

WPŁYW KWASU 2,4-DICHLOROFENOKSYOCTOWEGO NA EFEKTYWNOŚĆ KULTUR PYLNIKÓW ANDROGENICZNYCH LINII PAPRYKI *CAPSICUM* SPP.

Aleksandra Niklas-Nowak  , Dorota Olszewska ,
Paweł Nowaczyk 




UTP, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii


Streszczenie. Celem pracy było zbadanie wpływu oprysku roślin donorowych kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ na częstotliwość pojawiania się androgenicznych zarodków w kulturach pylników dziewięciu linii podwojonych haploidów papryki *Capsicum* spp. W zależności od genotypu i wariantu doświadczenia efektywność androgenozy wahała się od 0 do 8,4%. Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ oprysku 2,4-D na odpowiedź androgeniczną linii AT4, AC5 i AC7. W przypadku linii AC5 wstępne traktowanie egzogenną auksyną zaindukowało tworzenie zarodków (3,2%) i ich konwersję w rośliny (43,8%). W przypadku linii AT6, AP32, FA i FCH także zaobserwowano korzystną tendencję dotyczącą wzrostu liczby uzyskanych zarodków, a linie AP15 i AP40 wykazały zbliżoną reakcję androgeniczną w obu wariantach doświadczenia. W przeprowadzonych badaniach 41% otrzymanych zarodków rozwinęło się w rośliny o prawidłowej morfologii, które aklimatyzowano w szklarni. Analiza cytometryczna wykazała wśród 84 regenerantów: haploidy (54,8%), diploidy (36,9%) i miksoploidy (8,3%).

Słowa kluczowe: 2,4-D, *Capsicum* spp., androgeniza, linie DH

WSTĘP

Rodzaj *Capsicum* obejmuje kilkadziesiąt gatunków, w tym formy uprawne *C. annuum* i *C. frutescens* oraz wiele gatunków dzikich, które w wyniku krzyżowania z formami hodowlanymi mogą przyczynić się do rozszerzenia zmienności genetycznej papryki rocznej. Jedną z możliwości stabilizacji genetycznej otrzymanej zmienności jest uzyskiwanie roślin haploidalnych lub androdiploidalnych w wyniku indukowanej androgenozy w kulturach

Aleksandra Niklas-Nowak  <https://orcid.org/0000-0002-7923-8702>; Dorota Olszewska  <https://orcid.org/0000-0002-1381-6178>; Paweł Nowaczyk  <https://orcid.org/0000-0002-1312-2168>

 niklas@utp.edu.pl

© Copyright by Wydawnictwo SGGW

pylników form mieszańcowych. Homozygotyczne linie podwojonych haploidów (linie DH), otrzymywane na drodze kolchicynowania lub spontanicznej diploidyzacji są obecnie wykorzystywane w hodowli wielu gatunków roślin uprawnych, w tym także papryki rocznej [Adamus 2005, Dunwell 2010]. Prace badawcze prowadzone nad indukowaną androgenezą roślin rolniczych i warzywnych wskazują na wiele czynników, które w istotny sposób wpływają na wydajność tego procesu. Do najważniejszych z nich należą: genotyp roślin matecznych [Ercan i in. 2006, Nowaczyk i in. 2009a, Nowaczyk i in. 2009b], faza rozwojowa mikrospor [Kim i in. 2004, Nowaczyk i Kisiała 2006], skład pożywek, warunki prowadzenia kultury *in vitro* [Özkum Çiner i Tipirdamaz 2002, Parra-Vega i in. 2013, Ari i in. 2016] oraz czynniki stresowe [Niklas-Nowak i Nowaczyk 2009, Popova i in. 2016]. W celu zwiększenia efektywności androgenezy i dostosowania metody do wybranych genotypów testowane są także modyfikacje dotyczące wykorzystania egzogennych fitohormonów, dodawanych do pożywek lub stosowanych do oprysku roślin donorowych [Gémesné i in. 1998, Cheng i in. 2013, Nowaczyk i in. 2015, Nowaczyk i in. 2016].

Celem przeprowadzonego doświadczenia było zbadanie wpływu oprysku roślin matecznych kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym na efektywność androgenezy w kulturach pylników *in vitro* wyselekcjonowanych linii podwojonych haploidów *Capsicum* spp.

MATERIAŁ ROŚLINNY

Materiał badawczy stanowiły linie DH wyprowadzone z mieszańców wewnątrzgatunkowych papryki rocznej (*C. annuum* L. ATZ1 × ‘Tomaticat giallo’)F₁; linia AT4 i AT6; (*C. annuum* L. ATZ1 × ‘Corno di toro’)F₁; linia AC5 i AC7; (*C. annuum* L. ATZ1 × *C. annuum* L. PO)F₁; linia AP15, AP32, AP40; a także z mieszańców międzygatunkowych (*C. frutescens* × *C. annuum* L. ATZ1)F₁; linia FA; (*C. frutescens* × *C. chinense*)F₁; linia FCH. Kryterium doboru materiałów hodowlanych do doświadczenia stanowiły wyniki wcześniejszych badań, które pozwoliły na wyselekcjonowanie wartościowych pod względem cech agromorfologicznych androgenicznych linii papryki. Wszystkie materiały roślinne pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii Rolniczej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.

METODY

Doświadczenie prowadzono w 4 powtórzeniach. Dla każdego genotypu wysadzono 40 roślin, z czego 20 stanowiło wariant kontrolny, pozostałe rośliny, po 5 w każdym powtórzeniu, poddano opryskom egzogenną auksyną. W eksperymencie zastosowano kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) w stężeniu 1 mg·l⁻¹, który aplikowano roślinom matecznym w porze wieczornej dnia poprzedzającego zbiór pąków. Rośliny donorowe uprawiano w nieogrzewanych tunelach foliowych, w okresie wegetacji nie stosowano środków ochrony roślin.

Pąki kwiatowe pobierano w godzinach porannych od 28 czerwca do 7 lipca 2017 roku. Wybierano pąki o płatkach korony równych lub nieco dłuższych od działek kielicha, których pylniki były lekko przebarwione antocyjanowo. Stadium rozwojowe mikrospor

określano na podstawie obserwacji mikroskopowych preparatów rozgniatanych, wykonywanych z pylników wybarwionych w 1-procentowym roztworze orceiny w 45-procentowym kwasie octowym lodowatym. Większość analizowanych mikrospor znajdowało się w stadium jednojądrowym, 4–13% stanowiły komórki 2-jądrowe. Pobrane pąki przemywano 70-procentowym etanolem, i sterylizowano powierzchniowo, wytrząsając w 5-procentowym roztworze podchlorynu wapnia (CaCl_2O_2) przez 10 min, po czym 3-krotnie przepłukiwano sterylną wodą destylowaną. Kultury pylników prowadzono według procedury zespołu Dumasa de Vaulx'a [1981] opracowanej dla *C. annuum* L., pożywki przygotowano zgodnie z procedurą Chambonneta [1988]. Pylniki wykładano na pożywkę indukcyjną CP zawierającą $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2,4-D i $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kinetyny. Dla każdego genotypu wyłożono łącznie po 500 pylników w wariancie kontrolnym i po zastosowaniu oprysku roślin donorowych kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym. Przez 8 dni pylniki inkubowano w ciemności, w temperaturze 35°C . Następnie kulturę kontynuowano w warunkach 12-godzinnego fotoperiodu w temperaturze 25°C . Po 14 dniach pylniki przenoszono na pożywkę regeneracyjną R1 uzupełnioną kinetyną w stężeniu $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pojawiające się zarodki przenoszono na pożywkę V3 bez regulatorów wzrostu. Zregenerowane rośliny aklimatyzowano w szklarni.

Doświadczenie prowadzono w fitotronie przez 4 miesiące. Dla ocenianych linii oznaczono liczbę i procentowy udział otrzymanych zarodków w stosunku do całkowitej liczby pylników wyłożonych na pożywkę CP (efektywność androgenozy). Ponadto określono procentowy udział zregenerowanych roślin w porównaniu do liczby otrzymanych zarodków (konwersja w rośliny).

Ploidalność regenerantów określono za pomocą cytometru przepływowego Partec CCA (Münster, Niemcy), wyposażonego w lampę rtęciową (High Pressure Lamp HBO-100W). Materiał roślinny do analizy cytometrycznej przygotowano zgodnie z procedurą opracowaną przez zespół Galbraitha [1983]. Jako standard zewnętrzny wykorzystano młode liście diploidalnej linii hodowlanej ATZ1 *C. annuum* ($2n = 2x = 24$). Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci histogramów, które analizowano za pomocą programu komputerowego Partec DPAC 2.2.

Wyniki dotyczące wpływu 2,4-D na efektywność androgenozy w kulturach pylników opracowano statystycznie z zastosowaniem programu Statistica, przeprowadzono analizę wariancji oraz test Duncana przy $p = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Prace badawcze prowadzone nad indukowaną androgenezą papryki wskazują na wiele czynników, które w istotny sposób wpływają na wydajność uzyskiwania haploidalnych zarodków. O powodzeniu tego procesu decydują warunki prowadzenia kultury *in vitro*, skład pożywek, a zwłaszcza rodzaj i stężenie stosowanych regulatorów wzrostu [Matsubara i in. 1998, Özkum Çiner i Tipirdamaz 2002, Niklas-Nowak i Nowaczyk 2009]. Wykazano, że wysokie stężenie 2,4-D ($0,1\text{--}0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) stymuluje kalusogenezę [Matsubara i in. 1992] niski poziom tego hormonu w pożywce indukcyjnej ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) wpływa natomiast korzystnie na bezpośrednią embriogenezę w kulturach pylników papryki [Dumas de Vaulx i in. 1981]. Stwierdzono, że zastosowanie oprysku roślin donorowych roztworem wodnym

zawierającym 2,4-D ($0,1-1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) również może indukować proces androgenyzy w przypadku wybranych genotypów papryki [Nowaczyk i in. 2015, Nowaczyk i in. 2016].

W przeprowadzonym doświadczeniu obserwowano zróżnicowaną reakcję androgeniczną badanych genotypów na wstępne traktowanie roślin donorowych opryskiem 2,4-D w stężeniu $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Efektywność androgenyzy wahała się od 0% dla genotypu AC5 w warunkach kontrolnych do 8,4% dla genotypu AT4 po oprysku roślin donorowych. Analiza statystyczna potwierdziła istotny wpływ egzogennej auksyny na odpowiedź androgeniczną 3 spośród 9 badanych genotypów AT4, AC5 i AC7. Na szczególną uwagę zasługiwała linia AC5, która w warunkach kontrolnych doświadczenia nie wykazywała żadnej reakcji androgenicznej. W przypadku genotypów opornych na indukcję androgenyzy bardzo ważnym elementem jest modyfikacja metody badawczej i wprowadzenie nowego czynnika indukcyjnego. W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowanie oprysku 2,4-D dla niereagującej linii AC5 spowodowało rozwój androgenicznych zarodków z efektywnością 3,2% i ich konwersję w rośliny na poziomie 43,8%. Nie stwierdzono istotnego statystycznie zróżnicowania dla pozostałych genotypów. W przypadku linii AT6, AP32, FA i FCH zaobserwowano korzystną tendencję wzrostu liczby uzyskanych zarodków po zastosowaniu oprysku egzogenną auksyną. Linie AP15 i AP40 były zbliżone w reakcji androgenicznej w obydwu wariantach doświadczenia (tab.).

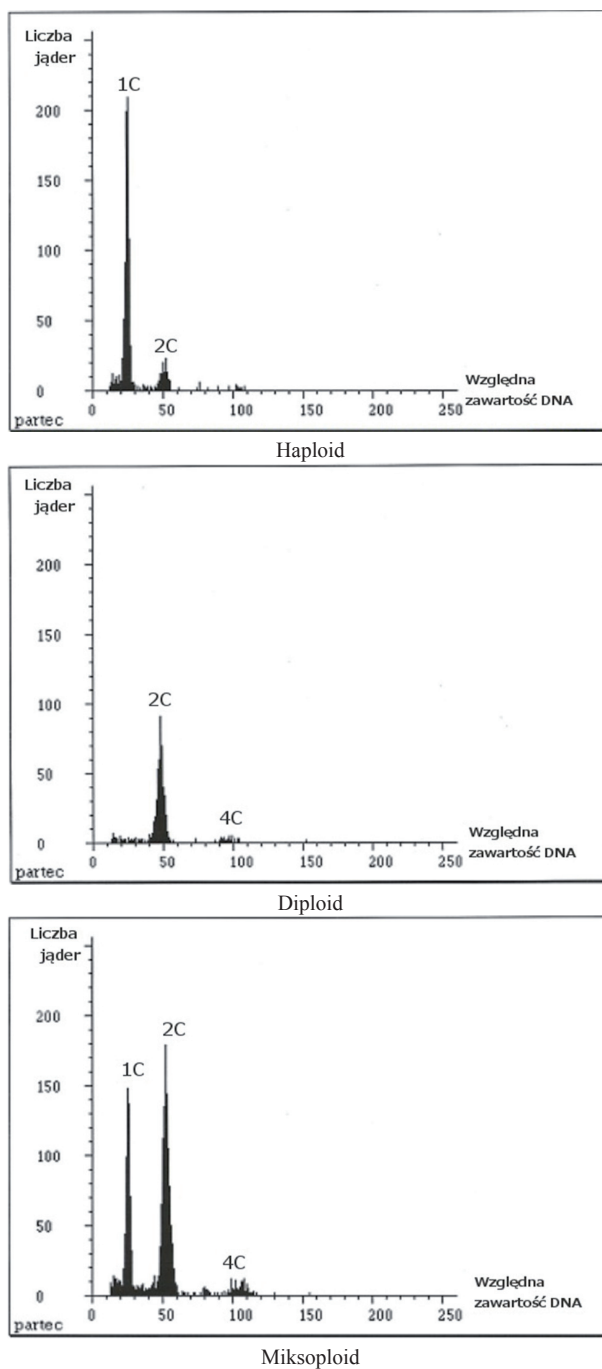
W przeprowadzonych badaniach 41% otrzymanych zarodków rozwinęło się w rośliny o prawidłowej morfologii, które następnie aklimatyzowano w warunkach szklarniowych.

Tabela. Efektywność androgenyzy, ploidalność i konwersja w rośliny

Table. Effectiveness of androgenesis, ploidy level and conversion into plants

Genotyp/traktowanie Genotype/treatment	Suma zarodków Sum of embryos	Efektywność androgenyzy Effectiveness of androgenesis [%]	Haploidy Haploids	Diploidy Diploids	Miksoploidy Mixoploids	Konwersja w rośliny Conversion into plants [%]
AT4	28 b	5,6	4	1	0	17,9
AT4 2,4-D	42 a	8,4	7	2	2	26,2
AT6	1 f	0,2	0	1	0	100
AT6 2,4-D	3 f	0,6	0	2	0	67
AC5	0 f	0	–	–	–	–
AC5 2,4-D	16 ce	3,2	3	2	2	43,8
AC7	6 f	1,2	2	0	0	33,3
AC7 2,4-D	17 cde	3,4	5	2	0	41,2
AP15	8 df	1,6	1	3	0	50
AP15 2,4-D	7 f	1,4	2	2	0	57,1
AP32	2 f	0,4	1	0	0	50
AP32 2,4-D	4 f	0,8	2	1	0	75
AP40	7 f	1,4	2	2	2	85,7
AP40 2,4-D	8 def	1,6	1	2	0	37,5
FA	20 bc	4	4	6	0	50
FA 2,4-D	27 b	5,4	8	4	0	44,4
FCH	4 f	0,8	1	0	0	25
FCH 2,4-D	7 f	1,4	3	1	1	71,4

Różne litery oznaczają istotne zróżnicowanie oszacowane za pomocą testu Duncana – different letters indicate significant differences assessed by Duncan test.



Rys. Zawartość jądrowego DNA w zregenerowanych roślinach

Fig. The content of nuclear DNA in regenerated plants

Ploidalność regenerantów oceniono cytometrycznie (rys.). Dla 9 analizowanych genotypów uzyskano 46 roślin haploidalnych (54,8%), 31 diploidalnych (36,9%) oraz 7 mikso-ploidalnych (8,3%). Jak wskazują dane literaturowe, ploidalność androgenicznych regenerantów zależy przede wszystkim od genotypu roślin donorowych [Mityko i Fari 1997, Gyulai i in. 2000, Gémesné i in. 2001]. Autorzy wielu prac badawczych szczególną uwagę zwracają na obecność spontanicznych diploidów wśród otrzymanych roślin, ponieważ stanowią one wyrównany pod względem genetycznym, stabilny materiał hodowlany [Gyulai i in. 2000, Olszewska i in. 2015]. W przeprowadzonym doświadczeniu androdiploidalne regeneranty uzyskano dla wszystkich badanych genotypów.

WNIOSKI

1. Oprysk roślin donorowych kwasem 2,4-D w stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ wpłynął istotnie statystycznie na wzrost efektywności androgenozy dla linii AT4, AC5 i AC7, a dla linii AC5 okazał się czynnikiem indukującym ten proces.

2. W przypadku linii AT6, AP32, FA i FCH obserwowano korzystną tendencję dotyczącą wzrostu liczby uzyskanych zarodków, a linie AP15 i AP40 wykazały zbliżoną reakcję w obydwu wariantach doświadczenia.

3. Efektywność indukcji zarodków w kulturach pylników wahała się od 0 do 8,4%, a ich konwersja w rośliny od 17,9 do 100% w zależności od genotypu i wariantu doświadczenia.

4. Analiza cytometryczna wykazała wśród regenerantów obecność 46 roślin haploidalnych (54,8%), 31 diploidalnych (36,9%) oraz 7 mikso-ploidalnych (8,3%).

LITERATURA

- Adamus A., 2005. Aktualny stan badań nad wykorzystaniem podwojonych haploidów w hodowli warzyw. W: B. Michalik, E. Żurawicz (red.). Zmienność genetyczna i jej wykorzystanie w hodowli roślin ogrodniczych. Wydawnictwo Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniążka w Skierniewicach, Skierniewice, 7–15.
- Ari E., Yildirim T., Multu N., Buyukalaca S., Gokmen U., Akman E., 2016. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). Turk. J. Biol. 40, 944–954.
- Chambonnet D., 1988. Production of haploid pepper plants. Bulletin Interne de la Station d'Amelioration des Plantes Maraicheres, d'Avignon-Montfavet.
- Cheng Y., Ma R., Jiao Y., Qiao N., Li T., 2013. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction of pepper (*Capsicum annuum* L.). Afr. J. Bot. 88, 306–309.
- Dumas de Vaulx R., Chambonnet D., Pochard E., 1981. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.) amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à $+35^{\circ}\text{C}$. Agronomie 1, 859–864.
- Dunwell J.M., 2010. Haploids in flowering plants origins and exploitation. Plant Biotech. J. 8, 377–424.

- Ercan N., Sensoy F.A., Sensoy A.S., 2006. Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Sci. Hortic.* 110, 16–20.
- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E., 1983. Rapid flow cytometry analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220, 1049–1051.
- Gémesné J., Vági P., Vorosvary B., Kristof Z., 2001. Summarized results of *in vitro* haploid induction of vegetables as paprika, spice paprika, eggplants, cucumber, zucchini and onion. *Acta Hortic.* 725, 845–854.
- Gémesné J. A., Sági Z.S., Salamon P., Somogyi N., Zatykó L., Venczel G., 1998. Experiences and results of *in vitro* haploid methods application in pepper breeding programme. W: 10th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* & Eggplant, Avignon, 201–205.
- Gyulai G., Gemesne J. A., Sagi Z., Zatyko L., Venczel G., 2000. Doubled haploid development and PCR-analysis of F₁ hybrid derived DH-R2 paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *J. Plant Physiol.* 156, 168–174.
- Kim M., Kim J., Yoon M., Choi D.I., Lee K.M., 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77, 63–72.
- Matsubara S., Hu K., Murakami K., 1992. Embryoid and callus formation from pollen grains of eggplant and pepper by anther culture. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 61(1), 69–77.
- Matsubara S., Yamamoto M., Man-Hyun Jo., Murakami K., Man H.J., 1998. Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci. Rep. Faculty Agric. Okayama Univ.* 87, 117–122.
- Mityko J., Fari M., 1997. Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. *Acta Hortic.* 447, 281–187.
- Niklas-Nowak A., Nowaczyk P., 2009. Wpływ temperatury na efektywność androgenezy w obrębie rodzaju *Capsicum*. W: *Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych*. Wydawnictwo Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, Poznań, 275–281.
- Nowaczyk L., Nowaczyk P., Olszewska D., 2016. Treating donor plants with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid can increase the effectiveness of induced androgenesis in *Capsicum* spp. *Sci. Hortic.* 205, 1–6.
- Nowaczyk L., Nowaczyk P., Olszewska D., Niklas-Nowak A., 2015. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pretreatment of *Capsicum* spp. donor plants on the anther culture efficiency of lines selected by capsaicinoid content. *BioTechnologia* 96 (2), 179–183.
- Nowaczyk P., Kisiała A., 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J. Appl. Genet.* 47, 113–117.
- Nowaczyk P., Nowaczyk L., Olszewska D., Krupska A., 2009a. Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *C. chinense* Jacq. hybrids. *Acta Physiol. Plant.* 31, 877–879.
- Nowaczyk P., Olszewska D., Kisiała A., 2009b. Individual reaction of *Capsicum* F₂ hybrid genotypes in anther cultures. *Euphytica* 168, 225–233.
- Olszewska D., Niklas-Nowak A., Kisiała A., Dzwonkowska M., Nowaczyk P., 2015. Agromorfologiczna i molekularna ocena podwojonych linii haploidów papryki (*Capsicum annuum* L.). *ZPPNR* 580, 95–104.
- Özkum Çiner D., Tipirdamaz R., 2002. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) *Turk. J. Bot.* 26, 131–139.

- Parra-Vega V., Renau-Morata B., Sifres A., Segui-Simarro J.M., 2013. Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 112, 353–360.
- Popova T., Grozeva S., Todorova V., Stankova G., Anachkov N., Rodeva V., 2016. Effects of low temperature, genotype and culture media on *in vitro* androgenic response of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiol Plant.* 38(11), #273. DOI 10.1007/s11738-016-2294-4

INFLUENCE OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID ON THE EFFECTIVENESS OF ANTHHER CULTURES OF THE ANDROGENIC LINES OF *CAPSICUM* SPP.

Summary. The effectiveness of *Capsicum* spp. androgenesis depends on the species, genotype, growth conditions, pretreatment of donor plants and the developmental stage of the microspores. The composition of media, in particular the role of growth regulators and *in vitro* culture conditions can also significantly modify this process. The purpose of the study was to examine the influence of donor plants pre-treatment with a water solution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) on the frequency of androgenic embryos production for selected pepper genotypes. The research material were double haploid lines (DH lines) derived from intra-species hybrids of pepper (*C. annuum* L. ATZ1 \times 'Tomatcat giallo') F_1 ; lines AT4 and AT6; (*C. annuum* L. ATZ1 \times 'Corno di toro') F_1 ; lines AC5 and AC7; (*C. annuum* L. ATZ1 \times *C. annuum* L. PO) F_1 ; lines AP15, AP32, AP40; and DH lines from inter-species hybrids (*C. frutescens* \times *C. annuum* L. ATZ1) F_1 ; line FA; (*C. frutescens* \times *C. chinense*) F_1 ; line FCH. The selection criteria of breeding materials for the experiment were provided by the results of previous research, which allowed for the selection of genotypes valuable in terms of agromorphological characteristics. Anther cultures were performed according to the method developed for *C. annuum* L. by team of Dumas de Vaulx in 1981 with modifications regarding the incubation time of the anthers on CP inducing medium (14 days) and agar concentration in the media ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). For the evaluated DH lines the number and percentage of embryos obtained, their conversion into plants and ploidy of regenerants were determined. The results concerning the influence of donor plant pretreatment on the androgenesis efficiency in anther cultures were statistically analyzed using the Statistica program, analysis of variance and Duncan test were carried out at $P = 0.05$. In the experiment, a differentiated reaction of the tested genotypes to donor plants spraying with water solution of 2,4-D was observed. The effectiveness of androgenesis ranged from 0% for the AC5 genotype under controlled conditions to 8.4% for the AT4 genotype after the 2,4-D spray. Statistical analysis confirmed the significant effect of pretreatment with exogenous auxin on the androgenic response for three lines: AT4, AC5 and AC7. Particularly noteworthy was the AC5 line, which showed no androgenic reaction under the controlled conditions of the experiment. As many authors claim, the key factor limiting the frequency of embryo formation in anther cultures is the donor plant genotype. In case of genotypes resistant to the induction of androgenesis, a modification of the research method or the introduction of a new factor to stimulate microspores to morphogenesis becomes a very important element. In the experiment the application of 2,4-D spraying for

unresponsive AC5 line induced androgenesis (3.2%) and the conversion of embryos into plants (43.8%). No statistically significant differentiation for the remaining genotypes was observed, but in case of AT6, AP32, FA and FCH lines a favorable tendency of the increase in the number of obtained embryos after auxin spraying was also observed. AP15 and AP40 lines were similar in the androgenic reaction in both variants of the experiment. 41% of the obtained embryos developed into plants with normal morphology, which were then acclimated in greenhouse conditions. Ploidy level of androgenic regenerants was assessed cytometrically. For the nine analyzed genotypes, 46 haploids (54.8%), 31 diploids (36.9%) and 7 mixoploids (8.3%) were obtained.

Key words: 2,4-D, *Capsicum* spp., androgenesis, DH lines