



2000-2002

תקופת המחקר:

261-0366-02

קוד מחקר:

Subject: PROPAGATION VIA ASEXUAL
EMBRYOGENESIS IN PEPPER TISSUE CULTURE

Principal investigator: BENJAMIN STEINITZ

Cooperative investigator: AARON ZELCER, PARAN
ILAN

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: ריבוי אל-מיני דרך יצירת עוברים
בתרבות רקמה של פלפל

חוקר ראשי: בנימין שטייניץ

חוקרים שותפים: אהרון זלצר, אילן פארן

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

הצגת הבעיה: טכנולוגיה אמינה לרגנרציה של צמחים ולריבוי אל-מיני בתרבות רקמה של פלפל איננה קיימת, ובהעדרה אין אפשרות לרבות ווגטיבית צמחי עילית בקנה מידה המוני לצרכי שתלנות.

מטרות המחקר: [א] מציאת תנאי תרבות המשרים התמיינות עוברים סומטים של פלפל; [ב] הגדרת תנאי נביטה והתפתחותו צמחים מהעוברים.

מהלך ושיטות העבודה: בחינת השפעתם של מרכיבי מצע שונים של תרבות רקמה ביכולתם להשרות אמבריוגנוזה סומטית, ומציאת דרכים לנביטה של העוברים והתפתחותם לצמחים. עיקר המחקר התבצע עם זן פלפל מתוק 1595 של חברת "הזרע", וכן נבדקה תגובת השראת אמבריוגנוזה סומטית במגוון זנים של פלפל מתוק, חריף ופלפל לייצור פפריקה.

תוצאות עיקריות: נבדק כושרם של אוקסינים טבעיים וסינתטיים, כתוספים לקרקע המזון של התרבות, להשרות אמבריוגנוזה. האוקסינים - 2,4-D, centrophenoxine ו- quinclorac - נמצאו כמשרנים של אמבריוגנוזה סומטית ישירה, ויעילות ההשראה הייתה מרבית ודומה בשני האוקסינים הראשונים ויעילה פחות באוקסין השלישי. נוכחות ציטוקינין במצע הפחיתה איכות העוברים או מנעה כליל את יצירתם. מידת התגובה ל- centrophenoxine שנבחנה בזני פלפל שונים הייתה ספציפית לזן, ונעה בתחום מהעדר תגובה בזנים אחדים ועד ליצירה של עוברים רבים בזנים אחרים. עוברים סומטים בוגרים נבטו והתפתחו לצמחים חסרי גבעול. מסקנות והמלצות: [א] בידנו שיטה ליצירה ישירה של עוברים אל-מיניים, מרקמת עוברים זיגוטים בשלים, במגוון זני פלפל. [ב] המחסום לקבלת צמח נורמאלי מעובר סומטי הוא העדר גבעול בצמח המתפתח מהעובר. [ג] להערכתנו, העדר גבעול מקורו בהתמיינות פגומה של המריסטמה האמירית של הגבעול כבר בעת השלבים המוקדמים של האמבריוגנוזה הסומטית. ליישום מעשי של טכנולוגית הריבוי האל-מיני בתרבות רקמה של פלפל יידרש מחקר נוסף למציאת דרכים שימנעו את התופעה של התפתחות צמחים חסרי גבעול.

פרסומים

Steinitz, B., Küsek, M., Raz, A., Zelcer, A. (2001). Factors limiting plant regeneration *in vitro* and genetic transformation in *Capsicum annuum* L. *XIIth*

Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant.
Antalya, Turkey, April 2001.

Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., Zelcer, A. (2002). Direct somatic embryogenesis in Pepper. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38: p. 137-A abstract P-1464.

Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., Zelcer A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot.

In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39: (in press).

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 261-366-02

ריבוי אל-מיני דרך יצירת עוברים בתרביות רקמה של פלפל

Propagation via asexual embryogenesis in pepper tissue culture

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

בנימין שטייניץ

אהרון זלצר

אילן פארן

כל החוקרים במחלקה לגנטיקה של צמחים, מכון לגידולי שדה, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני,

בית דגן

Benjamin Steinitz, E-mail: steinitz@volcani.agri.gov.il

Aaron Zelcer, E-mail: zelcer@volcani.agri.gov.il

Ilan Paran, E-mail: iparan@volcani.agri.gov.il

All at: Dept. of Plant Genetics, Field and Garden Crops Institute, A.R.O., the Volcani

Center, P.O.B. 6, Bet Dagan 50 250.

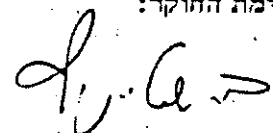
ינואר 2003

שבת תשס"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.

חתימת החוקר:



תקציר

הצגת הבעיה: טכנולוגיה אמינה לרגרציה של צמחים ולריבוי אל-מיני בתרבית רקמה של פלפל איננה קיימת, ובהעדרה אין אפשרות לרבות וגטטיבית צמחי עילית בקנה מידה המוני לצרכי שתלנות. מטרות המחקר: [א] מציאת תנאי תרבית המשרים התמיינות עוברים סומטים של פלפל; [ב] הגדרת תנאי נביטה והתפתחות צמחים מהעוברים. מהלך ושיטות העבודה: בחינת השפעתם של מרכיבי מצע שונים של תרבית רקמה ביכולתם להשרות אמבריוגנזה סומטית, ומציאת דרכים לנביטה של העוברים והתפתחותם לצמחים. עיקר המחקר התבצע עם זן פלפל מתוק 1595 של חברת "הזרע", וכן נבדקה תגובת השראת אמבריוגנזה סומטית במגוון זנים של פלפל מתוק, הריף ופלפל לייצור פפריקה. תוצאות עיקריות: נבדק כושרם של אוקסינים טבעיים וסינטטיים, כתוספים לקרקע המזון של התרבית, להשרות אמבריוגנזה. האוקסינים - 2,4-D, quinclorac ו-1 centrophenoxy - נמצאו כמשרנים של אמבריוגנזה סומטית ישירה, ויעילות ההשראה הייתה מרבית ודומה בשני

האוקסינים הראשונים ויעילה פחות באוקסין השלישי. נוכחות ציטוקינין במצע הפחיתה איכות העוברים או מנעה כליל את יצירתם. מידת התגובה ל- *centrophoxine* שנבחנה בזני פלפל שונים הייתה ספציפית לזן, ונעה בתחום מהעדר תגובה בזנים אחדים ועד ליצירה של עוברים רבים בזנים אחרים. עוברים סומטים בוגרים נבטו והתפתחו לצמחים חסרי גבעול. מסקנות והמלצות: [א] בידינו שיטה ליצירה ישירה של עוברים אל-מיניים, מרקמת עוברים זיגוטים בשלים, במגוון זני פלפל. [ב] המחסום לקבלת צמח נורמאלי מעובר סומטי הוא העדר גבעול בצמח המתפתח מהעובר. [ג] להערכתנו, העדר גבעול מקורו בהתמיינות פגומה של המריסטמה האמירית של הגבעול כבר בעת השלבים המוקדמים של האמבריוגנזה הסומטית. ליישום מעשי של טכנולוגית הריבוי האל-מיני בתרבית רקמה של פלפל יידרש מחקר נוסף למציאת דרכים שימנעו את התופעה של התפתחות צמחים חסרי גבעול.

רשימת פרסומים

- Steinitz, B., Küsek, M., Raz, A., Zelcer, A. (2001). Factors limiting plant regeneration *in vitro* and genetic transformation in *Capsicum annuum* L. *XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Antalya, Turkey, April 2001.
- Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., Zelcer, A. (2002). Direct somatic embryogenesis in Pepper. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38: p. 137-A abstract P-1464.
- Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., Zelcer, A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39: (in press).

מבוא

פלפל הנו צמח קשה לרגנרציה בתרבית רקמה. מזה ארבעה עשורים נערכים מחקרים רבים שנועדו לפתח שיטות רגנרציה המבוססות על אורגנוגנזה (קרי, השראה של מריסטמות גבעולים, התארכות הגבעול והשרשתו לקבלת צמח שלם המסוגל לעבור העתקה לאדמה). הניסיונות בכיוון זה של מעבדות בחו"ל ושלנו הניבו במקרים רבים תוצאות מאכזבות (ראה סקירות של Ochoa-Alejo et al., 2001; Wolf et al., 2001). במקביל הושקע מאמץ ברגנרציה של צמחים די-פלואידים בתרביות אבקני פלפל, תרביות בהן הצמחים - שמוצאם מהמיקרוספורות - נוצרים ברגנרציה במסלול האמבריוגנזה הסומטית (somatic embryogenesis); כאן הטכנולוגיה הבשילה לכדי יישום בחברות זרעים העוסקות בטיפול פלפל. מאמרים על רגנרציה של צמחים במסלול האמבריוגנזה הסומטית בתרביות רקמה שמוצאן מרקמות סומטיות שאינן אבקנים הופיעו רק בעשור החולף. הדיווחים הללו, לפחות ממעבדה אחת,

מצביעים לראשונה על קיום פוטנציאל ריבוי המוני בתרבויות תרחיף אמבריוגניות בנזל (Büyükalaca & Mavituna, 1996; Mavituna & Büyükalaca, 1996). טכנולוגיה מושתתת על תרבויות תרחיף לצרכי ריבוי המוני עשויה להיות כדאית מנקודת מבט של עלויות ייצור של שתילים. המאמרים האחרונים הנ"ל הניעונו להציע לפתח טכנולוגיה של ריבוי אל-מיני דרך יצירת עוברים סומטים בתרבויות רקמה של פלפל.

עוברים סומטים יכולים להיווצר בשני מסלולי התפתחות שונים: (א) במסלול אמבריוגנזה ישירה; העוברים נוצרים ישירות מתוך תאים של רקמת קטע המקור (= explant). (ב) אמבריוגנזה מרקמת קאלוס אמבריוגני; בשלב ראשון תאי רקמת קטע המקור מתחלקים ויוצרים קאלוס אמבריוגני, ובשלב שני העוברים המבוקשים נוצרים מתאי הקאלוס. במיני צמחים רבים רקמת המוצא בעלת התגובה האמבריוגנית הפוריה ביותר היא רקמת עוברים מיניים (עוברים זיגוטים). בכל המחקרים על אמבריוגנזה סומטית של פלפל (שלא מתרבויות אבקנים), עוברים מיניים שמשו כקטע מקור לתרבות. במחקרנו השתמשנו בעוברים מיניים, שהופקו מזרעים, כרקמת מקור לתרבות.

מטרות המחקר היו:

- א. לבסס תרבויות אמבריוגניות מקטעי מקור שהוכנו מעוברים מיניים בשלים.
- ב. לברר איזה אוקסינים מסוגלים להשרות אמבריוגנזה סומטית ישירה או אמבריוגנזה מקאלוס אמבריוגני.
- ג. לבדוק האם הרכב מצע תרבות המשרה אמבריוגנזה בזן אחד יעיל גם בהשראת אמבריוגנזה בזני פלפל נוספים?
- ד. למצוא הרכב מצע שיאפשר נביטה של עוברים סומטים בוגרים.
- ה. לאפיין את טיב הצמחים המתפתחים מעוברים סומטים.

פירוט הניסויים והתוצאות שהתקבלו

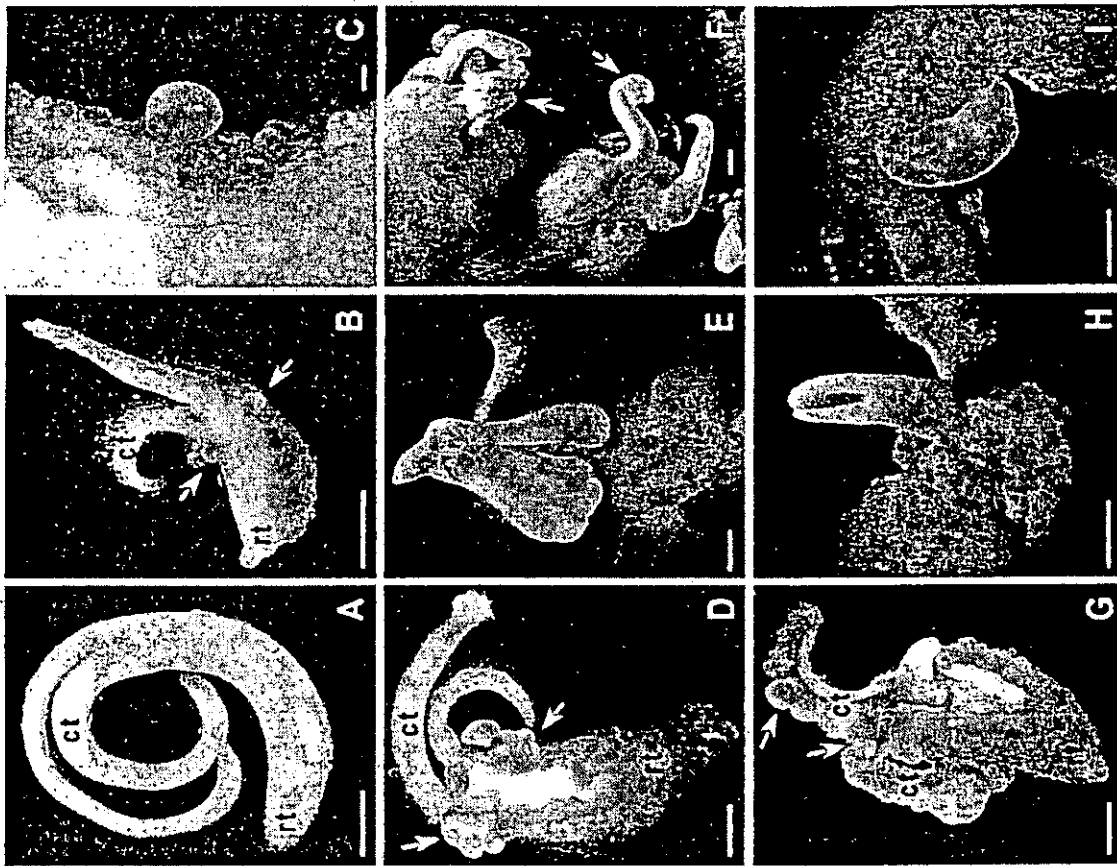
אמבריוגנזה סומטית ישירה

בשנה הראשונה של המחקר עיקר המאמץ הושקע במציאת דרך ליצור קאלוס אמבריוגני אשר מהווה מוצא לתרבות תרחיף אמבריוגני במצע נוזלי, והעבודה התבססה על התרשימים שפורסמו (Büyükalaca & Mavituna, 1996; Mavituna & Büyükalaca, 1996). כל המאמצים שהושקעו בכיוון זה העלו חרס; אמנם הצלחנו ליצור תרחיפי תרבויות קאלוס אבל לא התפתחו בהם עוברים. בהקשר זה ראוי לציין שפרסומים דומים לאלה שהוזכרו, ושמקורם ממעבדות אחרות, לא הופיעו מאז 1996. לאור מציאות זו, ולאור העובדה שפרוטוקול האמבריוגנזה בתרבות נוזלית מורכב משלבים אחרים כשבכל שלב קיימות אפשרויות רבות לשנוי ווריאציה, החלטנו להפסיק כיוון מחקר זה ולפנות למנו"פ השראת אמבריוגנזה ישירה בתרבויות הגדלות על קרקע מזון מוצקה.

קטע המקור לתרבויות בכל הניסויים המדווחים כאן הופק מזרעים. העובר שחולץ מהאנדוספרם נחצה לאורכו לשני חלקים. בניסויים מקדימים זהינו שלושה תנאים שקיומם הכרחי על מנת לקבל תוצאות חוזרות בניסויים חוזרים: (1) תנוחת קטע המקור חייבת להיות כך ששטח חתך הרקמה יהיה מונח על פני שטח קרקע המזון. (2) השראת אמבריוגנזה סומטית וגדילת העוברים מחייבת נוכחות ריכוזים גבוהים של סוכר במצע. בכל הניסויים, לבד אלה בהם צוין אחרת, המצע הכיל 200 מילימולר סוכרוז. (3) התמיינות העוברים טובה יותר בהעדר אור. בכל הניסויים, לבד אלה בהם צוין אחרת, התרבויות הודגרו בחושך.

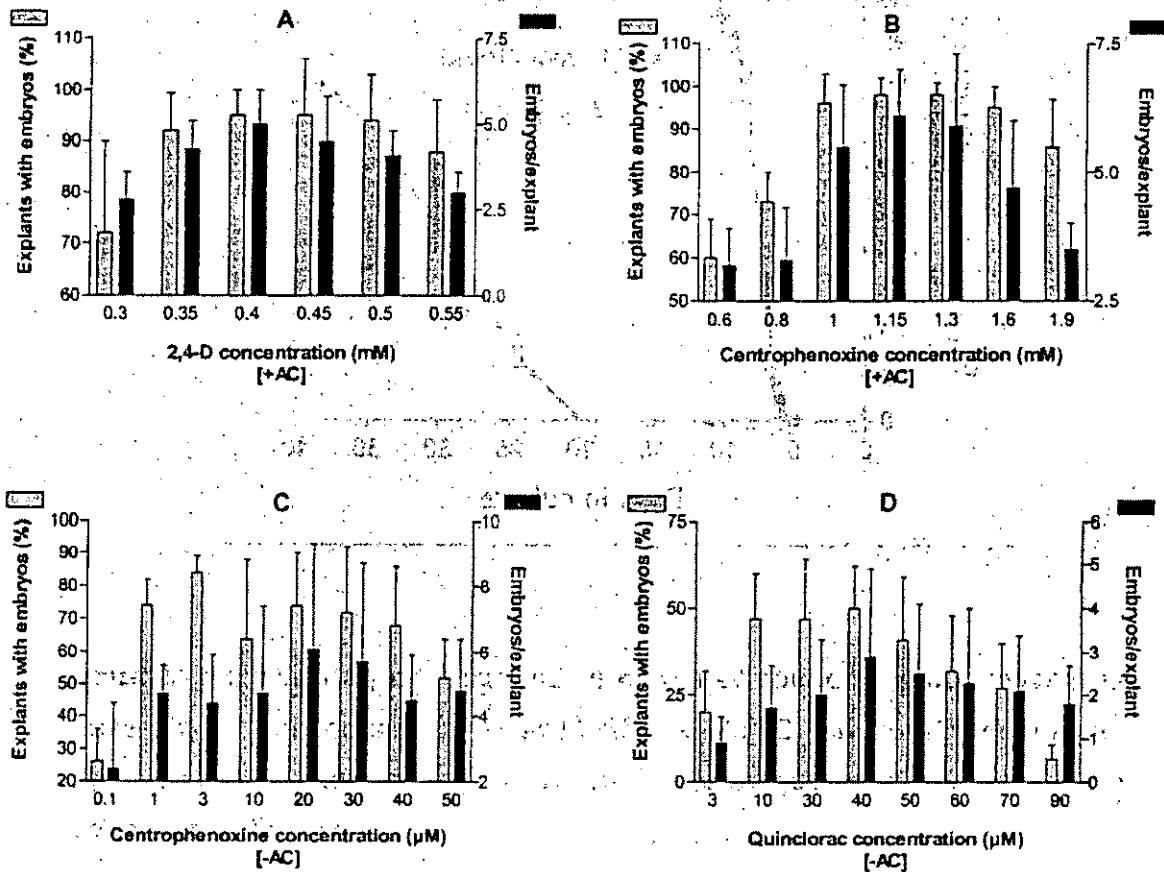
במערך ניסויים מרכזי בדקנו את כושרם של אוקסינים שונים, כתוספים במצע התרבות, להשרות אמבריוגנזה ישירה. כל אוקסין נבחן בשורה רחבה ומפורטת של ריכוזים. האוקסינים שנבחנו היו: IAA, NAA, PAA, Dicamba, Picloram, 2,4-D, Centrophenoxine, Quinclorac. פרט ל- 2,4-D, Centrophenoxine, Quinclorac גרמו ליצירת קאלוס מרקמת קטע המקור. עוברים סומטים נוצרו בהשפעת שלושת האוקסינים האחרונים [2,4-D, Centrophenoxine, Quinclorac] ישירות בקטע המקור ללא שלב ביניים של קאלוס.

בתמונה 1 מוצגים שלבים שונים בהתפתחות עוברים שהתמיינו ישירות על שטח פני קטע המקור. נקל להבחין בעוברים בשלב הכדורי (1B, 1C), המתארך (1D-F), והשלב הבוגר. מוצא העוברים הוא מתאי האפידרמיס ו/או רקמות תת-אפידרמליות של קטע המקור. לרוב, העוברים מופיעים בצברים, ולאחר התארכותם מתברר שהם מאוחדים באיזורי ציר העובר (ההיפוקוטיל) והשורש. כן בולטת העובדה כי מרבית העוברים נוצרים ללא התמיינות ברורה של פסיגים (1E, 1F). לעיתים רחוקות הבחנו בעוברים דו-פסיגיים; חלק מעוברים אלה נשאו דו-פסיגים מאוחדים (1H), ולעיתים נדירות הם התפתחו עם שני פסיגים נפרדים [שזו ההתפתחות הצפויה בהתמיינות נורמאלית של העובר] (1I).



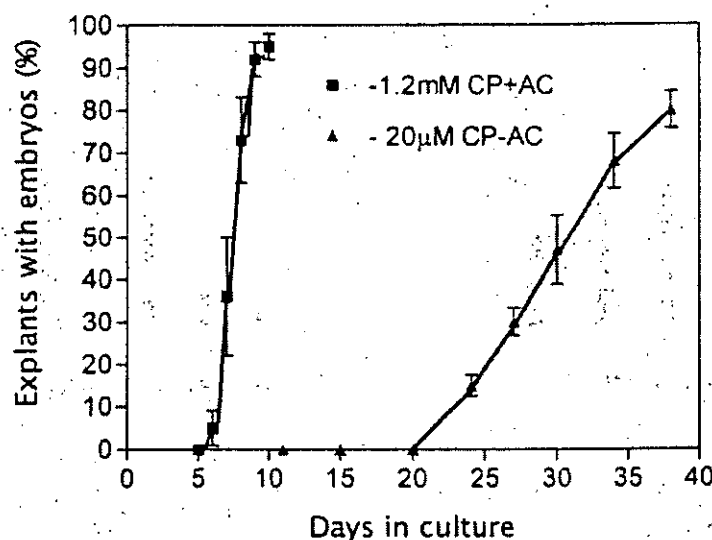
תמונה 1: אמבריוגנזה ישירה של עוברים סומטיים בפלפל מתוך קטעי מקור שהוכנו מעוברים זיגוטיים בשלים. 1A: קטע מקור שהוקן מעובר זיגוטי בוגר. 1B: עוברים סומטיים כדורים (חיצים) בתרבות בת 10 ימים שהודגרה על מצע עם centrophoxine 1.2 mM או 5 גר/ליטר פחם פעיל. 1C: עובר סומטי כדורי בתרבות בת 14 יום שהודגרה על מצע עם quindlorac $40 \mu\text{M}$. 1D-F: עוברים סומטיים בראשית של ההתארכות (D, חיצים, 14 יום הדגרה), עוברים ארוכים ובוגרים (E, 21 יום הדגרה), ועוברים מאוד ארוכים (F, 30 יום הדגרה). בכל המקרים הרקמות הודגרו על מצע עם centrophoxine 1.2 mM או 5 גר/ליטר פחם פעיל. G: מחרוזת עוברים סומטיים (חיצים) על רקמת הפסיגים של קטע המקור. תרבות בת 30 יום, הודגרה כל מצע עם centrophoxine $20 \mu\text{M}$. 1H-I: עוברים סומטיים דו-פסיגיים בוגרים. הפסיגים מאוחדים (H) או נפרדים (I).

בתמונה 2 סיכום גרפי של שורה של ניסויים שמטרתם הייתה להגדיר את מידת השראת אמבריוגנזה סומטית על ידי שלושה אוקסינים שונים. יכולת ההשראה של כל אוקסין נבחנה בסדרת ריכוזים כמצוין בתמונה 2. התגובה תועדה בשני מדדים; מספר העוברים הסומטים שנוצרו על פני קטע מקור שהוכן מעובר זיגוטי, ואחוז קטעי המקור שיצרו עוברים סומטים. הממצאים הבאים עולים מסיכום זה: (א) מבחינת רמת התגובה המושרית, בשני המדדים, 2,4-D ו-1 centrophenoxine דומים ואילו התגובה ל-centrophenoxine גבוהה יותר. בריכוזים אופטימליים של שני האוקסינים הראשונים מתקבלים 6-7 עוברים סומטים לקטע מקור, ובקרוב 95% מהקטעים יוצרים עוברים. (ב) במצעים המכילים תוספת של 5 g/L פחם פעיל, הריכוזים המשרים תגובה מרבית דומים ב- centrophenoxine (1-1.3 mM) וב- 2,4-D (0.4 mM). במצעים ללא פחם פעיל נדרשים ריכוז אוקסין נמוכים בהרבה (3-40 μ M) ליצירת עוברים. (ג) ריכוז האוקסין הנדרש להשראת אמבריוגנזה היה גבוה בכמה סדרי גודל (מילימולרים) במצעים עם פחם פעיל בהשוואה לריכוז הנהוץ במצעים ללא פחם פעיל (מיקרומולרים) (ראה תמונה 2A, 2B לעומת 2C). הצורך בריכוז הגבוה ביותר של אוקסין במצעים הכוללים פחם פעיל נובע מספיחה והאינאקטיבציה של חומר הצמיחה על ידי הפחם.



תמונה 2: השראת אמבריוגנזה סומטית ישירה באמצעות 2,4-D (A), centrophenoxine (B, C) ו-quinclorac (D). חומרי הצמיחה הוספו לקרקע המזון בריכוזים המוזכרים בטבלאות (תמונות A, B) או העדר (תמונות C, D). 5 g/L פחם פעיל. בדיקת התפתחות העוברים נערכה 21 יום (A, B) או 35 יום (C, D) מתחילת הדגרת התרבית. הנתונים הם ממוצע מספר העוברים שנוצרו על קטע מקור או אחוז ממוצע של קטעי המקור נושאי עוברים סומטים, \pm סטיית התקן של הממוצע.

קצב יצירה והתפתחות עוברים סומטים מתואר בתמונה 3. הניסוי נערך בתרבויות מודגרות עם centrophenoxine כמשרן אמבריוגנזה, בנוכחות או העדר פחם פעיל במצע; בנוכחות פחם פעיל, העוברים הופיעו מוקדם יותר. כן יצוין שהעוברים שגדלו במצע עם פחם פעיל היו גדולים ומפותחים (תמונות 1E, 1F) יותר מאלו שנוצרו בתרבית שגדלה על מצע ללא פחם (תמונה 1G).



תמונה 3: מהלך עם הזמן של הופעת עוברים סומטים על קטעי מקור שהוכנו מעוברים זיגוטיים. המצע כלל centrophenoxine בריכוז של 1.2 mM או 20 µM, בנוכחות (+AC) או העדר (-AC) 5 g/L פחם פעיל, בהתאמה. הנתונים הם אחוז ממוצע של קטעי מקור נושאי עוברים סומטים ± סטיית התקן של הממוצע.

כל הניסויים שתוארו לעיל נערכו בפלפל מתוק זן 1595 מחברת "הזרע". לאחר שמצאנו ש-Centrophenoxine משרה יעיל של אמבריוגנזה ישירה, נבדקה יכולתו להשרות אמבריוגנזה בזני פלפל אחרים. קטעי מקור שהופקו מזרעי פלפל מתוק, פלפל חריף ופלפל המשמש לייצור תבלין הפפריקה נשתלו בתרבית, ושיעור התגובה נאמד חודש לאחר מכן. התוצאות מרוכזות בטבלה 1, וזני הפלפל רשומים לפי סדר יורד של רמת התגובה האמבריוגנית שלהם.

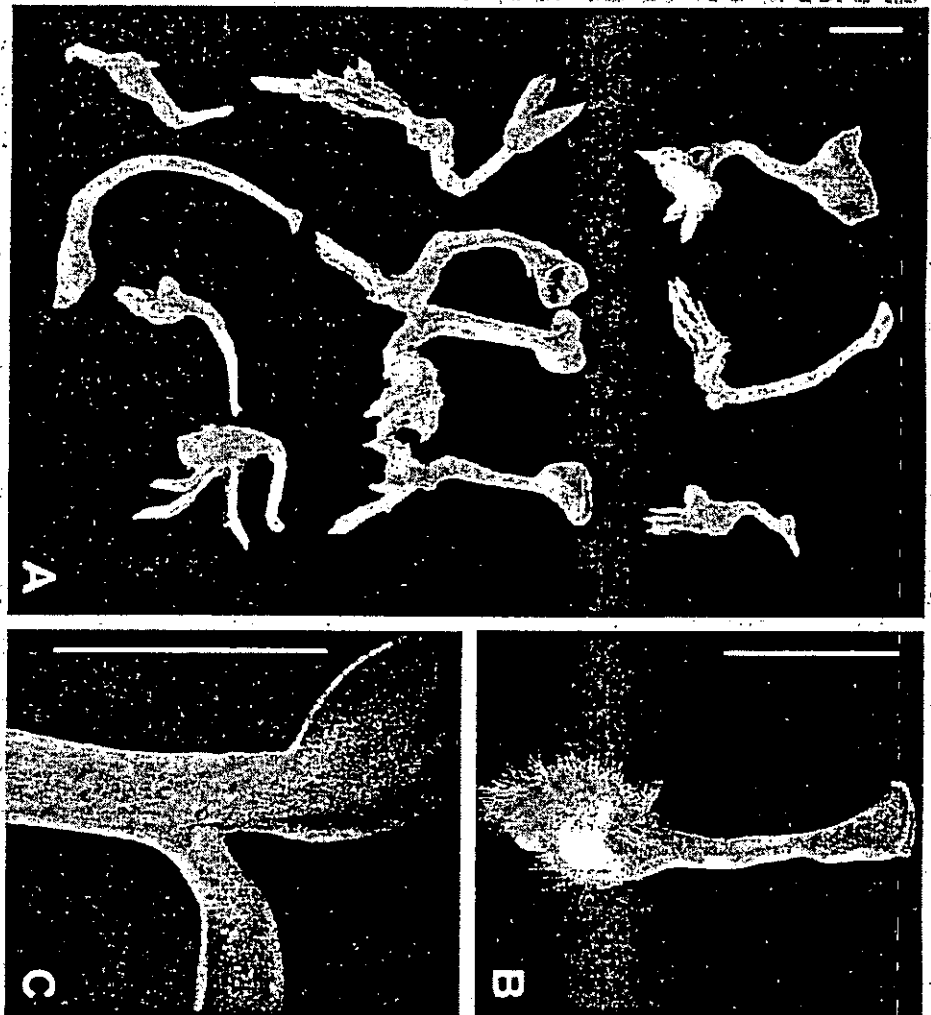
טבלה 1: השראת אמבריוגנזה ישירה בזני פלפל. קטעי מקור הודגרו על מצע שכלל 1.2 mM centrophenoxine עם 5 g/L פחם פעיל. התוצאות נקבעו חודש מתחילת התרבית והנתונים מהווים ממוצעים של מספר עוברים סומטים לקטע מקור או אחוז קטעי מקור נושא עוברים \pm סטיית התקן של הממוצע. נתונים בתוך עמודה המסומנים באותה אות אינם נבדלים זה מזה ברמת מובהקות של 0.05. בצד שמות הזנים צוינו חברות הזרעים והארצות מהן קבלנו לבחינה את הזרעים.

Genotype	Seed source	Explants with embryo [%]	Embryos/Explant
102	Zeraim Gedera (IL)	100 a	8.1 \pm 0.9 a
112	Zeraim Gedera (IL)	98 \pm 4 a	7.2 \pm 1.2 a
1595	Hazera Seeds (IL)	98 \pm 4 a	6.1 \pm 0.9 ab
Colombo	Royal Sluis (NL)	90 \pm 10 a	4.1 \pm 1.1 b
Paso Real	Hazera Seeds (IL)	82 \pm 7 ab	7.9 \pm 0.8 a
Fiesta	Hazera Seeds (IL)	58 \pm 11 c	2.3 \pm 0.6 c
New Ace	Park Seed (USA)	52 \pm 11 c	2.3 \pm 0.3 c
Cuby	Hazera Seeds (IL)	37 \pm 20 cd	2.8 \pm 1.4 c
Fehérözön	VRI (HU)	35 \pm 7 d	2.2 \pm 0.5 c
California Wonder	Park Seed (USA)	29 \pm 7 d	4.3 \pm 0.7 b
Galron	Volcani Center (IL)	0 e	0 d
Serenade	Hazera Seeds (IL)	0 e	0 d

התוצאות שבטבלה 1 מלמדות שהתגובה בתרבית, כצפוי, ספציפית לגנוטיפ המקור. ישנם זנים שהגיבו ברמה דומה לזן 1595, בה בשעה שזנים אחרים הניבו פחות, או לא יצרו כלל, עוברים אלא רקמת קאלוס בלבד. במילים אחרות, השיטה שנקטנו להשראת אמבריוגנזה סומטית ישירה בזן 1595 תקפה למיגון טיפוסים אבל היא איננה מתאימה במידה שווה לכל זני הפלפל.

התפתחות צמחים מעוברים סומטים

חלק ניכר מהעוברים שהתמיינו על שטח פני קטע המקור הופיעו בצברים, בצפיפות גבוהה עד כי כך שנוצרו אזורי איחוי של רקמות בחלקים התחתונים של גבעולי עוברים שכנים זה לזה [ראה תמונה 1c]. קשה היה להפריד בין עוברים אלה לצורך מעקב המשך ההתפתחות. לעומת זאת עוברים סומטיים שנוצרו כעוברים נפרדים (קרי, לא בצברים), או עוברים שנוצרו תוך מגע רופף עם עוברים שכנים, ניתן היה לנתקם בקלות יחסים מקטע המקור ולהעתיקם לצורך נביטה למצע בעל הרכב תוספים שונה מהמצע לאמבריוגנזה. התברר כי מצע נטול חומרי צמיחה, עם סוכרוז בריכוז נמוך (90 mM), ותוך השיפה של התרביות לאור (משור פוטופריודי) מאפשר נביטה עוברים בוגרים לצמחים. נביטת העוברים הייתה מיידית ולא קדמה לה כל תקופה של תרדמה או מנוחה. ברם, הצמחים שהתפתחו סבלו מהפרעות מורפולוגיות מסוגים שונים: יצירה של פסיג כודד (תמונה 4A), יצירה של פסיג דמוי כוסיית (תמונה 4B), נבטים ללא פסיגים (תמונה 4C), ולמעט מקרים יוצאים מן הכלל, הצמחים היו חסרי גבעול. להערכתנו הפגם של מחסור בגבעול מעיד על כך שהעוברים הסומטים נוצרו ללא מריסטמה אמירית תקינה ומתפקדת כנדרש.



תמונה 4: תפוחיות רגנרטיים ("צמחים") פגומים מעוברים סומיים. A: רגנרטיים בעלי פסג יחיד (שורה עליונה). בעלי פסג דמוי כוסית (שורה אמצעית), וחסי פסגים (שורה תחתונה). B: מבט מקרוב על רגנרטי שפסיגיו התאחו לצורת כוסית. C: מבט מקרוב על רגנרטי דו-פסג חסר קולקור צמיחה בין הפסגים. הרגנרטיים גדלו באור למשך חודש במצע נביטה נוזל חומרי צמיחה. קנה המידה מצג 1 ס"מ.

מסקנות והשלכותיהן על המחקר

מספר תגליות חדשות עלו מהמחקר הנוכחי: [1] בספרות יש דיווחים על אמבריוגנזה סומטית ישירה מעוברים זיגוטים לא בשלים. אנו מצאנו לראשונה שהשראת אמבריוגנזה ישירה אפשרית גם מרקמת עובר זיגוטי בשל המופקת מזרע. היתרון של אמבריוגנזה סומטית מרקמת עובר בשל הוא בנוחיות השגת רקמת המקור לתרבות: הפקתה מזרעים אפשרית בכל עת בעוד שיצור עוברים זיגוטים לא בשלים מצריך גידול צמחים לקציר עוברים טריים. [2] המחקר שלנו מדגים לראשונה השראת אמבריוגנזה סומטית באמצעות Quinclorac ו-Centrophenoxine. המשרן לאמבריוגנזה סומטית הנפוץ ביותר בשימוש הוא ה-2,4-D. העבודה שלנו מצביעה על כך ש-Centrophenoxine דומה ביעילותו ל-2,4-D. המין *C. annuum* L. (הפלפל) הוא המין השני אחרי *Arachis hypogaea* L. (אוגוז האדמה) בו מוכחת פעילותו המשרנית של אוקסין סינטטי זה. [3] כל הפרסומים הקודמים בנושאנו מציגים תוצאות מחקר שהתבצע על זן יחיד של פלפל. עבודתנו מבחינה, כי אמבריוגנזה ישירה אפשרית באמצעות מרשם נתון ובמגוון זני פלפל. היות ורמת התגובה האמבריוגנית תלויה בתכונות הגנטיות של הזן, אין אפשרות ליצור מרשם אחד בעל יעילות דומה לכל הזנים. [4] לאנחנו, העוברים הסומטים סובלים מפגמים מורפוגנטיים אחדים. הפגם החמור ביותר, שמנע יצירת צמחים, הוא העדר יצירת גבעול כנבטים המתפתחים מהעוברים. פגם כזה תואר בספרות בעוברים סומטים בגידולים ממנים אחרים אך לא הוצג כמכשול רציני בקבלת צמחים בפלפל. עוברים פגומים שהפכו בתנאי נביטה לצמחים הסרי גבעול הופיעו בכל הגנוטיפים שנכללו במחקר ובכל שלושת האוקסנים המשרים אמבריוגנזה בזן 1595. בשנה האחרונה של הפרויקט ערכנו שורה ארוכה מאוד של ניסויים שמטרת כולם הייתה למנוע, או לתקן, את הפגם של העדר גבעול. בדקנו תוספי מצע רבים ושונים (כגון סוגים שונים של סוכרים, חומרי צמיחה למיניהם) ותנאי תרבות אחרים אשר בחלקם מוזכרים בספרות כמשפרים איכות עוברים סומטים (כגון, שינוי בפוטנציאל האוסמוטי של המצע, סוג האגר, אור, איזורור התרבות למניעת הצטברות אחילן במיכל הגידול). עד לסיום הפרויקט לא גילינו שום גורם שעשוי לתקן את הפגם ולו באופן חלקי, ולפי שעה לא עלה בידינו לייסד שיטה לאמבריוגנזה סומטית שעשויה להיות נקודת זינוק לריבוי וגטטיבי המוני. אין ספק שיהיה צורך במחקר נוסף שמטרתו (א) למנוע פגמים בהתמיינות המריסטמה האמירית בשלב האמבריוגנזה, ו(ב) פיתוח מערכות אמבריוגנזה בתרחיף נוזל לריבוי המוני בביווראקטור.

פרוט מלא של הפרסומים המדעיים

חלק מהממצאים הוצגו בכנסים שהתקיימו באנטליה, טורקיה (אפריל 2001). ובפלורידה, ארה"ב (יוני 2002). כן מצורף תקציר מאמר הנמצא בדפוס ואמור להופיע ב-2003.

XIth Eucarpia Meeting on Geenetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, Antalya, Turkey, April 2001.

FACTORS LIMITING PLANT REGENERATION IN VITRO AND GENETIC TRANSFORMATION IN *CAPSICUM ANNUUM* L.

Benjamin Steinitz¹, Mustafa Küsek², Anat Raz¹ and Aaron Zelcer¹

¹Dept. of Plant Genetics, Institute of Field and Garden Crops, A.R.O., The Volcani Center, P.O.B. 6, Bet Dagan 50250, Israel. ²Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kahramanmaraş Sutcu Imam, 46060 Kahramanmaraş, Turkey.

Capsicum annuum L. is a recalcitrant species in terms of regeneration in vitro and genetic transformation. Generally regeneration in vitro was attempted via organogenesis [shoot formation with subsequent rooting], and most accounts reflect very low yields of regenerants per source plant. In the last decade a few laboratories reported pepper plant regeneration via somatic embryogenesis. We attempted to establish a somatic embryogenesis system in a sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. California Wonder) using germinating zygotic embryos as explant source. The auxin and carbohydrate concentrations in the agar-solidified medium utilized for embryogenic callus induction were found to be critical. Opaque white-cream colored globular structures [GS] appeared within one month from culture initiation with the highest frequency being approximately 90% of all explants. The number of GS per explant varied between single to a few tens. Only a small fraction of the GS developed into torpedo stage somatic embryos on a solidified medium. Most of these embryos were morphologically aberrant and, following transfer to a solid medium permitting their growth to progress, they eventually developed into abnormal plants. When embryogenic callus was transferred from an agar-solidified embryogenesis induction medium to a liquid suspension culture we obtained proliferation of the callus and of the GS, however the GS failed to develop into progressive developmental stages of somatic embryos. Reports of other laboratories and our results will be discussed in reference to pepper genetic transformation.

The work was supported in part by grant 261-0366-2000/01 of the Chief Scientist's Fund of the Ministry of Agriculture. M. K. was supported by the Ministry of Foreign Affairs, MASHAV program for Individual Training.

Direct Somatic Embryogenesis in Pepper

B. STEINITZ, M. Küsek¹, Y. Tabib, I. Paran, and A. Zelcer. Dept. of Plant Genetics, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Bet Dagan 50250, Israel, and ¹Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kahramanmaraş Sutcu Imam, 46060 Kahramanmaraş, Turkey. E-mail: steinitz@volcani.agri.gov.il

In Vitro Cell. & Develop. Biol. 38: p. 137-A abstract P-1464.

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is considered a recalcitrant species in terms of plant regeneration *in vitro*. For several decades research efforts have been focused mainly on regeneration via organogenesis whilst reports on somatic embryogenesis dealt mainly with the regeneration of dihaploids in anther culture. Studies considering somatic embryogenesis from vegetative tissue other than anthers started to appear only in recent years and the information available is limited as yet. Our objective was to explore the possibility to regenerate plants by somatic embryogenesis in sweet, pungent, and paprika types, using seed-derived zygotic embryos as source explant. After identification of several basic culture parameters important to obtain reproducible results, we examined the role of plant growth regulators in embryogenesis induction and in embryo maturation and conversion to plants. Facile direct somatic embryogenesis was induced in different genotypes by chlorophenoxy acids supplemented to the medium. Cytokinin supplement was found to be unnecessary for direct embryogenesis induction; moreover, it promoted callus formation, which was detrimental to embryogenesis. We will describe the dose response relationships for embryogenesis induction by different auxins and the time course of the appearance of somatic embryos on the explants, and we will present photomicrographs depicting embryo morphogenesis. Since embryos were generally morphologically aberrant and failed to develop into normal plants, we shall discuss at which stages in embryo development the major anomalies become established.

ספרות

שטייניץ ב., זלצר א., פארן א. ריבוי אל-מיני דרך יצירת עוברים בתרבויות רקמה של פלפל. דו"ח תוכנית מחקר 261-0366-00 ; 2000.

Büyükalaca, S., Mavituna, F. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:227-235.

Mavituna, F., Büyükalaca, S. 1996. Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 327-333.

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

Wolf, D.; Matzevitch, T.; Steinitz, B.; Zelcer, A. 2001. Why is it difficult to obtain transgenic pepper plants? *Acta Hort.* 560:229-233.

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

- א. להגדיר תנאי השראת אמבריוגנזה סומטית בפלפל.
- ב. לברר איזה סוגים של אוקסינים משרים התמיינות עוברים במסלול אמבריוגנזה סומטית.
- ג. למצוא תנאי תרבית המאפשרים נביטה של עוברים סומטיים והתפתחותם לצמחים.

עיקרי הניסויים והתרוצאות

- א. האוקסינים D, 2,4-D, Centrophenoxine, Quinclorac משרים אמבריוגנזה סומטית ישירה בקטעי מקור שהוכנו מעוברים זיגוטים בשלים.
- ב. השראת אמבריוגנזה סומטית ישירה באמצעות Centrophenoxine התאפשרה בזני פלפל שונים, אך דמת האינדוקציה תלויה בגנוטיפ המקור.
- ג. העוברים הסומטיים נובטים ומתפתחים לצמחים, אך הללו סובלים מפגמים מורפולוגיים; הפגם החמור ביותר הוא העדר התפתחות גבעול.

המסקנות המדעיות וההשלכות

- א. ניתן להשרות אמבריוגנזה סומטית ישירה ברקמה של עובר זיגוטי בשל.
- ב. יעילות האמבריוגנזה מושפעת מגנוטיפ הפלפל.
- ג. תנאי התרבית שהופעלו מאפשרים התפתחות צמחים מעוברים סומטיים.
- ד. שני אוקסינים נמצאו לראשונה כמשרני אמבריוגנזה סומטית בפלפל.

הבעיות שנתרו לפתרון

כיוון שהצמחים המתקבלים בתרבית נושאים פגמים התפתחותיים יש עדיין צורך ללמוד ולפתח דרכים לרגנרציה של צמחים תקינים מהעוברים הסומטיים. כמו כן נדרש מחקר נוסף של דרכים לריבוי וגטיבי המוני כחשית לפיתוח טכנולוגיה של ריבוי בביו-ראקטורים.

הפצת הידע

תמצית ממצאים של המחקר הוצגו בכנס מטפחי פלפל, בצסגרת Eucarpia שהתקיים באפריל 2001, באנטליה, טורקיה, ובכנס האגודה הבין לאומית לתרבויות רקמה וביוטכנולוגיה 2002, פלורידה, ארה"ב.