

UDC: 57.082.83:581.132.1

Оригинален научен труд  
Original research paper

## СОДРЖИНА НА ФОТОСИНТЕТСКИ ПИГМЕНТИ ВО КУЛТУРИ ОД ПИПЕРКА ВО УСЛОВИ *IN VITRO*

Колева - Гудева Лилјана\*, Спасеноски М.\*\* , Рафајловска Весна\*\*\*

### Краток извадок

Хлорофилите се едни од најзначајните хелатни соединенија во природата кои имаа способност да ја претвараат сончевата енергија во потенцијална хемиска енергија при процесот на фотосинтеза. Фотосинтезата е сложен биолошки процес кој, освен во *in vivo*, се одвива и во *in vitro* услови, но по алтративни патишта при биосинтеза на фотосинтетските пигменти.

Цел на овие истражувања беше да се определи содржината на фотосинтетските пигменти хлорофил *a*, *b* и *a+b*, во култури на пиперка *Capsicum annuum* L. од сортите *курџовска кајџија* и *златен медал* на MS (Murashige and Skoog,) медиум, и тоа во култура на изданоци, култура на клауси од котиледони и од меристеми и во култура на котиледони. Воедно, испитуван е и ефектот на повеќе различни регулатори на растењето врз биосинтезата на испитуваните фотосинтетски пигменти во услови *in vitro* кај сите испитувани култури на пиперка.

**Клучни зборови:** *пиперка Capsicum annuum* L., *хлорофил a*, *b* и *a+b*, *култура на икива*

---

\*Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, „Гоце Делчев“ б.б., 2 400 Струмица, Република Македонија, Е-mail: [liljanak@isc.ukim.edu.mk](mailto:liljanak@isc.ukim.edu.mk)

\*\*Природно-математички Факултет, П. фах. 162, 1 000 Скопје, Република Македонија, Е-маил: [mirkoms@iunona.pmf.ukim.edu.mk](mailto:mirkoms@iunona.pmf.ukim.edu.mk)

\*\*\*Технолошко-металуршки факултет, „Ругер Бошковиќ“ бр. 16, П.фах 580, 1 000 Скопје, Република Македонија, Е-mail: [vesna@tmf.ukim.edu.mk](mailto:vesna@tmf.ukim.edu.mk)

\*Institute of Southern Crops - Strumica, Goce Delcev b.b., 2400 Strumica, Republic of Macedonia, E-mail: [liljanak@isc.ukim.edu.mk](mailto:liljanak@isc.ukim.edu.mk)

\*\*Faculty of Natural Science and Mathematics, Gazi Baba b.b., PO box 162, 1 000 Skopje, Republic of Macedonia, Email: [mirkoms@iunona.pmf.ukim.edu.mk](mailto:mirkoms@iunona.pmf.ukim.edu.mk)

\*\*\*Faculty of Technology and Metallurgy, Rugjer Boskovic 16, PO box 580, 1000 Skopje, Republic of Macedonia, E-mail: [vesna@tmf.ukim.edu.mk](mailto:vesna@tmf.ukim.edu.mk)

## CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN PEPPER *IN VITRO* CULTURES

Koleva - Gudeva Liljana<sup>\*</sup>, Spasenoski M.<sup>\*\*</sup>, Rafajlovska Vesna<sup>\*\*\*</sup>

### Abstract

Chlorophylls are some of the most important chelates in nature. They are capable of channelling the energy of sunlight into potential chemical energy through the process of photosynthesis. Photosynthesis is complex biological process which occurs in *in vitro* conditions too, but in alternative pathways on biosynthesis of photosynthetic pigments.

The purpose of our examinations was to evaluate the content of photosynthetic pigments chlorophyll *a*, *b* and *a+b* in the pepper culture *Capsicum annuum* L. of the varieties Kurtovska Kapija and Golden Medal on the MS (Murashige and Skoog) medium, especially in shoot culture, culture of callus from meristem and callus, and as well as cotyledon culture. All pepper tissue cultures were subject of investigation regarding the effect of plant grown regulators on *in vitro* synthesis of photosynthetic pigments.

**Key words:** *pepper Capsicum annuum* L, chlorophyll *a*, *b* and *a+b*, pepper tissue culture

### 1. Вовед

Хлорофилите според хемиската структура се тетрапирили, кои градат порфириински прстен и се сродни на другите порфириински соединенија, како што е хем. За хлорофилите е карактеристично што имаат Mg во центарот на прстенот, како и петти циклопентанонски прстен, кој дополнително се формира. Кај растенијата постојат повеќе типови хлорофили кои се означени со буквите *a*, *b*, *c*, и *d*. Сите фотосинтетски организми (освен бактериите) содржат хлорофил *a*. (Neskovic, et al., 2003).

Модерните истражувања за фотосинтезата во услови *in vitro* започнуваат уште во 1937 год. со експериментите на Hill (Culafic et al., 2000). Во 1979 год. Murashige наведува дека присуството на зелената боја во култури на растителни ткива е недвосмислена евиденција за фотосинтеза во *in vitro* услови. Имено, самата биосинтеза на фотосинтетските пигменти е сложен процес во чиј синџир се испреплетуваат бројни реакции а кои сè уште се предмет на истражување (Belyaeva, 2003). Во услови *in vitro* синтезата на фотосинтетските пигменти се одвива по алтернативни патишта, при

што голем број ензими или отсутствуваат или се неактивни (Sasson, 1991).

## 2. Материјал и метод на работа

За изедување на органогенезата на пиперката во услови *in vitro*, најпрво семето од сортите *курџовска кајиџа* и *злајен медал* беше стерилизирано на следниот начин: семето се исплакнува во дестилирана вода и се остава да имбибира 2-3 h; потоа површински се стерилизира 15 s во 70% етанол; 10 min во 1% Izosan-G; а на крај се исплакнува неколку пати во стерилна вода. Вака стерилизираното семе беше поставено на 1/2 MS (Murashige, T. and Skoog, F. 1962) минерален раствор на ртење. Кога младите никулци достигнуа големина од 3-5 cm (по 21-25 дена), од нив беа изолирани почетните експлантати и истите беа поставени на хормонален MS медиум. Како почетни експлантати беа користени апикални пупки со големина 1-3 mm и 1/3 делови од котиледоните со големина 3-5 mm. Сите поставени култури од двете сорти на пиперка беа чувани на контролирани услови во клима комора и тоа на: температура од  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , релативна влажност од 50%, фотопериодизам од 16 h светло/ 8 h темно и интензитет на светлина од  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ .

Од *in vitro* услови беше земен растителен материјал за анализа на содржината на хлорофилот *a*, *b* и *a+b* од 4 различни култури на пиперка:

- култура на изданоци;
- култура на калуси од меристеми;
- култура на калуси од котиледони и
- култура на котиледони.

Всушност, анализирана е содржината на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во *in vitro* култури на седум различни MS хормонални подлоги, и тоа:

- MS +  $5,0 \text{ mg g}^{-1}$  KIN;
- MS +  $5,0 \text{ mg g}^{-1}$  BAP;
- MS +  $5,0 \text{ mg g}^{-1}$  ZEA;
- MS +  $5,0 \text{ mg g}^{-1}$  2,4-D;
- MS +  $0,5 \text{ mg g}^{-1}$  NAA +  $5,0 \text{ mg g}^{-1}$  BAP;
- MS +  $0,5 \text{ mg g}^{-1}$  NAA +  $10,0 \text{ mg g}^{-1}$  KIN и
- MS +  $1,0 \text{ mg g}^{-1}$  IAA +  $10,0 \text{ mg g}^{-1}$  BAP.

Содржината на хлорофилите *a*, *b* и *a+b* е одредена и во листовите на двете испитувани сорти *курџовска кајиџа* и *злајен медал* одгледувани во оранжериски услови.

Примероците за анализа на содржината на хлорофил *a*, *b* и *a+b* беа исушени до воздушно сува маса (на собна температура 6-7 дена). Дополнителната влага е коригирана со сушење на пробите во термостат до константна тежина на температура од 105°C со времетраење од 5 часа. Екстрактите се добиени со мацерирање на *in vitro* и *in vivo* материјал од пиперка (0,1 - 0,5 g) со 96% етанол во водена бања на температура од 40°C и за време од 5 часа. Содржината на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во етанолните екстракти од култури на изданоци, котиледони и калуси од пиперка беше одредена со отчитувања на апсорбанцијата на спектрофотометар тип Cary 50 Varian на бранова должина од 649 и 665 nm.

Во согласност со вредностите за апсорбанцијата отчитани во етанолните екстракти на култури на пиперка на бранова должина од 649 и 665 nm, (Слика 1б) е одредена содржината на фотосинтетските пигменти и истите се изразени како mg хлорофил *a*, *b* и *a+b* / g проба свежа маса.

Пресметувањата за содржината на фотосинтетските пигменти хлорофил *a*, *b* и *a+b*, за растворувачот 96% етанол, направени се според обрасците по Winttermansu и De Motsu (1965).

$$\text{Хлорофил } a = 13,70 \times A_{665} - 5,76 \times A_{649}$$

$$\text{Хлорофил } b = 25,80 \times A_{649} - 7,60 \times A_{665}$$

$$\text{Хлорофил } a+b = 6,10 \times A_{665} + 20,04 \times A_{649}$$

### 3. Резултати и дискусија

Содржината на испитуваните фотосинтетски пигменти најголема вредност покажува во *in vivo* листови кај двете испитувани сорти (Графикон 1), каде за сортата *курџовска кајџија* изнесува за хлорофил *a* 0,0366 mg g<sup>-1</sup>, хлорофил *b* 0,0526 mg g<sup>-1</sup> а хлорофил *a+b* 0,0903 mg g<sup>-1</sup> а за сортата *злајџен медал* хлорофил *a* 0,0362 mg g<sup>-1</sup>, хлорофил *b* 0,0528 mg g<sup>-1</sup> а хлорофил *a+b* 0,0891 mg g<sup>-1</sup>.

Резултатите од содржината на фотосинтетските пигменти во култури на пиперка покажуваат највисоки вредности во култура на изданоци (Графикон 2). Од сите испитувани медиуми најповолен медиум за синтеза на хлорофилите за сортата *курџовска кајџија* се покажа MS + 1,0 mg g<sup>-1</sup>NAA + 10,0 mg g<sup>-1</sup>BAР каде беа измерени хлорофил *a* 0,0652 mg g<sup>-1</sup>, хлорофил *b* 0,0397 mg g<sup>-1</sup> а хлорофил *a+b* 0,0903 mg g<sup>-1</sup> а за сортата *злајџен медал* хлорофил *a* 0,0289 mg g<sup>-1</sup>, хлорофил *b* 0,0407 mg g<sup>-1</sup> а хлорофил *a+b* 0,0696 mg g<sup>-1</sup>.

Во култура на калуси од меристемски ткива најповолен медиум за синтеза на хлорофилите се покажа MS + 1,0 mg g<sup>-1</sup>NAA +

10,0 mg g<sup>-1</sup>BAР и за двете испитувани сорти (Графикон 3). И кај овој испитуван медиум, се добива повисока содржина на хлорофил б во култура на калиси од меристемски ткива. Од сите четири испитувани типови на ин витро култури на пиперка во културата на калуси од меристем беа измерени најниски вредности и за двете испитувани сорти.

И во култура од калуси на котиледони како најповолен медиум за синтеза на фотосинтетските пигменти за сортата *курџовска кайија* се покажа медиумот MS+1,0 mg g<sup>-1</sup>NAA + 10,0 mg g<sup>-1</sup>BAР каде беа измерени хлорофил а 0,0180 mg g<sup>-1</sup>, хлорофил б 0,0383 mg g<sup>-1</sup> и хлорофил а+б 0,0564 mg g<sup>-1</sup> а за сортата *златен медал* највисоки вредности се измерени на медиумот MS + 5,0 mg g<sup>-1</sup>ZEA и тоа: хлорофил а 0,0289 mg g<sup>-1</sup>; хлорофил б 0,0407 mg g<sup>-1</sup>; хлорофил а+б 0,0696 mg g<sup>-1</sup>(Графикон 4).

Во култура на котиледони од пиперка најповолен медиум за синтеза на фотосинтетските пигменти за сортата *курџовска кайија* се покажа медиумот MS+1,0 mg g<sup>-1</sup>NAA + 10,0 mg g<sup>-1</sup>BAР, а за сортата *златен медал* медиумот MS + 5,0 mg g<sup>-1</sup>ZEA, со таа разлика што овде вредностите се нешто повисоки за разлика од културата на калуси од котиледони (Графикон 5).

Фотосинтетските активности во *in vitro* услови зависат од многу фактори, од кои најбитни се составот на медиумот, изборот на шеќер и соодветни фитохормони, фотопериодизмот и интензитетот на осветлувањето, како и многу други фактори кои ги активираат ензимските реакции во процесот на синтеза на фотосинтетските пигменти (Ticha et al., 1998). И во нашите истражувања различниот хормонален состав на седумте испитувани медиуми покажаа различни вредности за содржината на хлорофил а, б и а+б во ист тип култура.

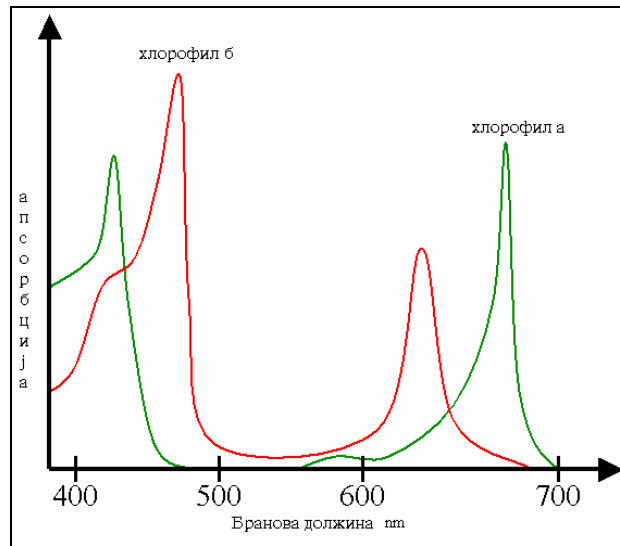
#### 4. Заклучок

Содржината на хлорофил а, б и а+б во култури на пиперка *in vitro* покажува значително пониски вредности за разлика од оние измерени во листови на пиперка ин виво. Во култура на изданоци од пиперка најголема е вредноста на хлорофилите, а додека најниски вредности беа измерени во култура од калуси на меристем. Различните хормонални медиуми различно влијаат врз биосинтезата на фотосинтетските пигменти во услови *in vitro*. Како најповолни медиуми за сите испитувани култури и за двете сорти се покажаа медиумите MS+1,0 mg g<sup>-1</sup>NAA + 10,0 mg g<sup>-1</sup>BAР; MS+1,0 mg g<sup>-1</sup>NAA +

10,0 mg g<sup>-1</sup> ВАР и MS +1,0 mg g<sup>-1</sup> NAA + 10,0 mg g<sup>-1</sup> ZEA. Со овие истражувања се потврдува фактот дека некои регулатори на раст во хормоналниот медиум можат да ја стимулираат биосинтезата на фотосинтетските пигменти, а со тоа и да го подобрат квалитетот на добиените регенеранти во услови *in vitro*.

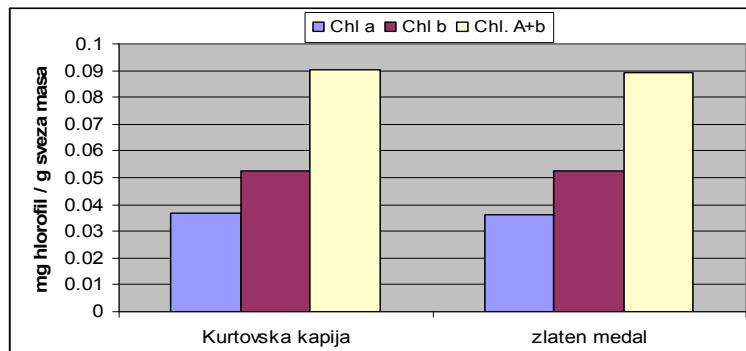
### **Литература**

- Belyaeva, B.O. 2003. Studies of chlorophyll biosynthesis in Russia. *Photosynthesis Research* 76: 405-411.
- Culafic, Lj., Cerovic, Z., Naunovic, G., Konjevic, R., 2000. *Praktikum Fiziologija Biljaka*, NNK-International, Beograd.
- Murashige, T. (1979): *Principles of Rapid Propagation. Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*. pp 14-24.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures, *Physiologia Planatarum*, Vol. 15: 473-497.
- Neskovic, M., Konjevic R., Culafic, LJ., 2003. *Fiziologija Biljaka*, NNK-International, Beograd.
- Sasson, A. 1991. Production of useful biochemicals by higher-plant cell culture: biotechnological and economic aspects. *CIHEAM – Options Mediterraneennes*. 14: 59-74.
- Ticha, I., Cap, F., Pacovska, D., Haisel, D., Capkova, V. and Schafer C. 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiologia Planatarum* Vol. 102: 155-162.

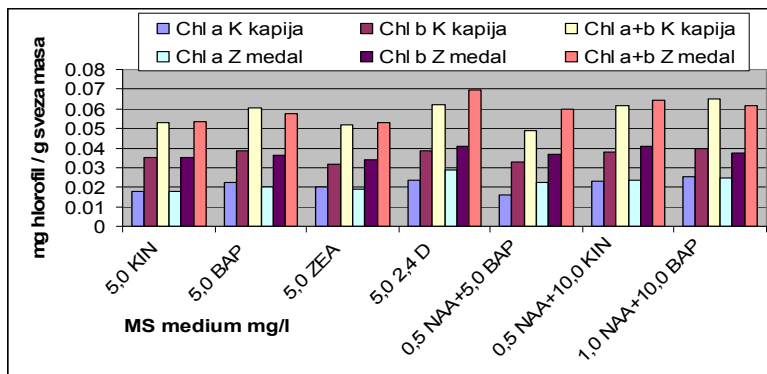


Слика 1. Апсорбциски спектар на слободните хлорофил *a* и хлорофил *b* во растворувач.

Figure 1. Absorption spectrum of free chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in solvent.

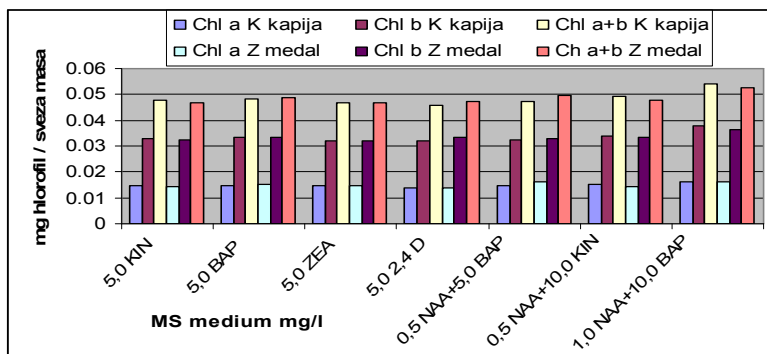


Графикон 1. Содржина на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во листови на пиперка *in vivo*.  
Graph 1. Content of chlorophyll *a*, *b*, and *a+b* in pepper leaves *in vivo*.



Графикон 2. Содржина на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во култура на изданоци од пиперка.

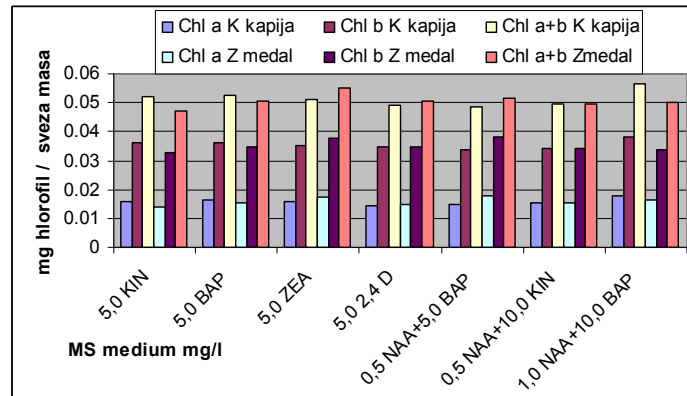
Graph 2. Content of chlorophyll *a*, *b*, and *a+b* in pepper shoot culture.



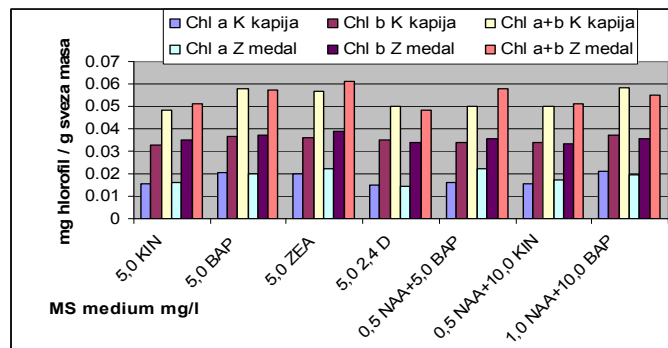
Графикон 3. Содржина на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во култура на калуси од меристемски ткива од пиперка.

Graph 3. Content of chlorophyll *a*, *b*, and *a+b* in callus from meristeme pepper culture.





Графикон 4. Содржина на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во култура на калуси од котиледони од пиперка.  
 Graph 4. Content of chlorophyll *a*, *b*, and *a+b* in callus of cotyledon pepper culture.



Графикон 5. Содржина на хлорофил *a*, *b* и *a+b* во култура на котиледони од пиперка.  
 Graph 5. Content of chlorophyll *a*, *b*, and *a+b* in cotyledons pepper culture.