



**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ЗА РАСТИТЕЛНО ПРОИЗВОДСТВО**

**ВЛИЈАНИЕТО НА НЕКОИ РЕГУЛАТОРИ НА РАСТ И САХАРОЗАТА ВРЗ
МИКРОТУБЕРИЗАЦИЈАТА НА КОМПИРОТ *SOLANUM TUBEROSUM* L.**

- МАГИСТЕРСКИ ТРУД –

Ирена Стојкова

Штип, ноември 2015 година

Комисија за оцена и одбрана

Претседател: Проф. д-р Рубин Гулабоски
Редовен професор, Земјоделски факултет

Ментор: Проф. д-р Лилјана Колева Гудева
Редовен професор, Земјоделски факултет

Член: Доц. д-р Фиданка Трајкова
Доцент, Земјоделски факултет

Датум на одбрана: _____

Датум на промоција: _____

Пред сè сакам да упатам огромна и посебна благодарност до сите оние личности кои ми беа поддршка додека се работеше овој магистерски труд и што несебично вложија труд за да може да се оствари овој труд и да дојде до негово завршување.

Најпрво морам да ја споменам најзаслужната личност проф. д-р Лилјана Колева-Гудева, која со неизмерната поддршка, огромна помош, несебичност, безбројните совети помогна во извршувањето на ова испитување. Голема благодарност до најдобриот ментор кој е најзаслужен за овој труд.

Огромна благодарност упатувам и кон доц. д-р Фиданка Трајкова, бидејќи без нејзина поддршка и огромна помош немаше да се оствари еден од најважните делови – статистичката обработка на резултатите потребна за пишување на магистерскиот труд.

Исто така, упатувам искрена благодарност и кон проф. д-р Рубин Гулабоски кој со своите стручни сугестии и предлози даде огромен придонес во изработката на овој магистерски труд.

Од срце им се заблагодарувам на членовите од моето семејство, од кое ја имах најголемата поддршка и големо трпение додека траеше изработката на овој магистерски труд.

Без сите гореспоменати личности сето ова немаше ниту да започне и затоа може само да им кажам од сè срце на сите заедно:

ЕДНО ГОЛЕМО БЛАГОДАРАМ !!

Рецензирани и објавени стручни, научни и апликативни трудови

- Колева-Гудева, Л., Трајкова, Ф. и Стојкова, И. (2014): Микротуберизација на компир (*Solanum tuberosum* L.), Годишен зборник на трудови на Земјоделски факултет, УГД, Вол. 12. Год. 2014:19-37.

- Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F. and Stojkova, I. (2016): The effect of plant growth regulators and sucrose on microtuberisation of potato (*Solanum tuberosum* L.), Romanian Agricultural Research, number 33/2016 (in press).

Користени кратенки

BAР	бензиламинопурин
KIN	кинетин
ABA	абсцизинска киселина
NAA	1-нафтил оцетна киселина
GA ₃	гиберелинска киселина
2,4 D	2,4 – дихлорофеноксоцетна киселина
IAA	индол-3-оцетна киселина
IBA	индол-3-бутерна киселина
BA	N ₆ -бензиламинопурин
ZEA	зеатин
MS	Murashige и Skoog
ER	Eriksson
B5	Gamborg
SH	Schenk и Hildebrandt
B ₁	тиамин
B ₆	пиридоксин хидрохлорид
He	Heller
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ANOVA	Analysis of Variance
FAO	Food and Agriculture Organization
ICBN	International Code of Botanical Nomenclature
CO	кумарин (coumarin)
PTZ	паклобутразол (paclobutrazol)
TDZ	тидиазурон (thidiazuron)
ET	етефон (ethephon)
CCC	хлор холин хлорид (chlore cholin chloride)
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	сахароза
(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	скроб
C ₂ H ₅ OH	етанол
HgCl ₂	жива хлорид

ВЛИЈАНИЕТО НА НЕКОИ РЕГУЛАТОРИ НА РАСТ И САХАРОЗАТА ВРЗ МИКРОТУБЕРИЗАЦИЈАТА НА КОМПИРОТ *SOLANUM TUBEROSUM L.*

- Краток извадок

Компирот е многу значајна култура во исхраната на човекот и се одгледува во 180 земји низ светот. Претставува четвртата култура по производство во светот, после пченицата, оризот и пченката.

Главна цел на ова истражување е добивање на тубери во *in vitro* услови, односно испитување на најпогодните услови за микротуберизација што беше истражувано преку поставување на култура на почетни експлантанти од 'ртулци од повеќе генотипови семенски и меркантилен компири: *agria*, *marabel*, *dido*, *ambition*, *agriko*, *agria SR*, *agria BE* во *in vitro* услови. Во текот на истражувањето беше следен развојот на експлантантите и степенот на органогенеза на различните експлантанти на различни хормонални подлоги.

Потенцијалот за регенерација во *in vitro* услови на почетните експлантанти е одредуван со пресметување на бројот на *de novo* изданоци, како и пресметување на процентот на вкоренување и процентот на 'ртливост.

За продукција на 'ртулци од кртолите компир во *in vivo* услови, тие беа третирани со 2 ppm, 12 ppm и 22 ppm гиберелинска киселина (GA₃) и бројот на дадени 'ртулци беше споредуван со истиот кај нетретирани кртоли (контрола) кај сите испитувани генотипови. Најдобри резултати беа добиени кај третманот на кртолите со 22 ppm GA₃.

Во *in vitro* услови беа поставени два типа на експлантанти 'ртулци и нодии, на MS медиум во присуство на неколку различни комбинации и концентрации на цитокинини и ауксини. Со истражувањето е утврдено дека MS + 4 mg/L KIN и MS + 2 mg/L BAP има најдобар ефект за културата на 'ртулците.

Добиените изданоци беа користени како експлантанти кои ги поставуваме на подлога со одредена концентрација на сахароза, со цел да се индуцира процесот на микротуберизација и добивање на микротубери. Микротуберизацијата беше стимулирана со зголемување на процентот на шеќер во MS медиумот од 30 g/L сахароза на 40, 60 и 90 g/L сахароза. MS медиумот со 90 g/L сахароза за генотипот *agria SR* даде најдобри резултати со 17 формирани микротубери.

Микротуберите добиени во *in vitro* култура беа посадени во стерилна мешавина од тресет: перлит (1:1) за да формираат мини-тубери, а подоцна и тубери за семенски компир.

Клучни зборови: микропропагација, *in vitro*, 'ртулци, нодии, изданоци, вкоренување, калус, микротубери

THE EFFECT OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS AND SUCROSE ON MICROTUBERISATION OF POTATO *SOLANUM TUBEROSUM* L.

- Abstract

The potato is a very important crop in human daily diet and it is cultivated in 180 countries worldwide. It is the fourth important crop in the world after wheat, rice and maize.

The main objective of this study is obtaining tubers in *in vitro* conditions, respectively examination of the most favorable conditions for microtuberisation which was researched by establishment of initial explants from sprouts of different seed and commercial genotypes: *agria*, *marabel*, *dido*, *ambition*, *agriko*, *agria SR*, *agria BE* in *in vitro* conditions. The development of explants and the extent of organogenesis of different explants on different hormonal media were followed during the research.

The potential for regeneration in *in vitro* conditions of the initial explants is determined by calculating the number of *de novo* shoots, as well as calculating the percentage of rooting and percentage of germination.

For the production of sprouts from potato tubers in *in vivo* conditions, they were treated with 2 ppm, 12 ppm and 22 ppm gibberellic acid (GA₃) and the number of produced sprouts was compared with the one from untreated tubers (control) for all tested genotypes. Best results were with obtained from the treatment of tubers with 22 ppm GA₃.

In *in vitro* conditions were set up two types of explants sprouts and nodules, on MS medium in presence of several different combinations and concentrations of cytokinins and auxins. In the course of this research it is identified that MS + 4mg / L KIN and MS + 2mg / L BAP has the best effect for sprouts culture.

The obtained plantlets were used as explants which were placed in medium with certain sucrose concentration, with an aim to induce the microtuberisation process and microtuber production. The microtuberisation was stimulated by increasing the percentage of sugar in MS medium from 30 g/L sucrose to 40, 60 and 90 g/L sucrose. MS medium supplemented with 90 g/L sucrose for the genotype *agria SR* gave the best results with formation of 17 microtubers.

The microtubers produced in *in vitro* culture were planted in a sterile mixture of peat : perlite (1:1) of production of the mini-tubers and later formation of the seed potato tubers.

Key words: *micropropagation, in vitro, nodes, sprouts, nodes, shoots, rooting, callus, microtubers*

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	10
1.1 Потекло на компирот	10
1.2 Производство на компир во светот и во Република Македонија	10
1.3 Таксономија и ботанички опис на компирот	13
1.4 <i>In vivo</i> и <i>in vitro</i> размножување на компирот	14
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА	16
2.1 Типови на култури	16
2.2 Подготовка, состав и избор на хранливата подлога (медиум)	18
2.3 Предности на пропагацијата во <i>in vitro</i> услови	21
2.4 Недостатоци на пропагацијата во <i>in vitro</i> услови	22
2.5 Техники за размножување на растенијата во <i>in vitro</i> услови	23
2.6 Методи во микропропагацијата	23
2.6.1 Пропагација на растенијата од аксиларните пупки или изданоци	23
2.7 Формирање на органи за складирање	25
2.7.1 Производство на луковици и грутчести луковици	26
2.7.2 Минијатурни тубери (мини-тубери)	26
2.8 Фази на микроразмножување	28
2.8.1 Култура на изданоци	28
2.8.2 Култура на изданоци од цветни меристеми	28
2.8.3 Култура на изданоци од семиња	28
2.8.4 Култура на меристеми	28
2.8.5 Култура на поединечни пупки	29
2.8.6 Директна регенерација на изданоците од експлантантите	29
2.8.7 Директна ембриогенеза	29
2.8.8 Индиректна регенерација на изданокот од морфогенски калус	29
2.8.9 Индиректна ембриогенеза од ембриогенетски калус или култури во суспензија	29
2.8.10 Формирање на орган за складирање	30
2.8.11 Фаза 0: Селекција на мајчинските растенија и нивна подготовка	30
2.8.12 Фаза I: Создавање на стерилна култура	31
2.8.13 Фаза II: Производство на материјал за микропропагирање	31
2.8.14 Фаза III: Подготовка за растење на регенерантите во надворешни услови	31
2.8.15 Фаза IV: Пренесување во надворешни услови	32
2.9 Прилагодување на културата и аклиматизација во <i>ex vitro</i> услови	34
2.10 Која растителна култура може комерцијално да се микропропагира	36
2.11 Применетата технологија на култура на ткиво во <i>in vitro</i> услови	37
2.12 Економија за микроразмножување	37

2.13 Планирање на комерцијална микропропагација	38
2.13.1 Општи забелешки	38
2.13.2 Важни параметри за комерцијално микроклонирање	38
2.14 Организација на пазарот	40
2.15 Досегашни истражувања за примена кај <i>in vitro</i> техниките на компирот	41
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	46
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКА РАБОТА	47
4.1 Основни карактеристики на испитуваните генотипови на компир	47
4.2 Третирање на компир со GA ₃ во <i>in vivo</i> услови за продукција на 'ртулци	48
4.3 Стерилизација на 'ртулци	48
4.4 Изолирање на почетните експлантанти	49
4.5 Состав на подлогата за култивирање на компир во услови <i>in vitro</i>	52
4.6 Услови за одгледување на културите од компир	53
4.7 Статистичка обработка на податоци	53
5. РЕЗУЛТАТИ	54
5.1 Продукција на 'ртулци со третман на GA ₃ во <i>in vivo</i> услови	54
5.2 Култура на 'ртулци како почетни експлантанти	58
5.2.1 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 4 mg/L KIN	59
5.2.2 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 2 mg/L BAP	60
5.3 Култура на изданоци	60
5.3.1 Индукција на калуси во култура на изданоци	60
5.3.2 Индукција на корени во култура на изданоци	62
5.3.3. Калусогенеза и ризогенеза во култура на изданоци	63
5.4 Култура на нодии	64
5.5 Микротуберизација во култура на нодии	65
5.5.1 Индукција на калус во култура на нодии	66
5.5.2 Микротуберизација и калусогенеза	68
6. ДИСКУСИЈА	70
6.1 Продукција на 'ртулци со третман на GA ₃ во <i>in vivo</i> услови	70
6.2 Култура на 'ртулци како почетни експлантанти	70
6.2.1 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 4 mg/L KIN	71
6.2.2 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 2 mg/L BAP	71
6.3 Култура на изданоци	71
6.3.1 Индукција на калуси во култура на изданоци	72
6.3.2 Индукција на корени во култура на изданоци	72
6.3.3. Калусогенеза и ризогенеза во култура на изданоци	72
6.4 Култура на нодии	74
6.5 Микротуберизација во култура на нодии	74
6.5.1 Индукција на калус во култура на нодии	76
6.5.2 Микротуберизација и калусогенеза	76
6.6 Влијанието на содржината сахароза во медиумот врз микротуберизацијата на компир	76
7. ЗАКЛУЧОК	79
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	81

1. ВОВЕД

1.1. Потекло на компирот

Компирот е четвртата важна култура во светот по производство, после пченицата, оризот и пченката. Компирот се смета дека потекнува од високо планинските масиви на Андите во Јужна Америка.

Кога компирот започнал да се шири по светот, најпрво се одгледувал на огромни површини во Ирска, па оттаму го нарекувале *Irish potato*.

На Европскиот континент најпрво компирот започнува да се шири во Швајцарија, а дури подоцна во 1620 година во Германија, каде е испитано дека поседува добри квалитетни својства.

За краток временски период компирот го зазема местото на другите полјоделски култури во Европа, бидејќи успевал и во подрачја со лоши климатски услови. На нашите простори компирот започнува да се одгледува од 1735 година (Василевски, 2004).

1.2. Производство на компир во светот и во Република Македонија

Компирот е многу значајна култура во исхраната на човекот затоа е раширена насекаде во светот. Се одгледува во 180 земји низ светот.

Според статистичките податоци од FAO - Food and Agriculture Organization, производството на компир во светот за 2013 година е прикажано во Табела 1.

Табела 1. Површина и производство на компир во светот за 2013 година (FAO статистички годишник за 2013 година)

Table 1. Area and production on potato worldwide for year 2013 (FAO статистички годишник за 2013 година)

Земја/ Country	Површина во ha Area in ha		Производство во t Production in t	
	Засадена / Planted	Обрана / Harvested	Вкупно / Total	Семе / Seed
Африка/Africa	149 065	149 000	30 498 584	2 310 593
Америка/America	261 759	261 630	42 603 428	3 060 553
Азија/Asia	189 254	188 567	18 721 888	937 297
Европа/Europe	197 321	197 206	11 429 479	1 788 435
Океанија/Oceania	403 912	45 476	1 836 830	148 903

Во Европа како најголеми производители на компир се: Украина, Полска, Белорусија, Германија, Романија, Холандија, Франција итн.

Компирот во Република Македонија започнал да се одгледува пред 150-170 години и бил донесен од Србија, Босна и Грција.

Во Република Македонија денес има над 13 000 ha површини под компир и масовно се проширува секоја година. Најмногу се одгледува во котлините до 1600-2000 m надморска височина.

Просечно приносите на компир во текот на една година изнесуваат некаде околу 14 t/ha (Василевски, 2004).

Табела 2. Површина и производство на компир (Статистички годишник на Република Македонија, 2014)

Table 2. Area and production of potato (Статистички годишник на Република Македонија, 2014)

Година / Year	Површина во ha Area in ha		Производство Production		Откуп на компир Ransom of potato
	Засадена / Planted	Обрана / Harvested	Вкупно Total	kg/ha	тони / t
2009	13 531	13 527	204 717	15 134	334
2010	13 044	13 037	200 125	15 351	53
2011	13 539	13 454	192 675	14 321	153
2012	13 224	13 204	168 859	12 788	121
2013	13 477	13 474	189 590	14 071	295

Според податоците од Статистичкиот годишник на Република Македонија (2014) прикажани во Табела 2 може да се видат површини засадени со компир во Република Македонија и како се движи производството во текот на последните 5 години.

Според овие податоци, вкупната засадена и обрана површина на компир по хектар, изнесува скоро исто во секоја година.

Производството на компир изразено во тони било најдобро во 2009 година кога изнесувало 204 717 t/ha. Најдобар принос имало во 2010 година, кога 1 ha има дадено просечно 15 351 kg (Државен завод за статистика, 2014).

Според Статистичкиот годишник на Република Македонија (2014), количеството на вкупен откуп на компир во 2009 година изнесувало 334 t, во 2010 година било 53 t, во 2011 година било 153 t, во 2012 година било 121 t, во 2013 година било 295 t, што според овие податоци значи дека најдобар откуп на компир имало во 2009 година.

Според податоците од табела 3 може да се види дека еден од подобрите региони за производство на компир на територијата на Република Македонија е Полошкиот регион кој ги опфаќа Тетово и Гостивар. Овој регион во 2013 година придонел со вкупна колична од 40 847 t компир.

Потоа се издвојува и Источниот регион кој ги опфаќа Штип, Кочани, Берово и Веница, со вкупно производство на компир за 2013 година од 34 209 t. Во 2013 најмалку компир се произведувало во Вардарскиот регион – Велес, Кавадарци, Неготино, Демир Капија со вкупно производство од 11 899 t (Државен завод за статистика, 2014).

Табела 3. Производство на компир по региони во Република Македонија во 2013 (Статистички годишник на Република Македонија, 2013)

Table 3. Production of potato by regions in Republic of Macedonia in 2013 (Статистички годишник на Република Македонија, 2013)

Производство на компир по региони – 2013 година / Potato production by regions – year 2013	
Регион / Region	Вкупно, t / Total, t
Полошки / Polog	40 847
Источен / Eastern	34 209
Југоисточен / Southeastern	26 736
Пелагонски / Pelagonia	22 190
Скопски / Skopje	20 542
Југозападен / Southwestern	17 944
Североисточен / Northeastern	15 222
Вардарски / Vardar	11 899
Вкупно во Република Македонија / Total in Republic of Macedonia	189 590

Според Василевски (2004) компирот кај нас се одгледува во четири подрачја и тоа:

- **Планинско подрачје** – едно од покарактеристичните подрачја за производство на компир, што ги опфаќа обработливите површини во планинските реони. Таму почвените и климатските услови се многу поволни за раст и развој на компирот, за негово производство особено за зимска храна, но ова подрачје е поволно и за развивање на семепроизводството.

- **Рамничарско подрачје** – ова подрачје се одликува со висока производност и овде се опфатени површините во котлините во Република Македонија. Компирот од овие реони е наменет особено за исхрана во летните месеци, бидејќи стасува за пазар некаде околу крајот на јуни месец. Со тоа се продолжува неговото производство, веднаш после младиот компир.

- **Подрачје за производство на ран компир** – садењето на компирот во овие реони е многу рано, уште од крајот на февруари месец, на отворено или пак во пластеници. Овде спаѓаат добро познатите раноградинарски реони како што се: струмичкиот реон, гевгелискиот реон, дел од повардарието. Овој компир се нарекува млад компир и се наоѓа на пазарот уште од почетокот на мај месец.

- **Подрачје за производство на компир како втора култура** – самото име втора култура кажува дека овој компир се сади после прибирањето на главната култура, односно од 15 јули до 15 август и самото формирање на тубери се случува во последната декада на септември месец, кога денот е пократок, а температурите се пониски. Во ова подрачје се опфатени рамничарските реони, кои се обезбедени со систем за наводнување, односно

има услови кои му одговараат на компирот. Со вакво садење може да се обезбеди добар меркантилен и семенски компир (Василевски, 2004).

1.3. Таксономија и ботанички опис на компирот

Таксономска припадност на компирот според ICBN (International Code of Botanical Nomenclature, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) е следната:

Царство: *Plantae*

Потцарство: *Viridaeplantae*

Оддел: *Tracheophyta*

класа: *Magnoliophyta*

Ред: *Solanales*

Фам: *Solanaceae*

род: *Solanum*

вид: *Solanum tuberosum* L.

Родот *Solanum* опфаќа над 2000 видови кои потекнуваат од Јужна Америка. Мал дел од овие видови формираат ситни тубери, некои имаат горчлив и неспецифичен вкус, а некои пак од нив се користат за исхрана на луѓето, односно се со сладок вкус.

Најголемо стопанско значење има компирот од видот *Solanum tuberosum* var. *europeraeum*.

Создадени се голем број различни сорти на компир со различна вегетација и за различна намена, бидејќи некои од нив се користат за научно-истражувачка работа.

Според податоци од Василевски од 2004 година, сите сорти се разликуваат според своите особини, односно според својствата и тоа:

- **Боја на месото:** жолто, светложолто до бело;
- **Должина на вегетација:** раностасни, средностасни, доцностасни;
- **Намена на производство:** за исхрана на луѓето (млад и зрел); за индустриска преработка (помфрит, чипс, брашно и др.);
- **Форма на туберите:** овални, јајчести, долги, топчести, издолжено-јајчести;
- **Почеток на формирање на туберите:** од многу рано формирање, па сè до доцно формирање;
- **Отпорност на болести:** многу отпорни, отпорни, осетливи, многу осетливи;
- **Готварски особини:** многу тврди, тврди и брашнести.

Во поново време кај нас се одобрени и внесени во производство многу странски сорти и тоа високоприносни од Холандија, Германија и од Франција. Како едни од најпознатите сорти денес кај нас се следниве: *кондор*, *минерва*, *латона*, *лизета*, *ариа*, *карлита*, *импала*, *викторија*, *купидо* и др. Овие сорти даваат принос и до 20-40 t/ha просечно.

Табела 4. Просечна хранлива содржина на компир

(International Potato center: Agriculture research for development <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3115?fgcd=&manu=&facet=&format=Full&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=11352>)

Table 4. Average nutrient content of potato

(International Potato center: Agriculture research for development <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3115?fgcd=&manu=&facet=&format=Full&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=11352>)

Компонента (на 100 g) / Component (of 100 g)	Количина / Quantity
Вода / Water	79 g
Јаглехидрат / Carbohydrat	17 g
Влакна / Fiber	2,2 g
Белковина / Protein	2 g
Шеќер / Sugar	0,78 g
Маст / Fat	0,09 g
Калиум / Potassium	421 mg
Фосфор / Phosphorous	57 mg
Магнезиум / Magnesium	23 mg
Витамин С / Vitamin C	19,7 mg
Калциум / Calcium	12 mg
Натриум / Sodium	6 mg
Витамин А / Vitamin A	2 mg
Ниацин / Niacin	1,05 mg
Железо / Iron	0,78 mg
Пантотинска киселина / Pantotin acid	0,30 mg
Витамин В6 / Vitamin B6	0,30 mg
Цинк / Zinc	0,29 mg
Манган / Manganese	0,15 mg
Бакар / Copper	0,11 mg
Тиамин / Thiamine	0,08 mg
Рибофлавин / Riboflavine	0,03 mg
Витамин Е / Vitamin E	0,01 mg
Фолат / Folate	16 µg
Селен / Selenium	0,3 µg
Енергија / Energy	322 kJ

1.4. *In vivo* и *in vitro* размножување на компирот

Како конвенционален метод за размножување на компирот е вегетативното размножување, па затоа често туберите подлежат на инфекциони напади од патогени, како што се габи, бактерии и вируси, што резултатира со лош квалитет и намален принос.

Од неодамна технологијата на култура на растителни ткива стана доста популарна, па има видливо влијание врз производството на безвирусен семенски компир.

За *in vitro* размножување, потребно е да се развие ефикасен протокол за микротуберизација. Познато е дека успешноста на *in vitro* размножувањето е условено пред сè од самиот генотип. Компирот како култура е доста прифатлив за *in vitro* манипулации, и што се однесува до *in vitro* регенерацијата во литературата постојат докази дека истата успешно се изведува, а самиот процес на формирање на мини и микро тубери е наречен микротуберизација.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРА

Формирањето на тубери е процес кој е многу сложен, но овој процес може да биде предизвикан и во *in vitro* услови, а познат е како микротуберизација. Поради малите димензии и маса, микротуберите имаат огромна предност во однос на складирање, транспорт и производствените практики. Тие можат да бидат директно посадени во почвата или пак можат да бидат произведени како семенски компир во било кое време од годината и имаат слични морфолошки и биохемиски карактеристики на туберите во споредба со конвенционално произведениот компир. Затоа, масовното производство на компир преку микротуберизација веќе го револуционизира светот во производството на компир.

За стимулирање на микротуберизацијата многу истражувачи користеле различни регулатори на растот за *in vitro* индукција на микротубери. Голем број на опсежни физиолошки истражувања покажаа дека *in vitro* туберизацијата е контролирана од страна на неколку фактори, како што се: хормоналниот состав и концентрацијата на фитохормоните, соодносот на фотопериодот, составот и концентрацијата на хранливите материи во медиумот итн.

Доказ за силна и конзистентна аналогија помеѓу микротуберите и туберите кои се добиваат преку конвенционален начин, за нивна индукција, раст и развој, се неколкуте компоненти за брза и точна синхрона индукција и раст, кој може да се модифицира со голем број на егзогени соединенија и услови, за да се направи микротуберизацијата вреден и ценет моделен систем (Coleman, 2001).

2.1 Типови на култури

По воведувањето на почетните експлантанти во *in vitro* услови, можеме да разликуваме главно два вида на раст на експлантантот и тоа: организиран и неорганизиран (Jelaska, 1994).

Организиран раст се јавува кога се култивираат организирани делови на растението (или органите) како што се: меристем, изданок или корен, лисни израсоци, млади цветни пупки и ситни плодови воведени во културата, каде што го продолжуваат својот развој, при што ја зачувуваат својата почетна структура, или пак, кога овие истите структури (органи) се создаваат одново, *de novo*, од култура на претходно неорганизирани ткива. Процесот на создавање органи *de novo*, го нарекуваме органогенеза или морфогенеза (развојни облици).

Терминот орган-култура вклучува асептичко издвојување од целото растение, одредени негови структури (органи) како што се: лист, лисни израсоци, незрели цветови и друго, и нивниот продолжен развој во услови *in vitro*. Според Jelaska (1994), во зависност од видот на експлантант, можеме да ги разликуваме следниве типови орган-култура:

а) култури на цели непроменети растенија, се стерилизираат семињата и како такви се сеат во *in vitro* услови да 'ртат, што понекогаш може да се развие и цело растение, како на пример: кај орхидејата, или кај видовите од родовите *Arabidopsis* и *Torenia*;

б) култура на ембрион, се изолираат ембрионите од семенската обвивка;

в) култура на корени;

г) култура на антери;

д) култура на меристем;

ѓ) култура на изданок, кој ги опфаќа горниот меристемски изданок со еден или повеќе парови на лисни примордии;

е) култура на поединечни пупки, која се состои од странични пупки или врвни пупки кои се прицврстени за дел од стеблото.

Неорганизиран раст често се среќава во култура на растителни ткива. Ткивото кое се создава не содржи ниту една препознатлива структура од растителниот организам и има само ограничен број на различни диференцирани, специјализирани клетки, какви се препознаваат во растителниот организам. Потполно создавање на овие диференцирани клеточни ткива сè уште не е постигнато. Неорганизираното ткиво може да се зголеми волуменски и со субкултивирање на тврд или течен медиум може да расте неограничено.

Во овој тип на раст на почетните експлантанти спаѓаат:

а) Култура на растителни ткива, ткивна култура или калус - калусното ткиво се состои од група на клетки кои се создаваат со неорганизиран раст на ситните растителни органи, откинати ткива, или од претходно култивирани клетки;

б) Култура на клетка во суспензија - се состои од популација на клетки и мали групи на клетки кои се расфрлени и растат во течен медиум;

в) Култура на поединечни клетки - растењето на поединечните клетки се постигнува со нивна изолација од калусот или култура на клетка во суспензија;

г) Култура на протопласти - тоа е култура на клетка од која е отстранет клеточниот ѕид, протопластите остануваат сочувани и живи, а потоа се култивира на течен медиум (Jelaska, 1994).

Неорганизирани / организирани култури е тип на раст кој е мешавина од претходните два споменати раста. Клетките и изолираните органи или ткива најпрво се дедиференцираат, кои со делењето создаваат ткива од кои понатаму се развиваат брзо органите (корени или изданоци) или цели организми (ембриони). Организираниите структури можат да се развиваат од неорганизирани култури, било да е спонтано или со посебни постапки. Во сите овие случаи потомството не мора да биде, а најчесто и не е потполно исто како мајчинскиот материјал од кој е создадена културата (Jelaska, 1994).

2.2 Подготовка, состав и избор на хранливата подлога (медиум)

Растителниот експлантант расте и се развива во услови *in vitro* на вештачки хранливи подлоги или медиуми. Успешниот развој на култивираниите клетки, ткива или органи ќе зависи од изборот на составот на хранливата подлога. Со додавање на потребните компоненти во соодветниот облик и комбинација, се овозможува создавање на култура, речиси од секој дел на растението, почнувајќи од филогенетски нижите растенија, како што се мововите, па сè до тревестите и дрвенестите видови. Тоа овозможува културите на ткива да се применуваат како техника за постигнување на различни цели.

Составот на медиумот е одлучувачки за растот на културите. Во почетокот на развојот на техниката, култура на растителни ткива често се употребувал составот на подлогата по White (1963). Оваа подлога содржи хранливи состојки кои им се потребни на растителните клетки и оваа подлога се употребува и денес, посебно за култура на изолирани коренчиња. Меѓутоа, пронајдено е дека одредени количини соли во споменатата подлога, посебно солите на азотот и калиумот не одговараат за потребите на растот на калусните ткива или култура на клетка во суспензија. Потребата за збогатување на солите е решено со додавање на екстракти од квасец, хидрозилат казеин, аминокиселини, кокосово млеко или некои други органски додатоци (Jelaska, 1994).

Без оглед на разликите меѓу хранливите подлоги кои денес се употребуваат, сите тие содржат минерални соли, јаглехидрати како извор на енергија (најчесто сахароза), витамини и регулатори на растот во својот состав. Подлогата мора да ги содржи соодветните количини и односи на неорганските состојки, кои ќе ги задоволат прехранбените и физиолошките потреби на клетките во културата. Ако тоа се постигне, клетките нема да бараат дополнително органски додатоци како што се аминокиселини, екстракти од квасец, хидрозилат казеин или кокосово мелко (Jelaska, 1994).

Најупотребувана подлога е онаа на Murashige и Skoog, (1962), која се применува за голем број на култури. Оваа подлога се разликува од многу други подлоги по високата содржина на калиум, нитрати и амониумови јони.

Во многу случаи потребите за некои од хранливите состојки се исполнувале лесно со покачување на концентрацијата на неорганските соли, посебно на азотните соединенија, но и на шеќерите и витамините (Jelaska, 1994).

Тестирани се многу основни хранливи подлоги (мешавина од неоргански соли) и во резултатите се покажало дека повеќето подлоги ги задоволуваат потребите на различни култури на растителни клетки.

Кога во литература се цитира одредена подлога, како на пример, подлогата MS, тоа подразбира дека составот на минералните соли е идентичен на подлогата MS (Murashige и Skoog, 1962), а другите додатоци како што се витамини, хормони и др. можат да отстапуваат и да се разликуваат од

оригиналниот состав, наведени во публикацијата на Murashige и Skoog (1962), бидејќи се прилагодуваат на потребите на одредени растителни видови како и за намерите за кои се поставува наведената култура. Подлогите MS и ER (Eriksson, 1965) се многу слични, но ER содржи двојно поголема количина на фосфат и значајно помала концентрација на микроелементите од MS, кои можат да бидат погодни за некои типови клетки и растителни видови. Подлогата B5 (Gamborg, 1968) е испитувана на голем број калусни култури и култура на клетки. Некои видови на калусните култури и култура на клетки подобро растат на подлогата MS, а некои други на B5 и ER. Подлогата B5 содржи релативно мали количини на амониумови јони, кои во некои случаи можат да го стопираат растот на клетките.

Подлога SH (Schenk и Hildebrandt, 1972) е слична со подлогата B5. Количината на минералните соли е нешто поголема, а амонијакот и фосфатот се додадени во унифицирано соединение. Подлогата He (Heller, 1953) многу се употребувала во Европа. Содржината на солите во подлогата на Heller е релативно ниска, содржи некои непотребни состојки (соли на никел и алуминиум), а молбиденот не е додаден, кој е потребен за секоја подлога за растот на растенијата. Калиумот и нитратот се додадени во посебни соединенија.

Многу светски компании на пазарот нудат потполно подготвени подлоги кои ги содржат сите компоненти, кои после купувањето треба само да се измешаат со одредена количина вода и да се употребуваат според упатството.

Во составот на секоја хранлива подлога ги има следните компоненти и тоа:

- Неоргански соли,
- Јаглехидрати,
- Витамини,
- Регулатори на раст,
- Органски додатоци.

Неорганските соли се повеќето минерални соли кои ја задоволуваат потребата на културата за макроелементи и микроелементи. Подлогата мора да содржи најмалку 25 mmol азот и 25 mmol калиум. Количина од 1-3 mmol калциум, сулфат и магнезиум во повеќето случаи е задоволителна. Потребата за натриум и хлор може да се додаде во вид на калциумова сол, фосфати или микроелементи. Потребни микроелементи во подлогата се следниве: I, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Co и Fe иако некои автори мислат дека нема потреба од јодот.

Јаглехидратите служат во подлогата како извор на енергија. Сахарозата како најпогодна за повеќето клетки се користи во концентрација од 2-4 %. Може да биде заменета и со гликоза или фруктоза, додека другите шеќери се слаб извор на јаглород.

Од **витамините** кои се додаваат во хранливата подлога и кои се употребуваат во посебни случаи, се мисли дека само B₁ односно тиаминот (во облик на хидрохлорид), навистина е потребен за растителните клетки, бидејќи тие не можат да го синтетизираат во потребните количини. Никотинската

киселина и B₆ пиридоксин (во облик на хидрохлорид) исто така, можат поволно да делуваат на растот.

Од составот на **регулаторите на растот** во подлогата, ќе зависи понатамошната органогенеза, развој и намена на културата.

Создавањето на калус во повеќето случаи се постигнува со додавање на 2,4-D (10^{-6} до 10^{-8} mol). Дополнително со 2,4-D и цитокинини (кинетин, зеатин или бензиламинопуриин во концентрација 10^{-6} до 10^{-7} mol) може добро да делува на калусогенезата, но само 2,4-D е доволен во многу случаи.

Ако културата се поставува заради морфогенеза, тогаш комбинацијата од ауксин (NAA) и цитокинин (BA, зеатин или изо-пентиладенин) ќе биде многу подобра од комбинацијата со 2,4-D. Додека 2,4-D ја поттикнува клеточната делба, комбинацијата од ауксин NAA, IBA или IAA со цитокинин (KIN или BAP) е поповолна за поттикнување на морфогенезата, која пак 2,4-D ја попречува. NAA може да биде заменета со IAA, но IAA треба да се стерилизира со филтрација. Самата IAA понекогаш може да биде разградена од ензимите на ткивата кои се култивираат, па во овој поглед е помалку стабилна од синтетичките ауксини, како што се NAA, IBA или 2,4-D. За индукција на калусните ткива посебно е ефективна 2,4,5-трихлорофеноксоцетна киселина. Ауксини и цитокинини кои најчесто се додаваат во подлогата се прикажани во Табела 5.

Табела 5. Ауксини и цитокинини кои најчесто се додаваат во подлогата (Колева-Гудева, 2010)

Table 5. Growth regulators are commonly added to the substrate (Колева-Гудева, 2010)

Ауксини / Auxins	Цитокинини / Cytokonins
3-индолоцетна киселина (IAA) / 3-indoleacetic acid (IAA)	N ₆ -бензиламинопуриин (BA) / N ₆ -benzylaminopurine (BA)
3-индолбутерна киселина (IBA) / 3-indolebutyric acid (IBA)	N ₆ -γ,γ- диметилалиламинопуриин (2iP) / N ₆ -γ,γ- dimethylallylaminopurine (2iP)
1-нафталиноцетна киселина (NAA) / 1-naphthalene acetic acid (NAA)	N ₆ - фурфуриламинопуриин или кинетин (KIN) / N ₆ - furfurylaminopurine or kinetin (KIN)
4-хлорофеноксоцетна киселина (CPA) / 4-chlorophenoxyacetic acid (CPA)	
2,4-дихлорофеноксоцетна киселина (2,4-D) / 2,4-dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D)	

Аминокиселините и органските додатоци во многу случаи не се потребни. Доколку неорганските компоненти не се доволни за раст на културата, најдобар начин за подобрување на подлогата е додавање 0,5-0,1%

хидрозилат казеин. Истиот понатаму може да се замени со L-глутамин (2-10 mol), или пак органскиот азот потполно да се исфрли. На клетките обично им е потребно месец дена или повеќе, за постепено да се прилагодуваат на отстранувањето на органскиот азот. Додавање на кашесто ткиво од плодот на банана и рибина емулзија поволно делуваат во култура на орхидеја. Најчесто се употребуваат како органски додатоци течниот ендосперм на кокосовиот орех (кокосово млеко), слад од јачмен и екстракт од квасец (Jelaska, 1994).

2.3 Предности на пропацијата во *in vitro* услови

Методите достапни за размножување на растенија во *in vitro* услови во голема мерка се надоградување на оние кои се веќе развиени за конвенционалните размножувања.

Според George (2008), *in vitro* техниките ги имаат следните предности во однос на традиционалните методи:

- Одгледувањето на културите се започнува од многу мали делови од растенијата (експлантанти), а потоа од 'ртулци или ембриони се пропагираат до цело растение. Оттука, потекнува терминот микроразмножување т.е. микропропација каде се опишуваат *in vitro* методите. Потребно е мал дел од просторот за да се одржуваат растенијата, сè со цел да се зголеми нивниот број. Размножувањето се врши во асептични услови (избегнување на зарази). Откако е започнато одгледувањето на вакви култури, сè помалку би имало патогени зарази кај културите, бидејќи конечно со ваквите култури се произведени идеални растенија кои се отпорни на некои болести кои се предизвикани од бактерии, габи и други микроорганизми.
- Методите се достапни за добивање на безвирусни растенија. Обезбедувајќи се со овие техники или со безвирусен материјал кој се користи за иницирање на култури, сертифицирани безвирусни растенија може да се произведуваат во големи количини.
- Прилагодувачки фактори кои влијаат врз растителната регенерација се светлината и температурата, кои делуваат врз растот и развојот. Размножувањето е многу поголемо, отколку во макропропацијата и многу повеќе растенија може да се произведуваат во даденото време. Ова може да овозможи новосоздадените генотипови побрзо да се шират, односно да се создадат поголем број растенија за пократко време. Техниката е многу погодна, кога обемот на производството е повисок и е од суштинско значење.
- Возможно е да се произведат клонови на некои видови растенија, кои бавно и тешко (или дури и невозможно) се пропагираат вегетативно.
- Растенијата можат да се здобијат со нови карактеристики преку микроразмножувањето, што ги прави попожелни за одгледување за

разлика од конвенционалните. Пример за тоа се некои од украсните грмушести и јагодести растенија.

- Производството може да трае во текот на целата година, тоа значи дека не зависи од сезонските промени.
- Вегетативниот (репродуцирачки) материјал може да се чува долг временски период.
- Помалку енергија и простор се потребни за размножување и за одржување на цели растенија.
- На растителниот материјал му треба повеќе внимание, отколку кај субкултурите и не му треба работна сила или материјали кои се потребни за наводнување, плевање, прскање и слично.
- Микроразмножувањето е најоправдано доколку чини помалку отколку традиционалните методи на размножување. Ако нема таква оправданост, мора да има некои други важни причини за да биде исплатливо.

2.4 Недостатоци на пропагацијата во *in vitro* услови

Според George (2008), потребни се напредни вештини за успешно спроведување на недостатоците кај *in vitro* методите и тоа:

- Специјализирано и скапо производство и прилично специфични методи се потребни за да се добијат оптимални резултати од секој вид и вариетет. Затоа цената на чинење на пропагирањето е релативно висока. Понатамошни последици од користењето на *in vitro* методите (иако тие можат да бидат произведени во голем број), се тоа што добиените растенија можат да имаат и некои несакани карактеристики.

- За да преживеат во *in vitro* услови, експлантантите и културите треба да се одгледуваат на медиум кој содржи сахароза или некој друг извор на јаглерод. Растенијата добиени од овие култури не се во можност самите да си произведат органска материја по пат на фотосинтеза (т.е. тие не се во целост автотрофни) и мора да поминат некој преоден период пред да започнат со својот независен раст. Во поново време се создаваат техники кои овозможуваат производство на фотоавтотрофни растенија во *in vitro* услови.

- Ако културите кои се одгледуваат во стаклени или во пластични садови се пренесат на места со висока релативна влажност, кои обично не се автотрофни, младите култури се повеќе подложни на губење на вода во надворешни услови. Шансите за производство на генетски абнормални растенија можат да бидат зголемени.

2.5 Техники за размножување на растенијата во *in vitro* услови

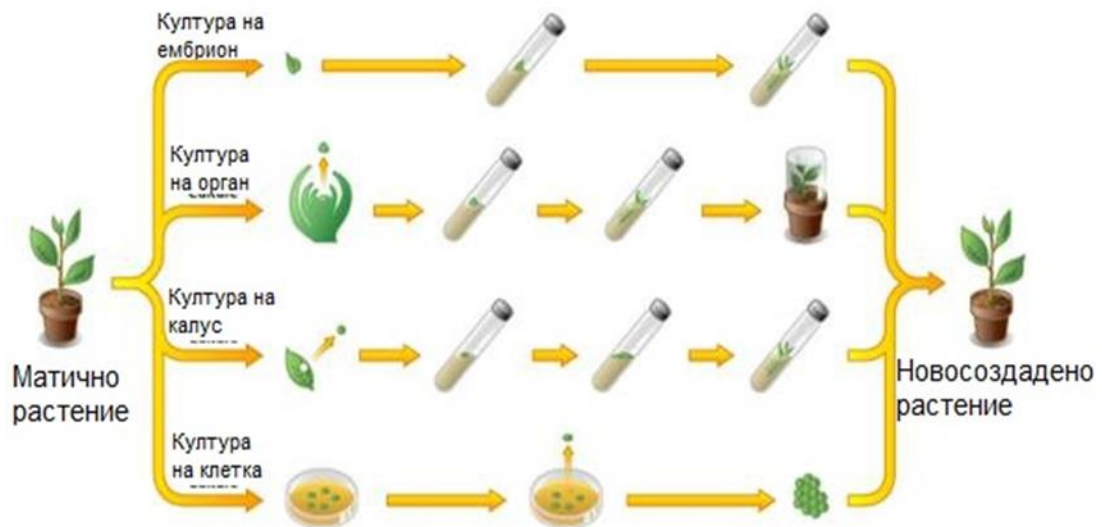
Методите кои теоретски се на располагање за размножување на растенијата во *in vitro* услови, прикажани од авторот George, (1996), се следниве:

- размножување со изданок од аксиларните пупки;
- размножување од формираните адвентивни изданoci или адвентивните соматски ембриони, или

а) директно од делови на ткива или органи (експлантанти) отстранети од матичното растение или

б) индиректно од неорганизираните клетки (култури во суспензија) или ткива (калусни култури), формирани од зголемувањето на бројот на клетките од експлантантите; од полуорганизираните калусни ткива или цели растенија (како што се кртоли, луковици) може да се добијат експлантанти (особено оние од одредени специјализирани растителни органи).

Некои од техниките за размножување на растенијата во *in vitro* култури на ембрион, орган, калус и клетка шематски се претставени на слика 2.



Слика 2. Создавање на ново растение во услови *in vitro*

(http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/plant_cell_culture.gif)

Figure 2. Creating a new plant in *in vitro* conditions

(http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/plant_cell_culture.gif)

2.6 Методи во микропропагацијата

2.6.1 Пропагација на растенијата од аксиларните пупки или изданoci

Производството на растенија од аксиларните пупки или изданoci се покажа дека е општо најприменливо и е најсигурен метод за вистинско *in vitro* размножување.

George, (2008), наведува два методи кои најчесто се користат во микропропагацијата, а тоа се:

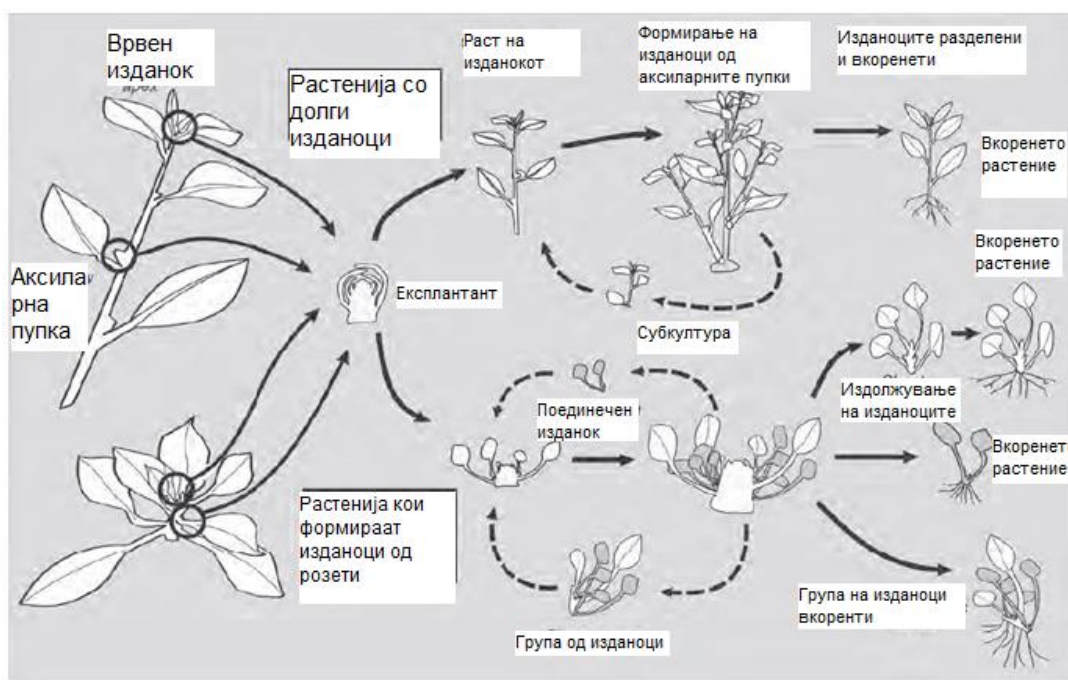
- Култура на изданоци, и
- Култура на поединечни пупки.

Двата методи зависат од стимулирањето на растот на аксиларни изданоци од надминувањето на доминацијата на апикалните меристеми.

Терминот **култура на изданок** сега се користи за култури кои започнуваат од експлантанти, каде што повторното размножување е од формираните аксиларни делови. Кај оваа техника, новоформираните изданоци служат како експлантанти за повторно размножување. Некои изданоци се вкоренуваат за од нив да се формираат мали култури кои ќе се одгледуваат во *in vitro* услови. Ова е најраширениот метод кој се користи во микропропагацијата (слика 3). Должината на експлантантите треба да изнесува до 20 mm.

Подолгите експлантанти имаат повеќе предности од помалите за иницирање на култура на изданок и тоа:

- Подобро го поднесуваат пренесувањето од *in vitro* на *ex vitro* услови;
- Побрзо го започнуваат растењето;
- Содржат повеќе аксиларни пупки.



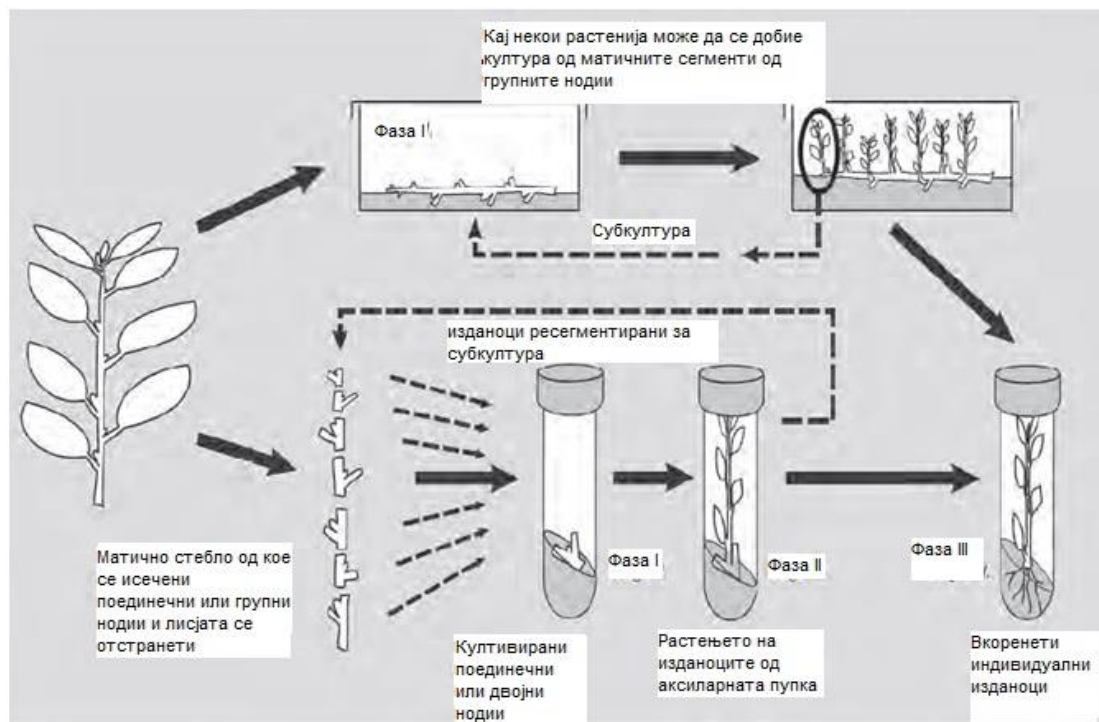
Слика 3. Култура на изданок (George, 2008)

Figure 3. Shoot tip culture (George, 2008)

Култура на **поединечни пупки** е уште една *in vitro* техника која може да се користи за микроразмножување кај некои видови. Како и кај културата на изданок, примарните експлантанти за културата на поединечните нодии се

врвните изданоци, страничните пупки или делови од една или повеќе пупки (т.е. со една или повеќе нодии). Кога исечените врвни изданоци се искористени, тоа може да биде повољно за иницирање на култури со подолги експлантанти (до 20 mm) и да бидат добиени безвирусни култури (слика 4). Неразгранетите изданоци растат во фаза I сè додека не се со 5 - 10 cm должина и имаат неколку дискретни и одделени нодии. Во фаза II, наместо поттикнување на растењето на аксиларните изданоци со регулатори на растот (како кај култура на изданок), еден од двата манипулативни методи се користи за да се надмине апикалната доминација и за да се поттикне развивањето на латералната пупка, а тоа се:

- индивидуалните изданоци можат да се стават на свеж медиум во хоризонтална положба. Овој метод се користи за пропагирање на компири;
- секој изданок може да се раздели на поединечни нодии или во групи што се субкултивираат.



Слика 4. Култура на поединечни или групни нодии (George, 2008)

Figure 4. Single and multiple node culture (George, 2008)

2.7 Формирање органи за складирање

Многу орнаментални и културни видови нормално се пропагираат, складираат и засадуваат во форма на вегетативни органи за складирање. Карактеристично е за неколку видови на растенија, на пример:

- Луковици: амарилис, зумбул, крин, нарцис, кромид;
- Грутчести луковици: гладиоли;
- Минијатурни тубери (мини-тубери): компир.

Методите за добивање на органи за складирање се разликуваат според видот на ткиво од кои се култивирани. Некои формираны органи за складирање *in vitro* може директно да се пренесат на почва *ex vitro* (George, 2008).

2.7.1 Производство на луковици и грутчести луковици

Видови кои природно се размножуваат од луковици може да индуцираат формирање на мали луковици на самата култура. Луковиците можат да бидат создадени од аксиларните пупки, но често тие се формираат од адвентивни пупки, кои се развиваат на некои делови од листот, на цветните стебленца, а особено на некои одвоени делчиња од луковицата.

Аксиларните и адвентивните изданоци и луковиците се формираат на основата на луковицата во *in vitro* услови. Силната доминација на главниот апикален изданок често го спречува формирањето на аксиларните пупки во основата на луковиците *in vivo*, но пупките се способни да формираат луковици. Кај некои видови, важно е да се остави мал дел од базалниот дел на луковицата во експлантантот. Во зависност каков вид луковица ќе биде образуван, експлантантите за да продолжат во фаза II на микропропагацијата, треба да содржат делчиња од луковиците или луковици кои биле исечени и поделени. Вегетативните структури за да бидат пренесени од фаза III во надворешната средина, можат да бидат млади регенерирани растенија, млади регенерирани растенија со основа од луковица или хибернирани луковици.

Малите грутчести луковици на видовите од родот *Gladiolus*, може да се формираат директно на експлантирано ткиво или во култура на калус, (Ziv и сор., 1970; Ziv и Halevy, 1972), или се формираны на млади регенерирани растенија и растат во култивирани теглички, се додека лисјата не остарат. Грутчестите луковици формираны во *in vitro* услови можат да бидат засадени во почва или се користат за да се создадат нови *in vitro* култури. (Hussey, 1978; Hussey и Stacey, 1981)

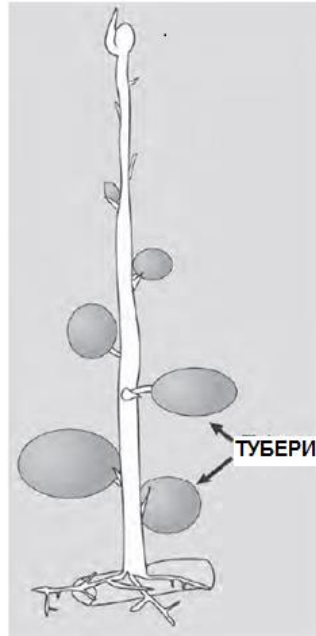
2.7.2 Минијатурни тубери (мини-тубери)

Растенијата кои природно формираат тубери, може да се индуцира создавање на минијатурни верзии на овие органи за складирање во медиум кој содржи висока концентрација на цитокинин. Компирот и слаткиот компир се култури кои формираат мини-тубери. Методите за поттикнување на *in vitro* туберизација на компирите, за првпат биле опишани од страна на Lee и сор. (1978), Wo Wang и Hy (1980) и Hussey и Stacy (1981). Овие автори наведуваат дека туберите на компирот најдобро се формираат во темно.

Мини-туберите имаат голема предност, со тоа што тие може лесно да се отстранат од матичната култура и да се пренесат во лабораториски садови, а потоа да се чуваат *ex vitro* без некои поголеми мерки на претпазливост дека ќе бидат заразени. Кога се засадени во почвата тие се однесуваат како нормални тубери и создаваат растенија од аксиларните изданоци. Доколку истите се

создадени од *in vitro* безвирусни изданоци, минијатурните тубери обезбедуваат идеален метод на размножување (слика 5).

Самите мини-тубери веќе се употребуваат низ многу земји во светот и не може да се замисли размножувањето на компирот без нив.



Слика 5. Минијатурни тубери формирани во култура од изданоци на компир (George, 2008)

Figure 5. Miniature tubers formed at shoot culture of potato (George, 2008)

2.8 Фази на микроразмножување

Професорот Murashige во 1974 година дефинираше три фази (I-III) во *in vitro* размножувањето на растенијата. Овие фази се широко прифатени од страна и на истражувачките и комерцијалните лаборатории за култури *in vitro*, бидејќи тие не само што ги опишуваат процедуралните чекори во процесот на микроразмножување, но ги претставуваат и главните точки кои животната средина на културата треба да ги промени.

Некои автори мислат дека првата фаза треба да се смета како подготвителна фаза. Па така, Debergh и Maene (1981) предложиле таа фаза каде што се вршат подготовките да се нарекува фаза 0, а четвртата фаза (IV), во која растенијата се пренесуваат во надворешната средина, исто така, да биде општо призната.

Генерално, според George (2008), секој култивиран експлантант минува низ следните фази:

I. Иницирање на култура

Растење на ткива или на органи во *in vitro* услови без присуство на алги, бактерии, габи или некои други контаминатори.

II. Зголемување на пропагираните култури

Поттикнување на културите да произведуваат поголем број на изданоци или соматски ембриони.

III. Подготвување на пропагираните изданоци за пренесување на почва

Подготвување на пропагираните култури да можат да опстанат како индивидуални растенија во надворешната средина.

Во следните подпоглавја опишани се фазите на микроразмножување и опишано е што се случува во секоја фаза посебно, при култивирање на различни типови на експлантанти (George, 2008).

2.8.1. Култура на изданоци

I. Пренесување на дезинфицираните изданоци или латерални пупки на цврст или течен медиум и почеток на растење на изданоците до 10mm.

II. Индуцирање – формирање на повеќе аксиларни изданоци, растење на изданоците до некоја големина во оваа фаза, за да би можеле експлантантите да преминат во фаза III.

III. Елонгирање на пупките формирани во втората фаза до еднакви изданоци. Пренесување на *in vitro* регенеранти во надворешни услови.

2.8.2. Култура на изданоци од цветни меристеми

I. Стерилна изолација на деловите од цветните меристемски ткива.

II. Поттикнување на меристемите да произведуваат што повеќе вегетативни изданоци. Најдобро би било поттикнувањето од врвните меристеми.

III. Пренесување на *in vitro* регенеранти добиени од врвните меристеми во надворешни услови.

2.8.3. Култура на изданоци од семиња

I. Стерилно ртење на семињата со поставување на хранлив медиум со висока содржина на цитокинин.

II. Поттикнување на зголемување на бројот на многубројните изданоци. Добивање на субкултура.

III. Ова важи за типовите на култури кои се размножуваат со изданок.

2.8.4. Култура на меристеми

I. Растење на малите врвни изданоци (со должина од 0,2 до 0,5 mm) во култура. Врвните изданоци (1 - 2 mm) можат да се користат како експлантанти, ако растенијата од кои се изолирани се третирани со топлина.

II. Растење на изданоците до 10 mm и зголемување на нивниот број.

III. Ова важи за типовите на култури кои се размножуваат со изданок.

2.8.5.Култура на поединечни пупки

I. Овие изданоци растат подолго за разлика од другите изданоци.

II.Поттикнување на аксиларните пупки во секоја нодија да растат како посебен изданок.

III.Ова важи за типовите на култури кои се размножуваат со изданок.

2.8.6.Директна регенерација на изданоците од експлантантите

I.Изолирање на соодветни експлантанти од мајчинските растителни ткива (на пример од лисните или стеблените сегменти).

II. Создавање на изданоци - експлантанти, без претходно формирање на калус. Изданоците кои се формираат можат да се употребат како експлантанти за новата фаза II на субкултурите или културите кои се размножуваат со изданок.

III. Ова важи за типовите на култури кои се размножуваат со изданок.

2.8.7.Директна ембриогенеза

I. Изолирање на ембриогенетските ткива од експлантантите или од претходно формирани соматски ембриони.

II. Директна индукција на соматските ембриони на експлантантите без претходно формирање на калус.

III. Растење на ембрионите во култури кои потоа можат да бидат пренесени во надворешни услови.

2.8.8.Индириктна регенерација на изданокот од морфогенски калус

I. Изолирање на калус од површинските меристемски изданоци.

II. Обновување на субкултурата од малите делчиња на калусот и потоа пренесување на медиум. Изданоците растат до 10 см.

III. Индивидуалните изданоци се пораснати и вкоренети.

2.8.9 Индириктна ембриогенеза од ембриогенетски калус или култури во суспензија

I. Иницирање и изолирање на калус сè со цел да можат да се формираат соматски ембриони или добивање на ембриогенетски култури во суспензија од ембриогенетскиот калус, или пак со *de novo* индукција.

II. Субкултурата од ембриогенетскиот калус или култура во суспензија се пренесува на медиум, со што се фаворизира развојот на ембрионот.

III. Растење на соматските ембриони во посадочен материјал.

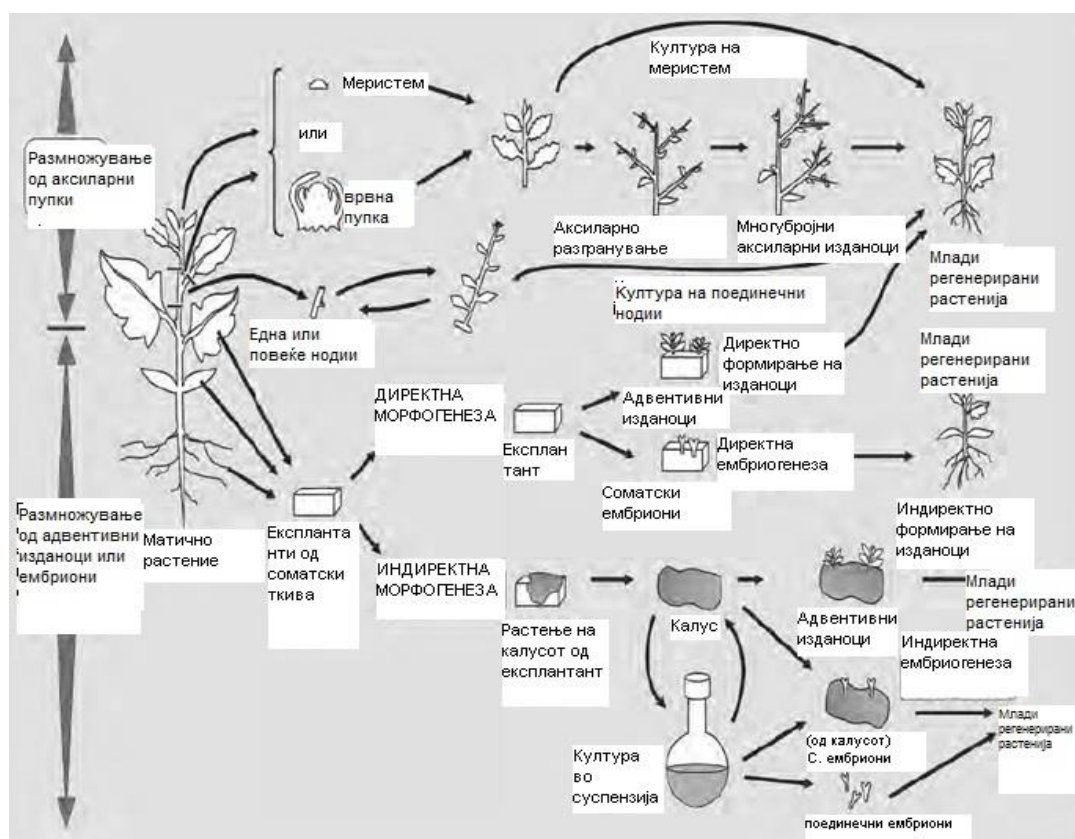
2.8.10 Формирање на орган за складирање

I. Изолирање на ткиво или орган од растение коешто е способно да формира органи за складирање.

II. Поттикнување за формирање на органи за складирање.

III. Растење на изданоците и нивно пренесување во почва или пак растење до некоја должина на оние делови за складирање и нивно пренесување на почва.

Барањата за завршување на секоја фаза од микроразмножувањето се разликува, зависно кој метод се применува, а развивањето на културите ќе зависи од способност за регенерација во *in vitro* услови (слика 6).



Слика 6. Основни методи на микропропагација (George, 2008)
Figure 6. The principal methods of micropropagation (George, 2008)

2.8.11. Фаза 0: Селекција на мајчинските растенија и нивна подготовка

Пред да се започне со микроразмножување, внимателно треба да се изврши избор на матичните (мајчинските) растенија. Тие мора да бидат типични за дадените видови и без никакви симптоми на болести.

Според Debergh и Maene (1981), чекорите за намалување на контаминацијата на експлантантите се важни и се суштинска фаза во програмите за комерцијални микроразмножувања.

Потребни се постапки за откривање и намалување или елиминирање на бактериските и вирусните болести. Индексот на болеста, како и индексот на елиминација, треба да бидат составен дел од целиот микроразмножувачки процес, но овие мерки на претпазливост, за жал, честопати се запоставуваат и понекогаш имаат негативни последици. Во Фаза 0 се извршуваат сите подготовки и предтретмани на матичните растенија.

2.8.12. Фаза I: Создавање на стерилна култура

Во вториот чекор кај процесот на микроразмножување потребно е да се добие асептична култура од избраниот растителен материјал. Успехот во оваа фаза бара прво експлантантите да бидат пренесени на медиум, без присуство на микробиолошки контаминенти, а потоа мора да се следи растењето на изданокот или формирањето на калусот. Обично се пренесуваат поголем број на експлантанти во исто време. По краток период на инкубација, ако се утврди дека некој сад од експлантантите е контаминиран, или пак некој медиум, тие задолжително мора да се отстранат. Фазата I ќе се смета како завршена, односно комплетна, ако има соодветен број на експлантанти кои не се заразени и кои продолжуваат со растењето.

2.8.13. Фаза II: Производство на материјал за микропропагирање

Важноста на фаза II е да се произведат изданоци или вегетативни структури, што кога ќе бидат одделени од културата да имаат способност да се развијат во ново целосно растение.

Ваквото размножување може да се случи од аксиларните или адвентивните изданоци, соматските ембриони или со вегетативни органи. Во некои микроразмножувачки методи, фазата II ќе вклучува и индукција на меристемски култури од кои може да се развиваат адвентивни органи. Некои од вегетативните структури, кои се добиваат во фаза II (особено изданоците), исто така можат да се користат како основа за понатамошниот развој на размножувањето. Тие можат да бидат повторно култивирани (субкултивирани), со што би се зголемил бројот на регенеранти.

2.8.14. Фаза III: Подготовка за растење на регенерантите во надворешни услови

Изданоците или младите регенерирани растенија добиени во фаза II се мали и не се способни самостојно да растат и да се развиваат во почва или во компост. Во фаза III се опишани чекорите кои треба да се преземат за секој поединечен изданок, или група од млади регенерирани растенија, да можат да

бидат способни сами да вршат фотосинтеза и да опстанат со снабдување на вештачки јаглехидрати. Некои култури треба специјално да бидат третирани во оваа фаза, за да не дојде до венење кога ќе се пренесат во надворешната средина. Како што првично предложил Murashige во 1974 година, фаза III вклучува *in vitro* вкоренување на изданоците пред нивното пренесување во *in vivo* услови.

Вкоренувањето на изданоците е многу важен дел од секоја *in vitro* размножувачка шема. Кај некои видови формирањето на адвентивните корени кај изданоците е во текот на фаза III, но обично е неопходно да се користат специјални медиуми или методи, за да се поттикне формирањето на корените. Понекогаш изданоците треба да бидат поиздолжени пред да се изврши нивно вкоренување. За да се намалат трошоците кај микроразмножувањето, повеќето лаборатории ги отстрануваат некоренетите изданоци од *in vitro* средината и ги вкоренуваат во посебни садови за вкоренување.

Затоа, кај културите каде микроразмножувањето се потпира на адвентивните или аксиларните изданоци, фаза III честопати е поделена, па Debergh и Maene (1981) предложиле да биде:

- Фаза IIIa , издолжување на пупките или изданоците формирани во текот на фаза II, за да обезбедат изданоци со соодветна големина за фаза IIIb ;
- Фаза IIIb, искоренувањето на изданоците од фаза IIIa *in vitro* или *extra vitrum*.

2.8.15 Фаза IV: Пренесување во надворешни услови

Иако не е посебено нумерирана фаза од Murashige (1974), методите при кои малите растенија или регенеранти се пренесуваат од *in vitro* во *ex vitro* надворешни услови се исклучително важни. Ако не се изврши преносот внимателно, може да резултира со значително губење на пропагираниот материјал.

Постојат две главни причини за загубата на пропагираниот материјал: изданоците кои се развиваат во култури се произведени во висока влажност и ниска осветленост. Ова резултира со листови кои имаат помалку епикутуларен восок или восок со изменет хемиски состав, во споредба со растенијата одгледувани во расадници или стакленици. Кај некои растенија произведени во *in vitro* услови стомите на листовите можат да бидат нетипични и неспособни за нивно целосно затворање под услови на ниска релативна влажност. Од тие причини, растенијата кои се образуваат во култура на ткива ја губат водата многу брзо кога ќе се пренесат во надворешни услови (Sutter и Langhans, 1979; 1980).

Микропропагираните растенија снабдени со сахароза (или некој друг јаглехидрат) и чувани во услови на недоволна осветленост не се целосно зависни од сопствениот процес на фотосинтеза (тие се миксотрофни). Важно за ваквите растенија е тие да можат сами да си ги задоволат потребите за

јаглерод и редуциран азот во вакви затворени услови (т.е. пред тие да станат способни за сопствено хранење - автотрофни) (Marin и Gella, 1987).

Промените кои се случуваат, откако растенијата имаат поминато период од неколку дена *ex vitro*, се опишани подолу во следниот параграф и се прикажани на слика 7.

Во пракса, младите регенерирани растенија кога се отстрануваат од медиумот во фаза III, гелот внимателно мора да се отстрани со измивање од коренот. Примената на антитранспиранти на листовите се препорачува во оваа фаза, но во практиката ретко се користи.

Младите регенерирани растенија потоа се пресадуваат во соодветна смеса каде ќе си развиваат подобри коренчиња (како тресет, компостиран песок и перлит) и се чуваат неколку дена на висока влажност со намален интензитет на светлината. Заситеноста на амбиенталниот воздух со водена пара е многу важна за одржување на влажноста (слика 7).

Кај некои растенија фаза III може да се прескокне, бидејќи изданоците од фаза II се вкоренуваат директно на висока влажност и во исто време, растенијата постепено се подготвуваат за растење во надворешни услови.



Слика 7. Алтернативни методи за вкоренување на изданоците добиена со микропропагацијата (George, 2008)

Figure 7. Alternative methods for rooting micropropagated shoots (George, 2008)

2.9 Прилагодување на културата и аклиматизација во *ex vitro* услови

Растенијата кои се одгледувани и растеле во *in vitro* услови многу се разликуваат од растенијата кои се одгледуваат на класичен начин во природни услови.

In vitro растенијата често имаат слабо развиена кутикула, како и слабо изразен восочен слој на кутикулата, што е последица на високата влага во воздухот во садовите за култивирање (околу 90 – 100 % релативна влажност). Како последица на овој недостаток се јавува голем губиток на вода.

Со оддавање на вода преку кутикулата, кога растенијата ќе се пренесат во надворешни услови, каде влагата во воздухот е многу мала, може да се јават големи загуби во трансферот *in vitro* во *ex vitro*. Листовите на растенијата одгледувани *in vitro*, многу често се тенки и нежни, па не можат да ја вршат фотосинтезата. Се претпоставува дека *in vitro* растенијата имаат повеќе палисадни клетки кои можат да ја користат светлоста од меѓуклеточните простори во мезофилното ткиво. Стомите не функционираат нормално, најчесто се отворени со што се губи голема количина на вода во првичните часови на прилагодувањето (аклиматизацијата). Кај овие растенија, исто така е утврдено васкуларно поврзување на изданоците и корењата, што исто така може да ја намали регулацијата на водата. *In vitro* растенијата сè уште не се автотрофни, што значи дека мораат да преминат на фотоавтотрофниот начин на живот (за да почнат нормално да фотосинтетизираат) после пренесувањето во почва, што за нив претставува еден голем стрес.

Растенијата кои се одгледувани во *in vitro* услови, треба да се подготвуваат за трансфер во надворешни услови, а овие постапки на пренесување во нестерилна средина се нарекуваат прилагодување на растенијата или аклиматизација.

Аклиматизацијата се постигнува на тој начин што постепено се прилагодуваат на намалувањето на релативната атмосферска влажност.

Во процесот на аклиматизација многу е важно правилно да се развива стоминиот апарат. Со намалувањето на атмосферската влажност се подобрува развивањето на кутикуларните восочни слоеви кои ја спречуваат кутикуларната транспирација.

Аклиматизацијата може да се постигне и со пренесување на *in vitro* растенијата во услови со висока влажност, што може да се постигне во стакленик каде што се врши фино оросување, или уште подобро, замаглување на просторот т.е. во воздухот лебдат ситни мали капки вода со што ќе се постигне контролирана атмосферска влажност. Истовремено во оваа фаза растенијата се слабо осветлени и се чуваат на пониски температури од вообичаените.

Друг начин на аклиматизација е кога *in vitro* садовите се оставаат отворени неколку дена во стерилни услови, сè додека растителниот материјал не се прилагоди на надворешните услови, а потоа регенерантите се отстрануваат од нив.

Растенијата кои во природата растат и живеат симбиотски со габите (микориза) или бактериите (видовите од родот *Aspergillus* и видовите од родот *Rhizobium*) ги немаат овие симбиотски организми кога се пренесуваат во почвата.

Постојат многу литературни податоци во кои се заклучува дека овие растенија во *in vitro* услови подобро растат и се развиваат доколку се инокулираат со одговарачката габа или бактерија.

Заразувањето на културата со габи или бактерии, се редуцира ако корените добро се измијат од подлогата, се употребува стерилизирана почва (стерилизирана со пара или со зрачење со гама зраци).

Во пракса многу ретко се употребува стерилна почва, но се применуваат многу фунгициди и слични средства.

Непосредно после преносот на растенијата во почва, ако габите почнаат интензивно да се развиваат треба да се уништат, бидејќи растенијата се многу осетливи. На пример, габите од родовите *Fusarium* и *Pythium* можат да се уништат со 0,15 - 0,25% Previcur-N (Schering) раствор, веднаш после пренесување на растението во почва.

За да се избегне оштетувањето на кореновиот систем добро би било растението да се засади во фина просеана почва. Преживувањето на растението после преносот во почва ќе биде постигнато добро со закоренување на подлога сиромашна со соли (Larcher, 2003).

Desjardins (1987) испитувал аклиматизација на јагода произведена во *in vitro* услови, која била подобрена со збогатување на околината со CO₂ и дополнително осветлување. Истото се однесува и за виновата лоза, по што се подобрила аклиматизацијата.

Во индустриската примена на култура на растителни ткива се постигнува подобрување, односно поголемо преживување на растенијата после нивното пренесување во услови *ex vitro*, со покривање со пластични материјали кои ја задржуваат високата влажност.

Резниците и изданоците добиени во *in vitro* услови кај некои украсни култури се пренесуваат на веќе подготвен супстрат каде што се вкоренуваат. Дрвенестите видови како на пр. брезите, подлога за јаболки, јоргован и др., често се вкоренуваат директно во супстрат, со што се штеди на време и пари.

Во последните години кај системите за индустриско микроразмножување на растенијата сè повеќе и повеќе се користи оросувањето како мерка за подобра аклиматизација на растенијата.

Од ден на ден во литературата, и на пазарот, се појавуваат нови супстрати кои овозможуваат успешно преживување на *in vitro* растенијата во *ex vitro* услови.

Аклиматизираните растенија на поголема оддалеченост се пренесуваат пакувани во влажен памук или хартија или во пластични вреќи, но треба да се внимава на температурата, особено ако се тропски видови кои тешко поднесуваат температура пониска од 15°C (Jelaska, 1994).

2.10 Која растителна култура може комерцијално да се микропропагира?

Jelaska, (1994) реферира дека постојат четири важни причини кои влијаат врз донесувањето на конечната одлука, дали некое растение може да се размножува во *in vitro* култура, а тоа се:

- Брза репродукција (*in vitro* методите засега се најбрзи во споредба со сите други методи);
- Да не е заразена културата од патогени микроорганизми;
- Добивање на генерации со единствени генотипови и фенотипови, кои не можат да се репродуцираат на никаков друг начин и
- Економски пресметки – утврдување на цените на пазарот.

Во многу случаи, првите три причини упатуваат на потребите за продукција *in vitro*, а четвртиот фактор ја одредува можноста за нејзина комерцијализација.

Денес, голем дел од пазарниот систем за размножување на изданоци, зависи од активноста и растот на апикалниот или аксиларниот меристем. Размножувањето на изданоците ќе зависи од самото растение и од составот на подлогата. Благодарение на употребата на регулаторите на раст, посебно цитокининот, стапката на размножување се зголемува.

Досега најмногу произведени растенија се добиени со поттикнување на аксиларното разгранување.

Другите начини за добивање на *in vitro* растенија (адвентивни пупки и соматска ембриогенеза), засега не се применуваат во комерцијалното производство.

Во индустриското микроразмножување важно е наследувањето на карактеристиките на културите (генотип, а потоа фенотип).

Без разлика колку добро е поставен методот за микропропагирање, тој не е успешен сè додека добиените растенија не се посадат во заштитен простор или на отворено.

Развивањето на една успешна стратегија за аклиматизација на растението е многу важно. Со намалување на релативната влажност во микросредината *in vitro*, се намалува и појавата на прекумерно насобирање на вода во ткивата и овозможува подобро создавање на восочен слој како и нормални лисни структури. Со тоа се подобрува преживувањето на растението кога се пренесува во заштитен простор или на отворен простор.

Повеќето култури се садат само во одредени месеци од годината. *In vitro* методите можат да станат нова стратегија за чување на растенијата, како и прекинувањето на дорманцијата. *In vitro* техниката може да вклучи и создавање на различни резервни органи (луковици, кртоли) кои би се саделе на отворен простор без претходно да бидат садени во заштитен простор. Со овие методи и постапки кај некои култури може да дојде до продолжување на вегетационата сезона, а кај други да се промени начинот на чување (Larcher, 2003).

2.11 Примена на технологијата на култура на ткиво во *in vitro* услови

Културата на ткиво во *in vitro* услови продолжува да се развива во стерилни услови. Културата мора да расте во стерилни затворени садови како експлантанти на хранлива подлога во која се додаваат шеќер и други хранливи состојки кои се стерилизираат. Исто така, пренесувањето и сечењето на растенијата се одвива во стерилни услови.

Рачната манипулација сè уште е база во оваа индустрија: ткивата и изданоците се раздвојуваат со употреба на дисекциски инструменти и рачно се пренесуваат на подлогата или супстратот. Аклиматизацијата во заштитниот простор или на отворен простор, се врши со помош на оросување или создавање на магла во заштитниот простор.

Сепак, недостатокот во пазарот за микропропагација е автоматизацијата.

Примената на трансплантантите овозможува зголемено добивање на вегетативни садници. Според тоа, поврзувањето на микроразмножувањето со автоматските расположливи конструкции за пренесување на садниците и малите резници, сè повеќе и повеќе се развиваат и ќе продолжат и понатаму да се користат.

Може да се заклучи дека нема запирање во примената на микроразмножувањето на растенијата, вкоренувањето или постапките при преносот со кои би се ограничило производството во индустријата.

Трошоците за произведување на *in vitro* трансплантати можат да се намалат само ако се воведи и употребува автоматизација на процесот (Larcher, 2003).

2.12 Економија за микроразмножувањето

Цената на производот од микропропагацијата се одредува според: трошоците за работна рака, потрошениот материјал, производството во лабораторија и заштитен простор, платата на вработените, општите трошоци и администрацијата (Larcher, 2003).

In vitro растенијата без оглед на видот, денес на светскиот пазар се продаваат по цена од околу 0,30 долари, од кои на работна сила отпаѓа околу 40%, на потрошен материјал 10%, на општи трошоци 20%, а на продажни трошоци, други трошоци и администрација околу 30%. Варијабилните и општите трошоци се состојат од значајни делови на ценовникот на основните средства.

Производството на *in vitro* растенија е скап процес. Најголем дел од трошоците отпаѓаат на лабораториско работење. Апаратите трошат многу голема количина на енергија за ладење и загревање, осветлување и автоклавирање. Основната опрема во лабораторијата за култура на ткива ги вклучува варијабилните трошоци и фиксните трошоци. Вообичаената типична потреба за производство на 500 000 растенија годишно би се проценила со

вредност на опремата од околу 250 000 долари и некои додатни месечни трошоци од околу 500 долари (Larcher, 2003).

Треба да се процени дека може да дојде до контаминација, миењето на садовите и подготовката на подлога, што исто така се додатни трошоци кои би требало да се пресметаат.

Во производниот процес кој се состои од субкултивирање, вкоренување, пренос на растението во заштитниот простор, во случај кога секоја субкултура ќе произведе четири изданоци на ден, растенијата би можеле да се произведуваат по цена од 0,17 долари. Како такви би се продавале по цена од 0,21 долар со одреден профит од работата. Во иднина може да се случи растенијата произведени во *in vitro* услови да се продаваат по многу високи цени. Главни причини за тоа се: високата цена на чинење на материјалот, намалување на стапката на мултипликација, губитоци во текот на вкоренувањето, во некои фази и намаленото работно време на работникот.

За производство на едно *in vitro* растение може да се продава најевтино 0,15 долари. Според тоа, реалната цена за производство на растителен материјал во *in vitro* услови е помеѓу 0,25 и 0,30 долари (Larcher, 2003).

2.13 Планирање на комерцијална микропропагација

2.13.1 Општи забелешки

За успешна комерцијална микропропагација важно е прецизно да се одредат задачите што треба да се направат. Секоја нова лабораторија на почетокот треба да почне да работи само со една култура, со јасно одредена причина: „Зошто токму тој вид сака да го клонира“? Откако потполно ќе се совлада постапката со првата култура, може да се почне да се работи и со втора култура.

За некои култури постојат огромен број расположливи податоци, што овозможуваат изведување на прецизна програма, а додека пак, кај оние за кои нема доволно информации, потребно е да се вклучи одредена истражувачка работа со која ќе се тестира можноста и состојбата за микропропагација. Со ова ќе се поскапи и процесот.

Овој стадиум е опишан како подготовка на производството, којшто зависи од луѓето кои работат во лабораторијата, државата, како и научните способности итн.

2.13.2 Важни параметри за комерцијално микроклонирање

Микропропагацијата на пазарот е нова индустрија, која може значајно да го измени производството на многу важни растенија.

Во светот има околу 130 ефективни лаборатории за микропропагација. Годишното производство на растенија со оваа техника е над стотици милиони растенија произведени во *in vitro* услови (Larcher, 2003).

Микропропагацијата е поврзана со истражувањето и има директни врски со производството. Преносот на технологијата е многу долг процес, па овозможува детална проверка на микрорастенијата пред да се почне нивното производство. Зависно од културата, овој период може да трае и неколку години. Во тој период можат да произлезат голем број на експериментални култури и растенија, како би било возможно лабораторијата од истражувачка фаза, преку експерименталните производи, да се преобрати во производство за пазар. Ова мора да биде заедничка работа и на менаџерот и на извршителот кој мора да биде присутен во тимот за работа. Микроразмножувањето бара трајна поврзаност со стручното лице, кој на работникот мора да му даде стручна помош во секој поглед. Оваа врска помеѓу истражувањето и производството е многу критична.

Успехот во микроразмножувањето на растенијата во широки размери секогаш зависи од постапките и управувањето со културите, како и луѓето кои работат со нив, а многу помалку на пр. е критично за хранливата подлога. Во текот на пренесувањето на технологијата, културите треба добро да се надгледуваат за да би можеле да се квантифицираат параметрите кои ќе се употребуваат во идното производство.

Во индустриското производство треба да се посвети внимание на следниве параметри: подготовка на почетните култури, површината на клима комората, потребите за хранлива подлога, стаклени површини и потребна работна сила.

Сите овие наведени параметри се важни, но стапката на мултипликација е најзначајна, бидејќи ја одредува цената во производството и ја заокружува потребата за стручни работници кои ќе управуваат со културите.

Работниците запишуваат белешки со кои точно би можеле да ја одредат стапката на мултипликацијата и да ја споредат со очекуваните резултати. Запишувањето на податоците е важно, бидејќи со тоа се води евиденција за сите култури кои се одгледуваат и произведуваат во лабораторијата. Организаторот на производството треба да има такви податоци со кои би можел брзо да реагира со секое отстапување од замислените планови и со тоа да го намалува или зголемува производството.

За културата е важно правилно да се култивира во циклусите кои се оптимални за одредената култура.

Квалитетот на културата подеднакво е важен како и количината на добиениот материјал, а најмногу зависи од работата со материјалот. Затоа, извршителите мора да бидат добро обучени и стручни за да ги препознаваат квалитетните карактеристики. Тие треба да се мотивираат за одржување на квалитетот односно, во текот на работата треба да се запазат следниве проблеми: асинхронизиран развој на културата, хронична контаминација, вкоренување *in vitro* и *ex vitro*, варијации во микрокултурите, интеграција на микропропагацијата и индексирање на болестите (Larcher, 2003).

2.14 Организација на пазарот

Факт е дека побарувачката за *in vitro* културите сè повеќе се зголемува, а со тоа се зголемува и бројот на лабораториите за микропропагација. Овие регенеранти (растенија од лабораторија) со сигурност нудат некои предности од конвенционалните култури и тоа: здрави елитни растенија од различни вариетети, зголемена разгранетост, порано цветање, компактен облик на растот, или пак некое друго посакувано морфолошко својство. Растенијата од лабораторија можат да осигурат независност од надворешните услови и со тоа да го зголемат производството на материјалот. Кога ќе се појави нов вариетет или морфотип, а за него не постои друг начин на размножување освен микропропагацијата, неговата пазарна вредност се зголемува. Таков пример е герберот и неговите вариетети кои се произведуваат во *in vitro* услови, кои можат да бидат многу скапи ако се размножуваат со семе и без разлика на бојата на цветот, не можат да се опрашуваат на класичниот начин (Larcher, 2003).

Културите коишто можат да се произведат денес се оние кои можат да поднесат цена од 0,25 до 0,30 долари по растение. Повеќето растенија кои се размножуваат на овој начин се некои лиснати и украсни растенија. Некои од јагодестите и овошните култури исто така, кај некои одредени фази се размножуваат на овој начин. Иако тие се произведуваат во *in vitro* услови, нивната годишна биомаса би било тешко да се споредува со биомасата на растенијата кои се одгледуваат на поле.

Кога цената на растенијата одгледувани на отворен простор е многу ниска, култура на ткива се применува само: а) за воспоставување на здрави матичници кои се без патогени микроорганизми, б) кога се размножува родителскиот матичник за производство на хибридно семе, в) за добивање на посебни и единствени различни производи или г) за истражување на разновидни подрачја.

Компирот е пример за културно растение кое почнува да ја пополнува празнината помеѓу хортикултурните и земјоделските култури за примена на култура на ткива. Компирот се размножува вегетативно, односно преку тубери. Го напаѓаат многу болести кои можат да се прошират и на семенскиот материјал и затоа семенскиот компир мора да задоволува одредени високи здравствени стандарди. Критериумите за здравствените стандарди се одредуваат според норми предвидени со одредени државни регулативи. Применувањето на култура на ткива за добивање на индустриски семенски компир започнува со употребата на меристем, заради добивање на почетен материјал без присуство на вируси. Денес *in vitro* техниката се применува масовно за производство на матичници за семенски компир и е широко распространета низ светот (Larcher, 2003).

Автоматизацијата во процесите во култура на ткива несомнено се приближува и развива. Многу од автоматизираните системи кои се

употребуваат во денешно време можат да произведат 10 - 15 милиони единки годишно.

Кај полуавтоматскиот и потполно автоматскиот систем сè уште има потреба од човечка работа, па во иднина околу микропропагацијата треба да се размислува за потполно отсуство на работна рака, како би се олеснило прилагодувањето на механизацијата.

За да би се постигнала автоматизација во *in vitro* услови треба да има блиска соработка помеѓу растителните физиолози, специјалистите од лабораторијата и условите во заштитниот простор кои зависат од конструкциите на инженерите.

Соматската ембриогенеза има најдобра перспектива за автоматизацијата, на пример, растот на ембрионите во биоректори е поврзан со успешна енкапсулација, со кое се добива синтетичко семе.

Синтетичкото семе потенцијално ветува намалување на цената за помалку од 0,1 цент по единица. Но сепак, ова подрачје сè уште е во почетна фаза на истражување (Larcher, 2003).

2.15 Досегашни истражувања за примена на *in vitro* техниките кај компирот

Badoni и Chauhan (2009) извршиле испитување на ефектот на регулаторите на растот врз развојот на меристемските клетки и мултипликацијата *in vitro* на генотипот компир *kufri himalini*. Меристемските клетки биле засеани на подлога Murashige и Skoog (MS), а подлогата била дополнета со различни хормонални комбинации на GA₃, KIN и NAA. После одреден временски период резултатите покажале дека помалата концентрација на ауксин и гиберелинска киселина е најдобра за потполен развој на експлантантите и мултипликацијата на меристемските клетки.

Imani и сор. (2010) го испитувале ефектот на различни концентрации на BAP и јаглехидратот врз компир во *in vitro* услови. Експлантантите биле засеани на MS подлога со 8 g/L агар и различни концентрации на шеќер (0, 60 и 80 g/L) и BAP (0, 12, 15 и 18 g/L). Резултатите покажале дека комбинацијата со концентрација на шеќер 60 g/L и концентрацијата на BAP 15 g/L е најдобра за добивање на максимален број на микротубери.

Според истражувањата на Nistor и сор. (2010), генотипот на компирот во *in vitro* услови има позитивно влијание за добивање на микротубери. Во нивното истражување тие воочиле дека најпрво треба да се има здрав материјал за добивање на микротуберизација во лабораторија, со тоа што кога тој здрав материјал ќе се засеа на подлога, ќе се добијат исто така, здрави регенерирани микротубери.

Kianmehr и сор. (2012) од Земјоделскиот факултет во Машхад, Иран го проучувале влијанието на регулаторите на порастот врз растенијата во *in vitro* услови во текот на создавање на микротубери. Целта на нивното истражување било секундарното влијание на регулаторите на пораст како СО-кумарин

(coumarin), PTZ-паклобутразол (paclobutrazol), TDZ-тидиазурон (thidiazuron) и ЕТ-етефон (ethephon) врз 4 различни генотипови на компир за индуцирање на микротубери. Резултатите покажале дека најдобри ефекти за индуцирање на микротубери дава ЕТ.

Од анализите на Zakaria и сор. (2008), бензел-аденин-пурин во комбинација со хлор-холин-хлорид во различни концентрации во *in vitro* услови влијае одлично врз генотипот компир *diamant*. Најдобри резултати, односно добивање на микротубери се покажало во комбинација на 10 mg/L BAP и 500 mg/L CCC.

Prematilake и Mendis (1997) при истражувањето добиле резултати според кои сите генотипови на компир, врз кои се вршело испитувањето во *in vitro* услови индуцирале микротубери со големини 2 - 8 mm и со тежина од 0,03 – 0,28 g по тубер.

Uranbey и сор. (2004) реферирале дека и температурата и гел агенсот влијаат врз индуцирање на микротубери. Резултати се добиле кога културите на компир *in vitro* се одржувале на 20-22⁰C на темно. Освен ова, се воочило дека бројот на микротуберите се зголемува, како и нивната просечна тежина со примена на гел агенсот во подлогата, во споредба со агарот, кога се користи како желатинирање.

За добивање на микротубери влијание имаат многу фактори и тоа: надворешни фактори (температура, светлина, топлина), видот на подлогата, содржината на подлогата, генотипот, експлантантите кои се користат за туберизација, односно нивната физиолошка зрелост и ефектот на регулаторите на пораст (Dobranszki, 2008).

Noque (2010) вршел испитување на *in vitro* туберизација на компир, со цел добивање на голем број безвирусни тубери. MS подлогата со 4 mg/L KIN се покажала како една од подобрите за регенерација на изданоците и формирање на микротубери. Помеѓу три различни експлантанти (нодален сегмент, апикален врв и изданок), нодалниот сегмент се покажал како најдобар, односно како експлантант со кој најбрзо се добиваат микротубери со добра просечна тежина.

Од проучувањата на Motallebi-Azar и Kazemian (2012) може да се оцени влијанието на алкохолните шеќери врз микротуберизацијата на компирот. При испитувањето се користеле различни концентрации од манитол и сорбитол и после 5 недели инкубација на темно се добиле микротубери. Проучувањето покажало дека повлијателен алкохолен шеќер за добивање на микротубери е манитолот.

Уште во 1962 година, Murashige и Skoog за потребите за култивирање на калуси од тутун користеле минерален раствор кој до денес е најчесто користен за приготвување на хранливи подлоги за *in vitro* култури, а по иницијалите на авторите популарно е познат како MS минерален раствор.

Според Gopal (1998) за добивање на микротуберизација може да се користи MS подлога со 10 mg/L BAP и 7 g/L агар со додатни 80 g/L сахароза. Со

додавањето на BAP и сахарозата дошле до заклучок дека формирањето на микротуберите се зголемило и било многу поефективно.

Yousef и Suwwan (1996) користеле MS подлога со различни концентрации на BAP 1; 2; 5; 10 mg/L во комбинација со 0,1 и 0,5 mg/L NAA и 20; 40; 80; 100 g/L сахароза на која се засадувале 'ртулци од генотипот *spunta*. Подобри резултати покажала MS подлогата со 2 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA за пролиферација на аксиларните пупки; за добивање на микротубери – MS + 2 mg/L BAP и 40 g/L сахароза; за тежина и растење на микротуберите 80 g/L сахароза со 1 mg/L BAP.

Во 2010 година Aslam и Iqbal ги објавуваат резултатите од влијанието на цитокининот и сахарозата врз *in vitro* туберизацијата на два генотипови на компир *diamant* и *red norland*. Ги засадувале 'ртулците на MS подлога со BAP или KIN (во разни концентрации од 2-4 mg/L + 40; 60; 80; 100; 120 g/L сахароза. Подобри резултати дал генотипот *diamant* кој на подлога со 40 g/L сахароза се постигнало добивање на најголем број микротубери, а со 80 g/L сахароза се постигнало микротуберизација за 20-30 дена.

Husein и сор. (2006) покажува дека генотипот *cardinal*, засаден на подлоги со различни концентрации на MS + 0-4 mg/L BAP (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L) и плус 30; 60; 90; 120 g/L сахароза, дал најдобри резултати на подлога со 90 g/L сахароза. На подлога со 30 g/L сахароза се добиле здрави 'ртулци, но не дошло до формирање на тубери (ниското ниво на сахароза било одговорно за вегетативниот раст на културите *in vitro*.)

Hannapel и сор. (1985) правеле испитување на влијанието на гиберелинската киселина врз формирањето на микротубери *in vitro*. При ова испитување заклучиле дека GA₃ има огромно влијание за растење и развивање на тубери *in vitro*, односно влијае за настанување на микротуберизација.

Saha и сор. (2013) го реферирале влијанието на различните концентрации на шеќер врз микротуберизацијата, како и влијанието на различната подлога врз иницирање на микротубери од компир. Како најдобра концентрација на шеќер за иницирање на микротубери се покажала онаа подлога која имала 10% сахароза.

Според анализите на Altindal (2010) големо влијание врз развојот на микротуберизацијата во *in vitro* услови на компирот имаат јаглехидратите. Користел различни концентрации на сахароза и малтоза (2, 4, 6, 8, 10, 12 %) на два генотипови компир *agria* и *justin*. Од анализите се покажале резултати кај генотипот *agria* доколку во подлогата има 6% на сахароза, а кај генотипот *justin* доколку има 4% малтоза.

Escalante и Langille (1995) ја докажале улогата на регулаторите на пораст за добивање на *in vitro* туберизација на компир. Заклучиле дека гиберелинската киселина има огромно влијание при создавање на микротубери *in vitro*.

Според истражувањата на Xu и сор. (1998) кои ја испитувале улогата на гиберелинската киселина, абсцизинската киселина и сахарозата во регулацијата на формирање на тубери *in vitro* кај компирот, дошле до заклучок дека GA₃ се покажала како еден од подобрите фитохормони додека траела

туберизацијата кај компирот. Од крајните резултати се идентификувало дека GA₃ е доминантен регулатор при формирањето на туберите, ABA ја стимулира туберизацијата, а сахарозата го регулира формирањето на микротуберите.

Gibson (2004) го покажува влијанието на шеќерите и фитохормоните во процесот на микротуберизацијата. При истражувањето дошла до заклучок дека колку поголема концентрација на шеќер се користи при испитување, толку подобро се добиваат микротубери. Исто така, за иницирање на микротуберизацијата како најдобар фитохормон при нејзиното истражување се покажала абсцизинската киселина.

Gopal и Chamail (2004) го испитувале иницирањето на микротуберизацијата под влијание на подлогата и фитохормонот ABA. Како поволна подлога се покажала MS + 2 mg/L BAP + 8 mg/L ABA во присуство на сахароза (60 и 80 g/L). Со помош на високиот процент на сахароза имало одлични резултати како: добра биомаса, добивање на микротубери како и зголемен процент на суви материи.

Микротуберите се одликуваат со мала големина и тежина и поради тоа се помалку подложни на инфекции. Нивното складирање и транспорт се полесни во споредба со конвенционално добиените тубери (Kef и сор., 2000; Kanwal и сор., 2006).

Микротуберизацијата кај компирот (*Solanum tuberosum* L.) е сложен развоен процес, кој е под влијание на фотопериод (Seabrook и сор., 1993), температурата (Leclerc и сор., 1994), извори на јаглехидрати (Simko, 1994), неорганска исхрана (Sarkar и Naik, 1998), па дури и физиолошката возраст на матичниот тубер (Villafranca и сор., 1998).

Овие фактори директно или индиректно влијаат врз формирањето на *in vitro* микротубери, со регулирање на ефектите од примената на егзогените супстанции за раст или пак со ендогени промени во хормоналниот баланс (Ewing и Struik, 1992).

Ефектот на јаглехидратите, сепак е повлијателен во споредба со другите фактори за иницирање на микротубери. Во текот на последните две децении се направени неколку обиди за да се развијат методи во микротуберизацијата без употреба на хормони (Yu и сор., 2000).

Dodds и сор. (1992) утврдиле дека оптималната концентрација на сахароза за иницирање на микротубери се движи од 60 до 80 g/L. Повисока или пониска концентрација на шеќер во медиумот доведува до намалување на туберизацијата и добивање на помали тубери (Yu и сор., 2000).

Соодветниот јаглехидрат во медиумот е потребен за исхрана на изданоците, но вишокот на сахароза може да се конвертира во скроб за развој на микротуберите (Yu и сор., 2000).

Економска употреба на микротуберите е возможна, ако стапката на *in vitro* туберизацијата е висока и сигурна (барем еден микротубер на експлантант или пак повеќе) и ако развиеноста на добиените микротубери е задоволително голема. Микротуберите со големина од 2 mm можат да се користат за пропација, додека пак, микротуберите поголеми од 4 mm се погодни за

подолго чување. Потребно е да се работи на зголемување на димензиите на микротуберите, бидејќи колку е поголем микротуберот, толку е помала загубата за време на складирањето (Tabog и сор., 1999). Исто така, таквите тубери имаат подобар почетен развој, подобар изглед и подобара пролиферација (Wiersema и сор., 1987; Ranalli и сор., 1994).

Освен тоа што микротуберите се користат како пропагациски материјал, се корисни и во други примени како на пример за: чување и размена на гермплазмата или како експериментални истражувачки алатки во областа на метаболизмот на растенијата; евалуација и селекција на гермплазмата; трансформација и соматска хибридизација, како и за *in vitro* селекција при избор на важни агрономски карактеристики како што се зрелоста, толеранција на абиотските стресови и др. (Lentini и Earle, 1991; Gopal и Minocha, 1998).

Во конвенционалните системи, главно семенските тубери на компирот се користат за размножување и за производство (Struik и Wiersema, 1999). За да може да се одгледува компир секоја година потребен е семенски компир кој ќе ги задоволува потребите за садење (Lomme, 1995; Struik и Wiersema, 1999). За да се зголеми квалитетот на семенскиот компир, потребно е да се има безвирусни тестирани тубери на компир, со цел да се постигне регуларно и константно производство на почетен материјал за семенски компир (Zobayed и сор., 2001). Денеска сè повеќе се обрнува внимание на микропропагацијата, техника која служи за добивање на генерација на тубери кои се безвирусни и можат да се користат за размножување. (Jones, 1988; Struik и Wiersema, 1999).

In vitro културите се произведуваат за да можат да се користат за брзо размножување (*in vitro*), микротуберизација (*in vitro*), како и производство на минутубери (во стакленици, оранжерии) (Struik и Lommen, 1990).

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Цел на истражувањето беше поставување на култура на почетни експлантанти од 'ртулци на повеќе генотипови на семенски компир: *agria*, *marabel*, *dido*, *ambition*, *agriko*, како и генотипови на меркантилен компир и тоа: *agria SR*, *agria BE*, *andrea* во *in vitro* услови. Во текот на истражувањето следен е развојот на експлантантите и степенот на органогенеза на различните експлантанти на различни хормонални подлоги.

Потенцијалот за регенерација во *in vitro* услови на почетните експлантанти е одредуван со пресметување на бројот на *de novo* изданоци, како и пресметување на процентот на вкоренување и процентот на 'ртливост.

Главна цел на ова истражување е добивање на тубери во *in vitro* услови, односно испитување на најпогодните услови за добивање на микротуберизација.

Со ова истражување се покажа дека може да се постигне микротуберизација во *in vitro* услови со соодвентна комбинација и концентрација на регулаторите на раст и сахароза на MS медиум.

Испитувано е и влијанието на фитохормонот гиберелинска киселина GA₃ врз формирањето на 'ртулци во *in vivo* услови, како и влијанието на фитохормоните на индукција на микротуберизација во услови *in vitro* на неколку генотипови на семенски и меркантилен компир (*Solanum tuberosum* L.).

Експериментите во *in vitro* услови беа поставени со два типа на експлантанти 'ртулци и нодии, на MS (Murashige & Skoog) медиум во присуство на неколку различни комбинации и концентрации на цитокинини и ауксини. Микротуберизацијата беше стимулирана со зголемување на процентот на шеќер во MS медиумот од 30 g/L сахароза на 40, 60 и 90 g/L сахароза.

Целокупната лабораториска работа во ова истражување е изведувана на Катедрата за растителна биотехнологија при Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип, во Лабораторијата за растителна биотехнологија, која е лоцирана во Наставниот центар - Струмица.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

4.1 Основни карактеристики на испитуваните генотипови на компир

Како почетен материјал за лабораториската работа, која се изведуваше во текот на двегодишните истражувања 2013-2014 година, беа користени повеќе генотипови на компир и тоа:

- семенски компир (*agria*, *dido*, *marabel*, *ambition*, *agriko*) и
- меркантилен компир (*agria SR*, *agria BE*, *andrea*)

Целата работа на експериментот беше вршена во лабораторијата за растителна биотехнологија, на Катедрата за растителна биотехнологија при Универзитетот „Гоце Делчев“ во Струмица.

Генотипот *agria* се вбројува во средно доцните генотипови. Овој генотип е добиен како резултат на вкрстување на генотиповите *quarta* x *semlo*. Туберите му се крупни, овално-издолжени; имаат жолта покожица, а месото им е темножолто; окцата им се плитки. Тој е високо приносен генотип, погоден за преработувачката индустрија како за помфрит, чипс итн. Има висок процент на суви материи; цветот има бела боја. Има средна осетливост на пламеницата на листот, а слаба осетливост на пламеницата на кртолите.

За експериментот користевме семенски и меркантилен компир. Дел од користениот меркантилен компир е произведен во регионот на Струмица (*agria SR*), а дел е произведен во регионот на Берово (*agria BE*).

Генотипот *ambition* е средно ран генотип кој е добиен како резултат на вкрстување на генотиповите *adora* x *quinta*. Овој генотип е високо приносен, има светложолта покожица, исто така и месото му е светложолто. Има големи, долги, овални тубери со плитки окца. Содржи нормален процент на суви материи. Отпорен е на патогените видови од родот *Erwinia* и *Fusarium*, но е доста осетлив на краставоста на туберите.

Генотипот *dido* е средно-ран генотип, високоприносен, погоден како за свежа консумација, така и за помфрит. Туберите се издолжени со жолта покожица и кремасто-жолто месо; има плитки окца. Негови родители се *linea* x *agria*. Содржината на суви материи изнесува: 19,7%.

Генотипот *marabel* е ран генотип, високоприносен. Туберите се со овална форма, имаат мазна, тенка жолтеникава покожица, месото им е жолто и имаат плитки окца. Отпорен е на пламеницата, на црната дамкавост, на *Rhizoctonia*, како и на краставост.

Генотипот *andrea* е средно ран генотип, високоприносен. Туберите се издолжени, имаат жолта покожица, тенка. Месото им е жолто и имаат плитки окца. Овој генотип е еден од најбараните генотипови на компир за консумирање во исхраната. Отпорен е на краставост и на пламеница.

4.2 Третирање на компир со GA_3 во *in vivo* услови за продукција на 'ртулци

За стимулирање на продукција на 'ртулци најпрво компирот се оставаше да про'рти на суво и темно место. Туберите од секој генотип беа третирани со гиберелинска киселина (GA_3), бидејќи со помош на овој фитохормон се стимулира побрзо никнење на самите 'ртулци на површината на кртолите на компирот. Третманот се изведуваше со три различни концентрации и тоа: со 2 ppm GA_3 , 12 ppm GA_3 и 22 ppm GA_3 , а дел од компирот се оставаше нетретиран, како контрола (слика 8).

Откако 'ртулците достигнуваат големина некаде околу 0,5 до 1 cm, се отстрануваат од про'ртениот компир. Потоа компирот со повторен третман со GA_3 , пак се враќаше на суво и темно место, за понатамошно добивање на нови 'ртулци од истиот компир, кој ќе служи за понатамошна работа во лабораторијата.



Слика 8. Кртоли од контрола и третман со 2 ppm GA_3 од генотип *agriа*
Figure 8. Tubers from control and treatment with 2 ppm GA_3 from genotype *agriа*

4.3 Стерилизација на 'ртулците

Откако ќе се отстранат 'ртулците од туберите, се врши нивна површинска стерилизација. Постапката за стерилизација на 'ртулците како почетни експлантанти се одвиваше на следниов начин:

- најпрво 'ртулците се мијат под силен млаз вода околу 15 минути;
- потоа се поставуваат во стерилна газа и се врзуваат;
- се стерилизираат 2 минути во 70 % C_2H_5OH ;
- па 5 минути во $HgCl_2$;

- 10 минути во 1 % Izosan G,
- и на крај се промиваат 3 пати во стерилизирана вода.

Вака стерилизираните 'ртулци беа спремни за поставување како почетни експлантанти за култивирање на MS медиум.

4.4. Изолирање на почетните експлантанти

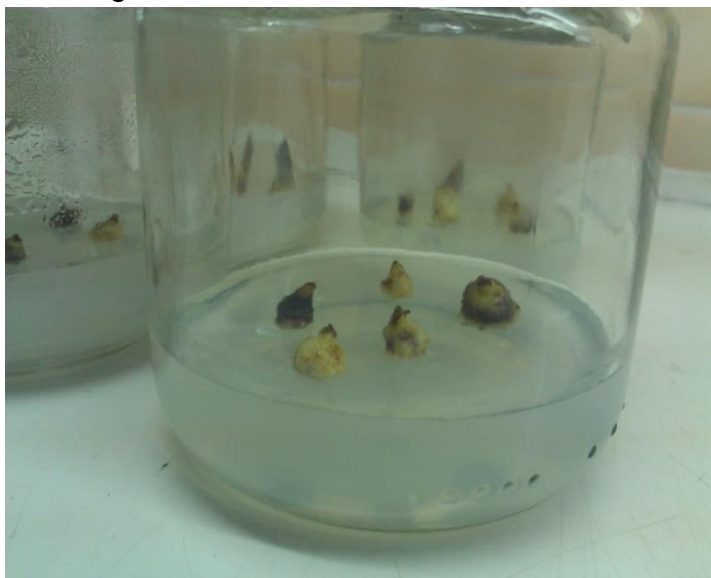
По стерилизација на 'ртулците, односно на почетните експлантанти, тие се подготвени да се постават на веќе подготвената MS подлога (Murashige и Skoog, 1962) што е тврд медиум со pH 5.8, збогатен со цитокини (слика 9). 'Ртулците со пречник од 0,5 – 1 cm беа поставени на подлога така што ја допираат со базалната страна на 'ртулецот на MS медиум со состав:

'Ртулци → MS + 4 mg/L KIN

'Ртулци → MS + 2 mg/L BAP

'Ртулци → MS + 4 mg/L BAP

'Ртулци → MS + 2 mg/L KIN



Слика 9. Поставување на 'ртулци како почетни експлантанти од генотипот *agri*a на хормонална подлога MS + 2 mg/L BAP

Figure 9. Setting sprouts as initial explants from genotype *agri*a on medium MS + 2 mg/L BAP

Почетните експлантанти почнуваат да растат и да се развиваат. По период од 4 недели тие достигнуваат големина од 3 до 5 cm. Се изолираат и се поставуваат на MS подлога, на која се додаваат потребните состојки за добивање на подобра вкоренетост (слика 10).

Нодиите од изданоците поставени на хранливата подлога за вкоренување и формирање нови изданоци по 14-15 денови се користат како експлантанти во т.н. култура на нодии.



Слика 10. Поставување на нодии во култура на подлога MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA генотип *agria BE*

Figure 10. Setting nodes in culture on medium MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA genotype *agria BE*

Културата на нодии беше поставена во ерленмаерови садови од 100 ml на MS подлога и инкубирани во клима комора во контролирани услови. MS подлогата беше подготвена со додавање на цитокинин BAP и ауксин IAA со различен процент на шеќер 30 g/L, 40 g/L, 60 g/L и 90 g/L сахароза (слика 11).

- Нодии → MS + 2 mg/L BAP + 2 mg/L IAA
- Нодии → MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAA
- Нодии → MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L IAA
- Нодии → MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L IAA



Слика 11. Поставување нодии од генотипот *agria SR* на медиум MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L IAA + 90 g/L сахароза

Figure 11. Setting nodes of genotype *agria SR* on medium MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L IAA + 90 g/L sucrose

Овие експлантанти претставуваат појдовна основа за добивање регенеранти или за создавање калусно ткиво, преку кои се одредува степенот

на органогенеза, калусогенеза, ризогенеза и микротуберизација на одредениот експлантант (слика 9,10 и 11).

Сите манипулации со експлантантите, стерилизацијата на 'ртулците, стерилизација на стакларијата, како и добивање на микротуберизација беа изведувани во стерилни услови во ламинарна комора за растителни ткива и клетки (слика 12).



Слика 12. Работа на ламинарна комора
Figure 12. Work in safety cabinet















Сите користени хранливи подлоги беа стерилизирани со автоклавирање на температура од 121°C со притисок од 121,59 kPa за време од 15-20 минути. (слика 13).



Слика 13. Стерилизација на хранливите подлоги и стакларијата во автоклав
Figure 13. Sterilization on mediums and glassware in autoclave

4.5 Состав на подлогата за култивирање на компир во услови *in vitro*

Во овие истражувања беше користен MS медиумот со следниот состав на минерален раствор (Murashige и Skoog, 1962):

 NH ₄ NO ₃	1650,00 mg/L
 KNO ₃	1900,00 mg/L
 CaCl ₂ ×2H ₂ O.....	440,00 mg/L
 MgSO ₄ ×7H ₂ O.....	370,00 mg/L
 KH ₂ PO ₄	170,00 mg/L
 Na ₂ EDTA	33,30 mg/L
 FeSO ₄ ×7H ₂ O.....	27,80 mg/L
 H ₃ BO ₃	6,20 mg/L
 MnSO ₄ ×4H ₂ O.....	22,30 mg/L
 ZnSO ₄ ×4H ₂ O.....	8,60 mg/L
 KJ.....	0,80 mg/L
 Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O.....	0,20 mg/L
 CuSO ₄ ×5H ₂ O.....	0,025 mg/L
 CoCl ₂ ×6H ₂ O.....	0,025 mg/L

Во хранливата подлога беа додадени следните органски компоненти:

- Витамин В₁ (тиамин)0,1 mg/L
- Витамин В₆ (пиридоксин)..... 1,0 mg/L
- Никотинска киселина.....0,5 mg/L
- Казеин хидролизат.....200,0 g/L
- Инозитол..... 100,0 g/L
- Сахароза.....30,0 %
- Агар-агар.....7,0 %

Од фитохормоните беа користени следните комбинации на цитокинини (KIN и BAP) со ауксин IAA:

- MS + 2 mg/L KIN
- MS + 4 mg/L KIN
- MS + 2 mg/L BAP
- MS + 4 mg/L BAP
- MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA
- MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAA + 40 g/L сахароза
- MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAA + 60 g/L сахароза
- MS + 2 mg/L BAP + 2 mg/L IAA + 30 g/L сахароза
- MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L IAA + 60 g/L сахароза
- MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L IAA + 90 g/L сахароза

4.6 Услови за одгледување на културите од компир

Ртулците од компирот беа култивирани во стаклени теглички во 20-30 ml хранлива подлога. Поставените култури беа чувани во контролирани услови клима комори и тоа:

- температура од 25°C;
- релативна влажност на воздухот од 50%;
- фотопериодизам од 16 часа светло / 8 часа темно и
- интензитет на светлина од 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Чувањето на културите на контролирани услови во клима комора е прикажано на слика 14.



Слика 14. Чување на културите во клима комора
Figure 14. Keeping of cultures in climate chamber

4.7 Статистичка обработка на податоци

Сите резултати добиени во текот на ова истражување беа статистички обработени и анализирани со статистичкиот софтвер IBM SPSS Statistics 21 (Statistical Package for the Social Sciences). Добиените средни вредности за различните испитувани параметри беа споредени со One-way ANOVA (Duncan posthoc) тест со ниво на сигнификантност од 0,05%.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 Продукција на 'ртулци со третман на GA₃ во *in vivo* услови

Продуктивноста на туберот за добивање на 'ртулци зависи од повеќе фактори и тоа: должината на денот, температурата, физиолошката зрелост на компирот, снабдување со вода, како и регулаторите на раст кај растенијата (Gregory, 1965).

Регулаторите на раст имаат важни и значителни ефекти врз плодноста на туберот и тоа е поврзано со хормоналниот биланс (Stuart и Cathey, 1961; Vreugdenhil и Struik, 2006).

За стимулација на формирањето на 'ртулци туберите беа третирани со гиберелинска киселина со 2 ppm, 12 ppm и 22 ppm, а беше поставена и контролна група на тубери која не беше третирана со гиберелинска киселина туку со дестилирана вода.

Резултатите од третманот со GA₃ кај семенскиот и меркантилниот компир се прикажани во табела 6.

Кај контролата, при продукција на 'ртулци, како најдобар генотип се покажа семенскиот генотип *marabel* и тоа со 64% формирање на 'ртулците, додека со третирање на генотиповите со 2 ppm GA₃ највисока вредност покажа семенскиот генотип *agria* со 76,93% формираност на 'ртулци.

Кај третманот со 12 ppm GA₃ најдобри резултати даде меркантилниот генотип *agria SR* со 100% формирање на 'ртулците.

Третманот на генотиповите со 22 ppm GA₃ има дадено одлични резултати кај повеќето семенски генотипови: *agria*, *dido*, *marabel*; меркантилните генотипови: *andrea*, *agria BE*, *agria SR* со 100% формираност на 'ртулци.

Според Rehman и сор. (2001) и Burton (1989) третманот на туберите со гиберелинска киселина GA₃, покажал дека туберите многу побрзо про'ртуваат и што е најважно, даваат поголем број на 'ртулци.

Третирањето на туберите со GA₃ дава одлични резултати, за разлика од оние тубери кои не се третирани со овој регулатор на растот, бидејќи 'ртењето било многу побавно и подоцна, потврдено е со истражувањата изведени од Timm и сор. (1962).

Според истражувањата на Xu и сор. (1998) кои ја испитувале улогата на гиберелинската киселина, абсцизинската киселина и сахарозата во регулацијата на формирање на тубери *in vitro* кај компирот, дошле до заклучок дека GA₃ се покажала како еден од подобрите фитохормони додека траела туберизацијата кај компирот. Од крајните резултати се идентификувало дека GA₃ е доминантен регулатор при формирањето на туберите, АВА ја стимулира туберизацијата, а сахарозата го регулира формирањето на микротуберите.

Табела 6. Ефектот на *in vivo* третманот со GA₃ во продукцијата на *de novo* 'ртулци кај семенски и меркантилен компир

Table 6. Effect of *in vivo* treatments with GA₃ for production of *de novo* sprouts in seed and mercantile potato

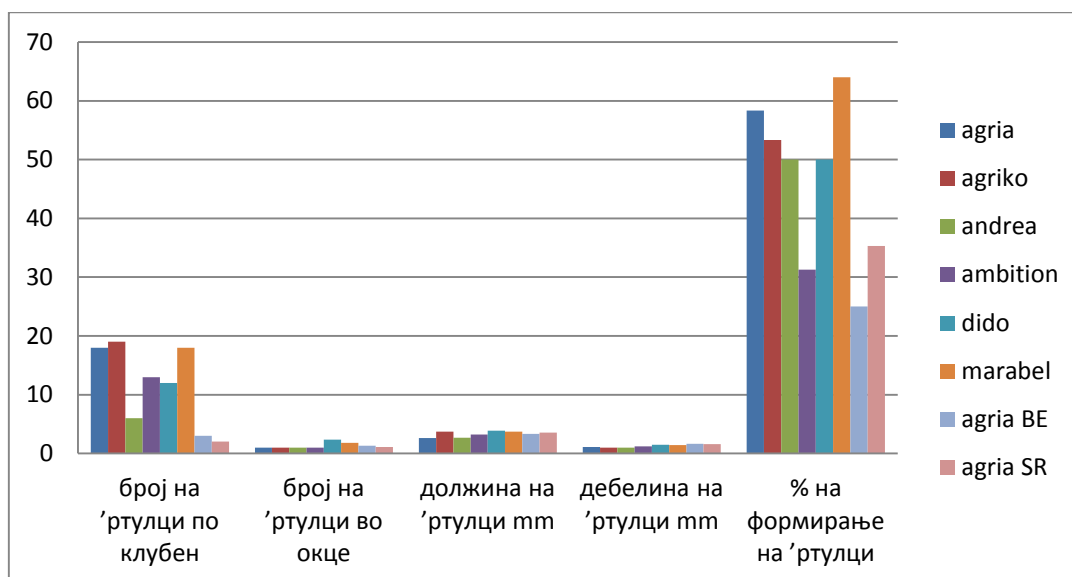
Продукција на 'ртулци / Production of sprouts						
Третирање со GA ₃ / GA ₃ treatment	Генотип / Genotype	Број на 'ртулци по клубен / Number of sprouts per tuber	Број на 'ртулци во окце / Number of sprouts per eyelet	Должина на 'ртулци / Length of sprouts (mm)	Дебелина на 'ртулци / Width of sprouts (mm)	% на формирање на 'ртулци / % of sprouts formation
Контрола / Control	<i>agria</i>	18	1,00c	2,61a	1,11bc	58,33f
	<i>agriko</i>	19	1,00c	3,73a	1,00c	53,33e
	<i>andrea</i>	6	1,00c	2,66a	1,00c	50,00d
	<i>ambition</i>	13	1,00c	3,23a	1,23bc	31,25b
	<i>dido</i>	12	2,33a	3,87a	1,50abc	50,00d
	<i>marabel</i>	18	1,83ab	3,72a	1,42abc	64,00g
	<i>agria BE</i>	3	1,33bc	3,33a	1,66ab	25,00a
	<i>agria SR</i>	2	1,00c	3,00a	2,00a	33,33c
2 ppm	<i>agria</i>	34	1,34b	2,29de	1,29b	76,93h
	<i>agriko</i>	22	1,00c	5,95a	1,86ab	73,33d
	<i>andrea</i>	10	1,20c	2,70cde	1,60ab	75,00e
	<i>ambition</i>	19	1,10c	3,53bcd	1,57ab	35,29a
	<i>dido</i>	16	2,93a	1,81e	1,66ab	76,90g
	<i>marabel</i>	28	1,96b	3,85bc	1,92ab	76,00f
	<i>agria BE</i>	8	1,12c	4,75ab	1,62ab	50,00b
	<i>agria SR</i>	5	1,20c	6,00a	2,20a	66,66c
12 ppm	<i>agria</i>	31	1,62ab	4,80b	2,03bcd	81,81d
	<i>agriko</i>	33	1,29b	4,39bc	1,75cd	73,33b
	<i>andrea</i>	12	1,57ab	2,75c	1,75cd	75,00c
	<i>ambition</i>	22	1,86ab	5,77ab	1,86ab	50,00a
	<i>dido</i>	25	1,66ab	2,72c	1,52d	91,66f
	<i>marabel</i>	33	1,92ab	5,03ab	2,45b	88,46e
	<i>agria BE</i>	12	1,60ab	4,33bc	2,16bc	75,00c
	<i>agria SR</i>	7	2,20a	6,71a	3,00a	100,00g
22 ppm	<i>agria</i>	43	1,00c	4,95bc	1,88c	100,00c
	<i>agriko</i>	38	1,05c	4,57bc	1,86c	87,50b
	<i>andrea</i>	19	1,21c	3,10c	1,89c	100,00c
	<i>ambition</i>	23	1,17c	6,52b	2,69ab	62,50a
	<i>dido</i>	29	1,96a	2,81c	1,60c	100,00c
	<i>marabel</i>	40	1,65b	9,57a	2,47b	100,00c
	<i>agria BE</i>	17	1,05c	4,58bc	3,17a	100,00c
	<i>agria SR</i>	10	1,20c	6,90b	3,10a	100,00c

Резултатите од продукција на 'ртулци кај контролата, односно нетретираните тубери со GA₃ се прикажани на слика 15.

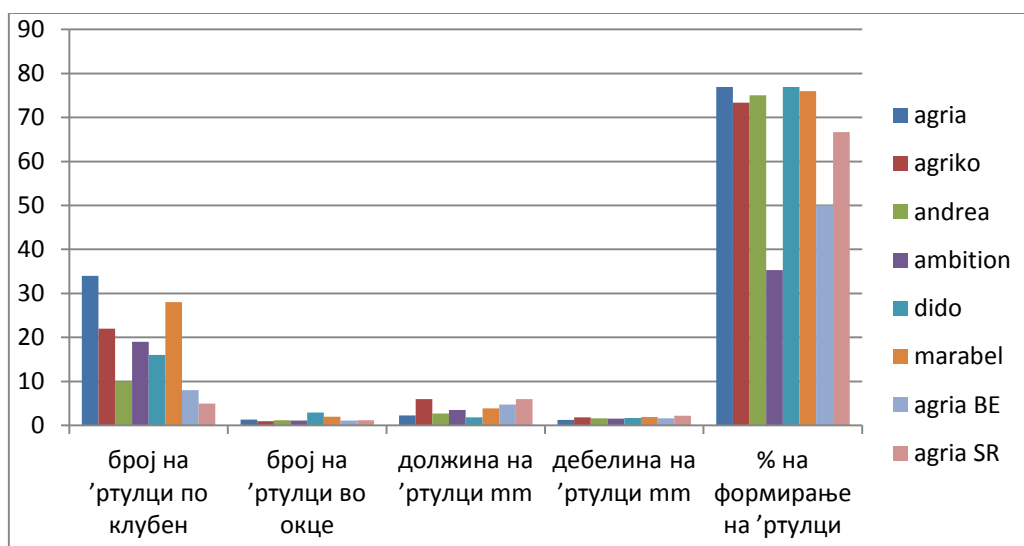
Генотипот *marabel* се одликува со највисок процент (64%) на формирани 'ртулци без третман со GA₃.

Генотипот *dido* има дадено 2,33 'ртулци во окце што претставува најдобра вредност за овој параметар и сигнификантно се разликува од бројот на 'ртулци во окце кај сите други генотипови.

Должината на формираните 'ртулци е најголема кај генотипот *dido* (3,87 mm), но без сигнификантна разлика во однос на должината на 'ртулците добиени од другите генотипови. Дебелината на 'ртулците од 2 mm е најголема кај генотипот *agria SR* и истата сигнификантно се разликува од дебелината на 'ртулците од генотиповите *agria* (1,11 mm), *agriko* (1 mm), *andrea* (1 mm) и *ambition* (1,23 mm).



Слика15. Продукција на 'ртулци на нетретирани тубери со GA₃ (контрола)
 Picture15. Production of sprouts from untreated tubers with GA₃ (control)



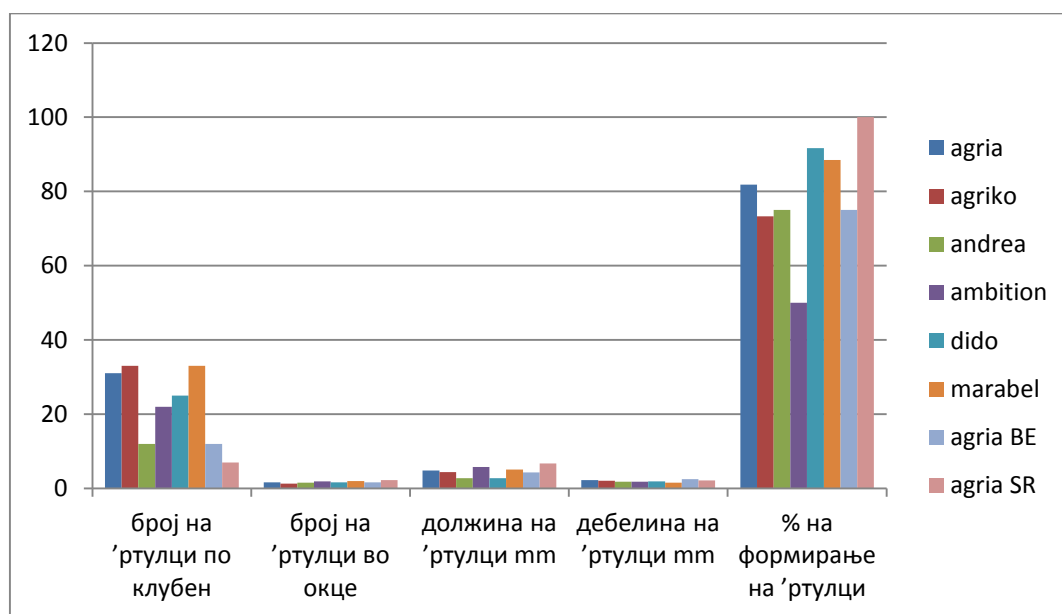
Слика 16. Продукција на 'ртулци кај тубери третирани со 2 ppm GA₃
 Figure 16. Production of sprouts from tubers treated with 2 ppm GA₃

Должината на 'ртулците е најголема кај генотипот *agria SR* (6 mm) и сигнифактно се разликува од должината на 'ртулците кај генотипот *dido* (1,81 mm) при третманот со 2 ppm GA₃.

Дебелината на 'ртулците од 2,20 mm е најголема кај генотипот *agria SR* и сигнификантно се разликува од дебелината на 'ртулците кај генотипот *agria* (1,29 mm), кога продукцијата на 'ртулци е стимулирана со 2 ppm GA₃.

При истиот третман генотипот *dido* има дадено 2,93 'ртулци во окце која претставува најдобра вредност за овој параметар и сигнификантно се разликува од бројот на 'ртулци во окце кај сите други генотипови.

Фактот дека гиберелините стимулираат продукција на 'ртулци кај компирот е истражуван и потврден од Clegg и Rappaport (1970); Claassenes и Vreugdenhill (2000).



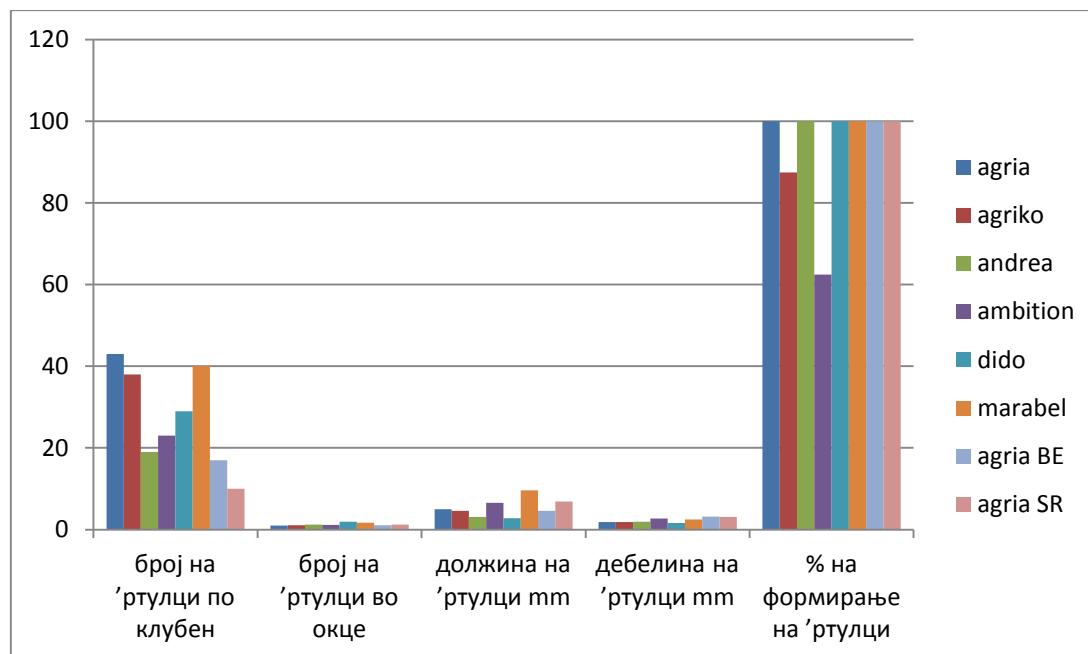
Слика 16. Продукција на 'ртулци кај тубери третирани со 12 ppm GA₃
Figure 16. Production of sprouts from tubers treated with 12 ppm GA₃

При третманот на 'ртулците со 12 ppm GA₃ забележано е:

- Кај број на 'ртулци во окце сигнификантно најдобра вредност покажа генотипот *agria SR* со 2,20 'ртулци во окце, која вредност сигнификантно се разликува од добиените вредности од другите генотипови;
- Дебелината на 'ртулците е најголема кај генотипот *agria SR* (3 mm), која е сигнификантно различна од дебелината на 'ртулците кај генотипот *dido* (1,52 mm);
- Со најмали вредности на должината на 'ртулците се одликуваат генотиповите *dido* (2,72 mm) и *andrea* (2,75 mm), што сигнификантно се разликуваат од вредноста добиена кај генотипот *agria SR* (6,71 mm).

Гиберелините имаат својство да ја прекинат латентноста на кртолите на компир (Herrera и сор., 1991). Примената на GA₃ со поголема концентрација ги

зголемува и издолжува 'ртулците. (Lorreta и соp., 1995; Marinus и Bodleander, 1987; Rappaport и соp., 1957)



Слика 18. Продукција на 'ртулци кај тубери третирани со 22 ppm GA₃
Figure 18. Production of sprouts from tubers treated with 22 ppm GA₃

При третманот со 22 ppm GA₃ најдолги 'ртулци има генотипот *marabel* со 9,57 mm, кој сигнификантно се разликува од добиените вредности кај генотиповите *dido* (2,81 mm) и *andrea* (3,10 mm).

Генотиповите при третирање со 22 ppm GA₃ со најдобри вредности се одликуваат *agriа BE* (3,17 mm) и *agriа SR* (3,10 mm) кои сигнификантно се разликуваат од вредностите на другите генотипови.

Со истиот третман генотипот *dido* има дадено 1,96 'ртулци во окце што сигнификантно се разликува од бројот на добиени 'ртулци во окце кај сите други генотипови.

5.2 Култура на 'ртулци како почетни експлантанти

Откако ќе се добијат 'ртулци од туберите на компир, стимулирани со третманот од GA₃, тие се отстрануваат од компирот и како такви претставуваат почетни експлантанти за поставување на *in vitro* култура во лабораториски услови.

'Ртулците се основата на поставениот експеримент, од каде се почнува целосното истражување. Овие почетни експлантанти, претходно површински беа стерилизирани (описано во поглавје 4.3), а потоа се поставуваат на различни MS медиуми со различни концентрации на цитокинини.

Табела 7. Формирање на изданоци кај почетните експлантанти

Table 7. Shoot formation from initial explants

Почетни експлантанти – 'ртулци/ Initial explants – sprouts						Формирање на изданоци / Shoot formation			
Генотипот / Genotype	MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Должина / Lentgh (mm)	Дебелина / Thickness (mm)	% на 'ртење / % of germination	Должина / Lentgh (mm)	Дебелина / Thickness (mm)	Бр на изданоци / Number of shoots	% на формирање на изданоци / % of forming shoots
<i>Семенски компир / Seed potato</i>									
<i>dido</i>	2 BAP	25	10,80b	2,06bc	100	30,00a	1,00a	17	80,95a
<i>marabel</i>	2 BAP	36	13,52a	1,62c	100	18,68b	1,18a	16	86,66a
<i>agriko</i>	4 KIN	57	9,98b	1,22c	100	/	/	/	/
<i>dido</i>	4 KIN	24	8,91b	2,29a	100	/	/	/	/
<i>marabel</i>	4 KIN	38	15,15a	1,80b	100	/	/	/	/
<i>Меркантилен компир / Mercantile potato</i>									
<i>agria SR</i>	4 KIN	24	7,62c	1,70b	100	/	/	/	/
<i>agria SR</i>	2 BAP	19	6,63c	3,89a	100	27,65a	1,01a	20	82,50a
<i>agria BE</i>	2 BAP	46	3,73d	2,29b	100	22,31ab	1,10a	44	69,41b

Табела 8. Формирање на корени кај почетните експлантанти

Table 8. Root formation from initial explants

Почетни експлантанти – 'ртулци / Initial explants – sprouts						Формирање на корени / Root formation		
Генотип / Genotype	MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Должина / Lentgh (mm)	Дебелина / Thickness (mm)	% на 'ртење / % of germination	Број на корени / Number of roots	Должина / Lentgh (mm)	% на вкоренување / % of rooting
<i>Семенски компир / Seed potato</i>								
<i>dido</i>	2 BAP	25	10,80b	2,06bc	100	17	8,00ab	15,00a
<i>marabel</i>	2 BAP	36	13,52a	1,62c	100	16	2,00a	15,00a
<i>agriko</i>	4 KIN	57	9,98b	1,22c	100	/	/	/
<i>dido</i>	4 KIN	24	8,91b	2,29a	100	/	/	/
<i>marabel</i>	4 KIN	38	15,15a	1,80b	100	/	/	/
<i>Меркантилен компир / Mercantile potato</i>								
<i>agria SR</i>	4 KIN	24	7,62c	1,70b	100	/	/	/
<i>agria SR</i>	2 BAP	19	6,63c	3,89a	100	2	3,50b	29,58a
<i>agria BE</i>	2 BAP	46	3,73d	2,29b	100	14	8,00ab	30,03a

5.2.1 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 4 mg/L KIN

Во табела 7 и табела 8 се претставени резултатите од почетните експлантанти поставени на медиум MS + 4 mg/L KIN. На оваа подлога беа поставени почетните експлантанти од меркантилниот генотип *agria SR*, како и семенските генотипови *dido*, *agriko* и *marabel*.

На оваа подлога најдолги експлантанти има семенскиот генотип *marabel* (15,15 mm) што е сигнификантно различно од меркантилниот генотип *agria SR* (7,62 mm). Најдебели 'ртулци покажа генотипот *dido* (2,29 mm), а додека пак најтенки 'ртулци покажа генотипот *agriko* (1,22 mm).

5.2.2 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 2 mg/L BAP

На MS медиум во кој имаше додадено и 2 mg/L BAP беа поставени почетните експлантанти од меркантилните генотипови *agria BE* и *agria SR*, како и експлантантите од семенските генотипови *dido* и *marabel* (табела 7 и табела 8).

Статистичка значајна разлика се јавува кај должина на експлантант, каде експлантантите од генотипот *marabel* се најдолги (13,52 mm), во споредба со генотипот *agria BE* кој се одликува со најмала вредност (3,73 mm).

Дебелината на експлантант од 3,89 mm е најголема кај генотипот *agria SR* и сигнификантно се разликува од дебелината на експлантантите кај генотипот *marabel* (1,62 mm).

5.3 Култура на изданоци

Во текот на истражувањето почетните експлантанти – 'ртулците понатаму се префрлуваат (пасажираат) на нова хранлива подлога, односно на нов свеж медиум со нов хормонален состав. Овие експлантанти пасажирани на нов свеж медиум ги нарекуваме изданоци.

Првото пасажирање на изданоците беше направено на нов медиум збогатен со цитокинини и ауксини.

Комбинацијата од цитокинин и ауксин била многу ефективна за зголемување на органогенезата во *in vitro* услови кај различни генотипови компир (Koleva Gudeva и сор., 2012).

5.3.1 Индуција на калуси во култура на изданоци

Во поново време се користат многу синтетички ауксини и цитокинини за добивање на недиференцирано калусно ткиво, што наоѓа голема примена кај културите *in vitro* и кај културите кои се размножуваат генеративно (Grbic и сор., 2007; Grbic, 2007).

Од табела 9 може да се воочи дека генотиповите *dido* (30 mm) и *agria SR* (27,65 mm) имаат должина на изданоците сигнификантно поголема од должината на изданоците кај генотипот *marabel* (18,68 mm).

А додека пак за дебелина на изданок кај испитуваните генотипови се покажа дека нема сигнификантна разлика кај добиените вредности.

Во табела 9 и слика 19 се прикажани резултатите од формирање на калус кај генотиповите меркантилен компир *agria BE* и *agria SR* и семенскиот *dido* и *marabel*.

Табела 9. Формирање на калуси кај култура на изданоци

Table 9. Formation of callus – shoot explants

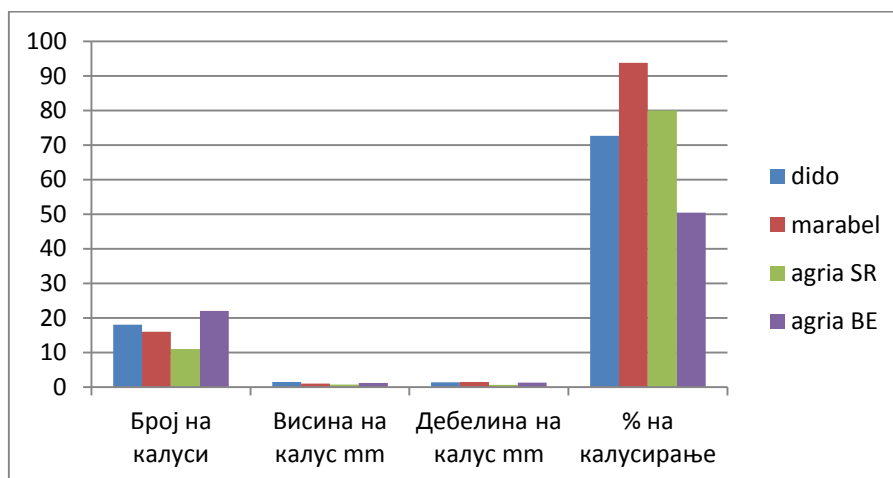
Култура на изданоци / Shoot explants					Формирање на калуси / Formation of callus			
Генотип / Genotype	MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на изданоци / Number of	Должина на изданок / Length of shoot (mm)	Дебелина на изданок / Thickness of shoots (mm)	Висина на калус / Height of callus (mm)	Дебелина на калус / Thickness of callus (mm)	Број на калуси / Number of callus	% на калусирање / % of callusing
<i>Семенски компир / Seed potato</i>								
<i>Dido</i>	2 BAP + 1 IAA	17	30,00a	1,00a	1,45a	1,38a	18	72,61ab
<i>Marabel</i>	2 BAP + 1 IAA	16	18,68b	1,18a	0,94b	1,43a	16	93,75a
<i>Меркантилен компир / Mercantile potato</i>								
<i>agria BE</i>	2 BAP + 1 IAA	44	22,31ab	1,0a	1,18ab	1,25a	22	50,44b
<i>agria SR</i>	2 BAP + 1 IAA	20	27,65a	1,01a	0,71b	0,59b	11	80,00ab

Генотипот *agria BE* (22) формираше најмногу калуси, за разлика од другите генотипови: *agria SR* (11), *marabel* (16) и *dido* (18).

Највисок калус од 1,45 mm има генотипот *dido*, која вредност сигнификантно се разликува од висината на калусите кај генотиповите *marabel* (0,94 mm) и *agria SR* (0,71 mm).

Генотипот *agria SR* (0,59 mm) кај дебелина на калус покажа статистичка најмала вредност во однос на вредностите кај другите генотипови: *agria BE* (1,25 mm), *marabel* (1,43 mm) и *dido* (1,38 mm).

Генотипот *agria BE* (50,44%) има најмал процент на калусирање, кој сигнификантно е помал од процентот на калусирање кај генотипот *marabel* (93,75%).



Слика 19. Формирање на калуси на медиум MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA

Figure 19. Formation of callus on medium MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA

5.3.2 Индукција на корени во култура на изданоци

Резултатите од процентот на вкоренување во култура на изданоци се прикажани во табела 10 (слика 21).

Кај генотиповите *marabel* и *agria SR* се оформиле најмал број на корени (по 2 на изданок), за разлика кај генотиповите *dido* кој има 8 корени, а кај генотипот *agria BE* има 14 корени по изданок (слика 20).

Со најдолги корени се одликуваат изданоците од генотиповите *marabel* и *dido* (15,00 mm) што е сигнификантно поголема вредност од 3,50 mm кај генотипот *agria SR*.

Кај процентот на вкоренување нема сигнификантни разлики во вредностите кај сите испитувани генотипови: *marabel* (31,25%), *agria BE* (30,03%), *agria SR* (29,58%) и *dido* (26,90%).

Табела 10. Формирање на корени кај култура на изданоци

Table 10. Formation of roots – shoot explants

Култура на изданоци / Shoot explants					Формирање на корени / Formation of roots			
Генотип / Variety	MS медиум / MS medium (mg/L)	Број на изданоци / Number of shoots	Должина на изданок / Length of shoot (mm)	Дебелина на изданок / Thickness of shoots (mm)	Број на изданоци кои се вкорениле / Number of shoots which formed roots	Број на корени / Number of roots	Должина на корен / Length of root (mm)	% на вкоренување / % of rooting
<i>Семенски компир / Seed potato</i>								
<i>dido</i>	2 BAP + 1 IAA	17	30,00a	1,00a	4,50	8	15,00a	26,90a
<i>marabel</i>	2 BAP + 1 IAA	16	18,68b	1,18a	5,00	2	15,00a	31,25a
<i>Меркантилен компир / Mercantile potato</i>								
<i>agria BE</i>	2 BAP + 1 IAA	44	22,31ab	1,10a	13,21	14	8,00ab	30,03a
<i>agria SR</i>	2 BAP + 1 IAA	20	27,65a	1,01a	5,91	2	3,50b	29,58a



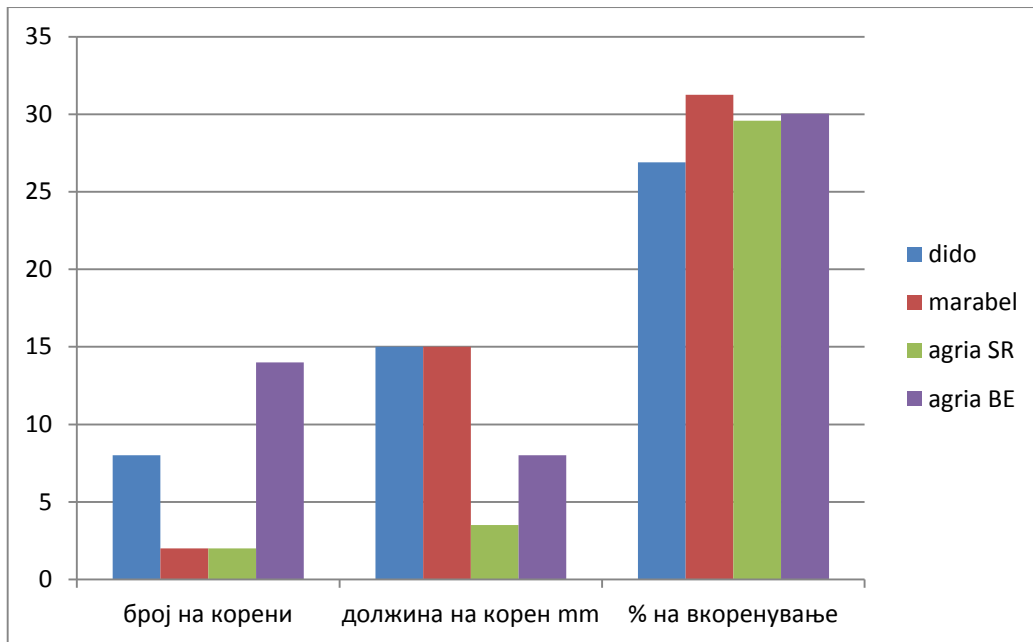
a)



b)

Слика 20. Добивање на вкоренети изданоци во *in vitro* услови а) *agria BE* б) *agria SR*

Figure 20. Obtaining rooted sprouts under *in vitro* conditions а) *agria BE* б) *agria SR*



Слика 21. Формирање на корени на MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA
 Figure 21. Formation of roots on MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA

5.3.3. Калусогенеза и ризогенеза во култура на изданоци

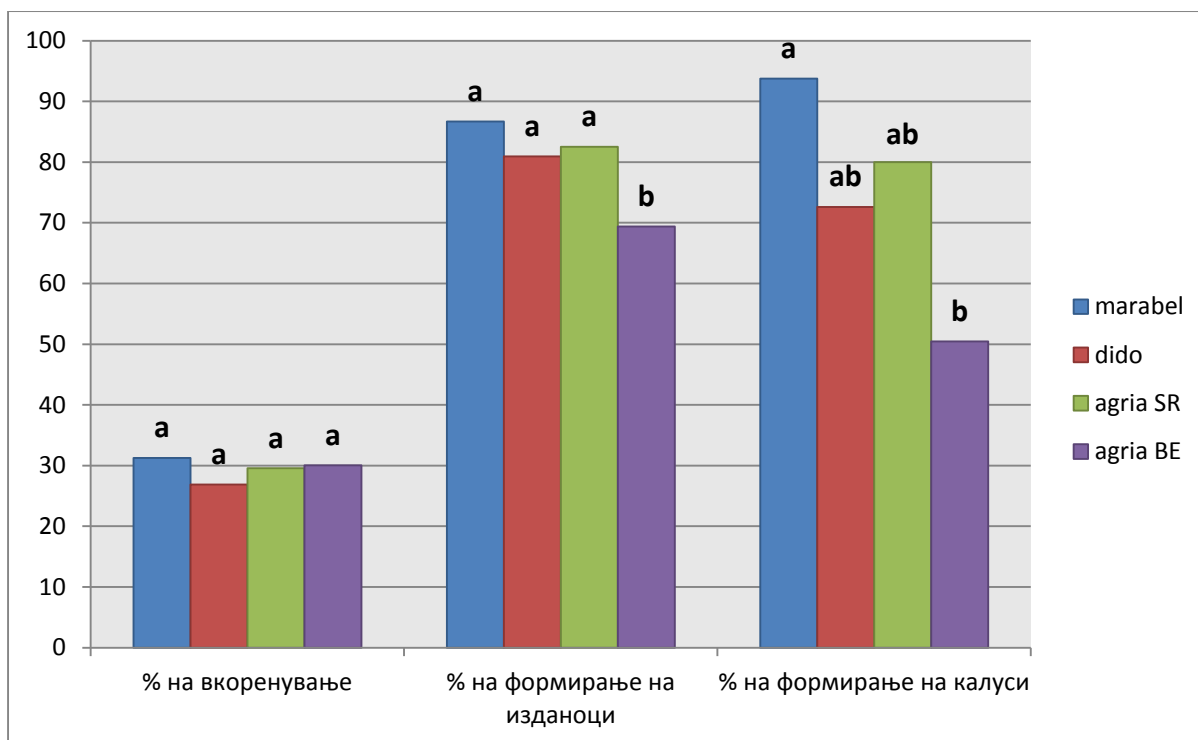
Во текот на истражувањето вршено е испитување на влијанието на хормоналната подлога MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA во културата на изданоци од компир врз процесот на калусогенеза. Влијанието е одредено со процентот на калусирани експлантанти.

Влијанието на горенаведената подлога и хормонален состав врз процесот на ризогенеза е утврдуван со процентот на вкоренети експлантанти.

Исто така испитуван е и процентот на формирање на изданоци кај генотиповите *marabel*, *dido*, *agriа SR* и *agriа BE*, кои беа поставени на истата подлога MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA.

Од добиените резултати (слика 22) е очигледно дека:

- Кај процент на вкоренување нема сигнификантни разлики во вредностите. Процентот на вкоренување се движи од 26,90 до 31,25%;
- Кај процент на формирање на изданоци има сигнификантни разлики помеѓу генотиповите. Генотиповите *marabel* (86,66%), *dido* (80,95%) и *agriа SR* (82,50%) покажаа вредности кои сигнификантно се разликуваат од генотипот *agriа BE* кој покажа (69,41%) на формирани изданоци;
- Кај процентот на формирање на калуси имаме сигнификантни разлики во вредностите кај генотиповите. Со најмал процент на калусогенеза (50,44%) се одликува генотипот *agriа BE* што е сигнификантно помала вредност од 93,75% на формиран калуси кај генотипот *marabel*.



Слика 22. Калусогенеза, ризогенеза и формирање на изданоци во култура на изданоци на MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA

Figure 22. Callusogenesis, rhizogenesis and shoots formation of shoots culture on MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA

5.4 Култура на нодии

Откако ќе се изврши првото пасажирање на изданоците, тие продолжуваат да растат и да се развиваат. Од изданоците се отстрануваат нодиите и се поставуваат во култура на нодии.

Во културата на нодии експлантантите се поставуваат на нов медиум збогатен со ауксин, цитокинин и поголем процент на сахароза.

Во ова пасажирање испитувано е влијанието на 4 различни концентрации на шеќер и тоа: 30, 40, 60 и 90 g/L сахароза врз формирањето на микротубери (табела 11).

Генотипот *agria SR* (1,42 mm) засеен на MS медиум со 60 g/L сахароза и генотипот *agria SR* (1,50 mm) засеен на MS медиум со 90 g/L сахароза покажаа сигнификантно најголеми вредности за дебелина на нодија во споредба со сите други генотипови засеани на различни MS медиуми и со различни концентрации на сахароза.

Должина на нодиите кај MS медиумот со 30 g/L сахароза, генотипот *agria SR* (5,84 mm) покажа сигнификантна вредност која се разликува од вредностите добиени кај генотиповите *dido* (17,61 mm) и генотипот *agria BE* (23,15 mm) засеани на MS медиум со 40 g/L сахароза.

Табела 11. Формирање на микротубери на различни MS медиуми во култура на нодии

Table 11. Formation of microtubers on different MS medium – culture of nodules

Експлантанти – нодии / Explants nodules						Микротуберизација / Microtuberization			
Генотип / Genotype	MS медиум / MS medium (mg/L)	Сахароза / Sucrose (g/L)	Број на експлант / Number of explants	Должина на нодија / Length of nodule (mm)	Дебелина на нодија / Thickness of nodule (mm)	Должина на тубер / Length of tuber (mm)	Ширина на тубер / Width of tuber (mm)	Број на тубери / Number of tubers	% на микротуберизација / % of microtuberization
<i>agria SR</i>	2 BAP + 2 NAA	30	13	5,84d	0,86b	/	/	/	/
<i>dido</i>	1 BAP + 0,5 NAA	40	13	17,61c	0,97b	5,00a	2,77a	8	58,33b
<i>agria BE</i>	1 BAP + 0,5 NAA	40	13	23,15b	1,00b	4,94a	3,50a	9	78,33ab
<i>agria SR</i>	4 BAP + 2 NAA	60	14	31,78a	1,42a	5,16a	3,50a	10	86,66a
<i>agria BE</i>	4 BAP + 2 NAA	60	14	30,21a	1,07b	5,00a	3,80a	10	70,00ab
<i>agria SR</i>	6 BAP + 2 NAA	90	14	32,14a	1,50a	5,47a	3,64a	17	83,33a

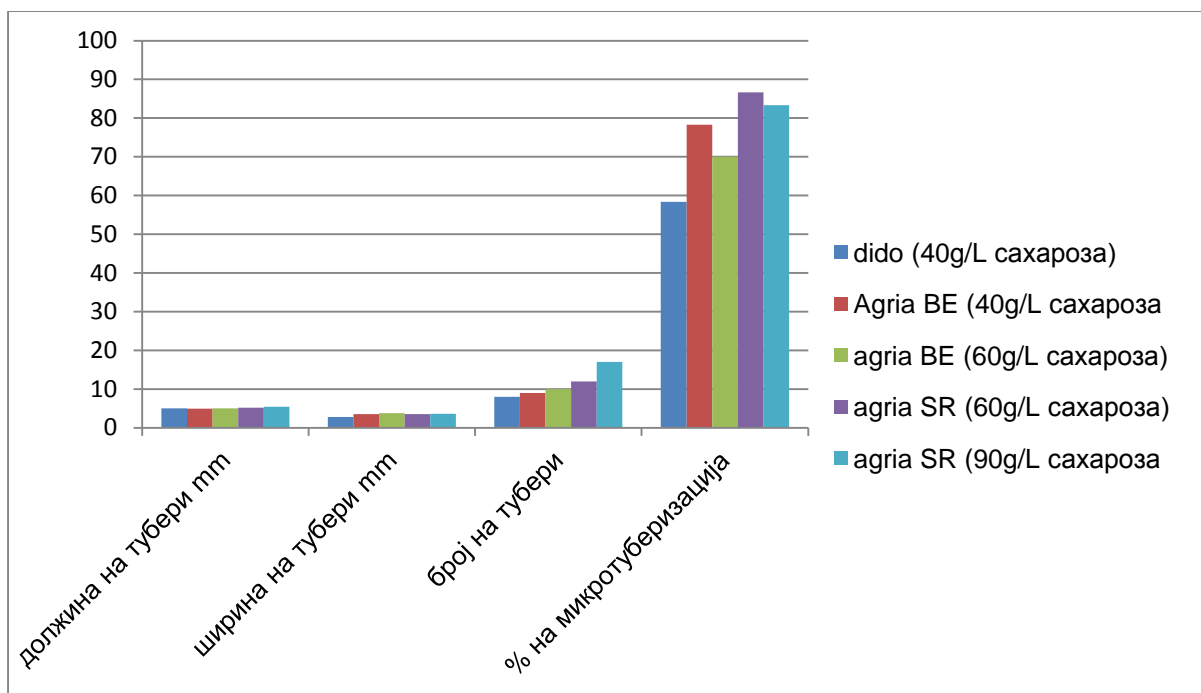
5.5 Микротуберизација во култура на нодии

Во култура на нодиите, со второто пасажирање започнува и формирањето на микротуберите, а процесот на микротуберизација е стимулиран со присуството на поголем процент на сахароза во овие медиуми.

Должината на туберите се движи од 4,94 mm кај генотипот *agria BE* (слика 24) до 5,47 mm кај генотипот *agria SR* без статистичка значителна разлика.

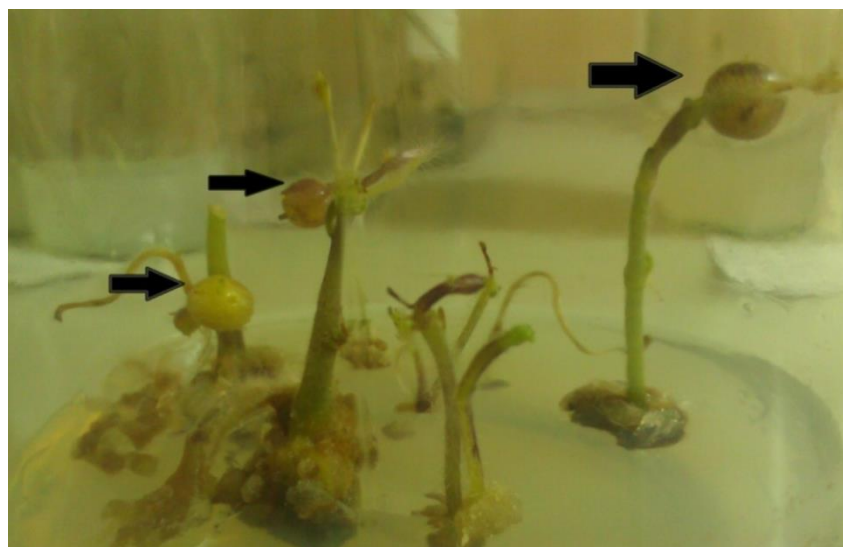
Во резултатите за ширина на тубери кај сите испитувани генотипови на сите медиуми не се покажаа сигнификанти разлики. Вредностите кај генотиповите се движат од 2,77 mm ширина кај генотипот *dido* засеен на MS медиум со 40 g/L сахароза до 3,80 mm ширина кај генотипот *agria BE* засеен на MS медиум со 60 g/L сахароза.

Најдобар процент на микротуберизација имаат генотипот *agria SR* (86,66%) на MS медиум со 60 g/L сахароза и генотипот *agria SR* (83,33%) на MS медиум со 90 g/L сахароза, кои сигнификантно се разликуваат од процентот на добиената микротуберизација (58,33%) кај генотипот *dido* на MS медиум со 40 g/L сахароза (табела 11, слика 23).



Слика 23. Формирање на микротубери на различни MS медиуми во култура на нодии

Figure 23. Formation of microtubers on different MS medium in culture of nodules



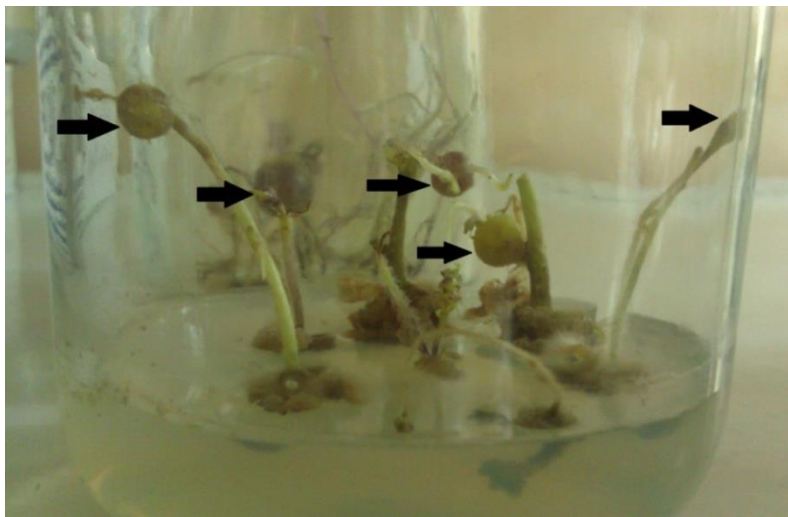
Слика 24. Добивање на микротубери во *in vitro* услови - генотип *agria BE*

Figure 24. Obtaining microtubers under *in vitro* conditions – genotype *agria BE*

5.5.1 Индуција на калус во култура на нодии

Во своето истражување Iqbal и сор. (2014) докажале дека регулаторите на раст имаат значајна улога во формирањето на калуси кај нодијалните експлантанти. Особено комбинацијата од BA и NAA во концентрација од 4-5 mg/L покажала формирање на калуси максимално.

Формирањето на микротубери многу често е проследено со процесот на формирање калуси. Вредностите за дебелина на калус се движат од 0,81 mm до 0,90 mm, а додека пак, за висина на калус се движат од 0,65 mm до 0,89 mm без статистички значителни разлики (табела 12, слика 25).



Слика 25. Добивање на микротубери во *in vitro* услови - генотип *agriа SR*
Figure 25. Obtaining microtubers under *in vitro* conditions – genotype *agriа SR*

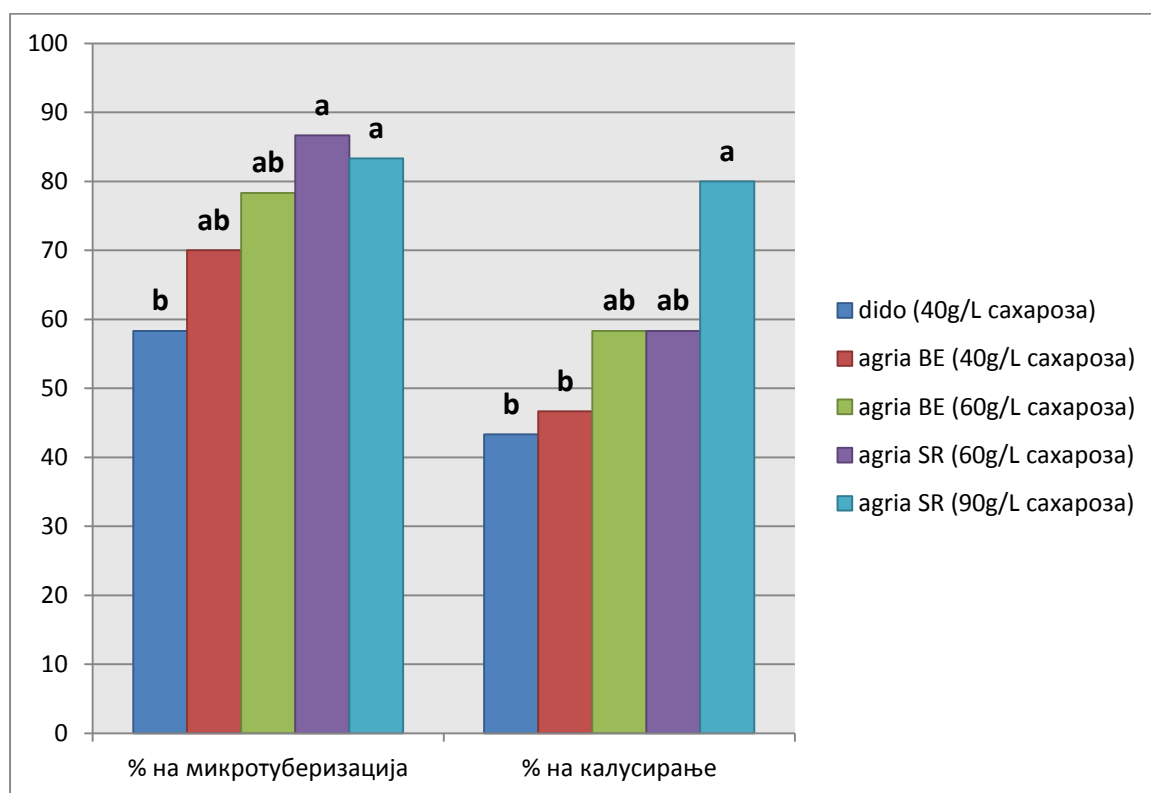
Табела 12. Формирање на калуси во култура на нодии
Table 12. Formation of callus in culture of nodules

Експлантанти – нодии / Explants – nodules						Формирање на калуси / Formation of callus			
Генотип / Genotype	MS медиум / MS medium (mg/L)	Сахароза / Sucrose (g/L)	Број на експлантанти / Number of explants	Должина на нодии / Length of nodules (mm)	Дебелина на нодии / Thickness of nodules (mm)	Висина на калус / Height of callus (mm)	Дебелина на калус / Thickness of callus (mm)	Број на калуси / Number of calluses	% на калусирање / % of callusing
<i>agriа SR</i>	2 BAP + 2 IAA	30	13	5,84d	0,86b	/	/	/	/
<i>dido</i>	1 BAP + 0,5 NAA	40	13	17,61c	0,97b	0,68a	0,85a	6	43,33b
<i>agriа BE</i>	1 BAP + 0,5 NAA	40	13	23,15b	1,00b	0,65a	0,81a	6	46,66b
<i>agriа SR</i>	4 BAP + 2 NAA	60	14	31,78a	1,42a	0,73a	0,82a	8	58,33ab
<i>agriа BE</i>	4 BAP + 2 NAA	60	14	30,21a	1,07b	0,80a	0,87a	8	58,33ab
<i>agriа SR</i>	6 BAP + 2 NAA	90	14	32,14a	1,50a	0,89a	0,90a	10	80,00a

5.5.2 Микротуберизација и калусогенеза

Овие два испитувани параметри се тестирани со компаративна анализа за сите генотипови на компир кај кои имаме добиено микротуберизација на подлоги со различна концентрација на сахароза. Според резултатите претставени на слика 26 можеме да го коментираме следното:

- Најголем процент на микротуберизација има кај генотипот *agria SR* (86,66%) на подлогата MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 60 g/L сахароза и кај генотипот *agria SR* (83,33%) на подлогата MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 90 g/L сахароза, кои сигнификантно се разликуваат од процентот на микротуберизација кај генотипот *dido* (58,33%) на подлогата MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA + 40 g/L сахароза.
- Генотипот *dido* (43,33%) и генотипот *agria BE* (46,66%) на подлогата MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA + 40 g/L сахароза истите сигнификантно се разликуваат од процентот на калусирање кај генотипот *agria SR* (80,00%) на подлогата MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 90 g/L сахароза.



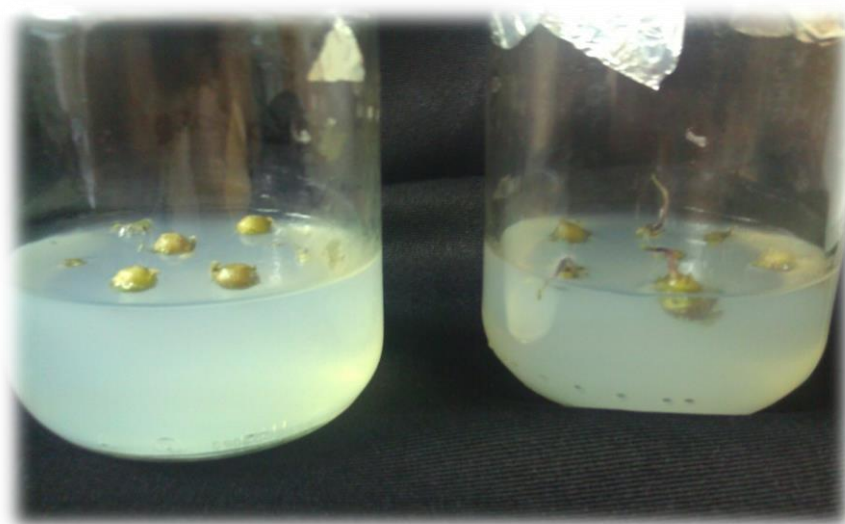
Слика 26. Микротуберизација и калусогенеза во култура на нодии

Figure 26. Microtuberization and callusogenesis in culture of nodules

Откако се формираа микротуберите, истите беа пасажирани и поставени на друг MS медиум и тоа во комбинација MS + 0,5 mg/L BAP + 1,25 mg/L KIN + 50 g/L сахароза. Оваа подлога беше подготвена со цел побрзо и подобро да растат микротуберите (слика 27).

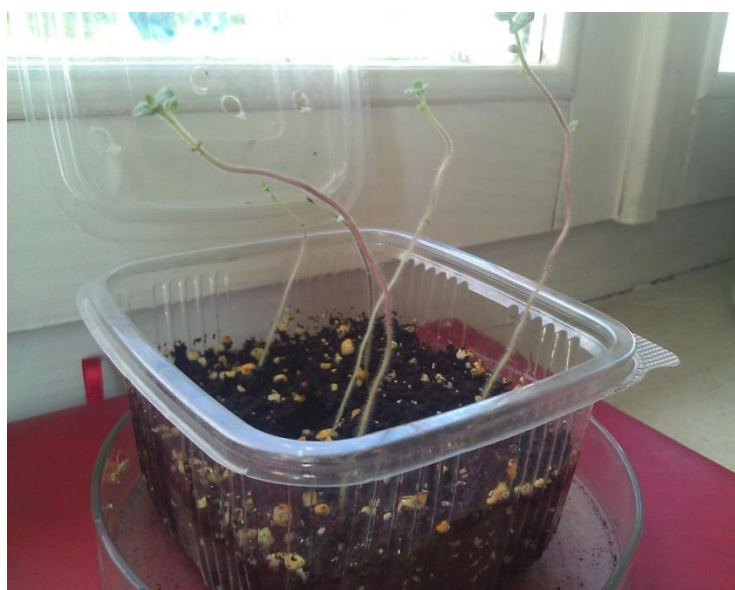
Според Dieme и сор. (2013) при експерименталните анализи на компирот во *in vitro* услови, најдобри резултати за побрзо 'ртење на микротуберите е медиум збогатен со BAP, KIN и сахароза.

Микротуберите добиени од култура *in vitro* беа посадени во стерилна мешавина од тресет: перлит (1:1) со цел формирање на минитубери, а подоцна и формирање на тубери за семенски компир. Микротуберите се адаптираа на нестерилни услови и формираа изданоци прикажани на слика 28.



Слика 27. Култура на микротубери на MS + 0,5 mg/L BAP + 1,25 mg/L KIN + 50 g/L сахароза

Figure 27. Culture of microtubers on MS + 0,5 mg/L BAP + 1,25 mg/L KIN + 50 g/L sucrose



Слика 28. Пренесување на микротубери во стерилна мешавина од тресет: перлит (1:1)

Figure 28. Transfer of microtubers into mix of peat : perlite (1:1)

6. ДИСКУСИЈА

6.1 Продукција на 'ртулци со третман на GA₃ во *in vivo* услови

Улогата на GA₃ во продукцијата на 'ртулци има голема важност. Во испитувања коишто се вршеле на компир, GA₃ воглавно се нанесува надворешно. Овие истражувања покажуваат дека со аплицирањето на GA₃ се зголемува растењето и издолжувањето на 'ртулците, а се инхибира формирањето на микротубери во медиум (Smith и Rappaport, 1969; Kumar и Wareing, 1972).

Гиберелините се покажале како стимулатори на микротуберизацијата во *in vivo* и *in vitro* експериментите кои биле извршени од Vreugdenhil и Sergeeva (1999). Овие резултати се во согласност на истражувањата од овој магистерски труд. Кај сите *in vivo* третирани тубери третманот со GA₃ резултираше со *de novo* никнење на 'ртулци во окцата на туберите.

Третманот со 22 ppm GA₃ се покажа најефикасен и за двата типа испитуван компир. Аплицирањето на највисоката доза на GA₃ резултираше со 100% формирање на 'ртулци кај семенскиот компир од генотиповите *dido*, *marabel* и *agria*. Кај меркантилниот компир 100% формирање на 'ртулци се јави и кај третманот со 12 ppm GA₃ и тоа кај генотиповите *agria SR* и *andrea*.

Резултатите од нашите истражувања укажуваат дека меркантилниот компир е поосетлив на третманот со гиберелинска киселина и дава поголем процент на формирање на *de novo* 'ртулци за сите испитувани генотипови и за сите аплицирани концентрации.

Споредбено помеѓу контролите кои се направени за сите генотипови и различните концентрации со третирањето со GA₃ може да се воочат разликите кај третираните и нетретираните тубери. Од аплицирањето на различните концентрации со гиберелинска киселина, највоочливи резултати се постигнува со 22 ppm GA₃.

Примената на регулаторите на пораст има значителен ефект врз плодноста на туберот, а тоа е поврзано со хормоналната рамнотежа (Stuart и Cathey, 1961; Vreugdenhil и Struik, 2006).

Со третирање на туберите со гиберелинска киселина тие побрзо 'ртат и произведуваат поголем број на 'ртулци, за разлика од нетретираните тубери (Rehman и соp., 2001; Burton, 1989).

Гиберелинската киселина може да ја прекине латентноста на туберите и тоа ако се аплицира надворешно што значи ја стимулира продукцијата на 'ртулци (Garcia-Torres и Gomez-Campo, 1973; Lorreta и соp., 1995; Rappaport и соp., 1957; Vreugdenhil и Sergeeva, 1999).

6.2 Култура на 'ртулци како почетни експлантанти

Поставувањето на 'ртулците (почетните експлантанти) на MS медиум со различни концентрации на цитокинините KIN и BAP е покажан нивниот ефект

врз формирањето на изданоци, корени и калуси. Резултатите укажуваат дека кај сите испитувани генотипови на компир органогенезата се одвива во правец на ризогенеза, формирање на изданоци и калусирање.

Споредбено, резултатите на Koleva Gudeva и сор. (2012) покажале дека со употреба на цитокините KIN и BAP во MS медиумот се добива органогенеза кај меркантилниот генотип *agria* со слични резултати презентирани во овој магистерски труд .

6.2.1 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 4 mg/L KIN

На подлогата MS + 4 mg/L KIN беа поставени почетни експлантанти од 4 генотипови на компир и тоа: *agria SR*, *agriko*, *dido* и *marabel*.

Најдолги експлантанти (15,15 mm) покажал генотипот *marabel*, кој споредбено од истражувањата на Kanwal и сор. (2006) на истиот медиум генотипот *cultivar koroda* дал 6,95 mm должина на експлантант.

Најдебели експлантанти (2,29 mm) дал генотипот *dido* во споредба со генотипот *agrico* (1,22 mm) кој даде сигнификантно пониска вредност.

6.2.2 Почетни експлантанти – 'ртулци на MS + 2 mg/L BAP

На медиумот MS + 2 mg/L BAP беа поставени 'ртулци од меркантилните генотипови *agria BE* и *agria SR* и 'ртулци од семенските генотипови *dido* и *marabel*.

За дебелина на експлантант најмала вредност покажа семенскиот генотип *marabel* (1,62 mm), која вредност сигнификантно се разликува од вредноста добиена кај генотипот *agria SR* (3,89 mm).

Сигнификантна разлика има и кај должината на експлантантот, каде генотипот *marabel* (13,52 mm) даде одлични резултати во споредба со генотипот *agria BE* (3,73 mm) која покажа послаби резултати за овој параметар.

При споредба на резултатите на Koleva Gudeva и сор. (2012) на овој медиум генотипот *agria* даде 7,82 mm должина на експлантантите, а дебелината на експлантантите изнесуваше 2,87 mm.

6.3 Култура на изданоци

Кај култура на изданоци експлантантите беа пасажирани на подлогата MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA.

На оваа подлога беа поставени експлантанти од генотиповите: *agria SR*, *agria BE*, *dido* и *marabel*.

Кај семенскиот генотип *marabel* имаше формираност на изданоци од 86,66%. Со слични резултати се покажаа генотипот *agria SR* (82,50%) и генотипот *dido* (80,95%) во формираност на изданоци.

Комбинацијата од цитокинин и ауксин била многу ефективна за зголемување на органогенезата во *in vitro* услови кај различни генотипови на компир, истражувано од Koleva Gudeva и сор. (2012).

6.3.1 Индуksiја на калуси во култура на изданоци

При индуksiјата на калуси кај подлогата MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA сите генотипови на компир покажале калусогенеза.

Најголеми вредности покажа генотипот *marabel* (93,75%) која вредност е сигнификантно подобра од генотипот *agria SR* (80,00%), па генотипот *dido* (72,61%) и генотипот *agria BE* (50,44%) (слика 28).

Резултатите за индуцирање на калуси укажуваат дека во *in vitro* услови поставени на медиумот MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA семенските генотипови на компир имаат поголема способност за формирање на калуси од меркантилните генотипови на компир.

In vitro регенерантите добиени со микропропагација на компир се помалку преносливи на бактерии, габи и вируси. *In vitro* регенерацијата на компирот се покажала како една од најпотребуваната техника низ повеќе земји во светот. Овој метод има големи предности при создавањето на нови генотипови за разлика од конвенционалниот начин на одгледување. Според ова истражување увозот на компирот со добиени позитивни резултати се намалил и до 50% (Karim, 2009).

За да се добие добро вкоренување, калусирање како и формирање на изданоци треба да се испита, кој хормон, кој регулатор на раст би бил најдобар за добивање на овие параметри (Karim, 2009).

6.3.2 Индуksiја на корени во култура на изданоци

На медиумот MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA семенскиот генотип *marabel* формирал просечно 2 корени по изданок, за разлика од меркантилниот генотип *agria BE* кој формирал просечно 14 корени вкупно по изданок.

Кај процентот на вкоренување немаме голема сигнификантна разлика во резултатите кај генотиповите: *marabel* (31,25%) од вкупниот број на изданоци кои се вкорениле (5). Кај генотипот *dido* процентот на вкоренување е 26,90% од вкупниот број на изданоци кои се вкорениле (4,5). Од вкупниот број на изданоци кои се вкорениле (13,21), процентот на вкоренување кај генотипот *agria BE* изнесува 30,03%. Генотипот *Agria SR* од вкупен број 5,91 вкоренети изданоци, процентот на вкоренување изнесува 29,58%.

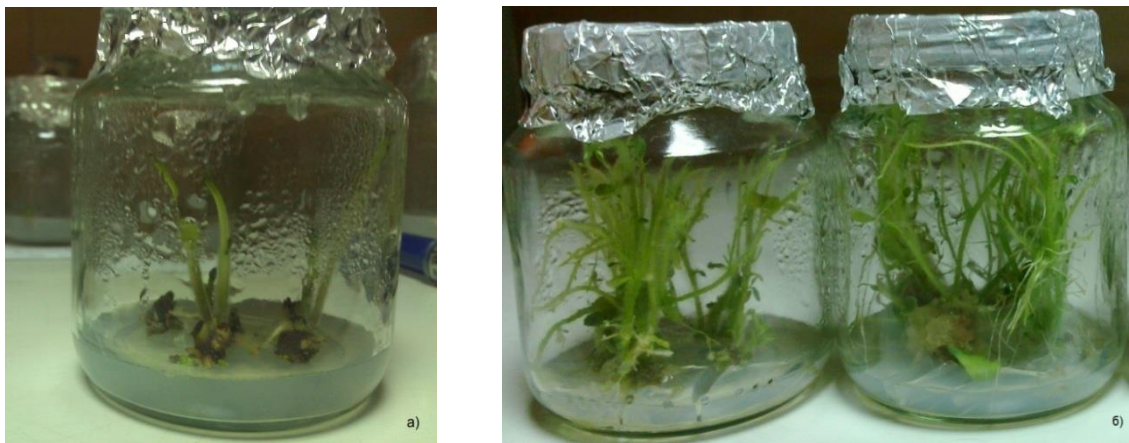
6.3.3 Калусогенеза и ризогенеза во култура на изданоци

Резултатите за параметрите формирање на калуси и корени беа анализирани за сите генотипови кои беа поставени на MS + 2 mg/L BAP + 1

mg/L IAA за добивање на корени, изданоци и калуси. Тоа беа генотиповите: *marabel*, *agria BE*, *agria SR* и *dido*.

На MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA при испитување на формирањето на изданоци генотиповите *marabel* (86,66%), *agria SR* (82,50%) и *dido* (80,95%) покажаа статистички подобри резултати од генотипот *agria BE* (69,41%).

Со најдобар процент на калусирање се издвојува генотипот *marabel* (93,75%) добиени калуси (слика 29), кој е сигнификантно поголем процент на калусирање од генотипот *agria BE* кој покажа најмала вредност (50,44%) за овој параметар.



Слика 28. а) Формирање на изданоци, корени и калуси кај меркантилниот генотип *agria BE* на подлога MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA, б) Формирање на изданоци, корени и калуси кај семенскиот генотип *marabel* на подлога MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA

Figure 28. a) Formation of shoots, roots and callus from mercantile genotype *agria BE* on medium MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA, b) Formation of shoots, roots and callus from seed genotype *marabel* on medium MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L IAA



Слика 29. Добивање на изданоци, калуси и корени кај семенскиот генотип *marabel*

Figure 29. Proliferation of sprouts, calluses and roots of seed genotype *marabel*

6.4 Култура на нодии

Кај култура на нодии беше користено нов MS медиум со 30, 40, 60 и 90 g/L сахароза; BAP – 1, 2, 4 и 6 mg/L и IAA – 0,5 и 2 mg/L.

Со зголемување на концентрацијата на сахароза во MS медиумот од 40 - 90 g/L се зголемуваше и процентот на формирање на микротубери. Генотипот *dido* беше засеен на подлога MS + 1 BAP mg/L + 0,5 NAA + 40 g/L сахароза кој покажа 58,33% формираност на микротубери, која вредност сигнификантно се разликува од генотипот *agria SR* (86,66%) засеен на подлога MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 60 g/L сахароза и истиот генотип *agria SR* (83,33%) засеен на подлога MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 90 g/L сахароза.

Истиот генотип *agria SR* беше засеен на медиум MS + 2 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 30 g/L сахароза кој не даде никакви резултати.

Ова укажува на фактот дека медиумите со 1, 4, 6 mg/L BAP ја фаворизираат микротуберизацијата.

Според анализата со најголем процент на микротуберизација имаме добиено кај генотипот *agria SR* на медиум MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 60 g/L сахароза и тоа со 86,66% и кај истиот генотип *agria SR* засеен на медиум MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 90 g/L сахароза со 83,33% микротуберизација.

6.5 Микротуберизација во култура на нодии

Добивањето на минутубери од *in vitro* растенија ја подобрува мултипликацијата во програмите за производството на тубери (Farran и Mingo-Castel, 2006).

Концентрацијата на GA₃ кај поиздолжените 'ртулци е повисока и игра улога на инхибитор на туберизацијата (Koda и Okazawa, 1983).

Според анализите на Altindal (2010) големо влијание врз развојот на микротуберизацијата во *in vitro* услови на компирот имаат јаглехидратите. Користел различни концентрации на сахароза и малтоза (2, 4, 6, 8, 10, 12 %) на два генотипови компир *agria* и *justin*. Од анализите се покажале резултати кај генотипот *agria* доколку во подлогата има 6% на сахароза, а кај генотипот *justin* доколку има 4% малтоза.

Микротуберизација кај испитуваните генотипови на компир се постигна кај семенскиот генотип *dido* и меркантилните генотипови *agria BE* и *agria SR*.

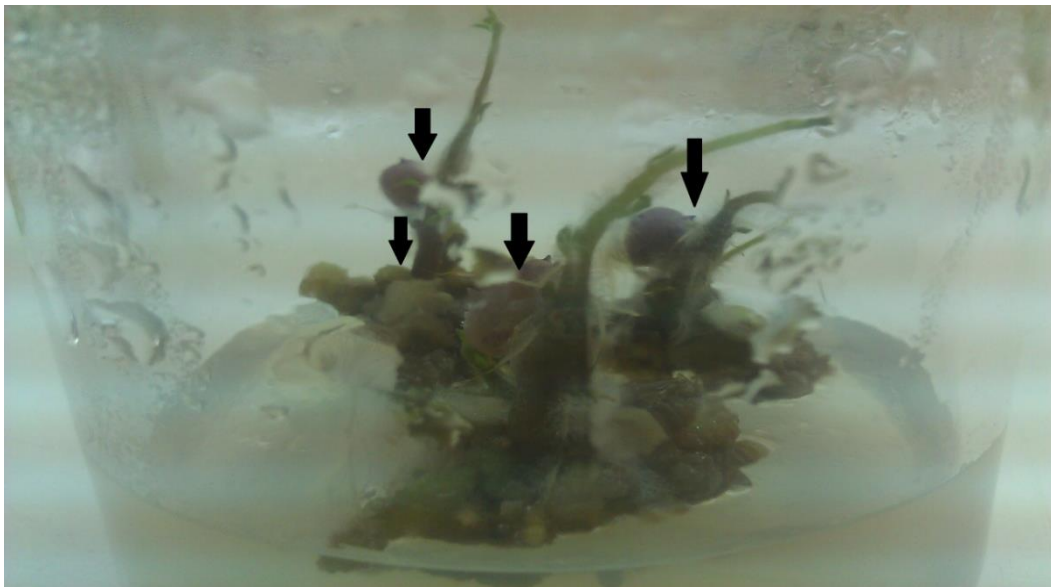
За иницирање на процесот на микротуберизација се користеше MS подлога со различни концентрации на BAP и NAA:

- MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA + 40 g/L сахароза
- MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 60 g/L сахароза
- MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 90 g/L сахароза

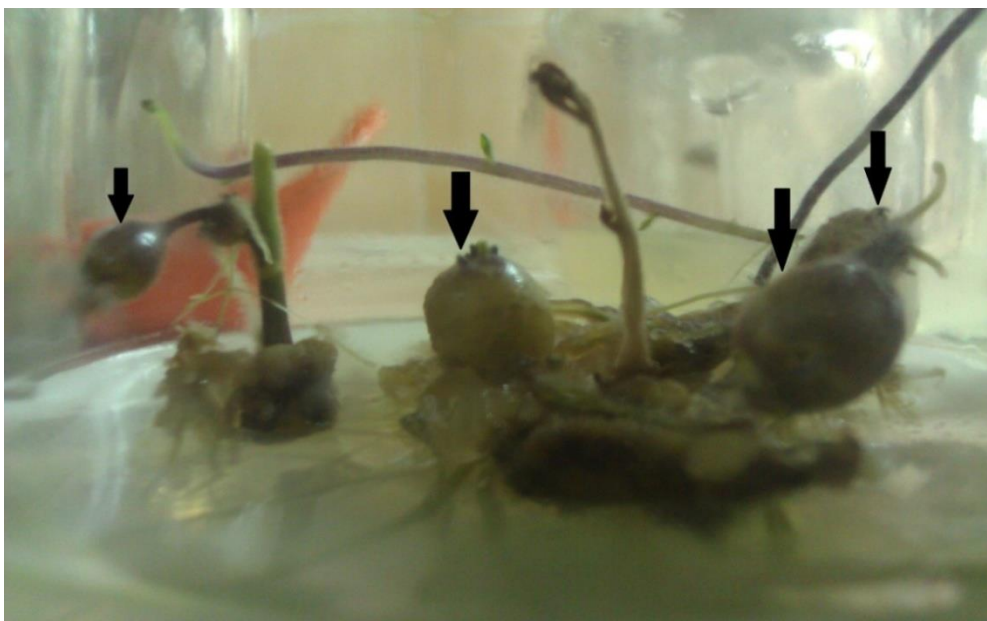
На подлогата MS + 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA + 40 g/L сахароза генотипот *dido* формираше 8 клубени со должина од 5 mm и широчина на тубер од 2,77 mm. (слика 30). Кај генотипот *agria BE* на истата подлога формираше 9 тубери со должина од 4,94 mm и широчина на тубер од 3,5 mm.

Генотипот *agria BE* на подлогата MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 60 g/L сахароза формираше 10 тубери со просечна должина од 5 mm и просечна широчина на тубер од 3,80 mm. Генотипот *agria SR*, на истата оваа подлога, формираше 12 микротубери со просечна должина на туберите (5,16 mm) и просечна широчина 3,50 mm на тубер.

На подлогата MS + 6 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 90 g/L сахароза генотипот *agria SR* формираше 17 тубери, за разлика од сите други генотипови и подлоги. Просечната должина на еден тубер изнесува 5,47 mm, а просечната широчина на еден тубер 3,64 mm (слика 31).



Слика 30. Добивање на микротубери кај семенскиот генотип *dido*
Figure 30. Obtaining microtubers on seed genotype *dido*



Слика 31. Добивање на микротубери кај меркантилниот генотип *agria SR*
Figure 31. Obtaining microtubers on mercantile genotype *agria SR*

6.5.1 Индукција на калус во култура на нодии

Во култура на нодии се формираа калуси кај испитуваните генотипови компир. Генотиповите *dido* и *agria BE* на MS + 1 mg/L BAP + 0,5 NAA + 40 g/L сахароза формираа ист број на калуси и тоа по 6 калуси. Процентот на калусирање кај генотипот *dido* изнесува 43,33%, а кај генотипот *agria BE* изнесува 46,66% без сигнификантна разлика.

На подлогата MS + 4 mg/L BAP + 2 NAA + 60 g/L сахароза на која беа поставени нодии од генотиповите *agria BE* и *agria SR* добивме по 8 калуси и кај двата генотипови, а исто така и процентот на калусирање изнесува исто и кај двата генотипови и тоа 58,33%.

На подлогата MS + 6 mg/L BAP + 2 NAA + 90 g/L сахароза на која беа поставени нодии од генотипот *agria SR* се формираа вкупно 10 калуси. Процентот на калусирање кај овој генотип *agria SR* изнесува 80,00% и е статистички најголем процент во однос на процентот на калусирање кај генотипот *dido* (43,33%) и генотипот *agria BE* (46,66%) поставени на MS + 1 mg/L BAP + 0,5 NAA + 40 g/L сахароза.

Од ова може да се воочи дека на медиумот со најголем процент на сахароза имаме добиено и најмногу калуси, односно процентот на калусирање е најголем.

6.5.2 Микротуберизација и калусогенеза

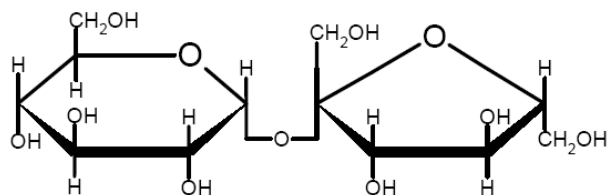
На слика 26 е прикажана графичка компаративна анализа на процесите микротуберизација и калусогенеза кај генотиповите: *dido*, *agria SR*, *agria BE*.

Според истражувањата на Колева Гудева и сор. (2014) на неколку генотипови компир во *in vitro* услови сите истражувани генотипови покажале потенцијал за регенерација на компирот во стерилни услови.

Меркантилниот компир *agria SR* спореден со семенскиот генотип *dido*, за параметрите процент на микротуберизација (86,66%) и процентот на калусирање (80,00%), даде сигнификантно подобри вредности. Доминантен генотип за испитуваните параметри, процент на микротуберизација и процент на калусирање се покажа генотипот *agria SR*.

6.6 Влијанието на содржината на сахароза во медиумот врз микротуберизацијата на компир

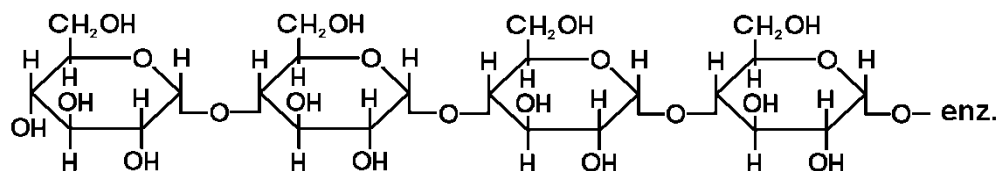
Сахарозата (C₁₂H₂₂O₁₁) е дисахарид кој се состои од две моносахаридни единици: глукоза и фруктоза. Молекулата на глукоза се поврзува со молекулата на фруктоза со издвојување на вода, при што настанува дисахаридот сахароза. (Berg, 2002).



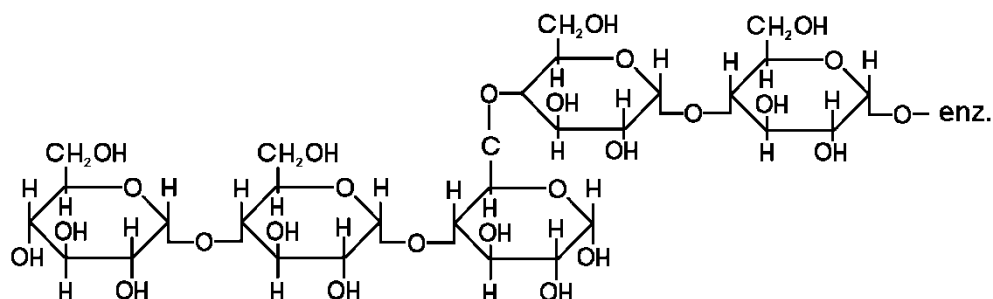
Слика 32. Структурна формула на сахароза
Figure 32. Structure formula of sucrose

Скробот ($C_6H_{10}O_5$)_n е растителен полисахарид (слика 33), кој претставува основен резервен шеќер кај растенијата. Растението вишокот на глюкоза го претвора во скроб, односно го складира како резервна храна. (Revedin et al., 2010). Скробот е изграден од меѓусебно поврзани молекули (единици) D - глюкози поврзани со α -1,4 гликозидни врски. Скробот е полисахарид, се среќава во две различни форми и тоа:

- Неразгранета форма, амилоза (25%) – (има форма на праволиниски ланец кој е составен од 25-1000 гликозидни единици) е линеарен полимер, каде што гликозидните единици се поврзани со α -1,4 гликозидни врски;
- Разгранета форма, амилопектин (75%) – (има форма на разгранет синџир кој е составен од 3000 гликозидни единици) претставува разгранет полимер, каде на секоја триесетта α -1,4 гликозидна врска се надоврзува дополнително една α -1,6 гликозидна врска. Амилопектинот содржи и фосфатна група (Berg, 2002).



а)



б)

Слика 33. Структурна формула на скроб а) амилоза б) амилопектин (Berg, 2002)
Figure 33. Structure of formula of starch a) amylose б) amylopectine (Berg, 2002)

Туберот е место каде што се складира резервната храна на компирот, односно е орган за складирање на скроб. Туберот служи орган во кој се насобира вишокот на енергија на растението, слично како што е семето кај другите растителни култури. Новите растенијата ќе ја користат оваа резервна материја за создавање на нови изданоци, а со тоа обезбедуваат потомство на компирот-родител. Секој тубер може да даде повеќе изданоци, во зависност од тоа колку окца има на него. Туберот исто така, помага да се зацврсти растението на површината на почвата до одреден степен (Berzok, 2003).

Додавањето на сахароза во медиумите во текот на овој експеримент се покажа дека има позитивна корелација во однос на процентот на додадена сахароза во медиумот со иницирањето на процесот на микротуберизација. Односно, добивањето на микротубери е тесно поврзано со присуството на јаглехидратите во медиумот. Шеќерот има таква моќ што овозможува добивање на микротубери, а зголемување на процентот на сахарозата во медиумот придонесува за побрза микротуберизација со формирање на поголем број микротубери.

Воглавно, колку е поголем процентот на сахароза во подлогата, толку повеќе и побрзо го стимулира процесот на микротуберизација без негативни последици. Сахарозата претставува промотор за добивање на голем број на *in vitro* микротубери. Сахарозата и нејзината концентрација е важен фактор за добивање на микротуберизација. Овие две својства се правопрпорционални, што значи секогаш одат во иста линија (Berg, 2002).

Motallebi-azar и Kazemiani (2013) заклучиле дека при додавањето на поголем процент на сахароза во медиумот (80, 100, 120 g/L) има многу позитивен ефект за добивање на поголем број на микротубери, и тоа без никакви штетни последици.

Со зголемувањето на концентрацијата на сахароза во медиумот при *in vitro* одгледување на компир се редуцират негативните ефекти од осмотскиот притисок врз микротуберизацијата. Motallebi-azar и Kazemiani (2011) при нивното истражување покажале дека со зголемување на концентрацијата на сахароза, освен тоа што се зголемува бројот на микротуберите, се зголемува и нивната големина и тежина.

Ahmed и сор. (2013) покажале дека микротуберизацијата *in vitro* е стимулирана од процентот на сахароза што се додава во медиумот на којшто се култивирани експлантантите од компир.

До исти резултати дошле и Al-Hussaini и сор. (2015) дека најголем број на тубери, со екстра големина и тежина, како и одличен процент на микротуберизација се добива со додавање на 80 g/L сахароза во медиумот.

7. ЗАКЛУЧОК

Резултатите од истражувањето во овој магистерски труд покажуваат дека со употреба на соодветен медиум во услови *in vitro* значително се подобрува растот и развојот на културите на компир како и индукцијата на микротуберизација.

Микроразмножувањето е алтернатива за конвенционално размножување на компир.

Методите на *in vitro* размножување, со користење на 'ртулци и сегменти на нодии, се посигурни за одржување на генетскиот интегритетот и за продукција на клонови од компир.

Микротуберите се првата генерација на семенски компир, од култура на ткиво и тие се користат за решавање на проблемите на трансфер на туберите од *in vitro* во *in vivo* услови. Микротуберизацијата е многу важен процес за производство и складирање на компир. Микротуберите добиени преку култура *in vitro* од нодијални сегменти се погодни за ракување, чување и размена на здрава гермплазма.

Од добиените резултати во текот на истражувањето и проучувањето на семенски и меркантилен компир за развојот и формирањето на микротуберизацијата во услови *in vitro* како и третмани со GA₃ во *in vivo* услови можат да се изведат следниве заклучоци:

1. Продукцијата на 'ртулци беше стимулирана со *in vivo* аплицирање на GA₃ на сите испитувани генотипови на компир во концентрација од 2, 12 и 22 ppm GA₃. Кај нетретирани тубери (контрола) најголем процент на формирани 'ртулци се јави кај генотипот *marabel* (64%), а најнизок кај *agria BE* (25%). Најдобри резултати кај третманот со 2 ppm GA₃ покажа генотипот *agria* (76,93%). Најдобри резултати со третирање со 12 ppm GA₃ покажа генотипот *agria SR* (100%). Туберите *agria*, *andrea*, *dido*, *marabel*, *agria BE* и *agria SR* третирани со 22 ppm GA₃ добивме 100% формирање на 'ртулци. Од ова може да се заклучи дека најдобро влијание врз продукцијата на 'ртулци кај испитуваните генотипови компир има концентрацијата од 22 ppm GA₃.

2. Стерилизација на 'ртулците се вршеше со нивно потопување во раствор од 0,1 % HgCl₂.

3. Кај култура на 'ртулци како почетни експлантанти најдобри медиуми за нивен развој се покажаа медиумите MS + 4 mg/L KIN и MS + 2 mg/L BAP.

4. Кај култура на изданоци најдобар медиум се покажа медиумот MS + 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA, на кој генотиповите *dido*, *marabel*, *agria SR* и *agria BE* покажаа добра индукција на калуси и корени.

5. Концентрацијата од 90 g/L сахароза во MS медиумот дејствува како поттикнување на сигналот кој води до акумулација на скроб. Тоа е најочигледно кај генотипот *agria SR* кој поставен на MS медиум со 30 g/L сахароза воопшто не формира микротубери. Истиот генотип на медиум со 60 g/L сахароза микротуберизацијата е зголемена до 86,66%, а на медиумот со 90 g/L сахароза микротуберизацијата достигна до 83,33%.

6. Капацитетот на *in vitro* туберизација кај компирот зависи од генотипот, структурата на медиумот и типот на експлантантот. На сите тестирани медиуми генотипот *agria SR* има највисок потенцијал за микропропагација и микротуберизација.

7. Меркантилниот компир има поголема способност за формирање на микротубери за разлика од семенскиот компир.

8. Од сите испитувани медиуми најдобар ефект при микротуберизација покажа медиумот MS + 4 mg/L BAP + 2 mg/L NAA + 60 g/L сахароза.

9. Добиените микротубери беа пренесени од *in vitro* во *in vivo* услови во стерилна мешавина од тресет : перлит (1:1) и истите покажаа добар развој.

10. Возможно е комерцијално одгледување и размножување на компир во *in vitro* услови. Во Република Македонија постои потенцијал за создавање на микротубери во *in vitro* услови и комерцијално создавање на семенски компир.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Abbott, A.J. and Belcher, R. (1986). Potato Tuber Formation *in vitro*. In: *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Application*. Withers, L.A. and Anderson, P.G.(Eds.). London: ButtWorth, 113-132.
- Ahmed, M., Saha, S., Islam, M.M. and Ali, M.R. (2013). Effect of different levels of sucrose on microtuberization and different substrates on minituber production resulted from potato meristem culture. *Journal of Agriculture and Veterinary Science, Vol.4, (6), 58-62*
- Al-Hussaini, Z.A., Yousif, S.H.A. and Al-Ajelly, S.A. (2015). The role of sucrose and light duration on *in vitro* tuberization for two cultivars of potato *Solanum tuberosum* L. *Intt. J. Curr. Microbiol. App Sci.* (2015) 4(2): 277-283
- Al-Momani, F., Shibli, R. and Ajloun, M. (2000). *In vitro* performance of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv.Spunta. *J.Agrotrop.* (11): 31-34.
- Altindal, D. and Karadogan, T. (2010). The effect of carbon sources on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Turkish Journal of field crops*, 15(1): 7-11.
- Anoop Badoni, Chauhan J.S. (2009). Effect of Growth Regulators on Meristem-tip Development and *in vitro* Multiplication of Potato Cultivar 'Kufri Himalini' *Nature and Science*, 2009, 7(9):31-34.
- Apichai, N. (1988). Microtuber production of potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*. *Journal of the National research Council of Thailand*, 20(2): 19-40.
- Aslam, A. and Iqbal, J. (2010). Combined effect of Cytokinin and sucrose on *in vitro* tuberization parameters of two cultivars i.e., Diamant and Red Norland of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Pak.J.Bot.*, 42 (2): 1093-1102.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* 5th edition. Chapter 11.
- Berzok, L.M., "Potato." *Encyclopedia of Food and Culture*. 2003. *Encyclopedia.com*. 27 Feb. 2015 <<http://www.encyclopedia.com>>.
- Bodlaender, K.B.A., Marinus, A. (1987). Effect of physiological age on growth vigor on seed potatoes. IBLV, Wageningen, Rapport 555, 142 pp.
- Burton, W.G. (1989). *The potato*. Third edition, John Wiley and Sons, Inc New York, NY. P. 742.
- Claassens, M.M.J., Vreugdenhil, D. (2000). Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation? *Potato Research* (43), 347–369.

- Clegg, M.D., Rappaport, L. (1970). Regulation of bud rest in tubers of potato, *Solanum tuberosum* L: VI. Biochemical changes induced in excised potato buds by gibberellic acid. *Plant Physiol* (45):8–13.
- Coleman, K.W., Danielle, J.D. and Coleman, S.E. (2001). Potato microtuber as research tools: A Review. *Am J Potato Res.*(78): 47-55.
- Debergh, P.C. and Meane, L.J., (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hortic.*, (14): 335-345.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. and Yelle, S. (1987). Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. *J Amer. Soc. Hort. Sci.* (112): 846-851.
- Dieme, A., Sambe, M.A.N., Agbangba, E.C., Sy, M.O. (2013). Residual effects of sucrose and hormonal treatments of the tuberization medium on *in vitro* germination of potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtubers. *American Journal of plant sciences*, (4): 1872-1878.
- Dodds, J.H., Silva-Rodriguez, D. and Tovar, P. (1992). Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: High-Tech and Micropropagation III*, (Ed. Bagaj, Y.S.P), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (19): 91-106.
- Dobranszki, J.; Magyar-Tabori, K. and Hudak, I. (2008). *In vitro* tuberization in hormone-free systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers. *Fruit, vegetable and cereal science and Biotechnology @2008 Global science books*.
- El Fatih, M., Mahdi, Hamad S. Al-Saad and Sakina M.A.I. Elshibili (2004). *In vitro* Tuberization of Potato Cultivars as Influenced by Photoperiod, Exogenous Sucrose and Cytokinin Concentrations. *J. King Saud Univ.*, Vol. 17, *Agric. Sci.* (1),25-35.
- El-Sawy, A., Bekheet, S., and Aly UI (2007). Morphological and molecular characterization of potato microtubers production on coumarin inducing medium. In *J AgriBiol.* 9(5): 675-680.
- Eriksson, T. (1965). Studies on growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.* (18): 976-993.
- Escalante, B.Z. and Langille, Alan R. (1995). Role of growth regulators in *in vitro* rhizome growth of potato. *HortScience*, Vol.30(6), 1248-1250.
- Ewing, E.E., Struik, P.C. (1992): Tuber formation in potato: Induction, initiation, and growth. *Horticultural Reviews* (14): 89–198.
- FAO – statistical yearbook for year 2013.

- Farran, I., Mingo-Castel, A.M. (2006). Potato minituber production using aeroponics: Effect of plant density and harvesting intervals. *American Journal of Potato Research - AM J POTATO RES* , vol. 83,(1): 47-53.
- Gamborg, O.L. Miller, R.A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* (50):151-158.
- Garcia-Torres, L., Gomez-Campo, C. (1973). *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberellic acid. *Potato Res.* 16(1):73-79.
- George, E.F. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition. Volume 1. The Background. Published by Springer – The Netherlands.
- George, E.F. (1996). *Plant propagation by tissue culture*. Part 1.2nd edition. Exegetics Ltd., Edington, Wilts, England.
- Gibson, S.I. (2003). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. *Department of Plant Biology. (JOEB)*, Vol.55, (395):253-264.
- Gopal, J., Minocha, J. L. and Dhaliwal, H. S. (1998). Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L). *Plant Cell. Rep.* (17): 794-798.
- Grbić, M., Đukić, M., Skočajić, D., Đunisavljević- Bojović, D. (2007): Role Of Invasive Plant Species In Landscapes Of Serbia, *Landscape Assessment- From Theory to Practice: Applications in Planning and Design*, Beograd.
- Grbić, M. (1997). The Interpretation of Results of Seed Germination Test by Program for Pc. *Proceedings book of 3th ICFWST*, vol 2. Belgrade. 600–605.
- Gregory, L.E. (1965) Physiology of tuberization in potato plants. *Plant Physiol.* (15):1328-1354.
- Hannapel, D.J., Miller, J.C. and Park, W.D. (1985). Regulation of potato tuber protein Accumulation by gibberellic acid. *Plant. Physiol.* (78): 700-703.
- Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives *in vitro*. *Ann. Sci. Natl. Biol. Veg.* (14): 1-223.
- Herrera, P., Huarte, J., Sanvito, F., Meda, P., Orci, L. and Vassalli, J. (1991). Embryogenesis of the murine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* (113), 1257-1265.
- Hoque, M.E. (2010). *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Department of Biotechnology, Bangladesh. *POJ* 3(1): 7-11.
- Hussan, I., Chaudhry, Z., Asghar, R. (2006). Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato. *Agricultural Biotechnology program. Pak.J. Bot.*, 38(2): 275-282.

- Hussey, G. and Stacey, N.J. (1981). *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) Ann. Bot. (48): 787-796.
- Hussey, G. (1978). The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Sci. Prog., (65): 185-208.
- Imani, A.A., Azimi, J. (2010). The effect of various concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) and sucrose on *in vitro* potato (*Solanum tuberosum* L.). Microtuber induction. Amer.-Eura. J. agri. And Envi. Sci., 8(4) 457-459.
- International Code of Botanical Nomenclature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- International Potato center: *Agriculture research for development*.
- Iqbal, M., Jaskani, M.J., Rafique, R. (2014). Effect of plant growth regulators on callus formation in potato. Journal of Agri-food and Applied Sciences. Vol.2 (3): 77-81.
- Jackson, S.D. (1999). Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. Plant Physiol., (119): 1-8.
- Jelaska, S. (1994). Kultura biljnih stanica I tkiva: temeljna istrazivanja I primjena. Zagreb, Monografije, 42.
- Jones, E.D., 1988. A current assessment of *in vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europa. American Potato Journal. (65): 209-220.
- Kanwal, A., Ali, A. and Shoaib, K. (2006). *In vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Kuroda- A new variety in Pakistan. Int. J. of Agri. & Biol. 8(3), 337-340.
- Karim, M.R., M.A. Malek, S.Rahman, M. Al-Amin and M.R. Amin. (2009). *In vitro* propagation of banana. Bangladesh J. Agric. Res. 34(2): 269-278.
- Kefi, S., Pavlista, A. D., Meagher, M. M. and Read, P. E. (2000b). Invertase activity as affected by cytokinin like compounds during potato tuberization *In Vitro*. Am. J. Potato Res. (77): 57-61.
- Khan, M.S., Hoque, R.H., Sarker, H. and Muehlebach P. (2003). Detection of important plant viruses in *in vitro* regenerated potato plants by double antibody sandwich method of ELISA. PlantTissueCulture 13(1): 21-29.
- Khuri, S. and Moorby, J. (1996). Nodal segments or microtubers as explants for *in vitro* microtuber production of potato. Plant Cell, tissue and organ culture, 45(3): 215-222.
- Khuri, S. and Moorby, J. (1995). Investigations into the role of sucrose in potato cv.Estima microtuber production *in vitro*. Annals of Botany (75): 295-303.

- Kianmehr, B., Parsa, M., Moradi, K., (2012). Effect of plant growth regulation during *in vitro* phase on potato minituber production. *Inter. J. of Agri. And Crop. Sci.* 4, (15): 1060-1067.
- Koda, Y. and Okazawa, Y. (1983). Influence of environmental hormonal and nutritional factors on potato tuberization *in vitro*. *Jpn. J. Crop, Sci.* 52(4): 582-591.
- Колева Гудева, Л., Трајкова, Ф. и Стојкова, И. (2014): Микротуберизација на компир (*Solanum tuberosum* L.), Годишен зборник на трудови на Земјоделски факултет, УГД, Вол. 12. Год. 2014:19-37.
- Koleva Gudeva, L., Mitrev, S., Trajkova, F., Ilievski, M. (2012) Micropropagation of potato *Solanum tuberosum* L. *Electronic Journal of Biology* 2012, Vol. 8(3) 45-49.
- Колева Гудева, Л. (2010). Физиологија на растенијата, Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип.
- Kumar, D. and Wareing, P.F.(1972). Factors controlling stolon development in the potato plant. *New Phytol.* (71):639–648.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups.* Springer
- Leclerc, Y., Donnelly, D., Seabrook, J.E.A. (1994): Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (37): 113–120.
- Lee, C.W., Mandani, A. and Hogan, L. (1978). *In vitro* propagation of *Simmondsia chinensis* via shoot tip culture. *Hort. Sci.* (13): 35 (Abstr.).
- Lentini, Z. and Earle, E.D.(1991). In vitro tuberization of potato clones from different maturity groups. *Plant Cell Rep.* (9): 691- 695.
- Lommen, W.J.M., (1995). Basic studies on the production and performance of potato minitubers. Thesis Landbouw Universiteit Wageningen, 181 pp.
- Lommen, W.J.M. and Struik P.C., 1995. Field performance of potato minitubers with different fresh weights and conventional seed tubers : multiplication factors and progeny yield variation. *Potato Research.* (38): 159-169.
- Lorreta, J., Miktzel, G., Nora, F. (1995). Dry Gibberellic acid combined With Talc and fir bark enhances early and tuber growth of shepody. *Am. .Potato J.* (72):545-550.

- Marin, J.A. and Gella, R. (1987). Acclimatization of micropropagated of cherry rootstock 'Masto de Montanana' (*Prunus cerasus* L.) Acta Hort. (212): 603-609.
- Mitten, D.H., Boyes, C. and Cucuzza, J. (1988). *In vitro* produced microtubers of potato. American-Potato-J., (65): 8, 492.
- Motallebi-Azar, A. and Kazemiani, S. (2013). The study of carbon sources efficiency on *in vitro* potato microtuberization. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Enviornment. Vol.4, (1)*, 66-81
- Motallebi-Azar, A. and Kazemiani, S. (2012). Effects of alcohol sugars on *in vitro* potato microtuberization. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Enviornment. Vol.3, (1)*, 73-83.
- Motallebi-Azar, A. and Kazemiani, S. (2011). A new concept about carbon source roles on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). AAB Bioflux. 3,(3), 160-167
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. (25), 135-166.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. (15):473-497.
- Novak, F.J., Zadina, J., Horackova, V. and Moskova, I. (1980). The effect of growth regulators on meristem tip development and *in vitro* multiplication of *Solanum tuberosum* L.plants.Potato Res., (23): 155-166.
- Prematilake, D.P. and Mendis, M.H. (1999). Microtubers of potato (*Solanum tuberosum* L.): *IN VITRO* conservation and tissue culture. *J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka* 27 (1): 17-28.
- Ranalli, P., Bassi, F., Ruaro, G., Del Re, P., Dicandilo, M., Mandolino, G. (1994): Microtuber and minituber production and field performance compared with normal tubers. Potato Research (37): 383–391.
- Rappaport, L., Lippert, L.F., Timm, H. (1957). Sprouting and plant growth of potato and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces. Am. Potato J. (34):254-260.
- Rehman, F., Lee, S.K., Kim, H.S., Jeon, J.H., Park, J., Joung, H. (2001). Dormancy breaking and effects on tuber yield of potato subjected to various chemicals and growth regulators under greenhouse conditions. Online J. Biol. Sci. 1(9):818-820.
- Revedin, A., Aranguren, B., Becattini, R., Longo, L., Marconi, E., Mariotti Lippi, M., Skakun, N., Sinitsyn, A., Spiridonova, E. and Svoboda, J. (2010). Thirty

- thousand-year-old evidence of plant food processing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 2; 107(44): 18815–18819.
- Saha, S., Ahmed, M., Islam, M.M., Remme, R.N. and Ali, M.R. (2013). Effect of different levels of sucrose on microtuberization and different substrates on minituber production resulted from potato meristem culture. J. of Agri. And Vete. Sci. PP 58-62.
- Sarkar, D., Naik, P. S. (1998): Effect of inorganic nitrogen nutrition on cytokinin-induced potato microtuber production in vitro. Potato Research (41): 211–217.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. (50): 199-204.
- Seabrook, J.E.A., Coleman, S. and Levy, D.(1993). Effect of photoperiod on in vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture (34):43-51.
- Simko, I. (1994): Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. Journal of Plant Growth Regulation (13): 73–77.
- Slimmon, T., Machado, S. and Coffin, R. (1989). The Effect of Light on *in vitro* Microtuberization of Potato Cultivars". Amer. Potato J., (66): 843-848.
- Smith, O.E. and Rappaport, L. (1969). Gibberellins, inhibitors and tuber formation in potato. *Solanum tuberosum*. Amer.Potato, J., (46): 185-191.
- Статистички годишник на Република Македонија, 2014
- Struik, P.C. & Wiersema, S.G. (1999). Seed potato technology. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Pers.
- Struik, P.C. and Lommen, W.J.M., (1990). Production, storage and use of micro- and minitubers. In Proceedings 11th Triennial Conference of European Association for Potato Research, Edinburgh, U.K. pp. 122-133.
- Stuart, N.W., Cathey, H.M. (1961). Applied aspect of Gibberellins in potato. Plant Physiol. (12):369-378.
- Sutter, E. and Langhans, R.W. (1980). Hort. Sci. (15): Abst.428.
- Sutter, E. and Langhans, R.W. (1979). Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Am. Soc. Hortic. Sci., (104): 493-496.
- Tabori, K.M., Dobranszki, J. and Ferenczy, A.(1999). Some sprouting characteristics of microtubers. Potato Res., (42): 611-617.

- Timm, H., Rappaport, L., Bishop, J.C., Hoyle, B.J. (1962). Sprouting, plant growth, and tuber production as affected by chemical treatment of white potato seed pieces. *Am. J. Potato Res.* 39(3):107-115.
- Tovar, P.R., Estrada, L., Schilde-Rentschler and Dodds, J.H. (1985). Induction and use of *in vitro* potato tubers. CIP Circular, International Potato Center (13): 1-4.
- Tugrul, S. and Samanci, B. (2001). Factors affecting tuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.) *Potato Abstr.* 26: 86.
- Uranbey, S., Parmaksiz, I., Sancak, C., Cocu, S., Ozcan, S. (2004). Temperature and gelling agent effects on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). University of Ankara. *Biotech. & Biotech. Eq.* 19/2004/2.
- Василевски, Г. (2004). Зрнести и клубенести култури. Факултет за земјоделски науки и храна – Скопје.
- Villafranca, M.J., Veramendi, J., Sota, V., Mingo-Castel, A.M. (1998): Effect of physiological age of mother tuber and number of subcultures on *in vitro* tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* (17): 787–790.
- Vreugdenhil, D., Struik, P.C. (2006). An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Physiologia Plantarum* 75(4):525-531.
- Vreugdenhil, D., Sergeeva, L.I. (1999). Gibberellins and tuberization in potato, *Potato Res.* (42):471-481.
- Wang, P.J. and Hu, C.Y. (1982). *In vitro* mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. *Am. Po. J.* (59): 33-37.
- Welander, M. and Pawlicki, N. (1994). Carbon compounds and their influence on *in vitro* growth and organogenesis. *Physiology, Growth and Development of plants in culture* (Eds. P.J. Lumsden, J.R. Nicholas and W.J.Davies), pp:83-93.
- White, P.R. (1963). Chelated iron in culture media. *Ann.Bot.* (46), 807-9, p.59.
- Wiersema, J.H. (1987) A monograph of *Nymphaea* subgenus *Hydrocallis* (*Nymphaeaceae*). *Systematic Botany Monographs* (16): 1–112.
- Xu, X et al. (1998) The role of Gibberellin, Abscisic Acid and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant physiology*, June 1998 vol.117, (2): 575-584.

- Xuan, C.P., Debasis, C., Eun, J. H. and Kee, Y. P. (2003). A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science*, Vol. 84(8): 1129-1132.
- Yildirim, M.B. and Yildirim, Z. (1984). Studies on the production of virus free potato, seed tubers by meristem culture. *Journal of the faculty of Agriculture, Ege University*, 21, (2): 45-50.
- Yousef, A.R.R., Suwman, M.A., Al-Musa, A.M. and Abu-Qaoud, H.A. (1997). *In vitro* culture and microtuberization of 'Spunta' potato (*Solanum tuberosum* L.) 173-181.
- Yu, W.C., Joyce, P.J., Cameron, D.C., McCown, B.H. (2000): Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports* (19): 407-413.
- Zakaria, M., Hossain, M.M. (2008). *In vitro* tuberization of potato influenced by benzyl adenine and Chloro choline chloride. *Bangladesh J. Agri;. Res.* 33(3): 419-425.
- Ziv, M., and Halevy, A.H. (1972). Organ and plantlet regeneration of gladiolus through tissue culture. *Proc. Int. Hort. Cong.* 18, (1): 211-212.
- Ziv, M., Halevy, A.H. and Shilo, R. (1970). Organ and plantlet regeneration of gladiolus through tissue culture. *Ann. Bot.*, (34): 671-676.
- Zobayed, S.M.A., Armstrong, J. and Armstrong, W.(2001). Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Sci.* (161): 537-548.