

РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА  
МИНИСТЕРСТВО ЗА НАУКА

**ЗАВРШЕН ИЗВЕШТАЈ  
ЗА РАЗВОЕН ПРОЕКТ**

НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:

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

ГЛАВЕНИСТРАЖУВАЧ: Д-р Саша Митрев

АДРЕСА НА НОСИТЕЛОТ ПРОЕКТОТ:

**ЈНУ „Институт за јужни земјоделски култури” - Стумица**

ул: „Гоце Делчев”, б.б, 2 000 Струмица, Р. Македонија

телефон: 0902 345 - 096

телефакс: 0902 345 - 096 / 107

ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ: од 1.06.2000 до 30.07.2001 год.

ШИФРА НА ПРОЕКТОТ: 09-2906/1 од 7.07. 2000 год.(бр. на одлука)

БРОЈ НА ДОГОВОР: 09 - 806/4 од 17.07.2000 год.

БРОЈ НА РЕШЕНИЕ: 05 - 3012/1 од 18.07.2000 год.

ИЗВЕШТАЈНА ГОДИНА: 2001

ДАТУМ НА ПОДНЕСУВАЊЕ НА ИЗВЕШТАЈОТ: \_\_\_\_\_ 2001 год.

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ  
*Д-р Саша Митрев*

НОСИТЕЛ НА ПРОЕКТОТ  
*Д-р Саша Митрев*

Одделение за заштита на растенијата од  
болести, штетници и плевели

ИНСТИТУЦИЈА:  
ЈНУ „Институт за Јужни земјоделски култури” - Струмица

Директор  
*Д-р Саша Митрев*

---

## **1. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ - ПРИЈАВАТА:**

Употребувајќи ги новите методи на култура на растителни ткива и клетки во услови *in vitro*, сосема реална 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. Истовремено тоа представува и можност за понатамошна селекција на здрав растителен материјал.

Основната цел на предложеното истражување беше да се постави култура од повеќе меристемски и немеристемски експлантати од пиперка (како и други видови од стратешко и комерцијално значење, кои во најскоро време ќе се реализираат), да се запознаат својствата на ткивата во услови *in vitro* и да се согледаат можностите за добивање на здрав безвирусен материјал.

Оваа цел е реализирана со поставување на експлантати од пиперка, и тоа на две сорти: **Куртовса Капија** и **Златен медал**, на повеќе различни хормонални комбинации на MS медиум.

Резултатите од истражувањето овозможуваат посмислен приод во користењето и примената на методот култура на растителни ткива во земјоделието а воедно и негова поголема практична примена.

Тоа допринесува за поголема примена и афирмација на новите современи методи во градинарството и пошироко во земјоделската практика, што на нашето производство многу му недостасува.

## **2. ОЧЕКУВАНИ РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ- ПРИЈАВАТА:**

Од текот на истражувањето, се покажа дека регенерација на пиперка од меристемските експлантати е сосема реална и за двете испитувани сорти на пиперка, како што и очекувавме. Од изолираните апикални пупки (меристематски ткива), се формираа изданоци во култура на MS медиумот, а со што добивме и докажавме директна регенерација на пиперка и тоа и за двете сорти Златен медал и Куртовска капија.

Добивањето на безвирусен посадочен материјал со примена на овој метод сосема е оправдано. 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.

За разлика од меристемските, немеристемските експлантати имаат значително помала способност за органогенеза, која во тој случај оди претежно во правец на калусогенеза.

Индириктната регенерација т.е. добивање на изданок во културата преку регенеративен калус, и тоа и за двете испитувани сорти, не е забележана.

### **3. ОСВРТ НА ОПРАВДАНОСТА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО ПОГЛЕДНА ПОСТИГНУВАЊЕТО НА ДЕФИНИРАНИТЕ ЦЕЛИ И ОЧЕКУВАНИТЕ РЕЗУЛТАТИ СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРИЈАВАТА:**

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. 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*.

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

Култура на меристеми особено се аплицира во хортикултурата, а во земјоделството несомнено битно е производството и користењето на безвирусен материјал за со стратешко, комерцијално и економско значење.

Растителните трансформации и генетското клонирање станаа важно средство во подобрувањето на растенијата преку генетскиот инженеринг. Моќта и потенцијалот на оваа нова технологија, представува развојот на регенеративните постапки за добивање на репродуктивно растително ткиво, што е всушност и првиот чекор во целата метода.

За пиперката оваа би можело да биде и метод на избор, поради потешкотиите на кои се наидува во елонгацијата на *in vitro* органогените изданци. Од повеќе различни експлантати на пиперка добиена е органогенеза (Phillips and Husbstenberger 1985; Agrawal et al. 1989; Ochoa-Alejo and Ireta-Moreno 1990; Arroyo and Revilla 1991; Valeria-Montero and Ochoa-Alejo 1992; Ebidia and Hu 1993; Hari and Andrasfalvy 1994). Нивните искуства ги користевме за реализација на нашите поставени цели, а тоа ни дава предност да бидеме во тек и да ги седиме светските трендови на Широката примена на методот *in vitro*.

### **4. ДЕТАЛЕН ИЗВЕШТАЈ ЗА ПРОЕКТОТ:**

Пиперката (*Capsicum annum L.*) е едно од најквалитетните и едно од најценетите градинарски растенија што се одгледува во нашата држава. Во Република Македонија вкупните површини под пиперка се движат околу 9.000 ha, од кои повеќето од половината се наоѓат во Струмичкиот реон. Просечениот принос изнесува приближно 12.000 kg/ha.

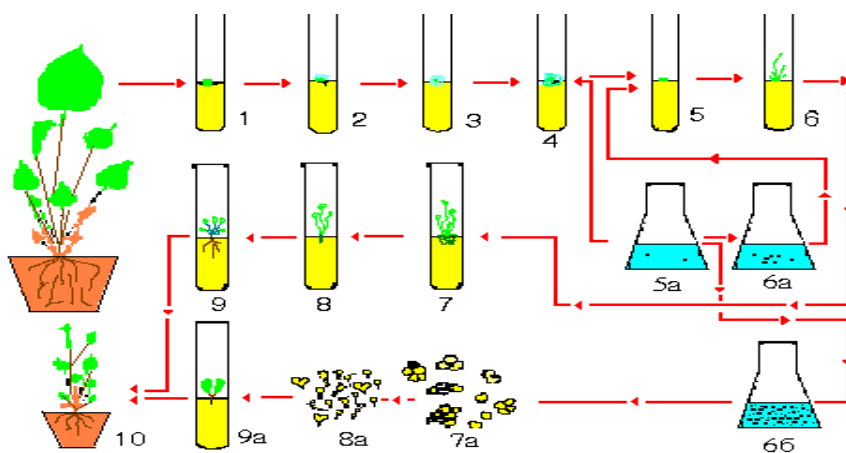
Како експериментален материјал беа користени експлантати до два вида на пиперка и тоа Куртовска капија, црвена слатка и Златен медал, црвена слатка сорта. И двете сорти се доста застапени во Р. Македонија и тоа Куртовската капија претежно се одгледува во Струмичкиот регион во југоисточна Македонија додека Златниот медал се среќава и во североисточниот дел на државата.

Во фазата на култивирање на иницијалните експлантати, работата со апикалните пупки ја доведовме до формирање на изданок и директна

регенерација, со што целите зацртани во предлог програмата сосема ги реализиравме.

Индуктивната регенерација т.е. работата на немеристемските експлантати се одвива преетежно во правец на калусогенеза. Во тој поглед предзедовме нови мерки за добивање на регенеративен калус, како што е поставување на кутури на калус и на течен и на цврст MS медиум. Затоа и во предлог програмата нагласивме за евентуална индиректна регенерација која бара поголем ангажман и почести субкултивирања и на течен и на цврст медиум, за што бележиме забележителен напредок во тој поглед.

Од поставените кутури на калус можевме да приметиме способност за формирање на ембрионидни структури, на пооделни медиуми со поголема концентрација на IAA и BAP (шема1.).



**(шема1.)** шематски приказ за индукција на калус, култура на калус, на растителни ткива (меристеми) и органи, соматска и ембрио регенерација и формирање на цело растение во услови *in vitro*: (R.L.M. Pierik 1998)

- 1 - 9 култура, ткива(меристеми), и органи;
- 5 - 9 култура на калус;
- 5<sup>A</sup>, 6<sup>A</sup>, 6<sup>B</sup> суспензија на клетки;
- 4 - 9<sup>A</sup> ембрио регенерација.

Почетните експлантати беа земени од изртени семиња од пиперка, сорта Куртовска капија и сорта Златен медал, во стерилни услови на  $1/2$  MS (Murashige и Skoog, 1962) минерален раствор. Стерилизираното семе беше поставено на  $1/2$  MS (Murashige и Skoog, 1962) минерален раствор на ртење. Кога младите понци достигаа големина од 3-4 cm (после 21-23 дена), од нив беа изолирани почетните (иницијални) експлантати и истите беа поставени на MS хормонален медиум.

Поставените кутури во епрувети или во ерленмаерови тиквици, беа одржувани во контролирани услови (клима комора) и тоа на :

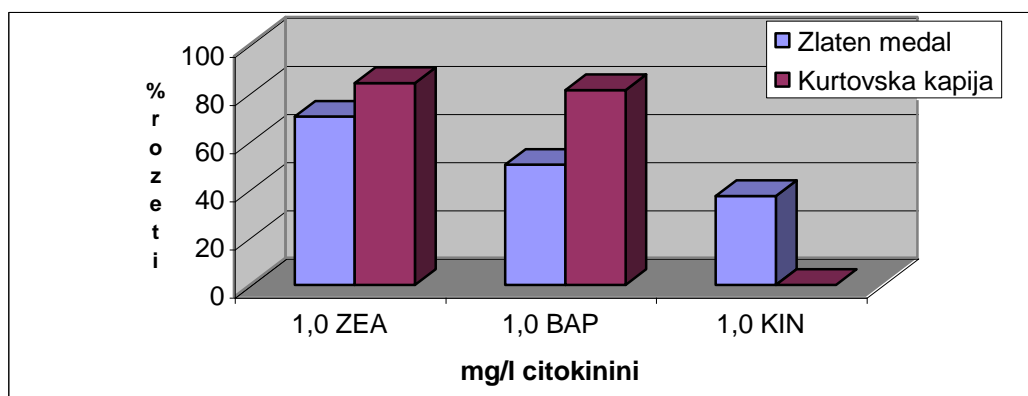
- температура од  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;
- релативна влажност од 80%;

- фотопериодизам од 16/8 светло/темно и
- осветлување од 2000-3000 лукси.

За култивирање на почетните експлантати беа користени претежно цитокинини со или без присуство на ауксини во медиумот, се разбира во различни концентрации и комбинации, во зависност од видот на експлантатот, неговата големина и степенот на органогенезата на експлантатот. Во текот на целото испитување беа употребувани следните хормони:

- индол-3-оцетна киселина (IAA);
- индол-3-бутерна киселина (IBA);
- нафтил-1- оцетна киселина (NAA);
- N<sub>6</sub>-бензиламинопурин (BAP);
- 6-фурфуриламинопурин или кинетин(KIN);
- 6-/ 4-окси-3-метил-транс-2-бутениламино-пурин или зеатин (ZEA).

Од сите испитувани фитохормони за реализација на наШтата цел најпогоден се покажа ZEA (График 1), кое искуство за реализација на следните замислени активности е огромно.



**График 1.** Ефектот на цитокинините (во концентрација од 1,0 mg/l во MS медиумот) врз регенерацијата пиперка.

Лабораториските испитувања и поставувањето на култури *in vitro* кои се извршени досега претставуваат новина во Македонија. Можноста за органогенеза и регенерација на пиперка во услови *in vitro* во наШтата земја досега не е испитувано, особено можноста за елиминација на вируси и добивање на здрав посадочен материјал.

На основа на лабораториска работа заснована на меѓународни стандарди во областа на културата на растителни клетки и ткива, добиена е регенерација на две сорти на пиперка Куртовска капија и Златен медал, кое има големо значење за правилно поставување на оваа методологија и покасно нејзина практична примената во пошироки рамки.

Безвирусен материјал значи елиминација на оние вируси кои биле идентификувани во стартните растенија и оние чие присуство би можело да се очекува. Растенијата инфицирани со габи, бактерии и вируси најчесто се третираат со фунгициди, бактериоциди и други хемиски средства за нивно сузбивање, но не постои ниту еден досега комерцијално произведен агенс за нивна тотлана елиминација.

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.

Во текот на постапката вршеме контрола за присуството или отсуството на познатите вируси, со вообичаени вирус тестови, за да на крај можеме да тврдиме дали материјалот е навистина прочистен или не. Според методологиите кои ни беа на располагање, вршеме тестирање на растенијата и тоа неколку пати во текот на годината. Растителен сок од едно од растенијата добиено со култура на меристеми, го инокулираме врз листот од друго растение. Ако вирусот е присутен во растителниот сок, по неколку дена се развиваат карактеристичните симптоми на површината на листот. Оваа постапка се повторува неколку пати се додека инокулираните листови не покажуваат симптоми на зараза.

Иако методот има извесни недостатоци, како времето потребно за појават на инфекцијата, карактерот на вирусот и сл, дава задоволителни резултати за вирусната елиминација. Посовремените и многу попрецизни тестови на вирусно докажување како серологија, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), електронска микроскопија и други не ни беа достапни, но тоа не значи дека од следните тестови за докажување комплетно ќе отсуствуваат.

За продукција на безвирусен материјал постојат строги правила и технички услови кои мора да се почитуваат. Добиениот безвирусен материјал може да се реинфицира па како превентивни мерки за заштита се препорачуваат: растенијата треба да се одгледуваат во стакленик или места каде природно не постои шанса за повторна инфекција или вектори (лисни вошки); да се води постојана грижа за заштита од заболувања (главно инсекти и нематоди) а изворите на инфекција постојано да се отклонуваат; да се води строга хигиена; да се континуирано контролира, и визуелно и лабораториски, состојбата со болестите и штетниците и.т.н.

Основната и единствена цел на предложената проект/програма експериментално добивање на безвирусен материјал го докажавме кај пиперката. Според програмата најскоро се планира истото да се докаже и на неколку перспективни видови на цвеќе и на некои други градинарски култури. Кај нас оваа представува еден од првите, но доста значаен чекор, во користењето и употребата на современата научна практика во подобрувањето и по квалитет и по квантитет на земјоделското производство.

Во реализацијата на овој проект учествуваа и фирмата Д.П.Т.У. Европромет Д.О.О. експорт-импорт од Струмица, која е потенцијален корисник на услугите на Институтот, како резултат на реализирањето на проектот. Споменатата фирма учествуваа во подигнувањето на опитен стакленик со површина од околу 400 м<sup>2</sup> со 3 (три) работни хали.

Ова инвестиција беше неопходна за технолошкото заокружување на овој проект во една целина, при што се комплетира целиот процес на производство на регенеративен растителен материјал од лабораторија, преку адаптација во стакленик, за на крај на отворено да излезе како комплетно прочистен и адаптирани за надворешни услови растителен материјал

Инвестицијата за подигнување на опитниот стакленик изнесуваше приближно 1.300.000,00 денари, а Институтот се обврза тие сретства да ги исплати со свои услуги кон горе наведената фирма.

Од средствата доделени од Министерството за образование и наука, во висина од 800.000,00 денари, за реализација на овој проект покрај за доопремување на изградениот стакленик најголем дел од средствата беа потрошени за доопремување на лабораториите за биотехнологија и за заштита на растенијата од болести и штетници. Сретствата беа искористени на следниот начин:

**РЕКАПИТУЛАЦИЈА НА ПОТРОШЕНИТЕ СРЕДСТВА ЗА  
РЕАЛИЗАЦИЈА НА ПРОЕКТОТ (од јуни 2000 до јули 2001 год.)**

	<b>2000 год.</b>	
<b>Фирма</b>	<b>Цел</b>	<b>Износ</b>
Феро-продукт	Метални цевки	4,200.00
Фонко	Климатизер за комора	50,000.00
Огражден	Ризла стакленик	16,300.00
Работници	Наемни работници	50,000.00
Конти Хидропласт	Пластични црева за систем	74,220.00
Полипроект	УПС систем за електрика	62,000.00
Радодизајн	Лаборат. работни маси	100,000.00
	<b>2001 год.</b>	
Експерти	Научни работници	60,000.00
Институт	Режиски трошкови	100,000.00
Пронекс 97	Елект. авт. проветрување	150,000.00
Џајми Комерц	Поцинкуван лим за растенија	30,500.00
Би-Ел	Лабар. авани и сталци	12,500.00
Би-Ел	Лабор чаши	480.00
Фото Трајче	Изработка на фотографии	1,340.00
Електромеханика	Хидрофор за вода	24,700.00
Панел	Инсталирање на водовод	10,650.00
Духефа	Лабар. хемикалии	59,500.00
Бопак	Машина за вакумирање	52,230.00
<b>Состојба</b>		<b>804,420.00</b>

**Извори на средства**

**Сопствено учество:**

**400.000,00 Учество на други институции:**

**1.300.000,00**

Учество на меѓународни институции  
0,00

Учество на Министерството за образование и наука:  
800.000,00

---

**ВКУПНО:** **2.500.000,00**

**ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ**  
(одговорно лице на проектот)

Име и презиме: **Д-р СаШа Митрев**  
 Наставно/научно звање: **научен соработник**  
 Институција: **ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури**  
**- Струмица**  
 (тел, факс, мобил) **☎ 0902 345-096 /102 ☎ 0902 345-096 /124 📠 070**  
**210 397**  
 e-mail **mitrevsasa@hotmail.com**

**СОРАБОТНИЦИ ИСТРАЖУВАЧИ НА ПРОЕКТОТ:**

Име и презиме: **М-р Лилјана Колева-Гудева**  
 Наставно/научно звање: **асистент- истражувач**  
 Институција: **ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури**  
**- Струмица**  
 (тел, факс, ) **☎ 0902 345-096 /107 ☎ 0902 345-096 /124**  
 e-mail **liljanak@hotmail.com**

**СОРАБОТНИЦИ ИСТРАЖУВАЧИ НА ПРОЕКТОТ:**

Име и презиме: **М-р Спасов ДуШан**  
 Наставно/научно звање: **асистент- истражувач**  
 Институција: **ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури**  
**- Струмица**  
 (тел, факс, мобил) **☎ 0902 345-096 /102 ☎ 0902 345-096 /124 📠 070**  
**514 196**



Август, 2001  
култури  
Струмица

ЈНУ Институт за јужни земјоделски  
Струмица

---

Д-р СаШа Митрев  
Директор

Во врска со вашето писмо бр. 07-2155/1 од 29.07.2001 год за доставување на завршен извештај на развоен проект ви го доставуваме следниот

### **ЗАВРШЕН ИЗВЕШТАЈ ЗА РАЗВОЕН ПРОЕКТ**

**НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:**

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

**ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ:** од 1.06.2000 до 30.07.2001 год.  
**ШИФРА НА ПРОЕКТОТ:** 09-2906/1 од 7.07. 2000 год.(бр. на одлука)  
**БРОЈ НА ДОГОВОР:** 09 - 806/4 од 17.07.2000 год.  
**БРОЈ НА РЕШЕНИЕ:** 05 - 3012/1 од 18.07.2000 год.

Во содржината на завршниот извештај е доставен и финансиски извештај со спецификација на потрошените средства со кој партиципирале Министерството за наука и образование на Р. Македонија.

Благодариме за соработката.

август 2001  
Струмица

ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури  
- Струмица

---

Д-р СаШа Митрев

Директор

Во врска со вашето писмо бр. 07-2154/1 од 19.07.2001 год за испитување на интересот и можностите за вклучување во меѓународната соработка Ве известуваме дека

**ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури - Струмица** како научна установа е заинтересирана за вклучување во проектните програми на **ЦЕНТРАЛНОЕВРОПСКАТА ИНИЦИЈАТИВА** како и за билатерална соработка со **РЕПУБЛИКА ТУРЦИЈА**.

Интерес и можност за соработка од страна на **ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури - Струмица** постои, за што Ве молиме да бидеме вклучени во вашите проектни програми и да бидеме информирани за истите.

Благодариме за соработката.

август 2001  
Струмица

**ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури**  
**- Струмица**

---

Д-р СаШа Митрев  
Директор