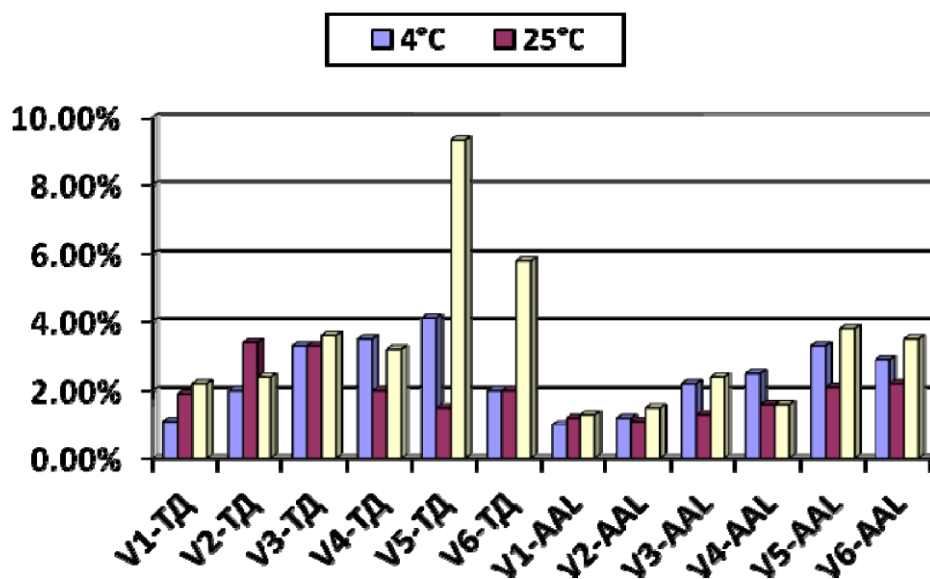
Наблюденията показаха, че най-вероятно гамарадиация по-голяма от 50 грея има пагубен ефект върху развитието на микроспорите, след като процентът на жизнени микроспори и делящи се клетки беше нисък. На края на културата бяха отчетени липса на ембриони и калусни структури или наличие на единични калусни структури, които при прехвърляне на твърда хранителна среда В5 (44) съдържаща 2% захароза не се развили в зелени растения. По-ниски дози гама радиация показаха по-благоприятен ефект върху микроспорите, като бяха отчетени 43.5% жизнени микроспори, когато бяха използвани 20 грея гама радиация. Този процент не се различаваше драстично от контролата, при която жизнените микроспори беше 45.2%. Подобен беше резултатът и при процентът на делящи се клетки, съответно 4.7% за контролата и 3.2% за варианта, при който беше използван 20 грея гама радиация. Подобни бяха резултатите при доза на гама радиация 30 и 40 грея със съответно 35 и 33.6% жизнени микроспори три дни след изолацията им. Процентът на спорофитно делящи се клетки беше 3.4 и 2.5% а в края на културата се наблюдаваха голям брой калусни структури, които не се развили в растения. Едно аномално ембрио можеше да се отчете за вариантите, при които беше използвана 20 и 30 грея гама радиация. Ниските дози гама радиация могат да имат положителен ефект върху андрогенезата при пипер, но за целта трябва да се направят по-детайлни изследвания. Високи дози гама радиация от порядъка на 80 и 90 грея в случая не показват положителен ефект, а микроспорите не формират ембриони или калусни структури.

3. Оптимизация на условията за спорофитното делене при сортове ALL и ТД.

Стресово третираните микроспори бяха прехвърлени на богата хранителна среда Р1 за ембриогенеза. Първите спорофитни деления бяха наблюдавани приблизително седем дни след изолирането на микроспорите.

Въпреки, че най-големият процент от жизнеспособни и издути клетки беше отчетен за вариантът с рН 7.0 и ниска температура 4°C при 0.25 М сорбитол за лютивият сорт и вариантът с рН 6.0, ниска температура 4°C при 0.5 М сорбитол при сладкият сорт ААL, това наблюдение не корелираше с най-големият процент делящи се клетки, който беше наблюдаван при варианта с висока температура – 33°C, рН 7.0 и 0.25 М сорбитол и отговаряше на 9.3% за ТД сорта и 3,8% за сорт ААL(Фигура 21). Вариантът с 0.5М сорбитол, висока температура – 33°C и рН 7.0 също показва добри резултати с 5.8% делящи се клетки при лютият пипер и 3.5% за сладкият сорт. 20 дни след началото на културата, честотата на срещане на

многоклетъчни и калусни структури за вариант V5 и вариант V6 беше висока, но само за вариантите, в които беше използвана висока температура от порядъка на 33°C. По-ниската концентрация на сорбитола беше по подходяща за инициране на многобройни спорофитни деления и за двата сорта пипер. Комбинацията от гладуване и ниска температура – 4°C показва добри резултати за поддържане жизнеността на микроспорите, както и за инициране на делене, но за сметка на това можеха да се открият само единични калусни структури 20 дни след началото на културата. Студът най-вероятно оказва по-голямо влияние върху запазване на жизнеността на микроспорите, както и в намаляване на процесите на деградация и съпътстващите ги токсични ефекти (45). Съндърланд и Робъртс (1979) установяват, че студът подsigурява оцеляването в по-голяма степен на ембриогенните поленови зърна. Когато нормална температура за спорофитно развитие на микроспорите, а именно 25°C, беше използвана в комбинация с гладуване и различно рН, микроспорите показаха спорофитен профил на делене. Характерно за всички варианти беше, че микроспорите претърпяха максимум от 1-2 симетрични деления и не се наблюдаваха многоклетъчни структури. Тези резултати навеждат на мисълта, че оптималната температура за развитие на микроспорите 25°C след репрограмиране не е оказала влияние като стресов фактор за превключване към спорофитно делене, а основният стресов фактор е била бедната хранителна среда и създадените условия на гладуване. Въпреки това гладуването само по себе си не е достатъчно за да стимулира многобройни микроспорови деления и формиране на ембриони. Това наблюдения показва, че 0,25 М сорбитол е по-подходящ за индуциране на микроспорова ембриогенеза, както и че високата температура и по-високо рН са по-оптимални за репрограмиране на микроспорите. Като цяло бяха отчетени по-добри резултати за лютивият пипер, което е пряко доказателство за силната генотипна зависимост и способността за преминаване към ембриогенеза.



Фигура 21. Влияние на температурата, рН и концентрацията на сорбитол върху деленето на микроспори от пипер сортове ALL и ТД

След като установихме част от критичните за микроспорова ембриогенеза фактори, а именно оптималната фаза на развитие на незрелите поленови зърна, най-подходящите стресови фактори за репрограмиране на микроспорите и зависимостта на генотипа на различните сортове ние се насочихме към оптимизиране на ембриогенните среди, в които ще се осъществяват деленията и формирането на хаплоидните ембриони. За целта стресово третирани и репрограмирани микроспори от лют пипер сорт Джолюнска Шипка в среда BS7 за 3 дни при 33°C бяха прехвърлени освен в богатата хранителна среда P1 и в ембриогенни среди: NLN (71), NLN1/2, NN (70) B5 (166), MS (167), съдържащи $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (500 mg/1), глутамин (439 mg/1) и малтоза 0.3 M. Развитието на микроспорите беше оценено след 15 дни след започване на културата. Най-добрият резултат беше наблюдаван, когато бяха използвани NLN1/2 и NN хранителни среди последван от NLN, B5 и MS (Таблица 9). Въпреки, че разликата в честотата на дялящи се микроспори не беше значителна NLN1/2 показва най-добри резултати с 13.4% дялящи се клетки, сравнена с NN, при която се отчетоха 13.1% и NLN с 12.2%. В допълнение микроспорите отглеждани в NLN1/2, NLN и NN се развиха в многоклетъчни структури и дадоха начало на множество калуси. Среди B5 и MS доведоха до честота на делене съответно 8,6 и 8,3%, но в последствие микроспорите не формираха калусни структури или ембриони (Таблица 20).

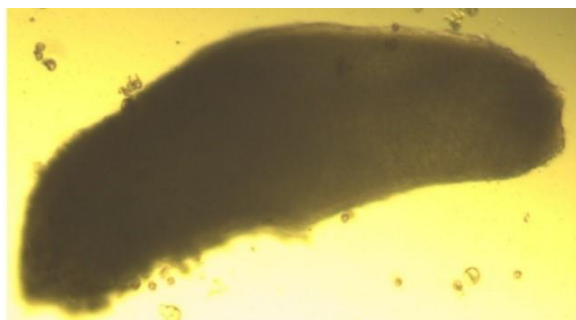
Таблица 9. Ефект на хранителни среди върху деленето на изолирани микроспори от сорт Джолюнска Шипка.

Среди	Делящи се микроспори (%)	Калусни структури
NLN1/2 (Lichter, 1982)	13.4	+
NN (Nitsch and Nitsch, 1969)	13.1	+
NLN (Lichter, 1982)	12.2	+
B5 (Gamborg, 1970)	8.6	-
MS (Murashige and Skoog, 1962)	8.3	-

• *Ефект на PEG върху спорофитното делене и ембриогенезата*

С цел да оптимизираме влиянието на ембриогенната среда NLN1/2, ние добавихме PEG (полиетилен гликол), за да създадем добро осмотично налягане за спорофитно развитие на микроспорите. Три различни концентрации на PEG 6000 (10, 20 и 25%) бяха изпробвани за подобряване на честотата на деление и формиране на ембриогенни структури. И трите изпитани концентрации на PEG не показаха подобрене в процента на дялящи се микроспори или в честотата на формиране на многоклетъчни структури и в края на културата се формираха основно калуси, но за вариантът с 10% PEG 6000 можеха да се открият единични абнормални ембриони (Фигура 22). Наличието на 10% PEG 6000 в средата имаше минимален, но положителен ефект върху деленето на микроспорите и преминаването им директно към формиране на ембрио и пропускане на калус

фазата. От тук нататък ние използвахме този компонент постоянно в ембриогенната среда и продължихме оптимизирането и.



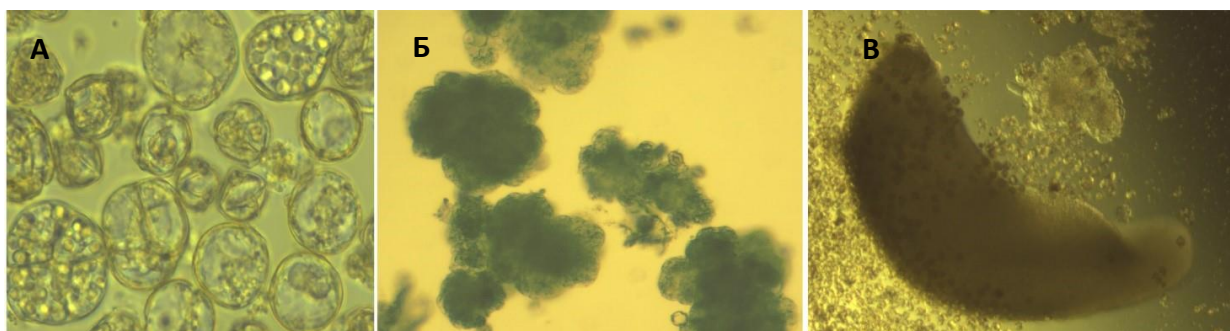
Фигура 22. Абнормално ембрио формирано в среда с 10% PEG 6000, 30 дни след началото на културата.

- *Ефект на въглехидратни източници върху спорофитното делене и ембриогенезата*

За да проверим влиянието на различни въглехидратни източници върху развитието на микроспорите ние тествахме четирите основни въглехидрата използвани в *in vitro* експерименти с микроспорови култури от ТД, а именно захароза, глюкоза, малтоза и галактоза. Всеки въглехидрат беше добавен в концентрация 0.1 М, 0.2М и 0.3 М към средата, която показва най-добри резултати – NLN1/2. Глутамин беше добавен като азотен източник в концентрация 439 mg/l. Малтозата в концентрация 0.3 М се доказва като най-добрият въглехидратен източник за развитието на микроспори от пипер сорт ТД, последвана от захарозата с концентрация 0.2 М. Галактозата и глюкозата не се оказаха подходящи за поддържане на делене и жизнеспособност на културалните микроспори, като не се наблюдаваха повече от 2-3 деления, или честотата на жизнеспособни клетки драстично намаляваше след 15 дни (Таблица 10).

Таблица 10. Ефект на различни въглехидратни източници върху ембриогенезата на микроспори от лют пипер сорт ТД.

	Малтоза			Захароза			Глюкоза			Галактоза		
	0.1M	0.2M	0.3M	0.1M	0.2M	0.3M	0.1M	0.2M	0.3M	0.1M	0.2M	0.3M
Делене %	6.9	8.3	8.4	3.2	5.5	4.4	3.8	2.3	3.3	0.2	0.5	0.3
Калус	++	+++	+++	+	++	++	–	–	–	–	–	–
Ембрио	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–



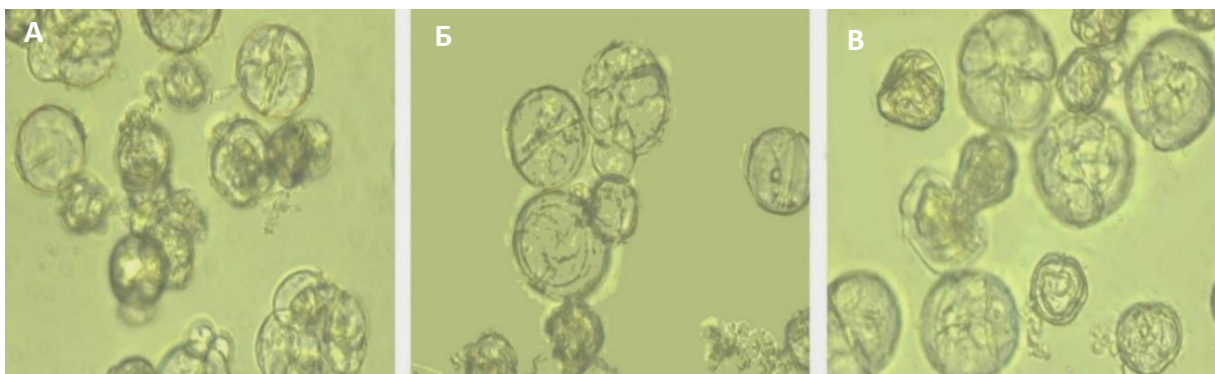
Фигура 23. Ефект на ембриогенна среда NLN1/2 съдържаща 0.2 М малтоза. А, дялящи се клетки и многоклетъчни структури. Б, калусни структури. В, абнормално ембрио.

Освен това средата съдържаща малтозата в концентрация 0.2 и 0.3М освен високият процент дялящи се клетки и големият брой калусни образувания можеха да се открият и единични абнормални ембриони (Фигура 23). Подобен резултат беше наблюдаван и за среда с 0.2 М захароза.

□ *Ефект на цитокинини и инхибитор на ауксиновият транспорт върху формирането на ембриони.*

Въпреки оптимизирането на много фактори и увеличаване на процента жизнеспособни и дялящи клетки, микроспорите не преминаваха калусната фаза и в културата не се наблюдаваха нормално изглеждащи торпедовидни и котиледонови ембриони, а единствено единични абнормални образувания, които не се развиваха в зелени растения след като бяха прехвърлени на твърда среда за растеж. Това ни наведе на мисълта, че вероятно съотношението на растежни регулатори – ауксини към цитокинини е приблизително равно или в такива граници, че води до производството на калусни структури.

Поради тази причина изследвахме влиянието на различни концентрации цитокинини върху клетъчното делене на микроспори от лютив пипер ТД с цел да променим съотношението в полза на цитокинините. Изследваните концентрации бяха съответно 1 mg/l, 2 mg/l и 5 mg/l от кинетин, 6-ВАР (6-Benzylaminopurine) и зеатин. И трите хормона имаха положителен но минимален ефект върху микроспоровата ембриогенеза. Най-добри резултати показаха 6-ВАР и зеатин в концентрации съответно 2 и 5 mg/l, като повишиха процента на симетрично дялящи се клетки, както и честотата на ясно изразени звездовидни структури – показател за ембриогенност в културата (Фигура 24), но 30 дни след изолацията на микроспорите все още се откриваха само калусни структури и минимален брой абнормални ембриони.



Фигура 24. Ефект на 6 – ВАР с концентрация 2mg/l върху деленето на микроспори от сорт ТД. А, Б, симетрично дялящи се микроспори. В, звездовидна структура.

Екзогенно добавяне на цитокинини не промени съдбата на микроспоровата популация и винаги в края на културата се наблюдаваха калусни структури или единични абнормални ембриони. Най-вероятно формирането на калуси е независимо от съотношението на растежни регулатори в случая, но за да потвърдим тази теория ние добавихме към средата инхибитор на ауксиновия

транспорт. Инхибитор на ауксиновият транспорт ТІВА (2, 3, 5-Triiodobenzoic acid) беше добавен към ембрионната среда веднага след индукционният стрес в концентрации 5 и 10 μM . Въпреки, че микроспорите показаха добър профил на делене с голям брой симетрични и звездовидни структури, в края на културата се наблюдаваха отново само калусни структури и липса на ембриони. Това наблюдение найвероятно потвърждава предположенията, че ендогенните растежни регулатори нямат пряк ефект върху формирането на ембриони при изолирани и *in vitro* култивирани микроспори от пипер. Екзогенно добавяне на цитокинини също не доведе до положителен ефект в края на културата въпреки, че имаше положителен ефект върху деленето на микроспорите. Поради тази причина не използвахме растежни регулатори за по нататъшно оптимизиране на културата.

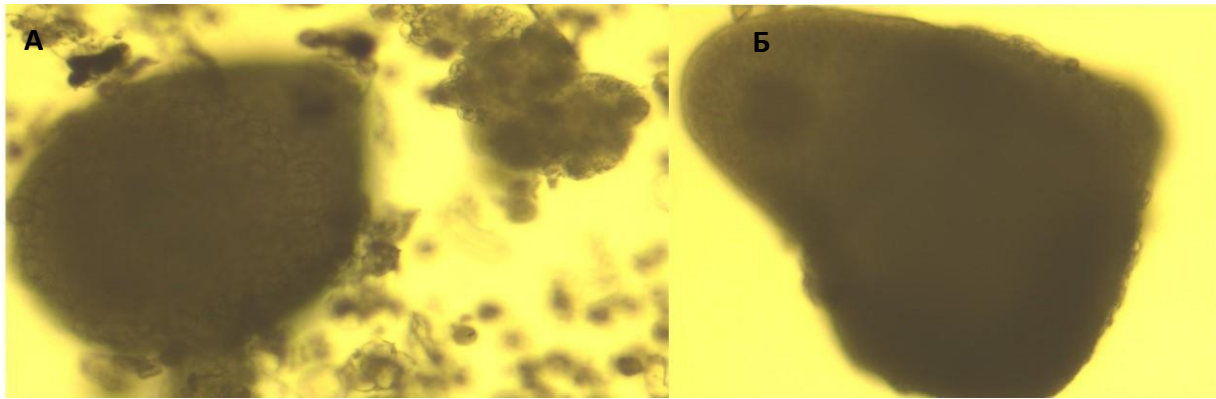
□ *Ефект на плодници от пипер или пшеница върху формирането на ембриони.*

Друг фактор, който тествахме с цел формиране на хаплоидни ембриони беше кокултура с плодници. Използвахме плодници от сладък пипер ААL и плодници от пшеница сорт Разул. Изолирането на плодниците ставаше 2 – 3 дена преди оплождането. Изследвахме влиянието на различен брой плодници, както и времето на добавянето им към средата (Таблица 11). Изолирани микроспори от лют пипер бяха стресирани в среда BS7 при 33°C за три дни и инкубирани с различен брой плодници от пипер или пшеница. Плодници бяха добавяни в началото на културата веднага след изолацията, на третият ден след трансфер на микроспорите на богатата хранителна среда и 10 дни след изолацията, когато се наблюдават първите спорофитни деления и присъстваха като спомагателен фактор до края на културата.

Таблица 11. Ефект на плодници от пипер сорт ААL върху ембриогенезата при микроспори от лют пипер ТД.

Време на добавяне на плодниците	Плодници от пипер сорт ААL					
	2 – 3	7 – 8	10 – 11	2 – 3	7 – 8	10 – 11
1 ^{-ви} ден	–	–	–	–	–	–
3 ^{-ти} ден	–	1.25	0.25	–	–	–
10 ^{-ти} ден	–	0.25	–	–	–	–
	<i>Глобуларни абнормални ембриони</i>			<i>Котиледонови ембриони</i>		

Плодници от пипер сорт ААL не бяха достатъчно ефективни, за да увеличат честотата на андрогенеза и ембрио формиране. Въпреки това можеха да се наблюдават единични глобуларни и сърцевидни ембриони, които не се развиваха в здрави котиледонови ембриони (Фигура 25).

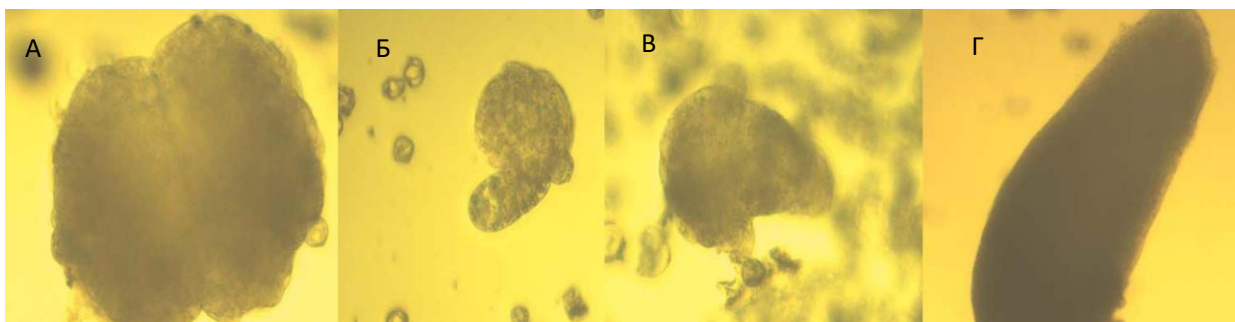


Фигура 25. Ефект на плодници от пипер сорт ААL върху ембриогенезата при лют пипер сорт ТД. А, глобуларно ембрио. Б, сърцевидно ембрио.

Най-добри резултати бяха отчетени, когато 7 – 8 плодника бяха добавени точно след приключване на стресирането и прехвърлянето на богата хранителна среда на микроспорите от лют пипер. Глобуларни ембриони можеха да се наблюдават, и когато 7 – 8 плодника се добавят на десетият ден след изолирането на микроспорите, или когато се добавят 10 – 11 плодника три дни след изолация, но честотата на тези ембриогенни структури беше много ниска. При така изследваните условия не се наблюдаваха здрави и добре изглеждащи котиледонови ембриони за това предположихме, че ефектът на плодниците от пипер сорт ААL не е съществен и се насочихме към кокултивиране с плодници от пшеница сорт Разул, като използвахме същите условия (Таблица 12).

Таблица 12. Ефект на плодници от пшеница *Triticum aestivum* L., сорт Разул, върху ембриогенезата при микроспори от лют пипер сорт ТД.

Време на добавяне на плодниците	Плодници от пшеница сорт Разул (брой)					
	2 – 3	7 – 8	10 – 11	2 – 3	7 – 8	10 – 11
1 ^{-ви} ден	–	–	–	–	–	–
3 ^{-ти} ден	–	46.3	–	0.25	89.5	1.75
10 ^{-ти} ден	–	–	13.1	–	–	–
	Глобуларни абнормални ембриони			Котиледонови ембриони		



Фигура 26. Ефект на плодници от пшеница сорт Разул върху ембриогенезата при лют пипер ТД. А, Б, глобуларни ембриони. В, сърцевиден ембрион. Г, абнормален ембрион.

Изолирани и *in vitro* култивирани заедно с микроспори от лют пипер плодници от пшеница показаха много по-добри резултати в сравнение с плодниците от сладък пипер сорт AAL. Наблюдаваха се много абнормални, глобуларни и сърцевидни ембриони (Фигура 26), които имат потенциал да се развият в котиледонови ембриони и в последствие в здрави хаплоидни растения.

Не само че броят на ембриогенните структури беше в пъти по-голям, но се наблюдаваха и много добре изглеждащи котиледонови ембриони (Фигура 27). Оптималният брой плодници, който доведе до формиране на ембриони беше 7 – 8, а най-добрият период за добавянето им към културата е точно след приключване на стресовите условия при прехвърляне на микроспорите в богата ембриогенна среда NLN1/2. Котиледонови ембриони можеха да се открият и когато се използваха 2 – 3 или 10 – 11 плодника от пшеница, три дни след изолация на микроспорите но броят им беше минимален. За сметка на това можеха да се открият много абнормални структури, когато 10 – 11 ембриона бяха добавени 10 дни след започване на културата, но тези структури не се развиха в растения след прехвърлянето им на твърда хранителна среда B5.

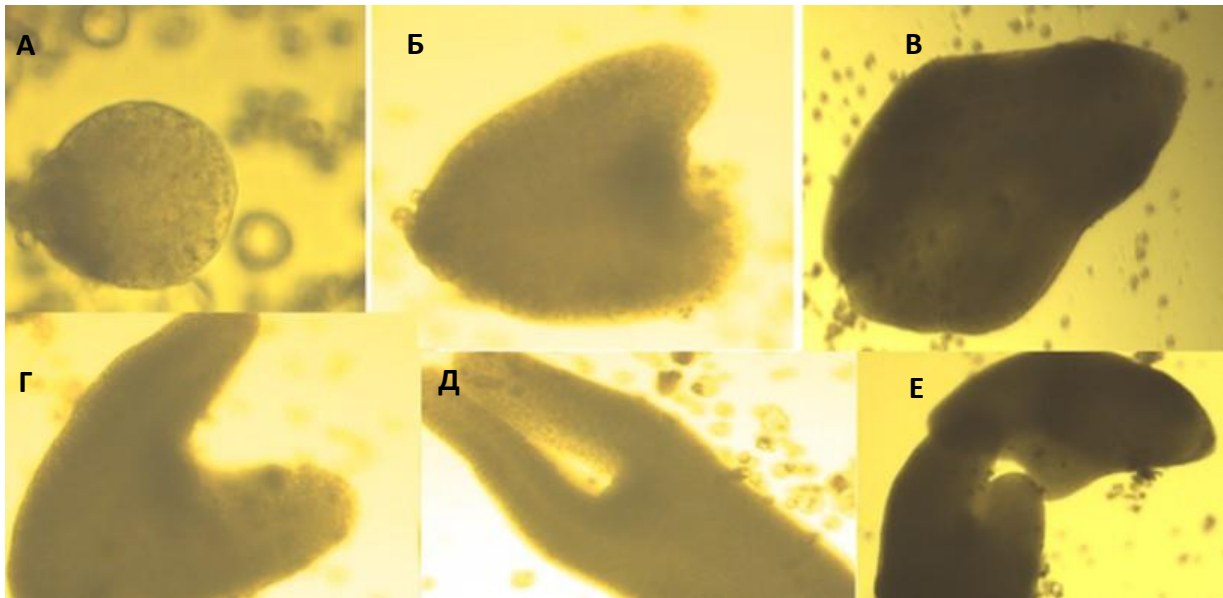


Фигура 27. Ефект на плодници от пшеница сорт Разул върхи ембриогенезата при лют пипер ТД. А, Б, В, котиледонови ембриони.

4. Андрогенеза при българските сортове пипер Хебър, Куртовска Капия и Джолюнска Шипка

След като оптимизирахме основните фактори за успешна андрогенеза при пипер, а именно оптимално отглеждане на донорните растения, оптималният стрес за репрограмане на изолираните микроспори от гаметофитно към спорофитно делене, ембриогенната среда с множество фактори оказващи положително влияние и кокултивирането с плодници от пшеница, които активно подпомагат микроспорите да преминат директно към формиране на ембрио и пропускане на калусната фаза, ние насочихме усилията си към индуциране на ембриогенеза при три български сорта пипер с голямо икономично значение. Използвахме 2 сладки сорта пипер и един лют сорт съответно Хебър, Куртовска Капия и Джолюнска Шипка. Изолираната популация от микроспори се състоеше основно от 80% късни едноядрени и 20% ранни двуядрени клетки, които бяха инкубирани в бедна хранителна среда BS7 за 3 дни при 33°C на тъмно. След стресовото третиране така вече репрограманите микроспори бяха прехвърлени на богата ембриогенна среда NLN1/2 съдържаща 439 mg/l глутамин, 10% PEG6000 и 0.3 M малтоза, а рН на средата беше 6.3. Плодници от пшеница бяха добавени веднага след стресирането, при прехвърляне на микроспорите на ембриогенната среда и останаха в културата до края. Честотата на симетрично делящи се клетки беше висока и за трите сорта пипер, като 15 дни след изолация на микроспорите

се наблюдаваха множество многоклетъчни структури. Положителният ефект на плодниците от пшеница беше очевиден не само заради високата честота на деления, но и поради факта, че 22 дни след изолация на микроспорите вече можеше да се забележат първите ембриогенни структури. Месец след изолиране и *in vitro* култивиране на микроспорите от сортове Джолюнска Шипка и Хебър вече можеха да се открият нормални котиледонови ембриони. Средно 91.6 котиледонови ембриона можеха да се отчетат за Джолюнска Шипка и 45 ембриона за сладкия пипер Хебър (Фигура 28).



Фигура 28. Ефект на плодници от пшеница върхи микроспоровата ембриогенеза при пипер сорт Хебър. А, глобуларно ембрио. Б, В, сърцевидно ембрио. Г, Д, Е, котиледонови ембриони

Сортът Куртовска Капия не показва добра ембриогенност и в края на културата се откриваха само калусни структури. Това показва силната генотипна зависимост и необходимостта от оптимизиране на протоколите за получаване на поголям брой ембриони от пипер. При отсъствие на плодници от пшеница в ембриогенната среда не се наблюдаваха или се откриваха само единични и често абнормални ембриони. Калусните структури бяха доминантната структура от развитието на незрелите поленови зърна.

Шестдесет дни след началото на културата, ембрионите и калусните структури бяха прехвърлени на среда В5 съдържаща 2% захароза с цел вкореняване и прорастване. Ембрионите и калусите от пипер сорт Джолюнска Шипка и Хебър показаха натрупване на хлорофилни пигменти и зелено оцветяване индикатор за начало на фотосинтетичната система, но не се наблюдаваше формиране на корени и прорастъци и не можаха да се развият в нови хаплоидни растения.

Заклучение: Хаплоидите са растения (спорофити), които съдържат гаметен хромозомен набор (n). Те могат да са резултат от спонтанни събития в природата или като резултат редица индукционни техники. Ембриогенезата при растенията

е уникален процес, тъй като може да бъде иницирана от широк набор от клетки, различни от зиготата. При стрес, микроспорите или незрелия поленов прашец могат да бъдат превключени от тяхното нормално поленово развитие към ембриогенно развитие, процес наречен андрогенеза. Андрогенезата представлява важен механизъм за проучвания в сферата на растителната генетика и селекция, след като ембрионите, получени чрез андрогенеза, могат да се развият в изцяло хомозиготни, двойно-хаплоидни растения(46). Тези растения са получени от хаплоидна клетка – яйцеклетка, полен или други клетки на гаметофита, от които чрез индуцирано или спонтанно удвояване на хромозомния набор се получава двойно хаплоидна клетка, от която се образува и двойно хаплоидно растение. От гледна точка на развитието андрогенезата представлява отлична система за разбирането на процесите на формиране на ембрион от една единствена хаплоидна микроспора (46). Обикновените процедури по имбридинг отнемат шест поколения за постигане на почти пълна хомозиготност, докато чрез двойни хаплоиди се постига за едно поколение (47). Въпреки огромното значение на андрогенезата оптимизирането на техниките и получаването на ефикасни резултати все още представляват предизвикателство пред учените. Успехите при други култури от голямо икономическо значение като тютюн, рапица и ечемик карат учените да се опитат да използват тези техники при род *Capsicum* и *Solanum*.

Изводи

1. Създадени са хаплоидни растения от рапица *Brassicanaapus*, сорт Topas 4079 чрез оптимизиране на критични точки на микроспоровата ембриогенеза. Получени са суспензорни и конвенционални ембриони.
2. Прилагането на метода за определяне на пloidността на регенерантите чрез броене на хлоропластите в устичните клетки при новополучените растения от рапица, доказва неговата надеждност и бързина.
3. Създадени са хаплоидни ембриони от пипер *C. annuum*, сортове Тайландски Декоративен, Джолюнска Шипка и Хебър чрез оптимизиране на критични точки за ембриогенеза.
4. Включването в хранителната среда на различни въглехидратни източници показва, че малтозата, в сравнение с глюкоза, захароза и галактоза, е подобреният въглехидратен източник за развитие на микроспори от пипер.
5. Внасянето в хранителната среда на плодници от пшеница *T. aestivum*, сорт Разул има стимулиращ ефект върху формирането на котиледонови ембриони при пипер.
6. При формиране на ембриогенни структури при пипер е установена силна генотипна зависимост.
7. Успешно са репрограмирани микроспори от домати *Solanum lycopersicum*, сорт Moneumaker, който се счита за силно неподатлив към ембриогенеза чрез оптимизиране на критичните точки за ембриогенеза.
8. Трихостатин А (инхибитор на хистонови деацетилази) оказва положителен ефект върху репрограмирането и спорофитното делене на микроспорите домати.

9. Бензил алкохолът стимулира репрограмирането и спорофитните деления на микроспори от домати.
10. Получените хаплоидни ембриони и растения от изследваните сортове селскостопански култури могат да бъдат използвани в молекулярно-биологични изследвания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blakeslee, A.F. et al. (1922) A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55, 646 – 647.
2. Clausen, R.E and Mann, M.C. (1924) Inheritance in *Nicotiana tabacum*. V. The occurrence of haploid plants in interspecific progenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 10, 121 – 124.
3. Gains, E.F. and Aase, H.C. (1926) A haploid wheat plant. *Am. J. Bot.* 13, 373 – 385
4. Kimber, G. and Riley, R. (1963) Haploid angiosperms. *Bot. Rev.* 29, 480 – 531.
4. Kimber, G. and Riley, R. (1963) Haploid angiosperms. *Bot. Rev.* 29, 480 – 531.
5. Riley, R. (1974) The status of haploid research. In: *Haploids in Higher Plants. Advances and Potential. Proceed. First Internat. Symp.*, (Kasha, K.J., ed), pp. 3 – 9, Guelph University Press.
6. Touraev, A. et al. (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. *Adv. Bot. Res.* 35, 53 – 109.
7. Chase, S.S. (1949) The reproductive success of monoploid maize. *Amer. J. Bot.* 36, 795 – 796.
8. Sebastian, R.L. et al. (2002) Identification of quantitative trait loci controlling developmental characteristics of *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.* 104, 601 – 609
9. Bert, P.F. (1999) High-density molecular marker map of ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99, 445 – 452
10. 49 Tuvešson, S. et al. (2006) Molecular markers and doubled haploids in European plant breeding. *Euphytica*, (in press)
11. 50 Michelmore, R.W. et al. (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 88, 9828 – 9832
12. McCallum, C.M. et al. (2000) Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* 18, 455 – 457
13. Colbert, T., et al. (2001) High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* 126, 480 – 484.
14. Maluszynski, M.; Kasha, K.J. & Szarejko, I. (2003). Published doubled haploid protocols in plant species. In: *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*, Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. & Szarejko, I., pp. 309 – 335, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1544-5, Dordrecht.
15. Irikova T, Grozeva S and Rodeva V (2011) Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Physiol Plant* 33:1559-1570.
16. Kristiansen K, Andersen SB (1993) Effect of donor plant-temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67:105 – 109.

17. Powell W (1990) Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 12. Haploids in crop improvement I. Springer, Berlin, pp 45 – 46.
18. Mityko J, Fari M (1997) Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. *Acta Hort* 447:281 – 287.
19. Supena, E. D. et al. (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 – 10
20. Shariatpanahi, E. M. et al. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol. Plant.* 127, 519 – 534.
21. Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI, Lee KM. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77, 63 – 72.
22. Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Huerta A (1997) Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effect of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J Am Soc Hortic Sci* 122:468 – 475.
23. Dunwell, J.M. (1985) Embryogenesis from pollen in vitro. In: *Biotechnology in Plant Science* (Zaitlin, P., Day, P., Hollaender, A., eds), pp. 49 – 76, Academic Press.
24. Kyo M, Harada H (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta* 168:427 – 432.
25. Zheng MY, Liu W, Weng Y, Polle E, Konzak CF. 2001. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores with inducer chemicals. *Plant Cell Reports* 20, 685 – 690.
26. Germana MA. (2006) Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86:131 – 146
27. Belmonte M, Elhiti M, Waldner B, Stasolla C (2010) Depletion of cellular brassinolide decreases embryo production and disrupts the architecture of the apical meristems in *Brassica napus* microspore-derived embryos. *J Exp Bot* 61:2779 – 2794.
28. Hayes, S. C., Wilson, K. G., Gifford, E. V., Follette, V. M., & Strosahl, K. (1996). Experiential avoidance and behavioral disorders: A functional dimensional approach to diagnosis and treatment. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 64, 1152 – 1168.
29. Novak FJ (1974) Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Z Pflanzenzucht* 72:46 – 54.
30. El-Beltagi, H.E.S. and A.A. Mohamed, 2010. Variations in fatty acid composition, glucosinolate profile and some phytochemical contents in selected oil seed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. *Grasas Y Aceites*, 61: 143 – 150.
31. Sauton, A. & Dumas de Vault, R. (1987). Obtention de plantes haploids chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenese induite par pollen irradie. *Agronomie*, Vol. 7, pp. 141 – 148, ISSN 0249-5627.
32. Li H., M. Soriano, J. Cordewener, J. Muiño, H. Fukuoka (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes totipotency in the male gametophyte. *The Plant Cell*, 26:195 – 202.

33. Shtereva LA, NA Zagorska, B., Dimitrov, M. Kruleva, H. Oanh (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Rep* 18: 312 – 317.
34. Zagorska NA, Shtereva A, Dimitrov BD, Kruleva MM (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)—I. Influence of genotype on androgenetic ability. *Plant Cell Rep* 17:968 – 973.
35. Corral-Martí'nez P, Nuez F, Seguí'-Simarro JM (2010) Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured ms1035 tomato anthers. *Euphytica*. doi:10.1007/s10681-010-0303.
36. Supena, E. D. et al. (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 – 10
37. Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425 – 434.
38. Touraev, A. et. al. (1997) Plant male germ line transformation. *Plant J.* 12, 949 – 956.
39. Yeung, E.C., T.A. Thorpe, and C.J. Jensen. 1981. In vitro fertilization and embryo culture, p. 253 – 271. In: T.A. Thorpe (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic, New York.
40. Merillon J., M.R. Ahuja 2014. *Tree biotechnology – book*. ISBN 13: 978-1-46659715-0.
41. Islam, S.M.S. (2010). The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 4, No. 9, (November 2010) pp. 660-665, ISSN 1835 – 2693.
42. Gamborg OL., (1970) The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol* 45:372 – 375.
43. Pechan PM, Keller WA (1989) Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 1073 – 1074.
44. Duncan EJ, Heberle E (1976) Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma* 90: 173 – 177.
45. Murashige J, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 115:473 – 497.
46. Maraschin, S.F.; de Priester, W.; Spaink, H.P. & Wang, M., (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 417, (July 2005), pp. 1711 – 1726, ISSN 0022-0957.
47. Sopory, S., and Munshi, M. (1996) Anther culture. In: *In vitro Haploid Production in Higher Plants* (Mohan Jain, M., Sopory, S.K. and Veilleux, R.E. eds), Vol. 1, pp. 145 – 176, Kluwer Acad. Publ.

Съкращения

X – хаплоиди

ДХ – двойни хаплоиди

BSA – (bulk segregating analyses) натрупващи сегрегирани анализи

PPB – (pre – prophase band) пре – профазна линия

HSP70 – (heat shock protein 70) – протеин на топлинния шок 70

HSP90 – (heat shock protein 90) – протеин на топлинния шок 90

PEG – (polyethylene glycol) – полиетилен гликол

ABA – (abscisic acid) – абсцисинова киселина

BSO – бутионин сулфоксимин

DAPI – 4', 6 – диамино – 2 – фенилиндол

Co⁶⁰ – Кобалт 60

2,4 – D – (2,4-дихлорофеноксиоцетна киселина)

IAA – (индол-3-оцетна киселина)

DMSO – Диметил сулфооксид

Научни приноси

1. За първи път е получен добър ембриогенен отговор при микроспорови култури от три български сорта пипер (Хебър, Куртовска Капия, Джолюнска Шипка).

2. За първи път са получени голям брой котиледонови ембриони чрез микроспорова култура от два български сорта пипер (Хебър и Джолюнска Шипка).

3. Показано е директното влияние на плодници от пшеница върху андрогенезата при български сортове пипер.

4. За първи път микроспори от домати сорт Moneymaker са репрограмирани към ембриогнеза и са наблюдавани спорофитни деления на микроспори от домати сорт Moneymaker.

Списък на научните публикации свързани с дисертационния труд

Nikolai Anachkov, Galina Yahubyan, Ivan Minkov, Oksana Charishnikova, Teodora Popova, Alisher Touraev (2017) Successful microspore reprogramming towards embryogenesis of Bulgarian pepper varieties and effects of stress treatments and wheat ovaries on embryo formation. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences (под печат).

Teodora Popova, Stanislava Grozeva, Velichka Todorova, Gergana Stankova, Nikolay Anachkov, Velichka Rodeva (2016) Effects of low temperature, genotype and culture media on in vitro androgenic answer of pepper (*Capsicum annuum* L.) Acta Physiol Plant 38:273.

Участия в конференции

Baev V., Mehterov N., Anachkov N., Vachev T., Naydenov M., Minkov G., Minkov I. and Yahubyan G. Cold- and heat-induced responses in smallRNAomes in *Arabidopsis*. International Conference Plant Abiotic Stress Tolerance, Viena, Austria, February 22 – 25, 2012.

Baev V., Milev I., Anachkov N., Vachev T., Naydenov M., Apostolova E., Minkov G., Toneva V., Minkov I. and Yahubyan G. (2011) Integration of NGS small RNA and gene expression data to explore plant stress response. Conference “Molecular Basis of Plant Stress“, Sunny Day Black Sea resort, Varna, Bulgaria.