

**УНИВЕРЗИТЕТ “СВ КИРИЛ И МЕТОДИЈ” - СКОПЈЕ
ИНСТИТУТ ЗА ЈУЖНИ ЗЕМЈОДЕЛСКИ КУЛТУРИ
СТРУМИЦА**

UDC 63(058)

ISSN 1409-987X

**ГОДИШЕН ЗБОРНИК
2001
YEARBOOK**

GODINA 1

VOLUME 1

**UNIVERSITY “ST CYRIL AND METODIJ” SKOPJE
INSTITUTE OF SOUTHERN CROPS - STRUMICA**

Годишен зборник 2001 Институт за јужни земјоделски култури - Струмица
Yearbook 2001 Institute of Southern Crops - Strumica

ГОДИШЕН ЗБОРНИК
ЈНУ ИНСТИТУТ ЗА ЈУЖНИ ЗЕМЈОДЕЛСКИ КУЛТУРИ - СТРУМИЦА
YEARBOOK
INSTITUTE OF SOUTHEREN CROPS - STRUMICA

Издавачки Совет

Д-р Саша Митрев
Д-р Васил Коцевски
Д-р Ристо Кукутанов
Д-р Илија Каров
Д-р Македонка Даутова
Д-р Добре Јакимов
Д-р Милан Ѓеорѓиевски

Editorial board

Dr. Sasa Mitrev
Dr. Vasil Kocevski
Dr. Risto Kukutanov
Dr. Ilija Karov
Dr. Makedonka Dautova
Dr. Dobre Jakimov
Dr. Milan Gjeorgjievski

Редациски одбор

Д-р Саша Митрев
Д-р Васил Коцевски
Д-р Ристо Кукутанов
Д-р Илија Каров
Д-р Македонка Даутова
Д-р Добре Јакимов
Д-р Милан Ѓеорѓиевски
М-р Душан Спасов
М-р Драгица Сапсова
М-р Љупчо Михајлов
М-р Микица Чавдарова
М-р Лилјана Колева-Гудева
М-р Ленче Ананиева

Editorial staff

Dr. Sasa Mitrev
Dr. Vasil Kocevski
Dr. Risto Kukutanov
Dr. Ilija Karov
Dr. Makedonka Dautova
Dr. Dobre Jakimov
Dr. Milan Gjeorgjievski
M. Sc. Dusan Spasov
M. Sc. Dragica Sapsova
M. Sc. Ljupco Mihajlov
M. Sc. Mikica Cavdarova
M. Sc. Liljana Koleva-Gudeva
M. Sc. Lence Ananieva

Одговорен уредник

Д-р Саша Митрев

Responsible editor

Dr. Sasa Mitrev

Главен уредник

Д-р Васил Коцевски

Editor in chif

Dr. Vasil Kocevski

Технички уредник

М-р Лилјана Колева-Гудева

Technical editor

M.Sc. Liljana Koleva-Gudeva

Компјутерска подготовка

М-р Лилјана Колева-Гудева

Computer adaptation

M.Sc. Liljana Koleva-Gudeva

Редакција и администрација

ЈНУ Институт за јужни
земјоделски култури - Струмица
Гоце Делчев б.б.
2000 Струмица, Р Македонија
тел/факс: 034 345-096

Address of the editorship

Institute of Southern Crops
Strumica
Goce Delcev b.b.
2000 Strumica, R Macedonia
phone/fax: ++ 389 34 345-096

Реализира Македонска Трибина - Скопје
(тираж 500)

МОЖНОСТИ ЗА ПРИМЕНА НА НЕКОИ НОВИ МЕТОДИ ЗА ДОБИВАЊЕ НА БЕЗВИРУСЕН ПОСАДОЧЕН МАТЕРИЈАЛ

Колева-Гудева Лилјана¹, Митрев С.,¹ Спасеноски М.²

Краток извадок

Познати се околу 600 растителни вируси, од кои најмалку 80 може да се пренесат во семето, а скоро секогаш се пренесуваат со вегетативно размножување. Поради тоа за вегетативното размножување кај некои растителни видови битно е да се започне со производство на безвирусен посадочен материјал.

Во ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, беше поставена култура на меристеми од две сорти на пиперка и тоа Куртовска капија и Златен медал. И двете испитувани сорти успешно се регенерираа во услови *in vitro* а потоа се адаптираа во надворешни услови. Присуството или отсуството на вируси кај регенерантите беше испитано со изведување на тестови за докажување на вируси, со употреба на методот на "тестирање на растенија".

Експерименталното добивање на безвирусен посадочен материјал беше докажано и кај двете испитувани сорти на пиперка.

Клучни зборови: култура на меристем, вирусна елиминација, *in vitro*.

POSSIBILITIES OF USES OF SOME NEW METHODS FOR FREE OF VIRUSES PRODUCTION OF PLANTS

Koleva-Gudeva Liljana¹, Mitrev S.,¹ Spasenoski M.²

Abstract

About 600 plant viruses are known of which at least 80 can be transferred in the seed; viruses can also be transferred during generative propagation. Therefore for the vegetative propagation on some plant species production of free of virus started material is very important.

Meristem tissue culture of two cultivars of pepper, Kurtovska kapija and Zlatan medal, was established at the Institute of Southern Crops. Both exanimate sorts were successfully regenerated in *in vitro* conditions and after that were adapted at outside conditions. The regenerated plants were examined with using of "plants testing" method were done the tests for virus identifications.

It was experimental proved obtaining of free of viruses seedlings of the both exanimate sorts of pepper.

Key words: culture of meristems, free of viruses, *in vitro*.

¹Institute of Southern crops - Strumica, Goce Delcev b.b., 2 000 Strumica, Macedonia

²Faculty of Natural Science and Mathematics, Gazi Baba bb, PO Box 162, Skopje, Macedonia

¹Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, Гоце Делчев б.б., Македонија

²Природно-математички Факултет, Гази Баба б.б. П.фак. 162, Скопје, Македонија

1. Вовед

Познати се повеќе методи на производство на безвирусни растенија, од кој елиминацијата на вируси со култура на меристемски врвови е една од најинтересните апликации на култура на ткива во услови *in vitro*. Производството и одржувањето на растенијата со култура на ткива денес масовно се користи, заради тоа што со оваа постапка за кратко време и на мал простор од едно растение може да се добијат, условно, неограничен број на генетски идентични единки. Со овој метод сосема реална е можноста за добивање на безвирусен посадочен материјал, а со тоа се подобрува не само генетичката стабилност на регенерирените растенија, туку и морфолошките и биолошките карактеристики на испитуваните култури.

Заразните инфекции предизвикани од вируси, микоплазми, бактерии и габи многу тешко се сузбиваат. Скоро и невозможно е тие да се елиминираат со употреба на комерцијални хемиски средства. Понекогаш е можно да се спречи вирусната мултипликација со употреба на релативно скапи хемиски соединенија, меѓутоа за вирусна елиминација тешко може да се гарантира.

Со употреба на култура на меристеми не само што се врши вирусна елиминација туку се елиминираат и бактерии и габи. Најважните родови (соеви) од бактерии како: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Bacillus*, како и најважните родови (соеви) од габи: *Fusarium*, *Verticillium*, *Phytophthora* и *Rhizoctonia* се елиминираат само во култура на меристеми.

Кога се работи за добивање на безвирусен материјал особено е важна големината на меристемското ткиво кое ќе се користи какаво почетен експлантат. Меристемот е без присуство на вируси, кога е изолиран со 1-2 лисни примордии (обично тоа е врвната купа) и веднаш се пренесува во хранлива средина. Меристемот со една лисна примордија е многу мал со 0,1 mm дијаметар и 0,2-0,4 mm должина. Најголеми шанси за добивање на безвирусен материјал има кога се изолира само меристемот, а од друга страна пак, шансите на меристемот без лисни примордии за опстанок во култура се доста мали. Според тоа колку е поголем меристемот, со повеќе лисни примордии, толку шансите за добивање на безвирусен материјал се намалуваат. Во принцип, сите врвни меристеми се погодни како почетен материјал а шансите за опстанок во култура ќе зависат до видот на апикалната пупка, неговата поставеност, од составот на хранливата средина, фотопериодизмот, температурата.....и.т.н.

Според вообичаената постапка за добивање на безвирусен материјал, вирусна идентификација (отсуство на познатите вируси) т.е. потврда дека материјалот е навистина елиминиран од присуство на вируси, неминовно е да се изврши повеќепати во текот на целата постапка. Најчесто за таа цел се спроведуваат методите:

- **Тесрирање на растенијата:** Растителен сок од едно од растенијата добиено со култура на меристеми, се инокулира врз листот од друго растение, - тест растение за одредување на присуството на вируси. Ако вирусот е присутен во растителниот сок, по извесно време ќе се развијат карактеристичните симптоми на површината на листот.

- **Електронска микроскопија:** Многу е мала употребата на овој метод со оглед на тоа што значително мал е бројот на тие лаборатории што може да ја извршат оваа идентификација.

- **Серологија:** Една од најчесто користените и екстремно сензитивна серолошка метода е ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Со тестирање на растенија или со некоја од серолошките методи најчесто се докажува добивањето на безвирусен материјал.

Откако е извршена првата успешна елиминација на вирус (Morel & Martin 1952), голем број на растителни видови се прочистија од нивните вирусни заболувања со примена на култура на врвни меристеми.

Денес вегетативното размножување во услови *in vitro* наоѓа голема примена во хортикултурата, градинарството, овоштарството, лозарството и цвеќарството со што се овозможува интензивирање на производство на посадочен материјал и добивање на здрави растенија (М. Спасеноски, 1993).

Оваа постапка многу е значајна, како за научно-истражувачки цели така и за директно комерцијално производство.

2. Матријал и методи на работа

Основна цел на истражувањето беше да се постави култура од повеќе меристемски и немеристемски експлантати од пиперка, да се запознаат својствата на ткивата во услови *in vitro* и да се согледат можностите за добивање на здрав безвирусен материјал.

Во нашите истражувања како почетен материјал за работа беа користени меристемски експлантате со големина 0,5 мм, соодветни за добивање на безвирусен материјал, и тоа од две сорти на пиперка Куртовска капија и Златен медал. Почетните експлантатите се изолира од семиња на пиперка, кои се изртени во асептички услови. Семето се стерилизираше 15 секунди во 70% алкохол, 15 минути во 5% натриум хипохлорид, 10 минути во 1% Изосан - G, а потоа се засева на 1/2 MS (Murashige & Skoog 1962) минерален раствор, (Слика 2).

Експлантатите се култивираа на MS минерален раствор (Слика 3) со 3% сахароза, 0,7% агар, 100 mg/L инозитол, 200 mg/L казеин хидролизат, од витамините се користат вит. В₁ (тиамин) 0,1 mg/L, В₆ (пиридоксин) 1,0 mg/L и никотинска каиселина 0,5 mg/L. Од фитохормоните се користеа:

-IAA (индол-3-оцетна киселина), NAA (1-нафталеноцетна киселина), GA₃ (гиберелинска киселина), BAP (N₆-бензиламинопурин), KIN (6-фурфурил аминопурин) и ZEA (зеатин).

Горенаведените фитохормони ги користевме во MS медиумот во различни комбинации и концентрации за добивање на органогенеза и регенерација на изданоци во цело растение.

После секое извршено пасажирање културите ги чуваме во стерилни услови: на температура од 25 ± 2°C, фотопериодизам од 16/8 часа светло/темно, и интензитет на осветлување од 2000 - 3000 Lux. (Слика 4).

Идентификацијата на вируси се вршеше повеќепати во текот на испитувањето. Ние ја користевме методата тестирање на растенија која се состои од следната постапка: растителниот сок, добиен со филтрирање од мацерирани регенеранти, го инокулиравме врз листот од друго тест растение. Доколку се јават симптоми на листот од тест растението станува

збор за присуство на вируси. Тестовите ги изведувавме и на изданоците во култура и на регенерантите кога се пренесуваа во надворешни услови. Меѓутоа постојат и други методи како што се електронска микроскопија и серологија. Електронска микроскопија е се уште во мала употреба, бидејќи е мал бројот на лаборатории во кои е можна идентификација на вирусите. Една од најчесто користените серолошки методи е ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Целата постапка (изолација на меристеми, нивно култивирање на медиум и пасажирање, како и тестовите за висусна идентификација) се изведуваше во стерилни услови, во ламинарна комора.

3. Резултати и дискусија

Вирусите ги причинуваат најголемите загуби во растителното производство, одразени и на квалитетот и на квантитетот на производството. Затоа создавање на безвирусен семенски и посадочен материјал е гаранција за успешно производство.

Експериментално поставивме култури на меристеми од пиперка, и преку регенерација и органогенеза во услови *in vitro*, добивме безвирусен материјал од пиперка. Беше испитувано и влијанието на различни комбинации и концентрации на ауксини и цитокинини на MS медиум врз органогенезата и регенерацијата на пиперка. За ефектот на фитохормоните врз развојот на изданоците од пиперка во култура веќе имаме соодветни податоци, кои се реферирани од Колева-Гудева Лилјана и М. Спасеноски (1994, 1995, 2001).

Во текот на постапката се контролираше присуството или отсуството на познатите вируси, со вообичаените вирус тестови, за да на крај можеме да тврдиме дали материјалот е навистина прочистен или не. По инокулацијата на растителниот сок врз листот на тест растенијата, не беа забележани симптоми на присуство на вируси.

Од текот на истражувањето, се покажа дека регенерација на пиперка од меристемските експлантати е сосема реална и за двете испитувани сорти. Од изолираните апикални пупки, меристемски ткива, се формираа изданоци во култура на MS медиумот (Слика 5) а со што добивме и докажавме директна регенерација на пиперка (Слика 6 и 7).

За разлика од меристемските, немеристемските експлантати имаат значително помала способност за органогенеза (Gunai, L. & Rao; Garcia, R; A Ficher; M. Fari, M., Czako) која во тој случај оди претежно во правец на калусогенеза. (Слика 1). Индиректната регенерација т.е. добивање на изданок во култура преку регенеративен калус, и тоа и за двете испитувани сорти, не беше забележана.

Според Спасеноски М. (1993), за да се елиминира присуство на одделни патогени организми кои ги заразуваат семето и растенијата треба да се изврши претходна стерилизација на семенскиот и растителниот материјал. Воедно со изолирање на меристеми или врвни пупки се врши обезвирусување на почетните експлантати. Тоа значи дека регенерираните растенија во услови *in vitro* се здрави и можат да служат како здрав посадочен материјал што е од посебно стопанско значење.

Добивањето на безвирусен посадочен материјал со примена на овој метод сосема е оправдано (Шема 1). Во прашање е само одговорот на времето

кога таа постапка ќе се комерцијализира, а во најблиска иднина овој недостаток итно ќе се наметне како неопходност

4. Заклучок

Основната и единствена цел на експерименталното добивање на безвирусен материјал го докажавме кај пиперката. Безвирусен материјал значи елиминација на оние вируси кои биле идентификувани во стартните растенија и оние чие присуство би можело да се очекува. Вирусите се пренесуваат и со семе, а меристемите (со 1-3 лисни примордии) не содржат или ги содржат во незначителен број. Со употреба на култура на меристеми не само што се врши вирусна елиминација туку се елиминираат и бактерии и габи. Меѓутоа со пропација на меристеми во услови *in vitro* и добивање на безвирусен материјал не значи дека се добива и вирусно резистентен материјал. Стартниот материјал е вирусно прочистен, што е голема предност за разлика од употреба на посадочен и семенски материјал кој е контаминиран на било кој начин.

Оваа е доста значаен чекор, во користењето и употребата на современата научна практика во подобрувањето и по квалитет и по квантитет на земјоделското производство.

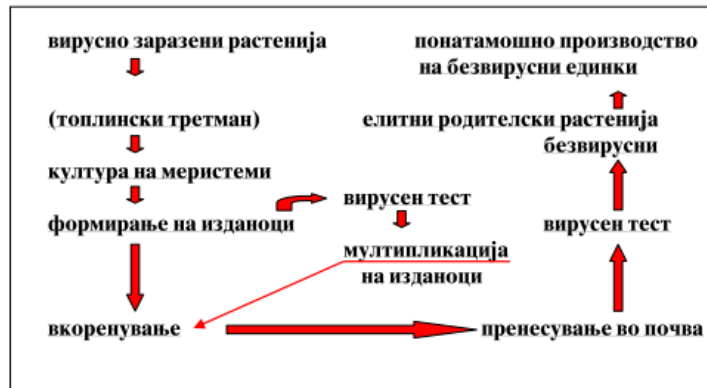
Литература:

- Agrawal S., (1989): Plant regeneration in tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L. c.v. Mathania), Plant cell, tissue and organ culture, 16 (1) p-p: 47-55.
- Fari, M., Czako, M. (1981): Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured *in vitro*, Sc.Horticulturae, 5:205-213.
- Ficher, M. (1990): Establishment of *Pepper nigrum* *in vitro*, Acta Horticulturae, 275: 285 - 291.
- Garcia, R. A.(1990): Tissue and cell culture of pepper (*Capsicum annuum* L. c.v. Pico and Piquilio), APHF/SECH, Jun 1990, p. 249 - 254.
- Gunai, L. & Rao, P.S. (1978): *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*), Plant Science Letters, 11: 365 - 372.
- Karakakis, G. (1999): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), PhD of Kararakis Georgis Aristotel Univ. Hellas, submitted od Univ of Nottingham UK.
- Колева Лилјана, Спасеноски М., (1995): Одледување на врвни пупки од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорта Куртовска капија во култура *in vitro*, Годишен зборник за заштита на растенија, Вол 6: 237 - 242.
- Liljana Koleva-Gudeva, M. Spasenoski (2001): The effect of some cytokinines on pepper organogenesis (*Capsicum annuum* L. cv. Kurtovska kapija and Zlaten medal) cultured *in vitro*. Acta Horticulturae in press.
- Phillips G.S., (1985). Organogenesis in pepper tissue culture, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 4. p-p 261-269.
- R.L.M. Pieric (1998): *In vitro* culture of higher plants, Dep. of Horticultura Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- S.S. Bhojwani (1990): Plant Tissue Culture, Dep. of Botany, Univ. of Delhi, India
- Спасеноски, М. (1993): Вегетативно размножување кај некои растителни видови во услови *in vitro* и можност за добивање на здрав растителен материјал, Год. Збор.за заштита на растенијата 1993, 5: 145 - 148.
- Спасеноски М., Лилјана Колева (1994): Регенерација на пиперката (*Capsicum annuum* L.) од апикални пупки во услови "*in vitro*", Симпозиум со

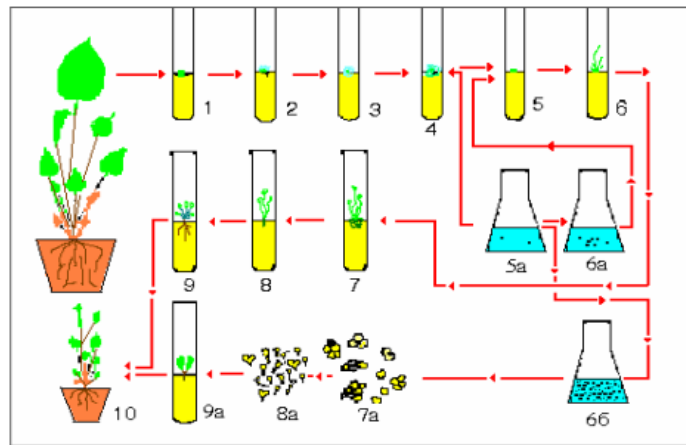
меѓународно учество "Нови технологии во градинарството и цвеќарството,
 Охрид, април 1994, Зборник на трудови, Книга 1: 203 - 209.

Шема 1. Шематски приказ добивање на безвирусен материјал

ПРОИЗВОДСТВО НА БЕЗВИРУСЕН МАТЕРИЈАЛ



Слика 1. Шематски приказ за култура на растителни ткива (меристеми) и органи, како еден од можните патешта за регенерација на цело растение во услови ин витро: (R.L.M. Pierik 1998)



Слика 2. Семе од пиперка 'ртено во асептички услови на 1/2MS минерален раствор,



Слика 3. Изолација на меристем од пиперка како почетни експлантати.



Слика 4. Чување на културите во контролирани услови, во клима комора.



Слика 5. Изданоци од пиперка на MS медиум, по 40 дена.



Слика 6. Култура на изданоци од пиперка Куртовска капија и Златен медал на MS медиум, по 40 дена



Слика 7. Адаптирани растенија добиени во услови ин витро и контролни растенија.

