

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП  
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

---

UDC 63(058)

ISSN 1409-987X



**ГОДИШЕН ЗБОРНИК**  
**2007**  
**YEARBOOK**



ГОДИНА 7

VOLUME VII

---

GOCE DELCEV UNIVERSITY – STIP  
FACULTY OF AGRICULTURE



**ГОДИШЕН ЗБОРНИК**  
**ЈНУ ИНСТИТУТ ЗА ЈУЖНИ ЗЕМЈОДЕЛСКИ КУЛТУРИ–СТРУМИЦА**  
**YEARBOOK**  
**INSTITUTE OF SOUTHERN CROPS–STRUMICA**

**Издавачки совет**

Проф. д-р Саша Митрев  
Проф. д-р Борис Крстев  
Проф. д-р Илија Каров  
Доц. д-р Лилјана Колева-Гудева  
Дипл. прав. Ристо Костуранов, спц.

**Editorial board**

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D  
Prof. Boris Krstev, Ph.D  
Prof. Ilija Karvor, Ph.D  
Ass. Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D  
Lawyer Risto Kosturanov, spc.

**Редакциски одбор**

Проф. д-р Саша Митрев  
Проф. д-р Борис Крстев  
Проф. д-р Илија Каров  
Доц. д-р Лилјана Колева-Гудева  
Доц. д-р Живко Гацовски  
Проф. д-р Верица Илиевска  
Проф. д-р Љупчо Михајлов  
Д-р Душан Спасов

**Editorial staff**

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D  
Prof. Boris Krstev, Ph.D  
Prof. Ilija Karvor, Ph.D  
Ass. Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D  
Ass. Prof. Zivko Gacovski, Ph. D  
Prof. Verica Ilievska, Ph. D  
Prof. Ljupco Mihajlov, Ph. D  
Dušan Spasov, Ph.D

**Одговорен уредник**

Проф. д-р Саша Митрев

**Editor in chief**

Prof. Saša Mitrev, Ph.D

**Главен уредник**

Доц. д-р Лилјана Колева-Гудева

**Managing editor**

Ass. Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D

**Јазично уредување**

Даница Гавриловска-Атанасовска  
(македонски јазик)  
М-р Марија Кукубајска  
(англиски јазик)

**Language editor**

Danica Gavrilovska-Atanasovska  
(Macedonian)  
Marija Kukubajska, M.Sci.  
(English)

**Техничко уредување**

Славе Димитров

**Technical editor**

Slave Dimitrov

**Редакција и администрација**

Универзитет „Гоце Делчев“–Штип  
Земјоделски факултет  
Бул. „Крсте Мисирков“ бб п.фах 201,  
2000 Штип, Р. Македонија

**Address of the editorial office**

Goce Delcev University – Štip  
Faculty of Agriculture  
Krste Misirkov b.b., PO box 201,  
2000 Stip, R. of Macedonia



## ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖУВАЊЕ КАЈ НЕКОИ РАСТИТЕЛНИ ВИДОВИ ВО *IN VITRO* УСЛОВИ

Лилјана Колева-Гудева\*

### Краток извадок

Денес, во почетокот на XXI век, студиите за вегетативното размножување на растенијата во *in vitro* услови се наоѓаат во фокусот на истражувањата од областа на растителната физиологија и биохемија. Применета на методот на изолирани растителни клетки и ткива во *in vitro* услови има посебно значење во истражувањата за вегетативното размножување (микропропагација) на растенијата. Методот на *in vitro* култури на растителни клетки и ткива се користи за вегетативно размножување (микропропагација) на растенијата. Всушност, со клонираното размножување на растенијата во *in vitro* услови се овозможува скратување на процесот на селекција, генетска стабилност на постоечкиот генофонд, како и производство на здрав безвирусен растителен материјал за садење.

Во овој труд е даден преглед на експерименталните резултати од способноста за микропропагација во *in vitro* услови на повеќе растителни видови, од различни изолирани почетни експлантати на различни хормонални подлоги, изведувани во лабораторијата по биотехнологија на Институтот за земјоделство - Струмица при Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип.

**Клучни зборови:** *микропропагација, Capsicum annuum L., Lycopersicon esculentum Mill., Cucumis sativus L., Rosa spp., Dianthus caryophyllus, Myrtillocactus geometrizans, Echinopsis spachiana*

## MICROPROPAGATION OF SOME PLANT SPECIES UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Liljana Koleva-Gudeva\*

\* Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, Земјоделски факултет, ул. „Крсте Мисирков“ 66, п.фах. 201, 2000 Штип, Македонија; [liljana.gudeva@ugd.edu.mk](mailto:liljana.gudeva@ugd.edu.mk)

\* Goce Delcev University – Stip, Faculty of Agriculture, Krste Misirkov b.b., PO box 201, 2000 Stip, R of Macedonia, [liljana.gudeva@ugd.edu.mk](mailto:liljana.gudeva@ugd.edu.mk)



### Abstract

At the beginning of the XXI century, the perspectives of the plant biochemistry and physiology are focused on examining the capability of plant cells and tissue culture for vegetative propagation. The method of *in vitro* cultivation of plant cell and tissue cultures is used for vegetative propagation (micropropagation) of plants. The vegetative propagation of the plants under *in vitro* conditions enables to abbreviate the process of selection, enhance the genetic stability of plants and improve the production of healthy plants without virus infection.

In this paper the results from the experimental work from the capacity of *in vitro* micropropagation of some plant species are presented. The results were obtained from different initial explants and on different hormonal medias, and were done at the laboratory of biotechnology at the Institute of Agriculture, Goce Delcev University – Stip.

**Key words:** micropropagation, *Capsicum annuum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Cucumis sativus* L., *Rosa* spp., *Dianthus caryophyllus*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Echinopsis spachiana*.

### 1. Вовед

Производството и одржувањето на растенијата со култура на ткива денес се користи масовно, 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 растенија. Со овој метод, сосема е реална можноста за добивање на безвирусен растителен саден материјал, а со тоа се подобрува не само генетичката стабилност на регенерираните растенија, туку и морфолошките и биолошките карактеристики на испитуваните култури (Колева-Гудева и сораб., 2001).

Морфогенезата кај растенијата е сложена појава и е регулирана од бројни фактори, како и од меѓусебните односи на растителните органи, ткива и клетки.

Корелацијата меѓу клетките, ткивата и органите на едно растение игра многу значајна улога во текот на растот и развојот во *in vivo* и во *in vitro* услови. Проучувањето на овој сложен систем може да се поедностави со изолирање на клетки, ткива и органи и нивно одгледување во *in vitro* услови. Во такви услови може да се следи влијанието на одделни фактори врз органогенезата и диференцијацијата на растителното ткиво, а од кои најчесто е испитувано влијанието на растителните хормони како важен фактор во морфогенезата кај растенијата.

Денес вегетативното размножување во *in vitro* услови наоѓа најголема примена во хортикултурата, градинарството, овоштарството, лозарството и шумарството.



## 2. Материјал и методи на работа

Основна цел на овие истражувања беше да се постави култура од повеќе меристемски и немеристемски експлантати, да се запознаат својствата на ткивата *in vitro* и да се согледа можноста за нивна микропропагација.

### 2.1. Изолирање на почетни експлантати

Како почетен материјал за работа од меристемските експлантати се користени апикални пупки и меристем со големина најмногу до 3 mm за апикалните пупки, а за изолација на меристем до 0,5 mm. Од немеристемските експлантати најчесто беа користени цели котиледони или делови од котиледонот, хипокотили, нодии, интернодии, а кај пиперката се користени антери за продукција на хаплоидни регенеранти. Сите почетни експлантати изолирани од изртено семе или пак од *in vivo* растителен материјал треба претходно да подложат на стерилизација.

### 2.2. Стерилизација на растителен материјал

Семето од пиперка и домот е стерилизирано така што најпрво се промива во млаз од вода (од водовод), па со дестилирана вода, при што се остава неколку часови да имбибира. Потоа се става да отстои 15 секунди во 70%  $C_2H_5OH$ , потоа 10 минути во 5%  $Ca(ClO)_2$ , па 10 минути во 1% Изосан-G и на крајот се преплакнува неколку пати во стерилна вода и се засева на  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige и Skoog, 1962) минерален раствор. Растителниот материјал од кој се изолираат почетните експлантати (на пример, цветни пупки од пиперка) од кои се изолираат антери, се стерилизира на следниот начин: промивање во водоводна вода, потоа во дестилирана вода следи 15-20 секунди во 70%  $C_2H_5OH$  збогатен со неколку капки од Tween 20, потоа 10-15 минути во 5%  $Ca(ClO)_2$  збогатен со неколку капки од Tween 80 и на крај експлантатите се плакнат неколку пати во стерилна вода. Вака стерилизираните почетни експлантати се култивираат на MS подлога во која се додаваат различни концентрации и комбинации на растителни хормони.

### 2.3. Состав на подлогата за одгледување на културите

Скоро сите растителни видови беа култивирани на MS минерален раствор со 3% сахароза, 0,7% агар, 100 mg·l<sup>-1</sup> инозитол, 200 mg·l<sup>-1</sup> казеин хидролизат, 0,1 mg·l<sup>-1</sup> В1, 1,0 mg·l<sup>-1</sup> В6 и 0,5 mg·l<sup>-1</sup> никотинска киселина. Од фитохормоните најчесто се употребувани: IAA (индолил-3-оцетна киселина), IBA (индолил-3-бутерна киселина), NAA (нафтаген-1-оцетна киселина), BAP (N6-бензиламино пурин), BA (N6-бензиладенин), KIN кинетин (6-фурфурил-аминопурин), ZEA зеатин (N6-4-хидрокси-3-





метил-бут-2-енил аминоксантин), 2iP (N6-2-изопентил аденин) и 2,4 D (2,4-дихлорофенокси-оцетна киселина).

#### **2.4. Услови за одгледување на културите**

Семето поставено на ртење на базална подлога, сите почетни експлантати како и секое следно култивирање на нова хормонална подлога се одгледува во клима-комора во контролирани услови со температура од  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ , фотопериодизам од 16/8 светло/темно, релативна влажност од 50% и интензитет на светлина од  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### **3. Резултати и дискусија**

Струмичкиот регион е главно ориентиран кон земјоделство, па затоа и интересот на Институтот за земјоделство во Струмица е главно ориентиран за *in vitro* од градинарските видови на култури. Во конвенционалното производство водечко место имаат домотот, пиперката и краставицата, па затоа акцент во истражувањата за регенеративната способност во *in vitro* услови е дадено токму на овие главни култури во регионот, па и во светски размери.

#### **3.1. Микропропагација на пиперка**

Во истражувањата за регенеративниот потенцијал на пиперката во култура *in vitro* се користени апикални пупки од меристемските ткива, а од немеристемските сегменти од котиледони и хипокотили. Изведена е успешна регенерација на пиперка од апикални пупки, добиени се регенеранти кои се адаптирани во нестерилни услови (Слика 1). Од немеристемските експлантати органогенезата претежно се одвива во правец на формирање на калус, а многу ретко резултира со формирање на лисни розети, кои пак од друга страна не формираат изданоци (Табела 1).

Исто така, кај пиперката е испитуван и андрогенетскиот потенцијал и способноста за формирање на ембриониди во култура на антери. Истражувањата се изведувани на повеќе различни медиуми со различни хормонални комбинации и концентрации а за стимулирање на андрогенетската способност се користени неколку различни температурни инкубациски третмани. Од сите испитувани медиуми и инкубациски третмани продукција на хаплоидни ембриониди е добиено само по методот на Dumas de Valux, et al., 1981 (Табела 1). Испитувањата се изведени на 21 различен генотип на пиперка, а е добиен и семенски материјал од 4 генотипови, кој е предмет на понатамошни цитогенетски и други истражувања на молекуларно ниво. Од регенерантите на овие четири генотипови се создадени повеќе селекциони линии, кои се вклучени во процесот на селекција на пиперката.



### 3.2. Микропропагација на домот

Како експериментален материјал за микропропагација на домот беа користени апикални пупки, сегменти од котиледони и хипокотили. Испитуван е ефектот на различни концентрации на цитокинините ВАР и КИН во комбинација со различни концентрации на ауксините IAA и IBA во подлогата. Комбинацијата ВАР + IBA се покажа како најефикасна во формирањето на лисните розети, а апикалните пупки во споредба со другите почетни експлантати покажаа најголем потенцијал за создавање на регенеранти и нивна мултипликација во *in vitro* услови (Табела 1, Слика 2).

### 3.3. Микропропагација на краставица

Апикални пупки, сегменти од котиледони и хипокотили се користени како почетни експлантати за микропропагација на краставицата во *in vitro* услови. Како и кај другите останати видови, така и кај краставицата сосема очекувано меристемските експланати имаат поголем потенцијал за создавање на изданоци во култура (Слика 3). Испитувани се повеќе хормонални комбинации во MS медиумот, а најповолните кај кои е постигнат најголем ефект се дадени во Табела 1.

### 3.4. Микропропагација на некои украсни видови

Во *in vitro* услови кај *Rosa spp* – мини саксиски ружи, *Dianthus caryophyllus* - каранфил, *Myrtillocactus geometrizans* - сукулентно растение кактус и *Echinopsis spachiana* - сукулентно растение кактус на MS медиум во присуство на различни концентрации на цитокинини и ауксини, беа добиени изданоци од различни видови на експлантати. Всушност, сите истражувани видови покажаа висок процент на мултипликација и се погодни за микропропагација односно за вегетативно размножување во *in vitro* услови (Табела 2).

## 4. Заклучок

Од 1902 година датираат почетоците на методот на *in vitro* култури кога Haberlant изолирал и култивирал растителни клетки. Иако безуспешен, првиот обид на Haberlant отвори сосема ново поле на истражувања, кое кон крајот на првата половина од XX век доживеа рапидна експанзија.

Примената на *in vitro* техниките за масовна микропропагација на растенијата имаат голем успех кај украсни, овошни, шумски, градинарски и лековити видови. Во *in vitro* услови е постигната целосна регенерација на повеќе од 300 растителни видови, а методот има посебно значење во истражувањата на повеќе области, како: растителната физиологија, биохемија, биотехнологија, молекуларна биологија и др. Денес без примена на *in vitro* методите не можат да се замислат и применат многу



софистицирани и сложени постапки на молекуларно ниво, а кои се предизвик на XXI век.

### Литература

- Arnold et al. (1992): A study of the effect of growth regulators and time of plantlet harvest on the *in vitro* multiplication rate of hardy and hibrid tea Roses. J Hort Science, 67: 727-735.
- Ahmand N. and Anis M. (2005): *In vitro* Mass Propagation of *Cucumis sativus* L. from Nodal Segments. Tur. J.Bot, 29: 237-240.
- Ault J.R.R and Blacknon W.J. (1987): *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthoides* (Cactaceae), Hort Science, 22: 126-127.
- Bhenki R.M. and Lesly S.M. (1976): *In vitro* plant regeneration form leaf explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato). Canad. J. Bot., Vol. 54: 2409-2414.
- Dumas de Valux R., Chambonnet D and Pochard e. (1981): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35°C treatments. Agronomie, 1(10): 859-864.
- Fray L. (1992): Somatic embriogenesis in carnation. Hort Science, 27: 63-65.
- Gambley R.L. and Dodd W. (1992): Effecte of hypocotil length on morphogenesis of explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) *in vitro*. Australian Journal of Plant Physiology, 19(2): 165-169.
- Gunai L. and Rao P. (1987): *In vitro* plant regeneration from hypocotil and cotiledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Science Letters, 11: 365-372
- Koleva-Gudeva L., Спасеноски M. and Trajkova F (2007): Somatic embriogenesis in pepper anther culture. The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae, 111: 1145-119.
- Колева-Гудева Л., Трајкова Ф. и Митрева Т. (2006): Микропропагација на домаг (*Licopersicon esculentum* Mill.). Годишен зборник на Земјоделски институт – Скопје, Вол. 24/25: 75-81.
- Колева-Гудева Л. и Спасеноски М. (2006): Органогенеза на котиледони од пиперка (*Capsicum annuum* L.) во *in vitro* услови. Годишен зборник на Земјоделски институт – Скопје, Вол. 24/25: 75-81.
- Колева-Гудева Л. (2003): Влијание на инкубацискиот третман врз андрогенезата на пиперката (*Capsicum annuum* L.). Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, Вол. 3: 87-94.
- Колева-Гудева Л. и Спасеноски М. (2002): Микропропагација на некои украсни растенија. Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, Вол. 2: 49-58.
- Колева-Гудева Л., Митрев С., Спасеноски М. (2001): Можност за примена на некои нови методи за добивање на безвирусен посадочен материјал. Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури - Струмица, Вол 1: 37-46.





- Колева Л. и Спасеноски М. (1995): *In vitro* органогенеза на хипокотили и котиледони од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорта *куртовска капија*. Годишен зборник, Биологија, Вол. 48: 21-32.
- Phillips G.S. (1985): Organogenesis in pepper tissue culture. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 4: 261-269.
- Punja Z.K., Abbas N., Sarmiento G.G., Tang F.A. (1990): Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *Hardwickii*, *C. malo* and *C. metulifus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 21(2): 93-102.
- Спасеноски М. и Колева-Гудева Л. (2002): Можности за вегетативно размножување на каранфил *Dianthus* spp. во *in vitro* услови. I симпозиум за хортикултура, Охрид, Македонија. Зборник на трудови: 92-97.

Таб. 1 Преглед на некои градинарски култури вегетативно размножени во *in vitro* услови  
Tab. 1 Revision of some vegetable species micropropagated under *in vitro* conditions.

Вид Species	Експлантант Explant	Подлога+хормон mg-l-1 Medium+Growth Regulators mg-l-1	Резултати Results	Референции References
<i>Capsicum annuum</i> L.	апикални пупки/ apical buds	MS+5.0BAP+0.5NAA MS+10.0BAP+0.5IAA MS+1.0ZEA	калус/callus изданоци/ shoots	Колева-Гудева и сораб. (2001) Phillips (1985)
	антери/ anthers	CP+0,01KIN+0,01 2,4D R1+0,01KIN	ембриониди/ embrios	Dumas deValux (1981) Колева-Гудева (2007, 2003)
	хипокотили 1/3 котиледони hypocotils 1/3 cotyledons	MS+10.0BAP+0.5NAA MS+30.0BAP+1.0IAA MS+5.0ZEA MS+2.5 2iP	калус/callus	Gunai & Rao (1978) Колева и Спасеноски (1995) Колева-Гудева и сораб. (2006)
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	апикални пупки/ apical buds	MS+4.5BAP+0.3IBA MS+6.0BAP+0.4IBAA MS+4.5KIN+0.3IAA	изданоци/ shoots	Bhenki & Lesly (1976) Колева-Гудева и сораб. (2006)
	хипокотили 1/3 котиледони hypocotils 1/3 cotyledons	MS+1.5BAP+0.1IBA MS+3.0KIN+0.1IAA MS+6.0BAP+0.4IBA	калус/callus	
<i>Cucumis sativus</i> L.	апикални пупки/ apical buds	MS+11.0KIN+3.5IBA	изданоци/ shoots	Ahmad & Anis (2005) Gambly & Dodd (1992) Punja et al. (1989)
	хипокотили hypocotils	MS+2.0KIN	калус/callus	
	1/3 котиледони 1/3 cotyledons	MS+6.5BA+10.0 2,4D	калус/callus	



Таб.2 Преглед на некои украсни култури вегетативно размножени во *in vitro* услови  
Tab. 2 Revision of some ornamental species micropropagated under *in vitro* conditions

Вид Species	Експлантант Explant	Подлога+хормон mg·l <sup>-1</sup> Medium+Growth Regulators mg·l <sup>-1</sup>	Резултати Results	Референции References
<i>Rosa</i> spp.	нодии/nodals. антери/ anthers	MS+10.0BAP	изданоци/ shoots	Колева-Гудева и Спасеноски (2002) Arnold et al. (1992))
		MS+10.0BAP+0.1IBA	корени/roots	
<i>Dianthus cariphillus</i>	апикални пупки/ apical buds	MS+1.0IBA MS+0.5KIN+1.0IAA	изданоци/ shoots	Спасеноски и Колева-Гудева (2002) Frey (1992)
	нодии/nodals	MS+1.0BAP+0.1IAA	калус/callus	
<i>Myrtillocactus geometrizzans</i>	апикални пупки/ apical buds	MS+10.0KIN+1.0NAA MS+10.0BAP+0.1 2,4D	калус/callus изданоци/ shoots	Ault & Black- ony (1987)
<i>Echinopsis spachiana</i>	апикални пупки/ apical buds	MS+10.0KIN+1.0NAA MS+10.0BAP+0.1 2,4D	калус/callus изданоци/ shoots	Колева-Гудева и Спасеноски (2002)



Слика 1. Култура на изданоци од пиперка *Capsicum annuum* L.  
Figure 1. Shoot culture of pepper *Capsicum annuum* L.

Слика 2. Култура на изданоци од домаат *Lycopersicon esculentum* Mill.  
Figure 2. Shoot culture of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill.

Слика 3. Култура на изданоци од краставица *Cucumis sativus* L.  
Figure 3. Shoot culture of cucumber *Cucumis sativus* L.