

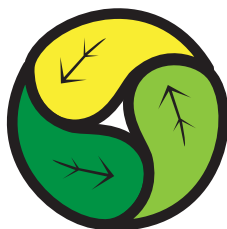
УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

UDC 63(058)

ISSN 1409-987X



ГОДИШЕН ЗБОРНИК
2007
YEARBOOK



ГОДИНА 7

VOLUME VII

GOCE DELCEV UNIVERSITY – STIP
FACULTY OF AGRICULTURE



ГОДИШЕН ЗБОРНИК
ЈНУ ИНСТИТУТ ЗА ЈУЖНИ ЗЕМЈОДЕЛСКИ КУЛТУРИ–СТРУМИЦА
YEARBOOK
INSTITUTE OF SOUTHERN CROPS–STRUMICA

Издавачки совет

Проф. д-р Саша Митрев
Проф. д-р Борис Крстев
Проф. д-р Илија Каров
Доц. д-р Лилјана Колева-Гудева
Дипл. прав. Ристо Костуранов, спц.

Editorial board

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D
Prof. Boris Krstev, Ph.D
Prof. Ilija Karvor, Ph.D
Ass. Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D
Lawyer Risto Kosturanov, spc.

Редакциски одбор

Проф. д-р Саша Митрев
Проф. д-р Борис Крстев
Проф. д-р Илија Каров
Доц. д-р Лилјана Колева-Гудева
Доц. д-р Живко Гацовски
Проф. д-р Верица Илиевска
Проф. д-р Љупчо Михајлов
Д-р Душан Спасов

Editorial staff

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D
Prof. Boris Krstev, Ph.D
Prof. Ilija Karvor, Ph.D
Ass. Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D
Ass. Prof. Zivko Gacovski, Ph. D
Prof. Verica Ilievska, Ph. D
Prof. Ljupco Mihajlov, Ph. D
Dušan Spasov, Ph.D

Одговорен уредник

Проф. д-р Саша Митрев

Editor in chief

Prof. Saša Mitrev, Ph.D

Главен уредник

Доц. д-р Лилјана Колева-Гудева

Managing editor

Ass. Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D

Јазично уредување

Даница Гавриловска-Атанасовска
(македонски јазик)
М-р Марија Кукубајска
(англиски јазик)

Language editor

Danica Gavrilovska-Atanasovska
(Macedonian)
Marija Kukubajska, M.Sci.
(English)

Техничко уредување

Славе Димитров

Technical editor

Slave Dimitrov

Редакција и администрација

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип
Земјоделски факултет
Бул. „Крсте Мисирков“ бб п.фах 201,
2000 Штип, Р. Македонија

Address of the editorial office

Goce Delcev University – Štip
Faculty of Agriculture
Krste Misirkov b.b., PO box 201,
2000 Stip, R. of Macedonia



СОДРЖИНА CONTENT

Velichka Rodeva, Liljana Koleva-Gudeva, Stanislava Grozeva, Fidanka Traikova Obtaining haploids in anther culture of pepper <i>Capsicum annuum</i> L. and their inclusion in the breeding process	
Велика Родева, Лилјана Колева-Гудева, Станислава Грозева, Фиданка Трајкова Добивање на хаплоиди во култура на антери од пиперка <i>Capsicum annuum</i> L. и нивно вклучување во процесот на селекција	7
Илија Каров, Саша Митрев, Љупчо Михајлов, Билјана Ковачевиќ, Даниела Ристова, Емилија Накова <i>Cochliobolus sativus</i> (Ito. & Kurib) причинител на гниење на коренот и стеблото и дамкавост на листовите на јачменот	
Ilija Karov, Saša Mitrev, Biljana Kovacevic, Daniela Ristova, Emilija Nakova <i>Cochliobolus sativus</i> (Ito. & Kurib) drechler ex dastur causer of root rot, steam rot and leaf lesion in barley	19
Лилјана Колева-Гудева Веgetативно размножување кај некои растителни видови во <i>in vitro</i> услови	
Liljana Koleva-Gudeva Micropropagation of some plant species under <i>in vitro</i> conditions	27
Верица Илиева, Даница Андреевска, Добре Андов, Тања Зашева, Наталија Маркова Споредбени испитувања на некои производно-технолошки карактеристики кај интродуцирани и стандардни сорти на ориз (<i>Oryza sativa</i> L.)	
Verica Ilieva, Danica Andreevska, Dobre Andonov, Tanja Zaševa, Natalija Markova Comperative examination of some productive–technological characteristics of introduced and standard varieties of rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	35
Ацо Кузелов, Дијана Трајчова, Наталија Маркова, Биљана Балабанова Влијание на ферментот колагеназа врз структурно-механичките карактеристики на конзервите со месо	
Aco Kuzelov, Dijana Trajcova, Natalija Markova, Biljana Balabanova Colagenase enzyme influence upon structural – mechanical properties of meat cans	49
Мите Илиевски, Гоце Василевски, Драгица Спасова, Милан Ѓеорѓиевски, Билјана Атанасова Производни карактеристики на компирот во Струмичко за периодот 1999-2007 година	
Mita Ilievski, Goce Vasilevski, Dragica Spasova, Milan Georgievski, Biljana Atanasova Production characteristics of potato in the Strumica region for the period 1999-2007	57
Милан Ѓеорѓиевски Влијанието на условите за одгледување врз генетиката на маркерот „Број на листови меѓу цветните гранки“ кај домотот (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	



Milan Gjeorgjievski The influence of breeding conditions on the genetics of "Number of leaves between flower branches", applied on tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	69
Трајко Мицески, Петар Клетникоски Погледи кон менаџментот на одржливиот развој на земјоделството Trajko Miceski, Petar Kletnikoski Some aspects of management of sustainable development in agriculture	79
Даница Андреевска, Верица Илиева, Добре Андов, Тања Зашева Дејството на основното губрење и прихранивањето со различни азотни губриња врз приносот и квалитетот на <i>прима риска</i> – новосоздадена сорта на ориз Danica Andreevska, Verica Ilieva, Dobre Andov, Tanja Zaševa Effect of basic fertilization and split application with diferent nitrogen fertilizers upon yield and quality of Prima Riska – recently developed rice variety	87
Иле Цанев, Ристо Кукутанов Експлоатациони карактеристики на машините за редна обработка на почвата во лозов насад Ile Canev, Risto Kukutanov Exploitation parameters of machine for processing soil in a row in vineyard	97
Ристо Кукутанов, Живко Гацовски, Душан Спасов, Даниела Ристова Испитување на влијанието на рокот на сеидба врз созревањето - технолошката зрелост и генетскиот потенцијал за родноста на генотиповите хибридна пченка (создадени во Институтот за пченка – Кнежа, Р. Бугарија) во струмичкиот регион на Р. Македонија Risto Kukutanov, Zivko Gacovski, Dusan Spasov, Daniela Ristova Examination of possibilities for introduction of hybrids maize made in the Institute for Maize – Kneza, R. Bulgaria for manufacturing in the Strumica region of R. Macedonia	107
Живко Гацовски, Цветан Јовановски, Игор Есмеров Испитување на генетскиот потенцијал за родност и можностите за ведување во производството на генотиповите хибридна пченка (создадени во Институтот за житни култури - Солун, Р. Грција) во битолскиот дел на Пелагонија - Р. Македонија Zivko Gacovski, Cvetan Jovanovski, Igor Esmerov Examination of genetic potential for brain and possibilities for introduction in manufacturing of genotype hybrids maize made in Institute for cereal cultures – Thessaloniki, Greece, in production in Pelagonia, the vicinity of Bitola, R. Macedonia	117
Критериуми за објавување на Зборникот	127
Criteria for publishing in the Yearbook	131



ПРЕДГОВОР

Република Македонија има одлична географска предиспозиција за земјоделство, а нашите квалитетни земјоделски производи се надалеку барани и ценети. За македонското земјоделско производство се отвораат голем број неискористени финансиски фондови и неограничена перспектива за брз развој.

Современото земјоделство претставува спој на конвенционалните и традиционални начини на производство со софистицираните и напредни методи. Исто така, новите информатички и комуникациски технологии, како и новите техники за научно-стручно истражување, налагаат промовирање на современ пристап во развојот на македонското земјоделство. Научниот кадар од Земјоделскиот факултет при Универзитетот „Гоце Делчев“ - Штип постојано ги следи новите достигнувања на современото земјоделство и ги имплементира во своите научно-стручни истражувања и студиски програми.

Земјоделскиот факултет при Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип, иако основан неодамна, на 27 март 2007 година од страна на Собранието на Република Македонија со донесување на Законот за основање на Државен универзитет „Гоце Делчев“ во Штип, сепак има длабока традиција и своја специфична историја, стара повеќе децении. Со законот за основање на Државниот универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, дојде до спојување на Институт за јужни земјоделски култури - Струмица со Државниот универзитет „Гоце Делчев“ во рамките на Земјоделскиот факултет. Целите на Земјоделскиот факултет се базирани на долгогодишното искуство и богатата традиција на нашето македонско земјоделско производство, па оттука е разбирливо да продолжиме да ја негуваме и збогатуваме богатата традиција преку конкретни едукативни и истражувачки активности.

Ова издание на Годишниот зборник на Земјоделскиот факултет е во континуитет со претходните изданија на годишните зборници на Институт за јужни земјоделски култури - Струмица.

Клучни елементи во развојот на секоја бранша се образованието и науката. Поврзувањето на научните истражувања со современите методи во високото образование се предизвик за нашиот тим во афирмација на современото македонско земјоделство. Со тоа го унапредуваме производството на здрава храна, индустријата за преработка на земјоделски производи, управувањето со природните ресурси, а воедно и развојот на руралниот и урбаниот простор, со што даваме огромен придонес во подобрување на целокупниот квалитет на животот во национална и глобална рамка.

Македонија е претежно земјоделски ориентирана земја. Во неа агркултурата како економски фактор ангажира најмногу луѓе, кои поради недоволно инволвирање на науката во аграрот честопати се изложени на голем ризик. Токму затоа, денес сè повеќе е зголемена потребата за вклучување на научно-стручните сознанија во оваа област која ја има клучната улога во севкупниот развој на земјава.

Издавачки одбор

Штип, септември 2008 год.

Одговорен уредник

Проф. д-р Саша Митрев



INTRODUCTION

The Republic of Macedonia has excellent geographic predisposition for agriculture, and its high-quality agricultural products are world-renowned.

A great number of funds are being allocated to the Macedonian agricultural production, and there are endless prospects for its quick development.

Contemporary agriculture is a fusion of both conventional and traditional ways of production while using sophisticated and advanced methods. Furthermore, the latest IT and communication technologies as well as the new techniques for scientific research have made it necessary to promote a modern approach to the development of Macedonian agriculture. The staff at the Faculty of Agriculture at Goce Delcev University in Stip always keeps an eye on the latest achievements in contemporary agriculture, and they implement them in their research and their academic courses.

The Faculty of Agriculture at Goce Delcev University in Stip was established only recently – it was founded on March 27th 2007 by the Assembly of the Republic of Macedonia and by virtue of the Law for Establishing a Public University in Stip. In addition, Goce Delcev University has a deep-rooted tradition and a decade-long history. By passing the Law for Establishing a Public University in Stip, the Institute of Southern Crops in Strumica became part of Goce Delcev University. The goals of the Faculty of Agriculture are based on years of experience and the rich tradition of Macedonian agriculture. Therefore, it is logical to keep on fostering and enriching that tradition through specific educational and research activities.

This issue of the Yearbook of the Faculty of Agriculture is a continuation of previous issues of yearbooks published by the Institute of Southern Crops in Strumica.

Key elements for the development of any field are education and science. Linking scientific research with contemporary methods of higher education is a challenge that our team encounters in its attempt to promote Macedonian contemporary agriculture. Thus we are improving the production of healthy food, the industry for processing agricultural products, the management of natural resources, and the rural and urban environment. In this way we also contribute to improving the quality of living, on national and global level.

Macedonia is mainly an agriculture-oriented country. Agriculture in Macedonia provides jobs for the majority of its people who are often at great risk because of the lack of involvement of science into agriculture.

Therefore, today there is an ever-growing need to include scientific discoveries in a field that plays crucial role in the development of our country.

Publishing committee

Stip, September 2008

Editor-in-Chief

Prof. Sasha Mitrev, PhD



UDC: 57.085:581.33:633.842

Original research paper
Оригинален научен труд

OBTAINING HAPLOIDS IN ANTHER CULTURE OF PEPPER *Capsicum annuum* L. AND THEIR INCLUSION IN THE BREEDING PROCESS

Velichka Rodeva*§, Liljana Koleva-Gudeva§, Stanislava Grozeva*,
Fidanka Trajkova****

Abstract

The frequency of obtained androgenic plants depends highly on the genotype; therefore the low rate of haploid recovery limits the utility of anther culture in pepper breeding.

The aim of this study was establishment of effective *in vitro* technology for study of haploid and diploid plant regenerants; induction of embryogenesis in pepper anther culture; development of the embryos into regenerants as well as successful adaptation and acclimatization of regenerants from sterile to greenhouse conditions. In the present study, the effectiveness of induced androgenesis in anther culture of several Bulgarian and Macedonian pepper genotypes was investigated.

The collected seed material is excellent possibility for further breeding processes, cytogenetic and other molecular level research.

The results of this paper derived from international bilateral Macedonian-Bulgarian Joint Research Project: “Obtaining haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their inclusion in the breeding process”, managed by the first two authors and with participation of the coauthors.

Key words: *in vitro* embryogenesis, *Capsicum annuum* L., genotype

* Maritsa – Vegetable Crops Research Institute, 4003 Plovdiv, 32 “Brezovsko shosse” Str., Bulgaria; velirod@yahoo.com

** Goce Delcev University – Stip, Faculty of Agriculture, Krste Misirkov b.b. PO box 201, 2000 Stip, R of Macedonia; liljana.gudeva@ugd.edu.mk

* Марица – Истражувачки институт за градинарски култури, 4003 Пловдив, 32 Бугарија; velirod@yahoo.com

** Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, Земјоделски факултет, ул. „Крсте Мисирков“ бб п.фах. 201, 2000 Штип, Македонија; liljana.gudeva@ugd.edu.mk

§ These authors contributed equally to this work.

§ Авторите имаат еднаков придонес во овој труд.



ДОБИВАЊЕ НА ХАПЛОИДИ ВО КУЛТУРА НА АНТЕРИ ОД ПИПЕРКА *Capsicum annuum* L. И НИВНО ВКЛУЧУВАЊЕ ВО ПРОЦЕСОТ НА СЕЛЕКЦИЈА

Велика Родева*, Лилјана Колева-Гудева**, Станислава Грозева*,
Фиданка Трајкова**

Краток извадок

Зачестеното добивање андрогенетски растенија е многу зависно од генотипот, па малата вредност на хаплоидното обновување го ограничува користењето на културата на антери во селекцијата на пиперка.

Целта на ова истражување беше воспоставување на ефективна *in vitro* технологија за проучување на хаплоидни и диплоидни растителни регенеранти; индукција на ембриогенеза во култура на антери од пиперка; развој на ембриони во регенеранти, како и успешна адаптација и аклиматизација на регенерантите од стерилни во оранжериски услови.

Колекционираниот семенски материјал дава одлична можност за понатамошни процеси на селекција, цитогенетски и други истражувања на молекуларно ниво.

Резултатите презентирани во овој труд се произлезени од интернационалниот билатерален македонско-бугарски истражувачки проект за соработка „Добивање на хаплоиди во култура на антери од пиперка *Capsicum annuum* L. и нивно вклучување во процесот на селекција“ воден од првите двајца автори со учество на коавторите.

Клучни зборови: *in vitro* ембриогенеза, *Capsicum annuum* L., генотип

1. Introduction

Pepper is one of the most widespread vegetable crops, economically important for countries of the Balkan region including Macedonia and Bulgaria. The specific genetic diversity of local forms here is unknown for many countries in the world.

Creation of haploids and spontaneous doubled haploids in anther culture is a method applied in pepper plant genetics and breeding because of the importance of the haploids in the study of the gene map (Yoo et al., 2003), for genetic manipulations, molecular investigations and development of disease and stress resistant lines (Gyulai et al. 2000; Ochoa-Alejo and Ramirez-Malagon, 2001; Arendo Andres et al., 2004). Wang et al. (1973) obtained the first haploid pepper in anther culture. Haploid morphogenesis of *Capsicum* species was studied by George and Narayanaswamy (1973) and Kuo et al. (1973) although the production of haploid plants was very low.



The first successful reproductive method for production of pepper haploids was developed by Dumas de Valux et al. (1981). The research on androgenesis was intensive during the last years of the twentieth century, but the regenerants were a mixture of haploid and diploid plants. In order to increase the effectiveness of somatic embryogenesis and haploid production different stress treatments were used (Mityko et al., 1995; Mityko and Fari, 1997; Supena et al., 2006).

The induction of somatic embryogenesis in culture of anthers when microspores are in the stage of first pollen division ($n=x$) is successful for obtaining haploid and diploid regenerants (Koleva-Gudeva, 2003). Nowadays, androgenesis under *in vitro* conditions is effective method for induction of haploids (Koleva-Gudeva et al., 2007).

This work is aimed to study *in vitro* embryogenic answer of anthers and plant regeneration in local Balkan region pepper lines, varieties and F_1 hybrids in different cultivation media.

2. Materials and Methods

2.1. Experiments carried out in Macedonia

Nineteen pepper genotypes were used as anther-donor plants. Anther-donor plants were grown under greenhouse conditions. Donor plants were used during the four weeks after the first flower buds had appeared. The flower buds were harvested when the corolla was of the same length as the calyx or slightly longer.

The developmental stage of the macrospores was determined in microscopic slides of acetocarmine squashes. Flower buds were surface sterilized in 70% ethanol for several seconds, then in 5% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ + 2-3 drops Tween 20 for 10 minutes, and rinsed three times in sterile distilled water. After the removal of the filaments, anthers from three flower buds were placed in Petri dish (6 cm diameter), with the concave face down, touching the culture medium.

The method of Dumas de Valux et al. (1981) was used for androgenic induction. According to the method, the anthers were cultivated on CP medium + $0,01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN + $0,01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D with incubation of 8 days in darkness at $35\pm 2^\circ\text{C}$, the following 4 days the anthers were transferred to climate chamber at $25\pm 2^\circ\text{C}$ with photoperiodism 12h light/12h dark. Afterwards, the anthers were subcultured on R_1 medium + $0,01\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN and placed in climate chamber at $25\pm 2^\circ\text{C}$ with photoperiodism 12h light/12h dark. Young shoots emerging from the anthers were transferred onto hormone free V_3 media in order roots to be formed.



2.2. Experiments carried out in Bulgaria

Donor plants from 22 lines, cultivars and F₁ hybrids grown under greenhouse conditions were used for collecting of flower buds during the period from May to October. Anthers 3-4,5 mm in size were placed on a medium containing micro- and macrosalts by Murashige and Skoog (1962), vitamins by Gamborg et al., (1968), 0,3 mg l⁻¹ 2,4-D, 0,1 mg l⁻¹ Kinetin, 0,005 mg l⁻¹ Biotin, 0,1 mg l⁻¹ Glycine, 0,04 mg l⁻¹ Vitamin B₁₂, 30 g l⁻¹ Sucrose and 0,7 % Agar. The cultivated anthers were treated in darkness with 35±1°C for the first 8 days and later were incubated on the same medium without growth regulators in the condition of growth chamber at 26°C ± 1°C, 4000 lux under 16/8 h day/night.

The plantlets were planted on sterile mixture of perlite: peat : sand (1:1:1) and acclimatized in climate chamber, and afterwards placed in greenhouse under cover in order crosspollination to be barred.

3. Results and Discussion

3.1. Results obtained in Macedonia

Not all genotypes under investigation were able to produce haploid embryos. After the induction period on CP medium for 12 days the anthers were subcultured on R₁ medium, where since the beginning the embryos showed totipotency, progression in development, growth and shoot formation.

The shoots continued the development on V₃ medium, where in absence of phytohormones young plants were formed (Figure 1a). The rooting was also on V₃ medium and well rooted shoots were transferred on sterile mixture of sand : perlite : peat in ration 1:1:1 (Figure 1b). In this stage the plants were ready for adaptation and acclimatization in greenhouse conditions.

From 19 pepper genotypes under investigation, 12 possessed potential for formation of direct somatic embryos. The hot genotypes (with exception of *Rotund*, *Kurtovska kapija TU* and *Kurtovska kapija MK*) did not show androgenic potential, i.e. in anther culture did not form haploid shoots.

According to the classification of Mityko and Fari (1997) for identification of androgenic potential according to the percentage of anthers that give embryos, pepper types are classified into:

- poor androgenic potential - less than 5% embryogenic anthers
- fair androgenic potential - 5.1 - 15% embryogenic anthers
- good androgenic potential - 15.1 - 30% embryogenic anthers
- excellent androgenic potential - over 30% embryogenic anthers

The results from our research showed that somatic embryos are formed on CP medium with heat temperature stress (+35°C) which is in concord with the findings of Dumas de Valux et al. (1981).

From all 19 genotypes, 12 showed ability for embryo formation (Table 1):



- 2 genotypes with good androgenic potential: *Tura* and *Féherözön*;
- 4 genotypes with fair androgenic potential: *Pritavit F1*, *Californian wonder*, *Zlaten medal SR* and *Majori*;
- 6 genotypes with poor androgenic potential: *Piran*, *Zlaten medal ЈБТ*, *Tomato shaped sweet*, *Kurtovska kapija BG*, *Kurtovska kapija SR* and *Slatko luta*;
- 7 genotypes do not possess androgenic potential: *Feferona*, *Vezena luta*, *Sivrija*, *Rotund*, *Kurtovska kapija TU*, *Kurtovska kapija MK* and *Bonbona*.

Seed material was collected from four genotypes: *Kurtovska kapija SR*, *Zlaten medal SR*, *Piran* and *Féherözön*. The collected seed material is good base for further cytogenetic and molecular research and involvement in process of pepper breeding in order better varieties to be created.

3.2. Results obtained in Bulgaria

A very important factor with influences the success of the *in vitro* anther culture is careful selection of the appropriate late uninucleate development stage of microspores. In the result of our experiments it was established that at this stage different length of the corolla petals and the calyx sepals occurs and mostly is between 3,0 mm to 4,5 mm for the corolla and 4,0 mm to 5,3 mm for the calyx in the studied genotypes. We registered microspores in different stage of microsporogenesis in the anthers with the same size which proves the importance of preliminary morphological and cytological characterization in choice of anthers for *in vitro* cultivation (Ozkum and Tipirdamaz, 2002). In the most of the studied genotypes it was established correlation between the stage “uninucleate pollen”, suitable for androgenesis and appearance of light anthocyan color on the anther tips with exception of non-anthocyan anthers of *line P295/03* and *line 295/00 F₃*, with coming of the anthocyan color in the late stage of bud development. (Fig. 2). In contrast with the opinion of some authors, buds with the length of corolla petals equal to the length of calyx sepals include microspores at the late uninucleate stage, in the studied Bulgarian genotypes this stage was observed in buds with slightly longer corolla petals.

In result of the experimental work it was established induction of embryogenesis in five from all 22 studied pepper genotypes. The answer of these five genotypes is presented in Table 2. Data in Table 2 show that from 1 315 cultivated anthers embryogenic reaction is registered in 1,67% and from 8,90% obtained embryogenic structures 1,82 plants per 100 anthers is regenerated. The highest percentage of embryogenic anthers is registered in variety *Strjama* (7,60%) and *line 2087/01* (2,14%). The lowest value of this characteristic is observed in variety *Bel Rubi* and *line 1647* (0,32%). Development of the obtained embryoids to plant-regenerants is not observed in the both genotypes. The



highest number of developed regenerants per 100 anthers (12,12) is established in variety *Strjama* in correlation with the highest number of obtained embryoid structures per 100 anthers (56,1). Comparatively high number of formed embryos is registered in anthers of line 2087/01 and variety *Zlaten medal* (8,02 and 4,79 per 100 anthers respectively), but considerable lower number of the structures are developed to plant-regenerants (0,53 and 1,34 per 100 anthers respectively) (Fig. 3). The established differences in the embryogenic answer of the studied genotypes probably are due to the cultivation conditions and to the specific genotype characteristics – more or less predetermined for embryogenesis. According some authors only some of the pepper genotypes have a capacity for embryogenic development. Qin and Rotino (1993) and Mityko et al. (1995) report about sporadic embryogenesis in different pepper genotypes. Mityko and Fary (1997), established better embryogenic answer in sweet pepper genotypes than the spice pepper genotypes.

The development of the obtained embryogenic structures to the plant-regenerants was very slow depending from the specificity of the genotype, the season of obtaining and cultivation conditions (Fig. 4). It was very difficult to micropropagate the developed plant-regenerants – a problem existing in the most working on pepper laboratories in the world. The higher phenolic contents in plant tissue make difficult *in vitro* pepper cultivation what is the reason for carrying out of extensive research for optimal media determining, antioxidant explant treatment and the period of the subculturing (Zhenjiu and Wang, 1990).

Seeds from 6 plants are collected from all 12 adapted plants which prove their diploid nature. Six of the regenerants are sterile, weak and slow developing plants, probably due to their haploid nature.

4. Conclusions

Pepper is recalcitrant in cultures *in vitro* and the results in cell and tissues cultures are moderate. Anther culture is the only exception from this rule (Mityko and Fari, 1997).

The results regarding the process of embryo formation on different media under different thermal conditions showed that the formation of haploid embryos occurred only in the CP medium exposed to heat-thermal stress (+35°C), what is in accordance with the findings of De Valux (1981). However, Irikova and Rodeva (2004) reported no embryos formation for the same medium and cultivation conditions.

There were established differences in the anther embryogenic capacity and development of the obtained plant-regenerants depending on the genotype. Embryogenic answer and regeneration in the optimized medium of Murashige and Skoog /1962/ were registered only in 5 specific for Balkan region local



pepper lines, varieties and F₁ hybrids from all 22 studied genotypes. Haploid and diploid plants are obtained and grown *in vivo* and seeds are collected for future experiments.

References

Аренедо Андрес М. С., Гарцес Цлавер А., Естебан Цхапаприа Ј., Пеиро Абрил Ј. Л., Палазон Ц., Луис Артеаде М., Гил Ортега Р. (2004): Апликацион оф антхер културе анд молекулар маркер то а пеппер бреџинг програм фор дисеае ресистанце. Цапсицум анд Еггплант Неџслеттер, Вол. 23: 105-108.

Dumas de Valux R., Chambbonet D., Pochard E. (1981): Culture *in vitro* d'anterès de piment (*Capsicum annum* L.): amèlioration des taux d'obtention de plantes chez différents gènotypes par des traitements à +35°C. Agronomie, Vol. 10: 859-864.

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, Vol. 50: 148-151.

George L., Narayanaswamy S. (1973): Haploid capsicum through experimental androgenesis. Protoplasma, Vol. 78: 467-470.

Irikova T., Rodeva V. (2004): Anther culture of pepper (*Capsicum annum* L.): the effects of nutrient media. Capsicum and Eggplant Newsletter Vol. 23: 101-104.

Gyulai G., Gemesne J., Sagi Z., Wenzel G. (2000): Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R2 paprika (*C. annum* L.) lines. Journal of Plant Physiology, Vol. 156: 168-174.

Koleva-Gudeva L., (2003): The effect of incubation treatment on the pepper (*Capsicum annum* L.) androgenesis, Yearbook of Institute of Southern Crops – Strumica, Vol. 3: 87-94.

Koleva-Gudeva L., Spasenoski M., Trajkova F. (2007): Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae, Vol. 111: 114-119.

Kuo J. S., Wang Z. Z., Chien N.F., Ku S. J., Kung M. L., Hsu H. C. (1973): Investigation of the anther culture *in vitro* of *Nicotiana* and *Capsicum annum* L.. Acta Bot. Sin., Vol. 15 (1): 43-47.

Mitykó J., Andrasfalvy A., Csillery G., Fáy M. (1995): Anther-culture in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annum* L.). Plant Breed., Vol. 114: 78-80.

Mitykó J., Fáy M. (1997): Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annum* L.) via anther and microscope culture. Hort. Biotech. In Vitro Cult. Breeding. Acta Hort., Vol. 447: 281-287.



Murashige S., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Vol. 15: 473-497.

Ochoa-Alejo N., Ramirez-Malagon R. (2001): *In vitro* chili pepper biotechnology. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, Vol. 37: 701-729.

Ozkum D., Tipirdamaz R. (2002): The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk. J. Bot.*, Vol. 26: 131-139.

Qin X., Rotino G. L. (1993): Anther culture of several sweet and hot pepper genotypes. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, Vol. 12: 59-62.

Supena E. D. J., Suharsono S., Jaconsen E., Custers J. B. M. (2006): Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Report*, Vol. 25: 1-10.

Yoo E. V., Kim S., Kim Y. H., Lee C. J., Kim B. D. (2003): Construction of a deep coverage BAC library from *Capsicum annuum*, ‘CM334’. *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 107: 540-543.

Wang J. J., Sun C. S., Wang C. C., Chein N. F. (1973): The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sinica*. Vol. XVI: 147-151.

Zhenjiu S., Wang M. (1990): Study on shoot tip meristem culture in *Capsicum*. *Capsicum Newsletter*, Vol. 8: 9-42.



Tab. 1 Haploid embryo induction from anthers of different pepper genotypes
Таб. 1 Индукција на ембриоиди од антери на различни генотипови пиперка

Pepper genotype Генотип на пиперка	Total number of anthers Вкупен број антери	Embryogenic anthers (%) Ембриогенетски антери (%)	Number of embryos per 100 anthers Број на ембриоиди на 100 антери	Embryogenic response Ембриогенетски одговор
<i>Féherözön</i> <i>фехерозон</i>	1502	17.39 a	32.60 bc	Good Добар
<i>Tura</i> <i>тура</i>	300	17.05 a	17.05 ab	Good Добар
<i>Pritavit F1</i> <i>притавит F1</i>	330	9.23 abc	9.39 abc	Fair Доволен
<i>California wonder</i> <i>калифорниско чудо</i>	151	6.67 abc	5.67 c	Fair Доволен
<i>Zlaten medal SR</i> <i>златен медал CP</i>	1031	6.12 abc	8.97 bc	Fair Доволен
<i>Majori</i> <i>мајори</i>	330	5.83 abc	6.73 c	Fair Доволен
<i>Piran</i> <i>пиран</i>	823	5.03 abc	34.05 ab	Poor Слаб
<i>Zlaten medal ŠT</i> <i>златен медал ШТ</i>	723	4.29 bc	18.57 bc	Poor Слаб
<i>Tomato shaped sweet</i> <i>доматовидна блага</i>	360	4.17 bc	4.54 c	Poor Слаб
<i>Kurtovska kapija BG</i> <i>куртовска капија БГ</i>	620	2.90 bc	50.55 a	Poor Слаб
<i>Kurtovska kapija SR</i> <i>куртовска капија CP</i>	875	2.73 bc	10.20 bc	Poor Слаб
<i>Slatko luta</i> <i>слатко лута</i>	140	2.43 bc	3.33 c	Poor Слаб
<i>Feferona</i> <i>феферона</i>	79	0.00 c	0.00 c	No Нема
<i>Vezena luta</i> <i>везена лута</i>	83	0.00 c	0.00 c	No Нема



<i>Sivrija</i> <i>сиврија</i>	104	0.00 c	0.00 c	No Нема
<i>Rotund</i> <i>ротунд</i>	109	0.00 c	0.00 c	No Нема
<i>Kurtovska kapija TU</i> <i>куртовска капија ТУ</i>	236	0.00 c	0.00 c	No Нема
<i>Kurtovska kapija MK</i> <i>куртовска капија МК</i>	122	0.00 c	0.00 c	No Нема
<i>Bonbona</i> <i>бонбона</i>	270	0.00 c	0.00 c	No Нема

Mean within a column followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Tab. 2 Embryo induction and plant regeneration in anther culture of different pepper genotypes

Таб. 2 Индуција на ембриоиди и регенерација на растенија во култура на антери од различни генотипови пиперка

Pepper genotype Генотип на пиперка	Total number of anthers Вкупен број на антери	Embryogenic anthers (%) Ембриогенетски антери (%)	Number of embryos per 100 anthers Број на ембриоиди на 100 антери	Plant-regenerants per 100 anthers Растенија-регенеранти на 100 антери	Embryogenic Response Ембриогенетски одговор
<i>Zlaten medal</i> <i>златен медал</i>	522	1.14 c	4.79 c	1.34	Poor
<i>Bel Rubi</i> <i>бел руби</i>	312	0.32 d	0.64 d	0.00	Poor
<i>Strjama</i> <i>стријама</i>	132	7.60 a	56.1 a	12.12	Fair
<i>Line 1647</i> <i>линија 1647</i>	162	0.32 d	0.62 d	0.00	Poor
<i>Line 2087/01</i> <i>линија 2087/01</i>	187	2.14 b	8.02 b	0.53	Poor
Average Просек 1	1315	1.67	8.90	1.82	

Mean within a column followed by the same letters are not significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.



Fig. 1 Morphological characteristics of pepper anther buds when microspores are in uninuclephase
Сл. 1 Морфолошки карактеристики на пупките од пиперка кога микроспорите се наоѓаат во фаза на идентични јадра

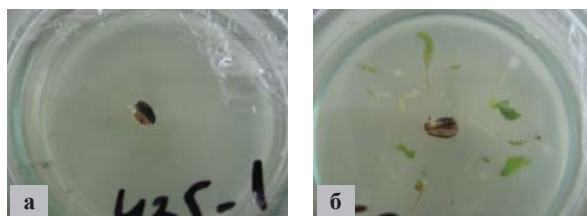


Fig. 2 Embryogenic reaction in pepper anther culture of a. *Line 2087/01* and b. variety *Strjma*
Сл. 2 Ембриогенетска реакција на култура на антери од пиперка на: а) линија 2087/1 и б) сорта *стријама*



Fig. 3 a.b. Development of the embryos into regenerants on V3 medium
Сл. 3 а.б. Развивање на ембрионидите во регенеранти на V3 медиум



Fig. 4 a. Acclimatization of the regenerants in climate chamber under controlled conditions
b. Adaptation of the regenerants in greenhouse conditions
Сл. 4 а. Аклиматизација на регенерантите во клима комора во контролирани услови
б. Адаптација на регенерантите во оранжериски услови