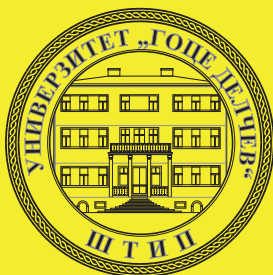


УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ” - ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

UDC 63 (058)

ISSN 1409-987X
ISSN 1857-8608 on line
Vol. 12, Year 2014



ГОДИШЕН ЗБОРНИК
2014
YEARBOOK

ГОДИНА 12

VOLUME XII

GOCE DELCEV UNIVERSITY - STIP
FACULTY OF AGRICULTURE

**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ**

UDC 63(058)

ISSN 1409-987X
ISSN 1857-8608 on line
Vol. 12, Year 2014



**ГОДИШЕН ЗБОРНИК
2014
YEARBOOK**

ГОДИНА 12

VOLUME XII

**GOCE DELCEV UNIVERSITY - STIP
FACULTY OF AGRICULTURE**



ГОДИШЕН ЗБОРНИК
УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП, ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ
YEARBOOK
GOCE DELCEV UNIVERSITY - STIP, FACULTY OF AGRICULTURE

Издавачки совет

Проф. д-р Саша Митрев
Проф. д-р Илија Каров
Проф. д-р Блажо Боев
Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева
Проф. д-р Рубин Гулабоски
М-р Ристо Костуранов

Редакциски одбор

Проф. д-р Саша Митрев
Проф. д-р Илија Каров
Проф. д-р Блажо Боев
Проф. д-р Лилјана Колева - Гудева
Проф. д-р Верица Илиева
Проф. д-р Љупчо Михајлов
Проф. д-р Рубин Гулабоски
Проф. д-р Душан Спасов

Одговорен уредник

Проф. д-р Саша Митрев

Главен уредник

Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева

Јазично уредување

Даница Гавриловска-Атанасовска
(македонски јазик)
Филолошки факултет
(англиски јазик)

Техничко уредување

Славе Димитров
Благој Михов

Редакција и администрација

Универзитет „Гоце Делчев“ Штип
Земјоделски факултет
бул. „Крсте Мисирков“ б.б.
п.фах 201, 2000 Штип, Македонија

Editorial board

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D
Prof. Ilija Karov, Ph.D
Prof. Blazo Boev, Ph.D
Prof. Liljana Koleva-Gudeva, Ph.D
Prof. Rubin Gulaboski
Risto Kosturanov, M.Sc

Editorial staff

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D
Prof. Ilija Karov, Ph.D
Prof. Blazo Boev, Ph.D
Prof. Liljana Koleva-Gudeva, Ph.D
Prof. Verica Ilieva, Ph.D
Prof. Ljupco Mihajlov, Ph.D
Prof. Rubin Gulaboski, Ph.D
Prof. Dusan Spasov, Ph.D

Editor in chief

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D

Managing editor

Prof. Liljana Koleva-Gudeva, Ph.D

Language editor

Danica Gavrilovska-Atanasova
(Macedonian)
Faculty of philology
(English)

Technical editor

Slave Dimitrov
Blagoj Mihov

Address of editorial office

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

<http://js.ugd.edu.mk>

<http://js.ugd.edu.mk/index.php/YFA/index>



СОДРЖИНА
CONTENT

- Виолета Иванова-Петропулос, Саша Митрев**
ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА SO₂ И РЕДУЦИРАЧКИ ШЕЌЕРИ ВО
МАКЕДОНСКИ ВИНА
Violeta Ivanova-Petropulos, Sasa Mitrev
DETERMINATION OF SO₂ AND REDUCING SUGARS IN
MACEDONIAN WINES 7
- Емилија Костадиновска, Саша Митрев, Илија Каров, Виолета Димовска**
ПРИСУСТВО НА СТОЛБУР ФИТОПЛАЗМАТА КАЈ
АВТОХТОНАТА МАКЕДОНСКА СОРТА СТАНУШИНА
Emilija Kostadinovska, Sasa Mitrev, Ilija Karov, Violeta Dimovska
PRESENCE OF STOLBUR PHYTOPLASMA ON LOCAL VARIETY
STANUSINA 19
- Лилјана Колева-Гудева, Фиданка Трајкова и Ирена Стојкова**
МИКРОТУБЕРИЗАЦИЈА НА КОМПИР (*Solanum tuberosum* L.)
Liljana Koleva Gudeva, Fidanka Trajkova and Irena Stojkova
MICROTUBERIZATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.) 37
- Фиданка Трајкова, Лилјана Колева-Гудева**
АНАЛИЗА НА ПЛОДОВИ ОД АНДРОГЕНЕТСКИТЕ ЛИНИИ
ПИПЕРКА P3 И P4 (*Capsicum annuum* L. сорта пиран) ВО
РАЗЛИЧНИ ФАЗИ НА ЗРЕЛОСТ
Fidanka Trajkova, Liljana Koleva Gudeva
FRUIT ANALYSIS OF PEPPER ANDROGENIC LINES P3 AND
P4 (*Capsicum annuum* L. cv. Piran) IN DIFFERENT MATURATION
STAGES 51
- Зоран Димитровски**
ПОСЛЕДИЦИ И ТЕХНИЧКИ РЕШЕНИЈА ЗА НАМАЛУВАЊЕ
НА СООБРАЌАЈНИТЕ НЕСРЕЌИ СО ТРАКТОРИ ВО
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
Zoran Dimitrovski
CONSEQUENCES AND TECHNICAL SOLUTIONS TO REDUCE
TRACTOR TRAFFIC ACCIDENTS IN REPUBLIC OF MACEDONIA 67
- Мите Илиевски, Драгица Спасова, Љупчо Михајлов, Наталија Маркова**
Руждиќ, Душан Спасов, Ристо Кукутанов, Милан Ѓеорѓиевски
ОРГАНСКО ПРОИЗВОДСТВО НА ЗДРУЖЕНИ ЖИТНИ
ПОСЕВИ



- Mite Ilievski, Dragica Spasova, Ljupco Mihajlov, Natalia Markova
Ruzdik, Dusan Spasov, Risto Kukutanov, Milan Georgievski**
ORGANIC PRODUCTION OF MIXED CEREAL CROPS 83
- Душан Спасов, Драгица Спасова, Билјана Атанасова, Мите
Илиевски, Милан Ѓеорѓиевски**
ЕФИКАСНОСТА НА НЕКОИ ИНСЕКТИЦИДИ – АКАРИЦИДИ
ВО СУЗБИВАЊЕТО НА ЦРВЕНО-КАФЕАВОТО ПАЈАЧЕ
(*ACULOPS LYCOPERSICAE* M.) КАЈ ДОМАТИТЕ ВО
ЗАШТИТЕН ПРОСТОП
**Dusan Spasov, Dragica Spasova, Biljana Atanasova, Mite Ilievski,
Milan Georgievski**
EFFECTIVENESS OF SOME INSECTICIDE - ACARICIDE TO THE
ERADICATION OF *ACULOPS LYCOPERSICAE* M. AT TOMATOES
GROWN IN OUSES 93
- Викторија Максимова, Лилјана Колева-Гудева, Татјана Рушковска,
Рубин Гулабоски**
ОДРЕДУВАЊЕ НА ВКУПНИ АНТИОКСИДАТИВНИ
ОСОБИНИ НА КАПСАИЦИНОИДИ ВО *CAPSICUM* ВИДОВИ
КУЛТИВИРАНИ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
**Viktorija Maksimova, Liljana Koleva Gudeva, Tatjana Ruskovska, Rubin
Gulaboski**
DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDATIVE CAPACITIES
OF CAPSAICINOIDS IN *CAPSICUM* SPECIES CULTIVATED IN
REPUBLIC OF MACEDONIA101
- Илија Каров, Саша Митрев, Билјана Ковачевиќ, Емилија Костадиновска**
ПЕПЕЛНИЦА (*MICROSPHAERA DIFFUSA*) НА ГОЏИ БЕРИ
(*LYCIUM CHINENSE*) ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
Pija Karov, Sasa Mitrev, Biljana Kovacevik, Emilija Kostadinovska
POWDERY MILDEWS (*MICROSPHAERA DIFFUSA*) ON GODJI
BERI (*LYCIUM CHINENSE*) IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA111
- Илија Каров, Саша Митрев, Билјана Ковачевиќ, Зорница Стојанова,
Емилија Костадиновска, Росица Родева**
GNOMONIA LEPTOSTYLA (Fr.) Ces. et de Not. ПРИЧИНИТЕЛ НА
АНТРАКНОЗА КАЈ ОРЕВОТ ВО ИСТОЧНИОТ РЕГИОН НА
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
**Pija Karov, Sasa Mitrev, Biljana Kovacevik, Zornitsa Stoyanova, Emilija
Kostadinovska, Rossitza Rodeva**
GNOMONIA LEPTOSTYLA (Fr.) Ces. et de Not. CAUSER OF
WALNUT ANTHRACNOSE IN THE EAST PART OF THE
REPUBLIC OF MACEDONIA119



ПРЕДГОВОР

Публикувањето на дванаесеттото издание на Годишниот зборник на Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, 2014, вол. 12, е уште еден евидентен доказ за посветеноста на нашиот факултет во науката и нејзината апликација во земјоделството.

Дванаесеттото издание на Годишниот зборник на Земјоделски факултет е прво издание кое во целост е изведувано преку електронскиот систем УГД журнари достапен на веб-страницата на УГД, на линкот <http://js.ugd.edu.mk/>

Електронскиот систем за публикување или UGD Publishing System ги опфаќа сите периодични изданија на УГД, зборници и меѓународни списанија на кои издавач е Универзитетот „Гоце Делчев“ – Штип. Научни, стручни и апликативни трудови од вкупно 14 (четиринаесет) периодични изданија домашни и меѓународни се објавуваат онлајн. Пријавувањето, рецензирањето и целосното издавање на пријавените ракописи за публикување е исклучиво електронски преку УГД журнари, а за публикување на научни, стручни и апликативни трудови во Годишниот зборник на ЗФ, УГД е достапен линкот

<http://js.ugd.edu.mk/index.php/YFA>

Современите информатички и комуникациски технологии, како и новите техники за научно истражување, наложија промовирање на електронски пристап во публикувањето на резултатите од научноистражувачката дејност на Универзитетот. Тоа создаде потреба да се користи нов и современ пристап во издаваштвото со употреба на моќни алатки како што се е-журнали и е-библиотека на УГД.

Науката е примарен фактор за конструктивен развојот на секоја област од современото општество. Научниот кадар од Земјоделскиот факултет постојано ги следи новите достигнувања во науката и современото земјоделие и ги имплементира новите трендови во научно-стручните истражувања како и во студиските програми од сите три циклуси. Од сето тоа произлегуваат дванаесетте изданија на Годишен зборник, акредитирани повеќе студиски програми за сите циклуси на студирање на Земјоделскиот факултет, бројни проекти домашни и меѓународни, учество на престижни научни и стручни манифестации на научниот кадар од факултетот, и бројни достигнувања и успешна примена на науката во соодветната земјоделска практика.

Издавачки одбор
Штип, декември 2014 год.

Одговорен уредник
Ректор, проф. д-р Саша Митрев



УДК:663.2:547.917

Оригинален научен труд
Original research paper

ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА SO_2 И РЕДУЦИРАЧКИ ШЕЌЕРИ ВО МАКЕДОНСКИ ВИНА

Виолета Иванова-Петропулос^{1*}, Саша Митрев¹

Краток извадок

SO_2 делува како антиоксидант, спречувајќи ја активноста на оксидазите, но и како антимикробен агенс, а покажува и потенцијал за обелување на пигментите и елиминација на непријатни мириси кај вината. Глукозата и фруктозата се главните јаглехидрати во грозје и вино, кои вообичано се нарекуват редуцирачки шеќери. Во ова истражување е извршена проверка на титрациски методи за определување на SO_2 (слободен и вкупен) и на редуцирачки шеќери во вина. Линеарноста, точноста и прецизноста на методите беше потврдена со примена на стандардни раствори од SO_2 и редуцирачки шеќери (фруктоза и глукроза) подготвени во определен концентрациски опсег, како и со ниски, средни и високи концентрации. Дополнително, точноста на методите е потврдена со методата на стандардни додатоци. Беа проверени и повторливоста и репродукцибилноста на методите со титрација на реални примероци вина, анализирани со соодветен број на повторувања. Валидираните методи се применети за определување на содржината на слободен и вкупен SO_2 , како и редуцирачки шеќери во десет вина од сортата *вранец*, произведени со различни квасци за ферментација.

Клучни зборови: SO_2 , редуцирачки шеќери, вино, титрација

¹ Универзитет „Гоце Делчев“, Земјоделски факултет – Штип, Република Македонија
University Goce Delcev, Faculty of Agriculture – Stip, Republic of Macedonia
Corresponding author: Violeta Ivanova Petropulos, e-mail: violeta.ivanova@ugd.edu.mk



DETERMINATION OF SO₂ AND REDUCING SUGARS IN MACEDONIAN WINES

Violeta Ivanova-Petropulos^{1*}, Sasa Mitrev¹

Abstract

SO₂ acts as an effective antioxidant, preventing the activity of the oxidases and antimicrobial agent, showing a potential for bleaching the pigments and elimination of unpleasant odour in wines. Glucose and fructose are the main carbohydrates in grapes and wine, usually called reducing sugars. In this study, three titrimetric methods for determination of SO₂ (free and total) and reducing sugars in wines were checked. The linearity, accuracy and precision of the methods were confirmed using standard solution of SO₂ and reducing sugars (fructose and glucose) prepared in appropriate concentration range, as well as with low, medium and high concentrations. Additionally, the accuracy of the methods was confirmed by standard additions. Repeatability and reproducibility were confirmed with titration of real samples, analyzed with appropriate repetitions. Validated methods were applied for determination of the content of free and total SO₂, as well as reducing sugars in ten Vranec wines produced with different yeasts for fermentation.

Keywords: SO₂, reducing sugars, wine, titration

1. Introduction

Wine is a complex mixture of a large number of compounds including carbohydrates, alcohols, aldehydes, esters, acids, proteins and vitamins. It also contains a number of elements, polyhydroxy aromatic and polyphenolic compounds, such as tannins, anthocyanins and flavonols, which contribute highly to colour and taste [1-5].

Sulfur dioxide is naturally present in wine, which can be produced at concentrations up to 64 mg/L by the yeast metabolism [6]. However, most of the yeasts cannot produce more than 10 mg/L SO₂, so that contents of SO₂ higher than 30 mg/L usually are result of doses added during the vinification. The use of SO₂ in winemaking is due to its ability of an effective antioxidant, preventing the activity of the oxidases. Also, it has significant activity as antimicrobial agent, as well as potential for bleaching the pigments and elimination of unpleasant odours (as a result of oxidation). Because yeasts are very sensitive to SO₂ (also, to other stress factors), it can selectively act against the wild yeasts, which come from the grape skin or equipment in the winery, and stop their activity. Sulfur dioxide can be added in a form of a salt, potassium metabisulphate (K₂S₂O₅), which can be ionized in acid media, releasing gaseous SO₂.



Sulfur dioxide is present in wines as free and total SO_2 . SO_2 that is bound to aldehydes (acetaldehyde), sugars, tannins and anthocyanins is bound SO_2 . Free and bound SO_2 in wine exist in a dynamic equilibrium:



Only free SO_2 possesses antiseptic and antioxidant properties. Higher amounts of SO_2 negatively influence the wine quality (flavor and taste).

The content of SO_2 (free and total) is usually determined by iodine titration, according to the Ripper's method [7], using standard solution of iodine in presence of starch as an indicator and sulfuric acid. Before titration, solution of NaOH is used in order to release the bound SO_2 . Iodine reacts with sulfur dioxide in the following way:



In addition, glucose and fructose are the main carbohydrates in grapes and wine, usually called reducing sugars. The content of sugars in grapes depends on variety, maturity and health conditions. Varieties of *Vitis vinifera* accumulate about 20 % sugars and even more during the ripening phase, while varieties from *Vitis labrusca* and *Vitis rotundifolia* rarely achieve this level of sugars.

During fermentation, sugars are broken down by the action of the yeast, thus forming an alcohol (ethanol) and carbon dioxide:



The ratio of glucose/fructose decreases from 0.95 initially to 0.25 at the end of fermentation. In fact, the glucose ferments at the beginning since it is used by different yeasts, which means that fructose is more prevalent than glucose. Dry wines contain residual sugar whose content is less than 1.5 g/L. At this concentration, which is low, the sweetness of wine is not felt.

For determination of reducing sugars in must and wine, chemical methods based on reduction-oxidation (redox) reactions that take place between sugars and Fehling's solution, are usually applied. Fehling's solution contains copper (II) ions that can be reduced by some sugars to copper (I) ions. This reaction can be used for the quantitative analysis of reducing sugars.

The aim of this work is validation of the methods for determination of SO_2 and reducing sugars in wines using titration methods, and then, application of the methods for analysis of different wine samples from Macedonia.



2. Materials and methods

2.1. Reagents

Standard solution of SO₂ and standards of glucose and fructose were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All other reagents used were with analytical grade of purity.

2.2. Wine samples

In total, 10 red wines from Vranec variety (vintage 2013) produced with different yeasts for fermentation were analyzed.

2.3. Determination of SO₂

Free SO₂. A volume of 50 mL wine is transferred to flask of 250 mL, followed by addition of 10 mL 25 % (v/v) solution of sulfuric acid (1+3) and 2-3 mL 1 % solution of starch as an indicator. Sulfuric acid is added since the oxidation in acid conditions is more intensive. The prepared wine is titrated with a standard solution of iodine with concentration of 0.01 mol/L until the endpoint of titration (change of color to dark-blue). The following equation is used for calculation of the content of free SO₂:

$$\begin{aligned} \text{Free SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot c(I_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1000/V(\text{wine}) \\ \text{Free SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot 12.8 \end{aligned}$$

Total SO₂. A volume of 25 mL of 1 M NaOH is transferred to flask of 250 mL, followed by addition of 50 mL wine. The sample is mixed, closed with a rubber stopper and left for 10 min in a dark place. Then, 10 mL 25 % (v/v) solution of sulfuric acid (1+3) and 2-3 mL 1 % solution of starch are added and the sample is titrated with standard solution of iodine (0.01 mol/L) until the endpoint of titration (change of color to dark-blue). The following equation is used for calculation of the content of total SO₂:

$$\begin{aligned} \text{Total SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot c(I_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1000/V(\text{wine}) \\ \text{Total SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot 12.8 \end{aligned}$$

The content of SO₂ (free or total) can be directly read out from Table 1, using the consumed volume of I₂ for titration of the sample.

2.4. Determination of reducing sugars

For determination of reducing sugars, wine is diluted 10 times and then, 10 mL of the diluted wine is transferred to a flask (250 mL) that contains 10 mL Fehling I and 10 mL Fehling II solutions. The flask with the sample is heated



on a moderate temperature until boiling temperature (or until appearance of 1-2 bubbles), followed with a change of color to red-brown (depending on the sugar content in wine). After heating, the flask is cooling (under tap water), and then, 10 mL 20 % (m/v) solution of KI and 10 mL 25 % (v/v) sulfuric acid are added to the flask. The flask is closing with a rubber stopper and left in a dark place to stand 2-3 min. Then, 2-3 mL of 1 % solution of starch is added and the sample is titrated with 0.1 mol/L solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ until change of color from yellow-brown to milky-white. Previously, a blank sample should be prepared and titrated in a same way as wine, using distilled water (20 mL). Then, the total consumed volume of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ is calculated as a difference between the volumes of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumed for titration of the blank and wine:

$$V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{слепа проба}} - V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{вино}}$$

and used for determination of the value for sugars content, found in a table (Table 2).

Table 1. Table for SO_2 (mg/L) in wine

$V(\text{I}_2)/$ mL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0.00	1.28	2.26	3.84	5.12	6.40	7.68	8.96	10.24	11.52
1	12.80	14.08	15.36	16.64	17.92	19.20	20.48	21.76	23.04	24.32
2	25.60	26.88	28.16	29.44	30.72	32.00	33.28	34.56	35.84	37.12
3	38.40	39.68	40.96	42.24	43.52	44.80	46.08	47.36	48.64	49.92
4	51.20	52.48	53.76	55.04	56.32	57.60	58.88	60.16	61.44	62.72
5	64.00	65.28	66.56	67.84	69.12	70.40	71.68	72.96	74.24	75.52
6	76.80	78.08	79.36	80.64	81.92	83.20	84.48	85.76	87.04	88.32
7	89.60	90.88	92.16	93.44	94.72	96.00	97.28	98.56	99.84	101.12
8	102.40	103.68	104.96	106.24	107.52	108.80	110.08	111.36	112.64	113.92
9	115.20	116.48	117.76	119.04	120.32	121.60	122.88	124.16	125.44	126.72
10	128.00	129.28	130.56	131.84	133.12	134.40	135.68	136.96	138.24	139.52
11	140.80	142.08	143.36	144.64	145.92	147.20	148.48	149.76	151.04	152.32
12	153.60	154.88	156.16	157.44	158.72	160.00	161.28	162.56	163.84	165.12
13	166.40	167.68	168.96	170.24	171.52	172.80	174.08	175.36	176.64	177.92
14	179.20	180.48	181.76	183.04	184.32	185.60	186.88	188.16	189.44	190.72
15	192.00	193.28	194.56	195.84	197.21	198.40	199.68	200.96	202.24	203.52
16	204.80	206.08	207.36	208.64	209.92	211.20	212.48	213.76	215.04	216.32
17	217.60	218.88	220.16	221.74	222.72	224.00	225.28	226.56	227.84	229.12
18	230.40	231.68	232.96	234.24	235.52	236.80	237.08	238.36	239.64	240.92
19	243.20	244.48	245.76	247.04	248.32	249.60	250.88	252.16	253.44	254.72
20	256.00	257.28	258.56	259.84	261.12	262.40	263.68	264.96	266.24	267.52
21	268.80	270.08	271.36	272.64	273.92	275.20	276.48	277.76	279.04	280.32



Table 2. Table for reducing sugars (g/L) in wine

V(Na ₂ S ₂ O ₃)/ mL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0.0	0.3	0.6	1.0	1.3	1.6	1.9	2.2	2.6	2.9
1	3.2	3.5	3.8	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7	6.1
2	6.4	6.7	7.1	7.4	7.7	8.1	8.4	8.7	9.0	9.4
3	9.7	10.0	10.4	10.7	11.0	11.4	11.7	12.0	12.3	12.7
4	13.0	13.3	13.7	14.0	14.4	14.7	15.0	15.4	15.7	16.1
5	16.4	16.7	17.1	17.4	17.8	18.1	18.4	18.8	19.1	19.5
6	19.8	20.1	20.5	20.8	21.2	21.5	21.8	22.2	22.5	22.9
7	23.2	23.5	23.9	24.2	24.6	24.9	25.2	25.6	25.9	26.3
8	26.5	26.9	27.3	27.6	28.0	28.3	28.6	29.0	29.3	29.7
9	29.9	30.3	30.7	31.0	31.3	31.7	32.0	32.7	32.7	33.0
10	33.4	33.7	34.1	34.4	34.8	35.1	35.4	35.8	36.1	36.5
11	36.8	37.2	37.5	37.9	38.2	38.6	38.9	39.3	39.6	40.0
12	40.3	40.7	41.0	41.4	41.7	42.1	42.2	42.8	43.1	43.5
13	43.8	44.2	44.5	44.9	45.2	45.6	45.9	46.3	46.6	47.0
14	47.3	47.7	48.0	48.4	48.7	49.1	49.4	49.8	50.1	50.5
15	50.8	51.2	51.5	51.9	52.2	52.6	52.9	53.3	53.6	54.0
16	54.3	54.7	55.0	55.4	55.8	56.2	56.5	56.8	57.3	57.6
17	58.0	58.4	58.8	59.1	59.5	59.9	60.3	60.7	61.0	61.4
18	61.8	62.2	62.5	62.9	63.3	63.7	64.0	64.4	64.8	65.1
19	65.5	65.9	66.3	66.7	67.1	67.5	67.8	68.2	68.6	69.1
20	69.4	69.8	70.2	70.6	71.0	71.4	71.7	72.1	72.5	72.9
21	73.3	73.7	74.1	74.5	74.9	75.3	75.6	76.0	76.4	76.8
22	77.2	77.6	78.0	78.4	78.8	79.2	79.6	80.0	80.4	80.8
23	81.2	81.6	82.0	82.4	82.8	83.2	83.6	84.0	84.4	84.8
24	85.2	85.6	86.0	86.4	86.8	87.2	87.6	88.0	88.4	88.8
25	89.2	89.6	90.0	90.4	90.8	91.2	91.6	92.0	92.4	92.8

3. Results and discussion

3.1. Methods validation

Linearity, accuracy, precision, repeatability and reproducibility were checked for SO₂ and reducing sugars in wine, considering the complete analytical procedures. For quantitative analysis of SO₂ and reducing sugars, we used standard solutions of SO₂ and carbohydrates (glucose and fructose), respectively.



Linearity. The linearity data of the analytical methods for determination of free SO₂, total SO₂ and reducing sugars are presented in Table 3. Each concentration level was analyzed in triplicate. Linearity was satisfactory in all cases with correlation coefficients (R^2) of 0.9999.

Table 3. Intercept, slope and correlation coefficients (R^2)

Compound	Intercept	Slope	R^2	Range
SO ₂ *	0.4307	0.9943	0.9999	0-500 (mg/L)
SO ₂ **	0.3512	0.9957	0.9999	0-500 (mg/L)
Reducing sugars	0.0603	0.9987	0.9999	0-100 (g/L)

*SO₂ determined with the procedure for free SO₂

**SO₂ determined with the procedure for total SO₂

Reducing sugars: glucose+fructose

Accuracy and precision. The intra-day and inter-day accuracy and precision were determined with titration of standard solutions of SO₂ and reducing sugars with low, medium and high concentration (Table 4). For determination of intra-day accuracy and precision, freshly prepared solutions were used, analyzed immediately, in 10 repetitions during the day. Inter-day accuracy and precision were determined with titration of the standard solutions during 10 consecutive days. The accuracy was determined with calculation of the relative error of the determined concentration compared with the true (nominal) value. Precision was expressed as relative standard deviation (RSD). Results for inter-day and intra-day accuracy and precision are presented in Table 4. Relative errors are ranged between -0.16 to 0.86 %, and relative standard deviations in range of 0.47 to 5.95 %. Obtained results confirm that the suggested methods for determination of SO₂ (free and total) and reducing sugars are accurate and convenient for quantitative analysis.



Table 4. Intra- and Inter- day accuracy and precision data for standard solutions of SO₂ and reducing sugars (n=10)

Sample	SO ₂						Reducing sugars					
	10 mg/L		50 mg/L		100 mg/L		10 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	Found	e _R (%)	Found	e _R (%)	Found	e _R (%)	Found	e _R (%)	Found	e _R (%)	Found	e _R (%)
<i>Intra- day accuracy and precision</i>												
<x>	9.98	-0.16	50.17	0.35	100.22	0.22	10.15	1.5	50.23	0.46	50.23	0.04
SD	0.51		0.51		0.58		0.32		0.24		0.24	
RSD (%)	5.13		1.02		0.58		3.12		0.47		0.47	
<i>Inter- day accuracy and precision</i>												
<x>	9.86	-1.44	50.67	1.37	100.74	0.73	10.04	0.4	10.04	0.06	10.04	0.86
SD	0.58		0.63		0.59		0.31		0.31		0.31	
RSD (%)	5.95		1.24		0.58		3.12		3.12		3.12	

Labels: <x> - average, SD – standard deviation, RSD – relative standard deviation

The accuracy of the methods was checked using the standard addition method. One red and one white wine sample, previously analyzed, were spiked with appropriate volumes of the standard solutions of SO₂ and reducing sugars (glucose and fructose) with concentration of 5, 10 and 50 mg/L for each standard. The satisfactory results for the recovery ranging from 92.5–105% (Table 5) confirmed that the methods are accurate and convenient for quantitative analysis.

Table 5. Results from the standard additions method for checking the accuracy of the titration methods for determination of SO₂ (free and total) and reducing sugars in wine samples (n = 3)

	γ (Free SO ₂)			γ (Total SO ₂)			γ (Reducing sugars)		
	Calcu lated /mg/L	Found /mg/L	Reco very, %	Calcu lated /mg/L	Found /mg/L	Reco very, %	Calcu lated /mg/L	Found /mg/L	Recovery, %
White wine									
Standard addition									
I	33.16	32.00	96.50	88.20	89.60	101.6	11.40	11.53	101.1
II	38.16	37.12	97.27	93.20	92.16	98.88	16.40	15.36	93.66
III	78.16	76.80	98.26	133.20	131.8	98.98	56.40	55.04	97.59
Red wine									
I	19.08	19.20	100.6	58.76	60.16	102.4	8.84	8.96	101.4
II	24.08	24.32	100.9	63.76	66.56	104.4	13.84	12.80	92.49
III	64.08	64.00	99.8	103.76	104.9	101.3	53.84	55.04	102.2



Repeatability and reproducibility. Additionally, to confirm the accuracy of the methods and to check their repeatability, 10 repetitions in one day were performed on two real samples (one red and one white wine). Results are presented in Table 6. As can be seen from the table, the values for the standard deviations for repeatability for all three methods are very low (SD = 0.14 to 0.66 for white wine and SD = 0.17 to 0.54 for red wine), which confirms that they are accurate and can be applied for determination of SO₂ (free and total) and reducing sugars in white and red wines.

Table 6. Results for repeatability and reproducibility of SO₂ (free and total) and reducing sugars in white (Smederevka) and red (Vranec) wines

Sample	Content of free SO ₂ /mg/L	Content of total SO ₂ /mg/L	Content of reducing sugars/g/L
Repeatability (10 replicates in one day)			
<i>Smederevka</i>			
<x>	28.93	82.56	6.49
SD	0.66	0.67	0.14
RSD (%)	2.28	0.82	2.23
<i>Vranec</i>			
<x>	13.82	53.50	3.72
SD	0.54	0.54	0.17
RSD (%)	3.90	1.01	4.53
Reproducibility (3 replicates x 3 titrations x 5 days)			
<i>Smederevka</i>			
<x>	29.01	82.77	6.60
SD	0.74	0.74	0.17
RSD (%)	2.55	0.89	2.62
<i>Vranec</i>			
<x>	13.65	53.33	3.67
SD	0.74	0.74	0.23
RSD (%)	5.41	1.39	6.30

<x> - average, SD – standard deviation, RSD – relative standard deviation

Reproducibility was also checked with replicate samples analyzed in five different days (3 replicates x 3 titrations x 5 days) and the RSD for each parameter was calculated (Table 6). Accordingly, the method showed good repeatability and reproducibility and the values for RSD were <10% (most of the values were <5 %).



3.2. Application of methods for analysis of Vranec wines fermented with different yeast

Ten Vranec wines were fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains: Clos, RC212, D254 and BDX (from Lallemand), and Vinalco (from Bitola, R. Macedonia) and analyzed for determination of SO₂ and reducing sugars. Results are presented in Table 7. It was noticed that the content of free and total SO₂ ranged in quantities sufficient to protect the wines from oxidation and other microbial infections. Thus, the amount of free SO₂ ranged from 24.32 to 26.88 mg/L, the total SO₂ ranged from 51.2 to 67.84 mg/L, while the content of reducing sugars was not very different between the wines (ranged from 5.4 to 6.1 g/L), which means that the rate of alcoholic fermentation was similar in all wines where different yeast cells were used to ferment glucose into ethanol.

Table 7. Content of SO₂ (free and total) and reducing sugars in Vranec wines fermented with different yeasts for fermentation

Wines	Free SO ₂ (mg/L)	Total SO ₂ (mg/L)	Reducing sugars (g/L)
V-L1	26.88	53.76	2.9
V-L2	23.04	57.60	2.6
V-L3	24.32	62.72	3.2
V-L4	25.60	52.48	3.2
V-Vi1	32.00	51.2	2.6
V-Vi2	24.32	58.88	2.6
V-Vi3	23.04	55.04	2.0
V-Vi4	25.60	67.84	3.2
V-Vi5	25.60	58.88	2.9

Abbreviation of wines: V-Vranec, Vi-Vinalco yeast, L-Lallemand yeasts: 1-Clos, 2-RC212, 3-D254, 4-BDX

4. Conclusion

Titrimetric methods for determination of SO₂ (free and total) and reducing sugars in wines were checked. Validation parameters of the methods confirmed that they are fast, accurate, precise and easily available in every laboratory. These methods are applicable in wineries for control of the content of SO₂ and sugars during the wine production. The content of SO₂ is usually higher in white wines compared to red wines since white wines are easily oxidizable and therefore need higher dose of SO₂ for protection. Vranec wines fermented with



different yeasts contained appropriate quantities of free and total SO₂, enough for their protection from oxidation. All wines were dry, containing low value of reducing sugars (< 5 g/L).

5. References

- [1] Mayén M., Mérida J. and Medina M. (1995). Flavonoid and nonflavonoid compounds during fermentation and post-fermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 255-261.
- [2] Canals, R., Llaudy, M.C., Valls, J., Canals, J.M. and Zamora, F. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4019-4025.
- [3] Ivanova V., Stefova M., Vojnoski B., Dörnyei Á., Márk L., Dimovska V., Stafilov T. and Kilár F. (2011). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International* 44: 2851-2869.
- [4] Ivanova V., Stefova M., Vojnoski B., Stafilov T., Bíró I., Bufa A., Felinger A. and Kilár F. (2013). Volatile composition of Macedonian and Hungarian wines assessed by GC-MS. *Food Bioprocess Technology* 6(6): 1609-1617.
- [5] Ivanova-Petropulos, V., Wiltsche, H., Stafilov, T., Stefova, M., Motter, H. and Lankmayr, E. (2013). Multi-element analysis of Macedonian wines by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP–MS) and inductively coupled plasma–optical emission spectrometry (ICP–OES) for their classification. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 32(2): 265-281.
- [6] Larue F., Park M. K. and Caruana C. (1985). Quelques observations sur les conditions de la formation d'anhydride sulfureux en vinification. *Connaissance Vigne Vin* 19: 241–248.
- [7] Vahl J.E. and Converse J. E. (1980). Ripper procedure for determining sulfur dioxide in Wine: Collaborative study, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63: 194-9.



ПРИСУСТВО НА СТОЛБУР ФИТОПЛАЗМАТА КАЈ АВТОХТОНАТА МАКЕДОНСКА СОРТА СТАНУШИНА

Емилија Костадиновска¹, Саша Митрев¹, Илија Каров¹, Виолета Димовска¹

Краток извадок

Фитоплазматските промени кај една од најперспективните култури на територијата на Република Македонија, виновата лоза, припаѓаат во групата на најмалку проучуваните и истражувани патогени промени кај нас. За разлика од нашата земја, во поголем број европски земји, на овие промени се работи многу интензивно, што резултира со бројни публикации значајни за науката и праксата.

Сортата *станушина* (суровина за производство на црвени вина) е домашна автохтона сорта од Тиквешкото виногорје, каде сè уште се одгледува. Тоа е сорта од која се добиваат црвени, јаки и тешки вина. Оваа сорта, во споредба со високоосетливите сорти *шардоне* и *вранец*, е помалку осетлива на проучуваните групи на фитоплазми. Симптомите од инфекциите со фитоплазми, кај сортата *станушина*, се разликуваат од општите одлики на симптомите кај црвените сорти, т.е. наместо очекуваните поцрвенувања, продуцира симптоми на пожолтување и свиткување на листовите, што се одлики за белите сорти.

Во текот на периодот предвиден за ова истражување (2012-2013), континуирано беше следена состојбата на терен од симптоматолошка гледна точка. Целта на ова истражување беше од колекционираниот материјал за анализа, во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, да се направи типизација на присутните патогени со примена на најсовремени молекуларни методи PCR/RFLP, со проучување на четири фитоплазматски генски локуси: *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1* ген (*stol* - *1H0*), *stamp* ген, за детекција на видот на присутните фитоплазми. Резултатите ја идентификуваа XII-A групата на фитоплазми кај сортата *станушина*. Оваа група е позната како застапена во Тиквешкото виногорје.

Клучни зборови: *фитоплазми*, *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1* (*stol* - *1H0*), *stamp*

1) Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип
emilija.kostadinovska@ugd.edu.mk



PRESENCE OF STOLBUR PHYTOPLASMA ON LOCAL VARIETY STANUSINA

Emilija Kostadinovska², Sasa Mitrev, Ilija Karov, Violeta Dimovska

Abstract

Phytoplasmic changes as well as virus diseases in one of the most promising crops in the Republic of Macedonia, the grapevine, are among the least studied and researched pathogenic changes in the country. In contrast, in other European countries, these changes have been investigated very intensively with results in publications relevant to the sciences and practice.

Variety Stanusina (used for red wine production), is autochthone variety from Tikves grapevine region, and we can still find there. For scientific investigation of the presence of phytoplasma on Stanusina, this variety, opposite from the Chardonnay and Vranec, is less sensitive. The symptoms in the field caused by phytoplasma disease on the variety Stanusina, are opposite from the literature, yellowing rolling leaves, characteristic of white variety.

During the period dedicated to this research (2012-2013), the situation was constantly monitored from the aspect of symptomatology. The main aim of the study was from collected material analyzed in the Laboratory of plant and environment protection, to make typification of the present pathogens by using modern molecular methods of PCR / RFLP, by studying four phytoplasmic gene loci: *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1 gene (stol - 1H0)*, *stamp gene*, for the detection of the type of the present phytoplasmas. We identify presence of phytoplasmas XII-A group in the Tikves grape region.

Key words: phytoplasmas, *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1 (stol - 1H0)*, *stamp*

1. Вовед

Одгледувањето на виновата лоза не само во наши услови, туку глобално на светско ниво, е процес на соочување со голем број на болести и штетници, кои секоја година последователно предизвикуваат штети во квантитетот и квалитетот на производството на грозје [1 - 6].

Проучувањето на епидемиологијата на болестите кај виновата лоза има многу важна улога во изготвување на стратегија за ефикасно и навремено менаџирање на појавата на болести и намалување на непотребните хемиски третмани [7-8]. Постојано во фокусот на научната

2) Faculty of Agriculture, Goce Delcev University, Stip, Macedonia
emilija.kostadinovska@ugd.edu.mk



јавност се интеракциите помеѓу виновата лоза како домаќин, условите на средината, и трите најзначајни патогени габи: *Uncinula necator* – причинителот на пепелница, *Plasmopara viticola* – причинителот на пламеница и *Gleosporium ampelophagum* – причинителот на антракноза на виновата лоза [7].

Меѓутоа, во најновите истражувања и публикувани податоци на глобално ниво се поголем акцент се дава на изготвување на контролна стратегија за заштита на виновата лоза од фитоплазматските промени. Овие интраклеточни облигатни патогени организми се шират многу лесно и брзо. За заштита на виновата лоза од нив се потребни многу енергија, труд, знаење и временски период [9-10]. “Flavescence doree“ (FD) (16SrV) и “Bois noir“ (BN) (16SrXII) се двете групи на фитоплазми кои предизвикуваат сериозни загуби кај голем број на европски лозови насади [4-6].

Фитоплазмите т.н. *микоплазматски слични организми* (*Mycoplasma like organisms* – MLOs) се специјализирани форми на бактерии кои се облигатни паразити на растителното флоемско ткиво или пак на неколку видови на инсекти. Фитоплазмите дивергирале во текот на својот развој од грам позитивни бактерии, кои припаѓаат на родот *Candidatus Phytoplasma* и на класата *Mollicutes* [11]. Тие се плеоморфни (со непостојана форма), без клеточен ѕид, со дијаметар помал од 1 μm , и многу мала големина на геномот (680-1.600kb) [12-14]. Детекцијата и идентификацијата на фитоплазмите подолг временски период се базирала на биолошки карактеристики и експресијата на симптомите, затоа што не можеле да се изолираат на хранителна подлога и на тој начин да се проучуваат во чиста култура [15].

Според најновите истражувања на тимот на Contaldo N., во 2012 за првпат е објавено култивирање на фитоплазмите на хранлив медиум [16]. Методите и техниките на култивирање на фитоплазмите се долготраен процес, кој досега не е повторен и потврден. Сепак, PCR-RFLP и анализата на секвенционирање на 16S rRNA PCR амплифицираниот регион, карактеристичен за рибозомалниот протеински ген, како и фактор на елонгација TU (*tuf* gene), сè уште се основни алатки за молекуларна идентификација, карактеризација и класификација на фитоплазмите [5-6].

Фитоплазмите се регистрирани како нестрого специфични патогени, затоа што често може да се сретнат и кај други растителни видови и фамилии [14, 17, 18].

Фитоплазмите предизвикуваат многу деструктивни заболувања кај виновата лоза и претставуваат проблем во современото одгледување



на виновата лоза во поголемите значајни винарски центри, како што се Франција, Италија, Шпанија

Основна карактеристика на фитоплазмите кај виновата лоза е брзото ширење и големата економска штета, кои често доведуваат до сушење на лозите и пропаѓање на насадите [19-21]. Во природни услови фитоплазмите се пренесуваат со помош на инсекти – цикади од фамилијата *Cicadellidae* (leafhoppers), *Fulgoridae* (planthoppers) и *Psyllidae*, редот *Homoptera*, [22-24].

Сортата *станушина* (суровина за производство на црвени вина) е домашна автохтона сорта од Тиквешкото виногорје, каде што сè уште се одгледува. Тоа е сорта од која се добиваат црвени, јаки и тешки вина. Оваа сорта, во споредба со високоосетливите сорти *шардоне* и *вранец*, е помалку осетлива на проучуваните групи на фитоплазми. Симптомите од инфекциите со фитоплазми, кај сортата *станушина*, се разликуваат од општите одлики на симптомите кај црвените сорти, т.е. наместо очекуваните поцрвенувања, продуцира симптоми на пожолтување и свиткување на листовите, што се одлики за белите сорти. Во нашето истражување направивме анализа на 16SrXII-A фитоплазмата присутна кај автохтоната македонска сорта *станушина*, со проучување на четири фитоплазматски генски локуси: *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1* ген (*stol - 1H0*), *stamp* ген.

2. Материјал и метод на работа

2.1. Колекционирање на материјал за анализа во лозовите насади во Тиквешко виногорје

За да може да се добие вистинска слика за здравствената состојба на автохтоната македонска сорта *станушина* во регионите каде што сè уште се одгледува, континуирано се следеше состојбата на терен од времето на појава на првите симптоми до крај на вегетацијата (почнувајќи од крајот на мај и завршувајќи до крајот на октомври), во периодот 2012-2013 год.

Покрај теренската анализа на состојбата со виновата лоза (фотодокументација и забележување на процентот на инфекција), за лабораториско испитување беше собирана симптоматична лисна маса (репрезентативно, 10 листови по примерок). При собирањето на лисна маса за секој примерок посебно, се внимаваше да се земаат симптоматични листови, млади и без некротирана нерватура. Вака собраната лисна маса, задолжително беше теренски запишувана со карактеристики прикажани во табела 1.



Табела 1. Евиденција на карактеристиките на терен во сезона 2012-2013
Table 1. Field observed characteristics in the season 2012-2013

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта на винова лоза	Вкупно примероци за анализа:		Симптоми од терен
				2012	2013	
Кавадарци	с. Крњevo м.в. Брловец	41°24'13.71"N 21°59'36.70"E 650м н.в.	Станушина	19	10	++
	с.Раец	41°24'12.60"N 21°50'44.14"E	Станушина	10	15	+++

При следењето на симптомите и запишување на карактеристиките на собраниот материјал за анализа, во опис на интензитетот на целокупните симптоми на терен, беа користени следниве ознаки, опишани во табела 2.

Табела 2. Опис на интензитетот на симптомите на собраниот материјал за анализа

Table 2. Description of symptom intensity on collected material

а. нејасни симптоми	+?
б. слаба појава на симптом (до 30% на една лоза)	+
в. јасно изразени симптоми (30 до 60% на една лоза)	++
г. силно изразена инфекција (над 60 % зафатеност на една лоза)	+++
д. нема појава на симптоми	/

2.2. Лабораториска анализа

При средувањето на материјалот за анализа, постапките беа во следниот редослед:

- по теренско донесување на материјал во лабораторија се вршеше шифрирање на истиот и чување на +4°C за краток временски период (неколку дена до подготовка за анализа);
- бидејќи се работи за флоремски патогени, од лисната маса се земаше само нерватурата;
- секогаш се одмеруваше во два примерока (оригинален кој се испитува и контролен кој се остава во случај на повторување на анализата);
- средениот материјал се чуваше на температура од - 20°C за период од неколку месеци (додека да се направат анализите) или на температура од - 80°C, за подолг временски период.



2.2.1. Молекуларни методи и современи лабораториски тестови за докажување на присуство на столбур фитоплазмата кај сортата станушина

Генерално употребуваниот метод за ДНК екстракцијата беше според протоколот опишан од Angelini et al., 2001, со модификација [25]. По добиената ДНК беа користени молекуларни методи со неколку групи на прајмерски сетови за детекција на различни геноми од столбур фитоплазмата.

Условите за реализација на една полимеразно верижна реакција како и прајмерските сетови за 16S rRNA регионот, како и за *tuf* генот се работени по веќе опишани протоколи на работа [15, 21, 26].

Во прилог се прикажани користените прајмерски сетови за четирите испитувани генски локуси:

Табела 3. Употреба на универзална група на прајмери за директен PCR – P1P7

Tab.3. Use of a universal set of primers for a direct PCR - P1P7

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>16S rRNA</i>	P1	5'-AAGAGTTTGATC CTGGCTCAGGAT-3'	директен	1850bp	<i>Tru9I</i>
	P7	5'-CGTCCTTCA TCGGCTCTT-3'	директен		

Табела 4. Употреба на универзална група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR- F2nR2

Tab 4. Use of a universal set of primers for a nested PCR- F2nR2

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>16S rRNA</i>	F2n	5'-GAAACGACTG CTAAGACTGG-3'	Вгнезден (nested)	1250bp	<i>MseI</i>
	R2	5'-TGACGGGCGGTG TGTACAAACCCCG-3'	Вгнезден (nested)		



Табела 5. Прајмерски сет за специфичен *tuf* ген
Tab. 5. Set of primers specific *tuf* gene

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>tuf</i>	fTufI	5'-CACATTGA CCCGGTA AAAAC-3'	директен	1100bp	HpaII
	rTufI	5'-CCACCTTCA CGAATAGAGAAC-3'	директен		
	fTufAY	5'-GCTAAAAG CAGAGCTTATGA-3'	Вгнезден (nested)	900bp	
	rTufAY	5'-CGTTGTCAC CTGGCATTACC-3'	Вгнезден (nested)		

Табела 6. Прајмерски сет за специфичниот *vmp* ген
Tab. 6 Set of primers specific for *vmp* gen

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>vmp</i>	H10F1	5'-AGGTTGTAA AATCTTTTATGT-3'	директен	2070 bp	RsaI
	H10R1	5'-GCGGATGGCTT TTCATTATTTGAC-3'	директен		
	H10F2	5'-TGTCACAGGG AAACAGACAG-3'	Вгнезден (nested)	1570bp	
	H10R2	5'-CACAAACATGAT GATTATCAACGA-3'	Вгнезден (nested)		

Табела 7. Прајмерски сет за специфичниот *stamp* ген
Tab. 7. Set of primers specific for *stamp* gen

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>stamp</i>	stampF	5'-GTAGGTTTTG GATGTTTTAAG-3'	директен	794bp	Hpy 188I
	stampR0	5'-AAATAAAAAGAA CAAGTATAGACGA-3'	директен		
	stampF1	5'-TTCTTTAAAC ACACCAAGAC-3'	Вгнезден (nested)	550bp	
	stampR1	5'-AAGCCAGAA TTTAATCTAGC-3'	Вгнезден (nested)		

* секвенците на прајмерите се веќе објавени во трудови од Cimerman et al. 2006, Quaglino et al., 2009 [27,28].



Полимеразно верижната реакција беше визуализирана на 1% агарозен гел, додека дигестираните фрагменти од рестрикцискиот полиморфизам (RFLP-restriction fragment length polymorphism) беа интерпретирани на 3% агарозен гел.

3. Резултати и дискусија

3.1. Симптоматолошки промени кај виновата лоза – теренска анализа

Во текот на теренските испитувања, кај сортата *станушина* ги забележавме следниве симптоми на фитоплазматски инфекции.

Симптоми кај листовите: листовите беа мали, делумно или целосно пожелтени, со послабо или посилено изразена некроза, совиени кон внатрешноста, со јасно изразен триаголен изглед и наредени едни врз други како ќерамиди (слика 1 а, б). Симптомите на лисната маса се исти како симптоми кај белите сорти (пр. исти симптоми се забележани кај осетливата сорта *шардоне*).



Слика 1. Автохтона сорта *станушина*, локација м.в. Брловец, Кавадарци
а. целосно зафатена лоза-сезона 2012

б. симптоми на лисната маса-сезона 2012

Figure 1. Autochthone variety Stanusina, locality Brlovec, Kavadarci

а. completely infected grapevine – season 2012

б. symptoms on leaves - season 2012



Ова се смета за еден вид на феномен и отстапување од стандардите во кои црвените / црните сорти на листовите развиваат симптоми на поцрвенување како резултат на фитоплазматска или вирусна инфекција. Слична симптоматологија била забележана и кај црвената сорта *пловдина*, од страна на Кузмановиќ [29], со тоа што инфекциите во овој случај биле со *Flavescence dorée* фитоплазмата. Ваквиот феномен досега е познат само во виногорјата кај нашиот северен сосед – Србија. Затоа, во оваа пригода сакаме да истакнеме дека овој феномен доби своевидна потврда и во наши услови. Објаснувањата за оваа појава се поврзани со локалните сорти, климатските услови, акумулација на флавоноидите (флавоноиди, антоцијани и проантоцијаниди), кои се различни кај црвените и белите сорти [30,31].

Симптоми кај ластарите: зрелите ластари беа со скратени интернодии, еластични и зелени (не лигнифицирани) на крајот на вегетацијата (слика 2).

Симптоми кај гроздовите: зрната кај заразените лози беа мали, најчесто во почетната инфекција недоволно созреани. Кај ваквите растенија се јавува нерамномерно созревање на гроздовите, кои постепено се собираа и се сушеа (слика 2).



Слика 2. Автохтона сорта *станушина*, локација м.в. Брловец, Кавадарци –зелен ластар, нерамномерно созревање на грозјето и сушење на зрната – сезона 2013

Figure 2. Autochthone variety *Stanusina*, locality Brlovec, Kavadarci – incomplete shoots, uneven ripening of grapes and drying of grains - season 2013



3.2. Лабораториски анализи - умножување на делови од геномот на столбур фитоплазмата

За комплетна детерминација на делови од геномот на столбур фитоплазмата, како и за утврдување на компатибилноста и различноста на изолатите од фитоплазми присутни кај сортата *станушина*, беше направена мултилокусна анализа, т.е. умножување на четири различни геноми со употреба на различни прајмерски комбинации (поглавје 2.2.1.).

Исто така, беше направен рестрикциски полиморфизам со примена на четири ензими, карактеристични за умножените генетски делови, со цел да се добие претстава за идентичноста и различноста на поставеност на базните парови во регионите од интерес (поглавје 2.2.1.).

Поради преголемата осетливост на лабораториските техники за идентификација на целните геномски региони, во сите анализи беше користен примерок од здрава сорта на винова лоза, како негативна контрола и примерок во кој немаше ДНК – само вода за молекуларни анализи. Преку негативните контроли правевме интерпретација на добиените резултати.

Десет репрезентативни примероци од сезоните 2012-2013 беа земени за комплетна анализа (табела 8). Добиените резултатите се прикажани на сликите 3 до 6.

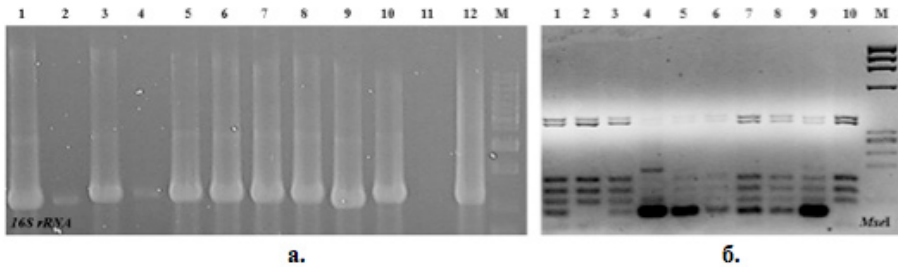
Табела 8. Резултати од лабораториските испитувања на четири различни генски локуси

Table 8. Results from laboratory testing of four different genetic locus

Ред. бр.	Шифра на примерок	Сорта	Прај мерски комби нации за <i>I6S rRNA</i>	Ензим	Гени			Ензими		
			P1P7/ F2nR2 ¹	<i>MseI</i> ¹	<i>Tuf</i> ²	<i>Vmp</i> ³	Stamp ⁴	<i>HpaII</i> ²	<i>Rsa I</i> ³	<i>Hpy 188I</i> ⁴
1	086/12	Станушина	+	XII-A	+	+++	+++	Type I	V2-TA	S1
2	094/12	Станушина	++	XII-A	+	+++	+++	Type II	V2-TA	S2
3	096/12	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S2
4	098/12	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S1
5	101/12	Станушина	++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
6	35/13	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S1
7	45/13	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
8	46/13	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
9	47/13	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
10	49/13	Станушина	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1

Легенда: ^{1,2,3,4} -----поврзаност на генот со ензимот за дигестирање

+ / ++ / +++ -----квалитет на добиениот фрагмент

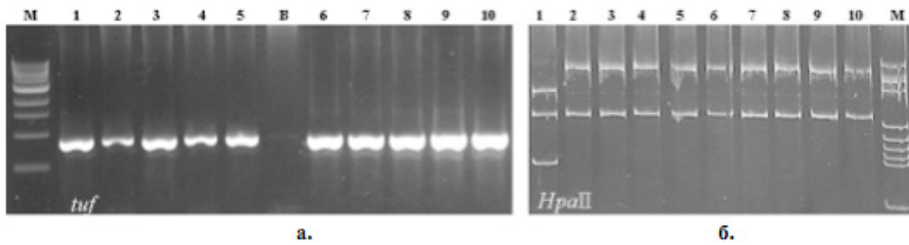


Слика 3а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, производи на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, со примена на 16SP1P7 - F2nR2 прајмерскиот пар. Распоредот на производите одговара на шифрите на примероците од табела 3. 11 – здрав примерок од сортата *станушина*, 12. AY – asrer yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано) М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

Слика 3б. Дигестирање на производите со ензимот *MseI* и визуализација на 3% агарозен гел.

Figure 3a. 1% agarose electrophoresis, *16S rRNA* gen, P1P7 - F2nR2 primer pair. Products in the picture corresponded with samples from Table 3. 11 – healthy plant from Stanusina, 12. AY – asrer yellow phytoplasma referent strain from the collection from Milano, M –1Kb DNA ladder.

Figure 3b. *MseI* digestion and visualization on 3% agarose gel.

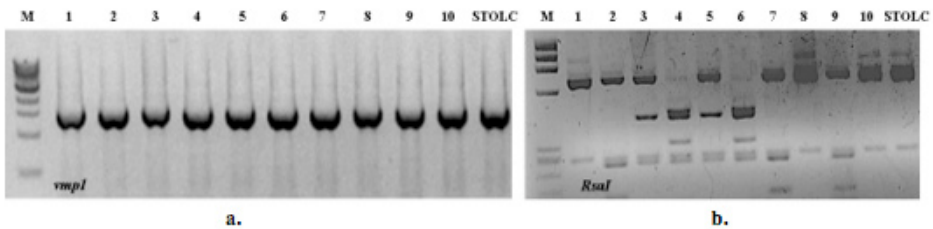


Слика 4а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *tuf* ген, со примена на ftufAY-rtufAY прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од табела 3. М – маркер 1Кb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

Слика 4б. Дигестирање на продуктите со ензимот *HpaII* и визуализација на 3% агарозен гел.

Figure 4a. 1% agarose electrophoresis, *tuf* gen, ftufAY-rtufAY primer pair. Products in the picture corresponded with samples from Table 3. M – 1Kb DNA ladder.

Figure 4b. *HpaII* digestion and visualization on 3% agarose gel.

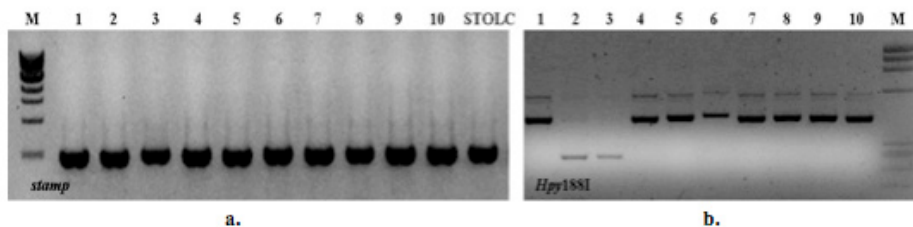


Слика 5а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *vmp1* ген, со примена на H10F2 – H10R2 прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од табела 3. М – маркер 1Кb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

Слика 5б. Дигестирање на продуктите со ензимот *HpaII* и визуализација на 3% агарозен гел.

Figure 5a. 1% agarose electrophoresis, *tuf* gen, ftufAY-rtufAY primer pair. Products in the picture corresponded with samples from Table 3. M – 1Kb DNA ladder.

Figure 5b. *RsaII* digestion and visualization on 3% agarose gel.



Слика 5а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *stamp* ген, со примена на *stampF1– stampR1* прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од табела 3. STOL C - референтен примерок на фитоплазма
M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

Слика 5б. Дигестирање на продуктите со ензимот *HpaII* и визуализација на 3% агарозен гел.

Figure 5a. 1% agarose electrophoresis, *tuf* gen, *ftufAY-rtufAY* primer pair. Products in the picture corresponded with samples from Table 3. STOL C – referent phytoplasma strain
M – 1Kb DNA ladder.

Figure 5b. *RsaII* digestion and visualization on 3% agarose gel.

4. Заклучок

Одгледувањето на виновата лоза не само во наши услови, туку глобално на светско ниво, е процес на соочување со голем број на болести и штетници, кои секоја година последователно предизвикуваат штети во квантитетот и квалитетот на производството на грозје [1 - 6].

Во текот на овие истражувања е утврден соодветен феномен на кај автохтоната сорта *станушина* (црна сорта). Природно заразените растенија манифестираа пожолтување на лисната маса (карактеристика за белите сорти) и окрутнување и свиткување на листовите, како и керамидест изглед на поставеност на лисната маса.

Анализите направени со рестрикцискиот ензим *HpaII* со RFLP дигестијата на *tuf* специфичниот генски регион за столбур фитоплазмата покажаа два различни профили кај прикажаните примероци, *tuf type I* и *II* (табела 3).

Анализите направени со рестрикцискиот ензим *RsaI* со RFLP дигестијата на *vmp1* генскиот регион покажаа три различни профили кај прикажаните примероци во истражувањето. Овие различни профили споредени со типот на столбур фитоплазмата анализирани за *tuf* генот, одговараат на *mun II (tuf-type b)*.



Со рестрикцискиот ензим *Hpy188I* за дигестирање на позитивните продукти за *stamp* генскиот регион, покажаа два различни профила S1 и S2 (табела 3).

Со ова истражување направивме еден чекор напред во однос на симптоматологијата и класификација на присутните фитоплазми кај нас, според добиените профили, па така според *vmp1* генскиот локус, добиени се три профили, од кои најчесто застапени кај нас се V4 (кој одговара на профили застапени во евромедитеранските региони) и V14 профил застапен во Западна Европа [32]. V3 профилот беше пронајден во помал процент застапен кај испитуваните примероци, но во комбинација со столбур *tuf* type a и b (тип I и II). И овој податок е нов за истражувањата во областа на геномската структура на фитоплазмаите, затоа што последните најнови податоци го поврзуваат профилот V3 со *tuf* type a [32]. Добиениот V2-TA профил, претходно е објавен само како профил присутен кај инсектите вектори *Reptalus panzeri* и *R. quinquecostatus* во Србија [33].

Со ова се отвора понатамошна можност за проверка и контрола на статусот на *Reptalus panzer* во Македонија, начинот на пренесување на фитоплазмите кај виновата лоза и врската меѓу лозата и пченката т.е. трансмисија на фитоплазмите преку инсектот вектор *Reptalus panzeri*.

Особено внимание при лабораториските анализи беше посветено детерминација на видот и разликите помеѓу застапените соеви на фитоплазмата кај автохтоната македонска сорта *станушина*, поради нетипичните симптоми за црна сорта кои ги забележавме на терен. Сепак, идентификацијата на видот на фитоплазмата не покажа карактеристичен профил кој се разликува од другите опишани профили на фитоплазми, според кој би можело да кажеме дека причина за жолтењето можеби е видот на фитоплазмата кој влијае на биохемиската структура на лисната маса.

5. Користена литература

- [1] Martelli, G.P. (2003). Grapevine virology highlights 2000-2003. Extended abstracts of 14th meeting of ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, September 12-17, 2003, 3-10.
- [2] Sforza R., Boudon-Padiou E., Greif C. (2003). New Mealybug Species Vectoring Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). European Journal of Plant Pathology, Vol 109, 975-981.
- [3] Carisse O., Bacon R., Lasnier J., McFadden-Smith W. (2006). Identification Guide to the Major Diseases of Grapes. Agriculture and Agri-Food Canada, Publication 10092E. 1-32.



- [4] Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E. (2012). Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The Scientific World Journal* Volume 2012, Article ID 185942, doi:10.1100/2012/185942, 1-25.
- [5] Santi S., De Marco F., Polizzotto R., Grisan S., Musetti R. (2013). Recovery from stolbur disease in grapevine involves changes in sugar transport and metabolism. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 4, Article 171, 1-12.
- [6] Schnee S., Queiroz E. F., Voinesco F., Marcourt L., Dubuis P.-H., Wolfender J.-L., Gindro K. (2013). *Vitis vinifera* Canes, a New Source of Antifungal Compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* and *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 61(23): 5459-5467.
- [7] Thind T.S., Arora K.J. Mohan C., Prem Raj (2004). Epidemiology of Powdery Mildew, Downy Mildew and Anthracnose Diseases of Grapevine. S.A.M.H. Naqvi (ed.) *Diseases of Fruits and Vegetables*, Vol. 1 621-638.
- [8] Sosnowski M., Wicks T. (2007). A global perspective on grapevine diseases. www.winebiz.com.au Australian viticulture, pp 77-81.
- [9] Pavan F., Mori N., Bressan S., Mutton P. (2012). Control strategies for grapevine phytoplasma diseases: influencing the profitability of replacing symptomatic plants. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 1, 11-22.
- [10] Ertunk F. (2013). A new threat for Turkish horticulture: phytoplasma diseases and their vectors. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 60, 221-224.
- [11] IRPCM. (2004). ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1243-1255.
- [12] Niemarck H., Kirckpatrick B.C., (1993). Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol Microbiol* 7: 21-28.
- [13] Marccone C., Neimark A., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E., (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.
- [14] Bertaccini A., Duduk B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* (2009) 48, 355-378.
- [15] Lee I.M, Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic *Mollicutes*. *Annual Review of Microbiology*, 54:221-255.
- [16] Contaldo N., Bertaccini A., Paltrinieri S., Windsor H.M., Windsor G.D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 3, 607-617.



- [17] Bertaccini A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology, *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689.
- [18] Maejima K., Oshima K., Namba S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J Gen Plant Pathol* (2014) 80:210–221.
- [19] Boudon-Padieu E. (2000). Recent advances on grapevine yellows detection, etiology, epidemiology and control strategies. Extended abstracts of 13th meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 87-88.
- [20] Boudon-Padieu E. (2003). The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control, pp. 47-53. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy).
- [21] Deng S., Hiruki C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14:53-61.
- [22] Osler R., Carraro L., Loi N., Gregoris A., Pavan F., Firrao G., Musetti R., Ermacora P., Loschi A., Pertot I., Rafatti e., (1996). Le piu importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli-venezia Giulia. *ERSA, Italia*.
- [23] Agrios G. N. (1997). *Plant Pathology* ISBN-10: 0120445646 ISBN-13: 9780120445646
- [24] Jones P. (2002). *Phytoplasma plant pathogens*. Plant Pathologist's Pocketbook 3th edition. Waler J.M., Lenne J.M., Waller S.J. CABI Publishing UK.
- [25] Marzachi C., Milne R.J., Bosco D. (2004). Phytoplasma–plant–vector relationships. In: Pandalai SG, Gayathri A, eds. *Recent Research Development in Plant Pathology*. Kerala, India: Research Signpost, 211–41.
- [26] Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. (2001). *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79-86.
- [27] Schneider B., Seemüller E., Smart C.D. and Kirkpatrick B.C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2 pp 369-380. Edited by S. Razin and J.G. Tully, Academic Press, New York.
- [28] Cimerman A., Arnaud G., Foissac X. (2006). Stolbur phytoplasma genome survey achieved using a suppression subtractive hybridization approach with high specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5): 3274-3283.



- [29] Quaglino F., Zhao Y., Bianco P.A., Wei W., Casati P., Durante G., Davis R.E. (2009). New 16Sr subgroups and distinct single nucleotide polymorphism lineages among grapevine Bois noir phytoplasma populations. *Annals of Applied Biology* ISSN 0003-4746, 154, 279-289.
- [30] Kuzmanović S., Osler R., Tošić M., Martini M., Starović M., Stojanović S., Aleksić G. (2006). Grapevine cv. Plovdina as indicator of flavescence dorée. In: *Extended Abstracts, 15th Meeting of the ICVG*, 3-7 April, 2006, Stellenbosch, South Africa, 99–100.
- [31] Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P. (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* 139, 652–663.
- [32] Hren M., Nikolic P., Rotter A., Blejec A., Terrier N., Ravnikar M., Dermastia M., Gruden K. (2009). ‘Bois noir’ phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* doi: 10.1186/1471-2164-10-460.
- [33] Foissac X., P. Carle, A. Fabre, P. Salar, J.-L. Danet and STOLBUR-EUROMED consortium (2013). ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ genome project and genetic diversity in the Euro-Mediterranean basin. In: *Abstracts, 3rd European Bois Noir Workshop*, March 22-23, 2013, Barcelona, Spain, 11–13.
- [34] Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Toševski I. (2014). Experimental and molecular evidences of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology* 63, 31–41.
- [35] Lee I.M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D.E. (1995). Detection of Multiple Phytoplasmas in Perennial Fruit Trees with Decline Symptoms in Italy. *The American Phytopathology Society*. Vol. 85, No. 6, 728-735.



УДК: 635.21:581.143.5.086.83

Оригинален научен труд
Original research paper

МИКРОТУБЕРИЗАЦИЈА НА КОМПИР (*Solanum tuberosum* L.)

¹Лилјана Колева-Гудева, ¹Фиданка Трајкова и ¹Ирена Стојкова
¹Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Земјоделски факултет,
liljana.gudeva@ugd.edu.mk; fidanka.trajkova@ugd.edu.mk; irena_stojkova@hotmail.com

Краток извадок

Во трудот се презентирани резултатите од испитувањето на влијанието на фитохормонот гиберелинска киселина GA_3 врз формирањето на `ртулци во *in vivo* услови, како и влијанието на фитохормоните во индукција на микротуберизација во *in vitro* услови на неколку сорти на семенски и меркантилен компир (*Solanum tuberosum* L.). Од семенскиот компир испитувањата беа направени на сортите *дидо*, *марабел*, *агрија*, *амбиџион* и *агрико*, а од меркантилниот компир беа користени сортите *агрија CP*, *Агрија БЕ* и *андреа*.

Експериментите во *in vitro* услови беа поставени со два типа на експлантати `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.

Третманот со 22 ppm GA_3 беше најефикасен за двата типа, семенски и меркантилен компир. Кај сите третирани клубени третманот со гиберелинската киселина GA_3 резултираше со *de novo* никне на `ртулци во окцата на клубените.

На MS+6 mg/l BAP+2 mg/l NAA+90 g/l $C_{12}H_{22}O_{11}$ микротуберизацијата достигна до 92.85% кај сортата *агрија CP* во култура на нодии од компир (*Solanum tuberosum* L.).

Клучни зборови: микропропагација, микротуберизација, *in vitro*, нодии, `ртулци, изданоци, вкоренување



MICROTUBERIZATION OF POTATO (*Solanum tuberosum* L.)

¹Liljana Koleva Gudeva, ¹Fidanka Trajkova and ¹Irena Stojkova

¹Goce Delcev University, Stip Macedonia

liljana.gudeva@ugd.edu.mk; fidanka.trajkova@ugd.edu.mk; irena_stojkova@hotmail.com

Abstract

This paper presents the results of the examination of the impact of phytohormon gibberellic acid GA₃ on sprouts formation in *in vivo* conditions, and the impact of the phytohormones on induction of microtuberization under *in vitro* conditions in several varieties of seed tubers and mercantile potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) Seed tubers potatoes tests were made with varieties Dido, Marabel, Agria, Ambition, and Agriko, while Agria SR, Agria BE and Andrea were the mercantile varieties of potato used in the experiment.

Experiments *in vitro* conditions were set by two types of explants: sprouts and nodal explants on the MS (Murashige & Skoog) medium with the addition of several different combinations and concentrations of cytokinines and auxins. Microtubarization was stimulated by increasing the percentage of sugar in MS medium from 30 g/l sucrose, to 40, 60 and 90 g/l sucrose.

The treatment with 22 ppm GA₃ was most effective for both types of potatoes seed tubers and mercantile potato tuber. In all tubers treated with gibberellic acid treatment resulted in *de novo* sprouting of tubers.

On the MS + 6 mg/l BAP + 2 mg/l NAA + 90 g/l C₁₂H₂₂O₁₁ microtuberization reached up to 92.85% for the variety Agria BC in nodal culture of potato (*Solanum tuberosum* L.).

Kew words: microtuberization, micropropagation, *in vitro*, nodals, sprouts, shoots, rooting

1. Вовед

Компирот (*Solanum tuberosum* L.) е многу важна култура во светското земјоделското производство и во Република Македонија. Оваа култура се одгледува во 180 земји во светот. Според податоците од ФАО [1], најголем производител на компир е Азија, потоа Европа, Јужна Америка, па Северна и Централна Америка. Најголемите производители на компир во Европа се Украина, Полска, Белорусија, Германија, Романија, Холандија и Франција. Почетоците одгледување на компир во Македонија датираат од пред 150-170 години. Денес во Република Македонија компирот се произведува на повеќе од 13.000 хектари со просечен принос од 20-40 t/ha и речиси секоја година површините по компир се прошируваат.



Формирањето на клубени е процес кој е многу сложен, но овој процес може да биде предизвикан и во *in vitro* услови познат како микротуберизација. Поради малите димензии и маса, микроклубените 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 кое било време од годината. Тие имаат слични морфолошки и биохемиски карактеристики на клубените во споредба со конвенционално произведениот компир. Затоа, масовно производство на компир преку микротуберизација веќе го револуционизира светот во производството на компир [2].

За стимулирање на микротуберизацијата многу истражувачи користеле различни регулатори на растот за *in vitro* индукција на микроклубени [3-6]. 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. [7-10]. Оваа технологија се користи за производство на безвирусен семенски компир во многу земји во светот со голем успех [11-13]. Во последно време протоколот за масовно производство на микроклубени е автоматизиран со користење на биореактор [14].

Техниките на култура на растителни ткива се користат во целиот свет, за производство на предосновен семенски материјал, кој кај семенскиот компир е познат како микроклубени. Тие се садат во заштитен простор за да се произведе миниклубени (основно семе). Основното семе влегува во синцирот за производство на сертифициран семенски компир за да биде дистрибуиран до крајните корисници, а тоа се земјоделците.

Главната цел на овој труд беше да се стандардизираат медиумите за микропропагација и индукција на микротуберизација. Истражувањето беше фокусирано на поставување на култура од нодии и `ртулци како почетни експлантати на неколку сорти семенски и меркантилен компир во *in vitro* услови. Во текот на оваа експериментална работа беа следени: развојот на експлантатите, органогенезата, ефектот на различните хормони во медиуми врз развојот на експлантатот, како и можноста за микротуберизација.



2. Материјал и методи на работа

Експериментот беше спроведен на Катедрата за растителна биотехнологија, Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Македонија. Како растителен материјал за евалуација на одговорот за *in vitro* микротуберизација, како и за *in vivo* третман со гиберелинска киселина GA_3 со концентрација од 0 (контрола), 2, 12 и 22 ppm GA_3 беа користени следните сорти од

- семенски компир: *дидо*, *дарабел*, *дгрија*, *дмбитион* и *дгрико*,
- меркантилен компир: *агрија СР*, *агрија БЕ* и *андреа*.

Сортата *агрија СР*, меркантилен компир, е произведена во струмичкиот регион, а клубените од сортата *агрија БЕ* се произведени во Берово. За одредување на ефектот на гиберелинската киселина во иницирањето на формирање на `ртулци покрај третман со наведените концентрации на GA_3 беше користена и контрола К, чии клубени не беа третирани со GA_3 .

Клубените беа третирани со GA_3 за индукција на `ртење на клубените. Една недела по третманот со GA_3 беа користени `ртулци од компир и поставени како почетни експлантати на MS медиум збогатен со различни комбинации и концентрации на фитохормони.

2.1. Стерилизација на почетни експлантати - `ртулци

`Ртулците беа површински стерилизирани со миење под протечна чешменска вода околу 10-15 минути и преплакувани неколкупати во дестилирана вода. По миењето во вода `ртулците беа површински стерилизирани со потопување во

- 70% C_2H_5OH за 2 минути,
- 0,1% $HgCl_2$ а 3-5 минути, а
- потоа беа неколку пати миени со стерилна дестилирана вода.

Почетните експлантати беа поставени на MS (Murashige и Skoog, 1962) [15] тврд медиум со pH 5,8.

2.2. Поставување на експлантатите во *in vitro* услови

`Ртулците како почетни експлантати беа поставени на MS (Murashige и Skoog, 1962) [15] тврд медиум со pH 5,8 во епрувети, на средина збогатена само со цитокинини

- `Ртулци → MS +4 mg/l KIN
- `Ртулци → MS + 2 mg/l BAP



Во рок од околу еден месец од почетните експлантати никнуваа нодули во изданоци со 4-5 сегменти. Јазлите беа сечени и од регенерираните изданоци експлантати се користеа само нодиите за *in vitro* микротуберизација на компир. Истите беа поставувани во ерленмаерови садови од 100 ml на MS медиуми и инкубирани во клима комора на контролирани услови. MS медиумите беа подготвени со 3%, 4%, 6% и 9% сахароза, 0,7% агар, мио-инозитол 100 g/l, казеин ензимски хидролизат 200 g/l, тиамин HCl 0,1 mg/l, пиридоксин HCl 1 mg/l, никотинска киселина 0,5 mg/l и дополнети со цитокинин BAP и ауксин NAA со следните концентрации:

- Нодии → MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l NAA
- Нодии → MS + 1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
- Нодии → MS + 4 mg/l BAP + 2 mg/l NAA
- Нодии → MS + 6 mg/l BAP + 2 mg/l NAA

На горенаведените MS медиуми на кои беа култивирани нодии, 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.

2.3. Одржување на културите во клима комора

Сите експлантати, `ртулците и нодиите, беа инкубирани во клима комора под следниве услови:

- температура $25 \pm 1^\circ\text{C}$;
- релативна влажност 50%;
- фотопериод од 16/8 часа светло/темно и
- осветлување на $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

3. Резултати и дискусија

Влијанието на гиберелинската киселина GA_3 за поттикнување на формирање на `ртулци на површината на клубените во *in vivo* услови е прикажани во табелите 1 и 2. Кај сите третирани клубени третманот со GA_3 резултираше со *de novo* никне на `ртулци во окцата на клубените.

Третманот со 22 ppm GA_3 беше најефикасен за двата типа семенски и меркантилен компир. Апликацијата на највисоката доза на GA_3 резултираше со 100% формирање на `ртулци на семенскиот компир кај сортите *дидо*, *марабел* и *агрија*. Кај меркантилниот компир 100% формирање на `ртулци се јави и во третманот со 12 ppm GA_3 кај сортите *агрија CP* и *андреа*. Резултатите прикажани во табелите 1 и 2 укажуваат на фактот дека меркантилниот компир е поосетлив на третманот со гиберелинската киселина и дава поголем процент на формирање на *de novo* `ртулци за сите испитувани сорти и сите аплицирани концентрации.



Табела 1. Ефектот на *in vivo* третманот со GA_3 во продукцијата на *de novo* ртулци кај семенски компир
Table 1. The effect of *in vivo* treatment with GA_3 on *de novo* production of sprouts in seed tuber potatoes

De novo продукција на ртулци								
Сорта	GA_3 ppm	Број на клубени	Број на окца по клубен	Број на ртулци по клубен	Должина на ртулци mm	Ширина на ртулци mm	Број на ртулци во окце	% на формирање на ртулци
дидо	К	12	2,58	1,16	0,82	1,40	1,12	50,00
	2	13	3,00	1,23	1,81	1,46	3,00	76,90
	12	12	4,25	2,08	2,68	1,52	4,75	91,66
	22	12	4,41	2,41	2,79	1,67	5,00	100,00
марабел	К	25	2,36	0,72	3,72	1,42	1,32	64,00
	2	25	2,56	1,12	3,89	1,92	2,20	76,00
	12	26	2,92	1,23	5,18	2,53	2,65	88,46
	22	25	3,20	1,60	9,50	2,57	2,72	100,00
агрија	К	12	2,00	1,50	2,61	1,11	1,50	58,33
	2	13	2,07	2,23	2,68	1,48	2,23	76,93
	12	11	2,72	3,00	4,69	1,90	2,72	81,81
	22	12	3,08	3,58	4,95	2,00	3,58	100,00
амбитион	К	16	1,12	0,81	3,23	1,30	0,81	31,25
	2	17	1,35	1,11	3,52	1,57	1,17	35,29
	12	16	1,62	1,37	5,77	2,18	1,37	50,00
	22	16	1,93	1,43	6,39	2,69	1,62	62,50
агрико	К	15	2,46	1,26	3,73	1,00	1,26	53,33
	2	15	2,66	2,13	3,78	1,18	1,46	73,33
	12	15	2,73	2,20	4,33	1,63	1,93	73,33
	22	16	3,00	2,43	4,43	1,79	2,50	87,50



Табела 2. Ефектот на *in vivo* третманот со GA₃ во продукцијата на *de novo* `ртулци кај меркантилен компир

Table 2. The effect of *in vivo* treatment with GA₃ on *de novo* production of sprouts in mercantile potatoes

De novo продукција на `ртулци								
Сорта	GA ₃ ppm	Број на клубени	Број на окца по клубен	Број на `ртулци по клубен	Должина на `ртулци mm	Ширина на `ртулци mm	Број на `ртулци во окце	% на формирање на `ртулци
<i>агрија</i> <i>CP</i>	К	3	2,33	0,66	3,00	2,00	0,66	33,33
	2	3	2,66	1,66	6,00	2,20	2,00	66,66
	12	3	3,33	2,33	6,71	3,00	3,00	100,00
	22	3	3,66	3,33	6,90	3,10	4,00	100,00
<i>агрија</i> <i>BE</i>	К	4	2,75	0,75	3,33	1,00	1,00	25,00
	2	4	3,00	2,00	3,50	1,62	2,25	50,00
	12	4	3,75	3,00	4,33	2,00	3,25	75,00
	22	4	4,25	4,25	4,58	3,17	4,50	100,00
<i>андреа</i>	К	4	2,50	1,50	2,66	1,00	1,50	50,00
	2	4	3,75	2,50	2,70	1,60	2,50	75,00
	12	4	5,25	3,00	2,75	1,75	3,00	100,00
	22	4	5,25	4,75	3,10	1,89	5,75	100,00

Во табелите 3 и 4 е прикажан ефектот на цитокинините KIN и BAP врз формирањето на изданоци и корени на почетните експлантати, `ртулци, поставени на MS медиум со 3% сахароза. Резултатите укажуваат дека и кај семенскиот и кај меркантилниот компир органогенезата се одвива во правец на ризогенеза и на формирање на изданоци. И во двата случаја се покажа дека MS + 2mg/l BAP е најповолен медиум за формирање на изданоци. Кај семенскиот компир сорта *тарабел* формирањето на изданоци достигна до 27,77%, а кај меркантилниот компир сорта *агрија CP* до 60,86%. Резултатите и за другите испитувани хормонални подлоги говорат дека во *in vitro* услови меркантилните сорти имаат поголема регенеративна способност.



Табела 3. Култивирање на почетни експлантанти - `ртулци на MS медиум кај семенски компир

Table 3. Cultivation of initial sprouts explants on MS medium form seed tuber potatoes

Сорта	MS медиум mg/l	Почетни експлантанти - `ртулци				Формирање на корени и изданоци						
		Број	Должина mm	Дебелина mm	Процент на `ртлиност	Должина на изданок mm	Дебелина на изданок mm	Број на изданоци по експлантант	Број на корени експлантант	Должина на корени mm	% вкоренување	% формирање на изданоци
<i>дидо</i>	2 BAP	25	10,80	2,06	100	4,40	0,12	0,12	0,04	0,32	4,00	12,00
<i>марабел</i>	2 BAP	36	13,52	1,62	100	19,5	1,08	1,00	0,50	7,50	10,00	27,77
<i>дидо</i>	4 BAP	24	8,20	2,02	100	8,95	0,12	0,25	0,16	1,95	6,25	12,05
<i>марабел</i>	4 KIN	38	14,78	1,80	100	18,00	1,00	1,00	/	/	/	13,15
<i>дидо</i>	2 KIN	33	14,66	1,96	100	32,5	1,00	1,50	1,50	21,6	50,00	6,06

Табела 4. Култивирање на почетни експлантанти - `ртулци на MS медиум кај меркантилен компир

Table 4. Cultivation of initial sprouts explants on MS medium form mercantile potatoes

Сорта	MS медиум mg/l	Почетни експлантанти - `ртулци				Формирање на корени и изданоци						
		Број	Должина mm	Дебелина mm	Процент на `ртлиност	Должина на изданок mm	Дебелина на изданок mm	Број на изданоци по експлантант	Број на корени експлантант	Должина на корени mm	% вкоренување	% формирање на изданоци
<i>агрија СР</i>	2 BAP	19	6,63	3,89	100	11,15	0,36	0,36	0,21	0,81	10,52	21,05
<i>агрија БЕ</i>	2 BAP	46	3,58	2,48	93,75	19,43	1,01	0,91	0,32	2,54	21,73	60,86
<i>агрија СР</i>	4 KIN	24	7,62	1,70	100	14,20	0,55	0,58	/	/	/	45,83

Во второто пасажирање беа користени нодии од формираните изданоци, кои беа култивирани исто така на MS медиум во кој освен цитокини се додаваше и ауксин. За иницирање на поголем процент на формирање на микроклубени во медиумот концентрацијата на сахароза



беше од 3 до 9%. Резултатите од микротуберизацијата на семенски и меркантилен компир се прикажани во табелите 5 и 6.

Резултатите покажаа дека различен е ефектот на различен генотип, како и содржината на медиумот, врз процесот на микропропагација и микротуберизација на компир што е реферирано и во истражувањата на многу други автори [16-20].

Табела 5. Микротуберизација на семенски компир

Table 5. Microtuberization of seed tuber potatoes

Сорта	Експлантати - нодии					Формирање на микроклубени			
	MS медиум mg/l	Сахароза g/l	Број	Должина mm	Ширина mm	Број	Должина mm	Ширина mm	Микротубер- изација %
<i>дидо</i>	1BAP+0,5 NAA	40	13	17,61	0,97	0,69	4,44	2,46	53,84

Табела 6. Микротуберизација на меркантилен компир

Table 6. Microtuberization of mercantile potatoes

Сорта	Експлантати - нодии					Формирање на микроклубени			
	MS медиум mg/l	Сахароза g/l	Број	Должина mm	Ширина mm	Број	Должина mm	Ширина mm	Микротубер- изација %
<i>агрија CP</i>	2BAP+2NAA	30	13	6,23	0,86	/	/	/	/
<i>агрија БЕ</i>	1BAP+0,5 NAA	40	13	23,15	1,00	0,69	4,83	3,38	53,84
<i>агрија БР</i>	4BAP+2NAA	60	14	31,64	1,07	0,78	4,90	3,45	64,28
<i>агрија CP</i>	4BAP+2NAA	60	14	31,78	1,42	0,85	5,16	3,50	85,71
<i>агрија CP</i>	6BAP+2NAA	90	14	32,14	1,50	1,21	5,23	3,64	92,85

Како со користењето на ртулците како почетни експлантати така и со користењето на нодијални експлантати се покажа дека меркантилниот компир има поголема регенеративна моќ, но и поголем потенција за микротуберизација од семенскиот компир (табела 6, слика 2).

Со зголемување на концентрацијата на сахарозата на медиумот од 40 до 90 g/l се зголемува и процентот на формирање на микроклубени од



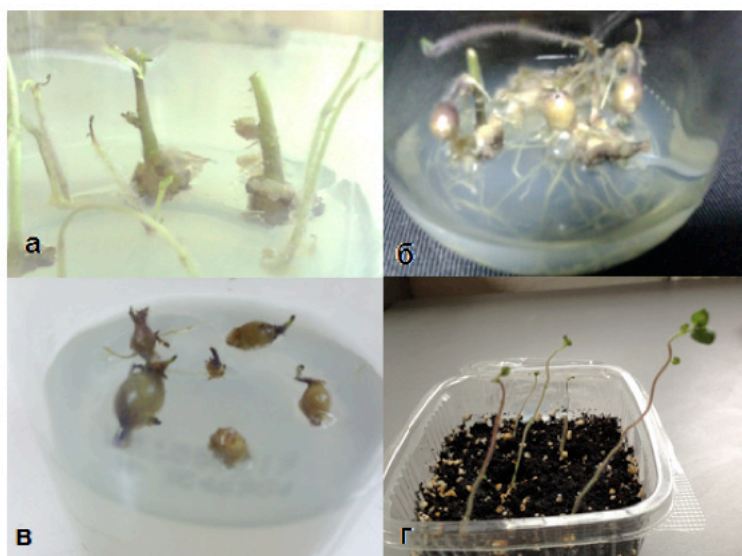
53,84% кај *агрија CP* до 92,85% кај истата сорта. Оваа сорта на медиум со 30 g/l сахароза во присуство на 2 mg/l BAP+2 mg/l NAA воопшто не се формирале микроклубени. Оваа укажува на фактот дека присуството на поголеми концентрации на BAP 4-6 mg/ ја фаворизира исто така микротуберизацијата што е прикажано во табелата 6.

Формираните микроклубени во култура *in vitro* беа посадени во стерилна мешавина од тресет : перлит (1:1) со цел за формирање на миниклубени, а подоцна и формирање на клубени за семенски компир. Микроклубените се адаптираа на нестерилните услови и формираа изданоци прикажани на слика 2г.



Слика 1. Третман со 2 ppm GA_3 во продукцијата на *de novo* `ртулци кај меркантилен компир сорта *андреа*

Figure 1. Treatment with 2 ppm GA_3 on *de novo* production of sprouts in mercantile potato cv. Andrea



Слика 2. а) Култура на нодии, б) Микротуберизација, в) Култура на микроклубени, г) Пренесување на микроклубени во стерилна мешавина тресет : перлит (1:1)

Figure 2. a) Culture of nodal segments, б) Microtuberization, в) Culture of micro-tubers, г) Transfer of micro-tubers into a mix of peat : perlite (1 : 1)

4. Заклучок

Резултатите од истражувањето покажуваат дека стандардизација на медиумите значително го подобрува растот на експлантатите на компир, како и индукцијата на микротуберизацијата. Микро размножувањето е алтернатива за конвенционалните размножување на компири. Методите на *in vitro* размножување со користење на ртулци и сегменти на нодии се посигурни за одржување на генетскиот интегритетот и за размножување на клонови. Микроклубените се првата генерација на семенски компир, од култура на ткиво се користат за решавање на проблемите на трансфер на клубените од *in vitro* во *in vivo* услови [21].

Микротуберизацијата е многу важен процес за производство и складирање на компир. Микроклубените добиени преку култура *in vitro* од нодијални сегменти погодни се за ракување, чување и размена на здрава гермплазма.



Во култура на MS медиум нодијалните сегменти покажаа поголема ефикасност во споредба со `ртулци. Составот на MS со цитокинин и ауксин покажа најдобар ефект, особено MS+6 mg/l BAP+1 mg/l NAA каде сортата *агрија CP* формира 92,85% микроклубени.

Високата концентрација на сахароза дејствува како поттикнување на сигналот кој води до акумулација скроб.

За да се зголеми процентот на микротуберизација концентрацијата на сахароза мора да биде повисока. Тоа е најочигледно кај сортата *агрија CP*, која на медиум со 30 g/l сахароза воопшто не формира микроклубени. Истата сорта на медиум со 40 g/l сахароза формира 53,84, со 60 g/l сахароза 64,28, а во медиумот со 90 g/l сахароза микротуберизацијата достигна до 92,85%

На тестираните медиуми сортата *агрија CP* има највисок потенцијал за микропропагација и микротуберизација. Студијата, исто така, покажува дека капацитетот за *in vitro* туберизација на компир зависи од генотипот, структурата на медиумот и типот на експлантатот. Меркантилен компир има поголема способност за формирање на микроклубени за разлика од семенскиот компир.

Од сите испитувани медиуми најдобар ефект покажа MS+6 mg/l BAP+1 mg/l NAA+90 g/l сахароза.

Користена литература

- [1] FAOSTAT Agriculture (2012). FAO statistical database. <http://www.fao.org/corp/statistics/en/> read on 29.09.2012.
- [2] Kanwal Amina, A. A. and K. Shoaib (2006). *In Vitro* Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Kuroda-A New Variety in Pakistan. International Journal of Agriculture and Biology 08(3):337-340.
- [3] Hossain M.J. (2005). *In vitro* Microtuberisation in Potato Obtained from Diverse Sources. Plant Tissue Cult. & Biotech. 15(2): 157-166.
- [4] Simko, I. (1993) Effect of Kinetin, Paclobutrazol and Their Interactions on the Micropropagation of Potato Stem Segments Cultured *in vitro* in the Light". *Plant Growth Reg.*, 12: 23-27.
- [5] Tovar PR, Estrada L, Schilde-Rentschler and Dodds JH (1985). Induction and use of *in vitro* potato tubers. CIP Circular, International Potato Center 13: 1-4.
- [6] Tugrul, S. and Samanci, B. (2001). Factors affecting tuber formation in potato (*Solanum tuberosum* L.) Potato Abstr. 26: 86.
- [7] Coleman KW, Danielle JD and Coleman SE (2001). Potato microtuber as research tools: A Review. Am J Potato Res. 78: 47-55.



- [8] El-Sawy A, Bekheet S and Aly UI (2007). Morphological and molecular characterization of potato microtubers production on coumarin iducing medium. In J Agri Biol. 9(5): 675-680.
- [9] 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.
- [10] Zobayed, S.M.A., Armstrong, J. and Armstrong, M. (2001) Micropropagation of Potato: Evaluation of Closed, Difusive and Forced Ventilation on Growth and Tuberization, Annals of Botany 87: 53-59.
- [11] Islam, M.S. and Chowdhury A.R. (1998). Virus free stock production of some indigenous potato varieties of Bangladesh. Plant Tissue Culture. 8(1): 41-47.
- [12] 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. Plant Tissue Culture 13(1): 21-29.
- [13] Wang PJ and Hu CY (1982). *In vitro* mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. Am Po J. 59: 33-37.
- [14] 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.
- [15] Murashige, T. and F. Skoog, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- [16] 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: Butt Worth, 113-132.
- [17] Slimmon, T., Machado, Souza and Coffin, R. (1989). The Effect of Light on *in vitro* Microtuberization of Potato Cultivars”. *Amer. Potato J.*, 66, 843-848
- [18] Hussey, G. and Stacey, N.J. (1984). Factors Affecting the Formation of *in vitro* Tubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.*, 53. 565-578.
- [19] Garner, N. and Blake, J. (1989). The Induction and Development of Potato Microtubers *in vitro* on Media Free of Growth Regulating Substances”. *Ann. Bot.*, 63. 663-674.
- [20] El Fatih M. Mahdi, Hamad S. Al-Saadand 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), pp.25-35.
- [21] Liljana Koleva Gudeva, Sasa Mitrev, Fidanka Trajkova, Mite Ilievski (2012) Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) Electronic Journal of Biology 2012, Vol. 8(3) 45-49.



УДК: 635.649-152.61:581.33

Оригинален научен труд
Original research paper

АНАЛИЗА НА ПЛОДОВИ ОД АНДРОГЕНЕТСКИТЕ ЛИНИИ ПИПЕРКА Р3 И Р4 (*Capsicum annuum* L. сорта *пиран*) ВО РАЗЛИЧНИ ФАЗИ НА ЗРЕЛОСТ

¹Фиданка Трајкова, ¹Лилјана Колева-Гудева

¹Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Земјоделски факултет,
fidanka.trajkova@ugd.edu.mk, liljana.gudeva@ugd.edu.mk

Краток извадок

Во овој труд се презентирани резултатите за анализата на плодовите од андрогенетски линии Р3 и Р4 во однос на сората *пиран* (контрола) користена за нивно добивање во процесот на андрогенеза. Во текот на од четиригодишниот експеримент беа испитувани десет карактеристики на плодовите во технолошка и ботаничка зрелост од андрогенетски линии Р3 и Р4 и контролата: маса, должина, широчина, индекс (форма), број на комори, рандман, дебелина на перикарп, суви материи во свеж плод, број и маса на семки од плод.

Добиените резултати од ова истражување покажуваат дека секоја од испитуваните андрогенетски линии Р3 и Р4 се разликува за три карактеристики на плодот во споредба со изворниот генотип *пиран*.

Клучни зборови: *пиперка, андрогенетска линија, пиран, карактеристики, плод, технолошка зрелост, ботаничка зрелост*



FRUIT ANALYSIS OF PEPPER ANDROGENIC LINES P3 AND P4 (*Capsicum annuum* L. cv. Piran) IN DIFFERENT MATURATION STAGES

¹Fidanka Trajkova, ¹Liljana Koleva Gudeva
¹Goce Delcev University - Stip, Faculty of Agriculture
fidanka.trajkova@ugd.edu.mk, liljana.gudeva@ugd.edu.mk

Abstract

In this paper are presented the results of fruit analysis of androgenic lines R3 and R4 compared to variety Piran (control) utilised for their generation in the process of androgenesis. During four-years experiment were examined ten fruit morphological characteristics in horticulturally and physiologically mature stages from the androgenic line P3 and P4 and the control: mass, length, width, index (shape), number of locules, fruit flesh, pericarp thickness, dry matter in fresh fruit and seed number and weight in fruit.

According to the presented results of this research each of the androgenic line P3 and P4 differs for three characteristics of the fruit compared to the original genotype Piran.

Key words: *pepper, androgenic line, Piran, characteristics, fruit, horticulturally mature stage, physiologically mature stage*

1. Вовед

Производството на пиперката (*Capsicum annuum* L.) како градинарска култура значително се зголемила во светот во текот на XX век како резултат на нејзината употреба како зеленчук и зачин. Според статистичките податоци на FAO [1], површините со пиперка се зголемени за 216.073 ha во периодот од 2000 до 2010 година, а вкупното производство во истиот период е зголемено за 8.643.499 тони со среден принос по хектар 14,50 тони. Според просекот на производството од 2000 до 2010 година, најголеми производители на пиперка на светско ниво се Кина, Мексико, Турција, Индонезија и САД, а во Европа се Шпанија и Италија. Хемискиот состав на пиперката е доказ за оправданоста таа да се користи како свеж зеленчук и како одлична суровина во преработувачката индустрија. Во последно време оваа култура добива вредности како функционална храна, како резултат на високото ниво на фитохемикалии за кои е докажано дека позитивно влијаат на човечкото здравје. Тука спаѓаат каротеноидите, флавоноидите, аскорбинската киселина, фенолните компоненти и пундентните капсаиноиди [2-3].



Според Националната сортна листа на Република Македонија [4], во Република Македонија има 2 македонски новосоздадени сорти, 53 странски одобрени сорти и 23 локални сорти – екотип пиперка. Пиперката произведена во Република Македонија е со висок квалитет и затоа е барана за свежа консумација и како суровина за преработка, што покажува дека нејзиното култивирање треба да претставува производна ориентација во градинарското производство [5]. Од друга страна сè почести се научните и стручните известувања дека производителите на пиперка, особено на отворено, се соочуваат со проблеми предизвикани од болести и штетници што наметнува потреба за создавање нови сорти пиперка со подобрени карактеристики [6].

Покрај добро познатите класични методи на генетиката и селекцијата за подобрување и создавање нови сорти, во светот сè повеќе се применуваат методи на растителната биотехнологија кои го помагаат и скратуваат процесот на селекција на многу култури [2], [7-9]. Андрогенезата е еден од методите за добивање на хаплоидни и спонтани дихаплоидни растенија во култура од антери во *in vitro* услови. Добиените хаплоиди и спонтани дихаплоиди располагаат со одредени генетски потенцијали кои полесно и побрзо доаѓаат до фенотипски израз, бидејќи имаат наследен материјал кој потекнува од хаплоидна клетка. Пред да бидат вклучени во процесот на селекција потребно е да се направи карактеризација на добиените андрогенетски растенија, да се проучат нивните фенофази и морфолошки карактеристики во споредба со изворниот генотип и да се утврдат разликите и сличностите помеѓу андрогенетските и родителските растенија [10-18] што е и главна цел на ова истражување.

2. Материјал и метод на работа

Методот на андрогенеза беше успешно применет за добивање на фертилни андрогенетски растенија во *in vitro* услови од автохтоната сорта *пиран*, а колекциониранiot семенски материјал од нив беше искористен како почитен материјал за овие истражувања. Деталниот опис на методологијата и процесот на креирање на андрогенетските линии пиперка е даден во повеќе трудови [19-22].

Предмет на истражувањето се плодовите од две андрогенетските линии пиперка P3 и P4 креирани од сортата *пиран* испитувани во реални агроколошки услови во заштитен простор. Во текот на истражувањето беше извршена анализа на нивните плодовите во технолошка и ботаничка фаза на зрелост во однос на контролата.

Сортата *пиран* која беше користена како контролен генотип е дел од генетските ресурси на ген-банката при Земјоделскиот факултет при Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип [23].



Сортата *пиран* користена како изворен материјал во процесот на андрогенеза и како контрола е македонска регистрирана сорта наменета за производство на отворено и во заштитени простори. Растението достигнува просечна висина од 80 cm. Плодовите се крупни со просечна маса од 100-120 g, со жолта боја во технолошка и црвена боја во ботаничка зрелост. *Пиран* има просечен принос од 60 до 80 t/ha.

а.1. Експериментален дизајн

Четиригодишните испитувања (2007-2010) се вршени во опитниот стакленик на Наставниот центар - Струмица, Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип.

Опитот беше поставен во четири повторувања, распоредени по методот на случаен блок-систем. Од секоја андрогенетска линија беа расадени по 10 растенија во секое повторување или вкупно беа расадени по 40 растенија од секоја линија (варијанта).

Растенијата беа расадени во пластични саксии (d=22 cm), со меѓусебно растојание од 30 cm, а растојанието меѓу различните повторувања изнесуваше 1 m. За успешно одгледување на растенијата беа применувани стандардни агротехнички мерки за одгледување пиперка во заштитени простори, при што наводнувањето и прихраната беа вршени заедно по пат на фертиригација со систем капка по капка.

а.2. Динамика на истражувањето

Во првата истражувачка година добиеното семе од фертилните андрогенетски растенија беше искористено како почетен материјал за експериментот. Семето од одбрани типични плодови според нивните морфолошки карактеристики од секоја андрогенетска линија во првата генерацијата беше искористено за поставување на експериментот во втората истражувачка година. Во третата истражувачка година семето од избраните плодови во втората генерација беше искористено за истражувањата во третата истражувачка година (трета генерација на растенија). Во четвртата истражувачка година семето од избраните плодови во третата генерација беше поставено во експериментални услови за истражувањата во четвртата истражувачка година (четврта генерација на растенија).

Анализата на карактеристиките на плодовите е извршена на 40 плодови по случаен избор од соодветната зрелост за секоја андрогенетска линија и контрола. Во текот на истражувањето беа анализирани следниве својства на плодови во технолошка и ботаничка зрелост:



- должина на плод (cm),
- широчина на плод (cm),
- индекс (форма) на плод,
- маса на плод (g),
- број на комори,
- рандман на плод (%),
- дебелина на перикарп (cm),
- суви материи во свеж плод (%),
- број и маса на семки (g) од плод.

а.3. Биометриска анализа на својствата

За оценка на експериментот во целина, применета е статистичка анализа на варијансата за секое својство на сите испитувани генотипови (One-Way ANOVA тест).

За утврдување на значајноста на разликата помеѓу испитуваните генотипови е користен Данкановиот многукратен тест за рангирање (Duncan's Multiple Range Test) за секое испитувано својство во секоја од експерименталните години за ниво на различност од 0,05% и за четиригодишниот просек од секое испитувано својство за ниво на различност од 0,05% и 0,01%.

За статистичка обработка на резултатите е користена софтверската програма IBM SPSS Statistics Software 19.0 (IBM SPSS Statistics 19 Brief Guide).

3. Резултати и дискусија

Во табела 1 се прикажани резултатите од испитуваните морфолошки својства на плодот во технолошка зрелост од андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* по години и просекот за контролата и андрогенетските линии за испитуваниот период.

Просечната должина на плодот на контролата е 15,14 cm, должината кај P3 изнесува 14,62 cm, а кај P4 изнесува 14,90 cm. Единствено во текот на третата експериментална година, постои сигнификантна разлика помеѓу должина на плодот на андрогенетските линии P3 (15,73 cm) и P4 (12,25 cm), но не и во однос на контролата (15,52 cm).

Должината на плодот кај различни популации од групата на долги пиперки (*C. annuum* L. ssp. *macrocarpum* var. *longum* Sendt.) се движи од 10,81 cm кај популацијата *струмичка пиперка* до 14,47 cm кај популацијата *долга месеста* [21].

Широчината на плодовите во технолошка зрелост кај *пиран* и андрогенетските линии се движи од 3,05 cm до 3,57 cm. Анализата на



широчината на плодовите во различните години покажува сигнификантна разлика помеѓу контролата и испитуваните линии во втората година. Просекот од широчината на плодовите на контролата за испитуваниот период е сигнификантно различен од просекот на андрогенетските линии P3 и P4 за истиот период, при што просечната широчина на плодот е 3,44 cm и 3,43 cm, соодветно кај линиите P3 и P4.

Индексот на плодот кај испитуваните генотипови покажува сигнификантна разлика за просекот за сите години помеѓу андрогенетските линии и контролата, и тој се движи од 4,25 cm (P4), 4,44 cm (P3) до 4,62 cm (контрола).

Масата на плодот во технолошка зрелост на плодот кај линиите P3 и P4 се движи од 32,93 g кај P3 (IV година) до 43,88 g кај P4 (I година). Во однос на просечните вредности од сите истражувачки години масата на плодот изнесува 41,16 g (P3), 39,82 g (P4) и 35,42 g (контрола), при што андрогенетските линии покажуваат сигнификантна разлика за ова својство во однос на контролата за двете нивоа на значајност. Масата на плодот кај андрогенетските линии во однос на контролата е сигнификантно различна во текот на втората и четвртата истражувачка година.

Просекот на бројот на комори за сите истражувачки години покажува дека нема значајна разлика помеѓу испитуваните андрогенетски линии и контролата и тој изнесува 2,11 кај плодот од линиите P3 и P4 и 2,15 кај плодот во технолошка зрелост од контролата.



Табела 1. Должина, широчина, индекс, маса и број на комори на плодовите на андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* во технолошка зрелост

Table 1. Length, width, index, weight and number of locules of fruits of androgenic lines P3 and P4 and the control Piran in horticulturally mature stage

Година	Генотип	Должина на плод (cm)	Широчина на плод (cm)	Индекс на плод	Маса на плод (g)	Број на комори
I	<i>пиран</i> Ø	15,16a	3,40a	4,59a	37,95a	2,2a
	P3	14,84a	3,55a	4,20a	42,08a	2,05a
	P4	15,64a	3,54a	4,44a	43,88a	2,05a
II	<i>пиран</i> Ø	15,30a	3,05b	5,10a	31,26b	2,10a
	P3	14,97a	3,46a	4,17b	43,27a	2,15a
	P4	14,45a	3,57a	4,08b	41,56a	2,15a
III	<i>пиран</i> Ø	15,52ab	3,36a	4,63a	39,07a	2,05a
	P3	12,25b	3,52a	4,09a	41,14a	2,05a
	P4	15,73a	3,55a	4,59a	40,94a	2,10a
IV	<i>пиран</i> Ø	14,43a	3,16a	4,58	32,47b	2,20a
	P3	14,37a	3,24a	4,47a	32,93b	2,20a
	P4	13,77a	3,07a	4,68a	37,77a	2,15a
Просек I-IV	<i>пиран</i> Ø	15,14 ^{a,1}	3,23 ^{b,1}	4,62 ^{a,1}	35,24 ^{b,1}	2,15 ^{a,1}
Просек I-IV	P3	14,62 ^{a,1}	3,44 ^{a,1}	4,25 ^{b,1}	41,16 ^{a,2}	2,11 ^{a,1}
Просек I-IV	P4	14,90 ^{a,1}	3,43 ^{a,1}	4,44 ^{ab,1}	39,82 ^{a,2}	2,11 ^{a,1}

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,05$ според тестот на Duncan.

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти броеви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,01$ според тестот на Duncan.

Во табела 2 се претставени резултатите за рандман, дебелина на перикарп, суви материи во свеж плод, маса и број на семки во плод на андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* во технолошка зрелост на плодот.

Просечната вредност за ова својство за целиот истражувачки период за линијата P3 (77,98%) е сигнификантно различна од просечната вредност за контролата (79,98%) за првото ниво на сигнификантност. Процентот на рандман кај плодовите во технолошка зрелост од линиите P3 и P4 и контролата се движи од 82,54% кај P4 (I година) до 75,63% кај P3 (III година). Ова својство покажува најголеми разлики помеѓу испитуваните генотипови во 2008 година, кога рандманот кај андрогенетските линии P3



(79,72%) и P4 (79,23%) сигнификантно се разликуваат од рандманот кај контролата (81,94%).

Дебелината на перикарпот кај линиите и контролата *пиран* покажува статистички оправдано варирање во текот на втората истражувачка година, кога вредноста за ова својство кај андрогенетските линии P3 (0,23 cm) и P4 (0,24 cm) значајно се разликува во споредба со контролата (0,17 cm). Перикарпот на плодовите во технолошка зрелост е најдебел во последната истражувачка година и неговата дебелина е иста кај контролата и P4 (0,35 cm), а кај P3 изнесува 0,43 cm. Просечната дебелина на перикарпот во текот на целиот истражувачки период кај линиите P3 и P4 не покажува сигнификантна разлика во споредба со контролата.

Овие резултати се во согласност со класификацијата на повеќе генотипови долга пиперка во групата на пиперка со средно дебел перикарп [24].

Процентот на суви материи кај андрогенетските линии и контролата различно варира во текот на целиот истражувачки период, при што просечната вредност на процентот на суви материи во свеж плод за целиот истражувачки период е повисок кај контролата (5,08%) во однос на андрогенетските линии P3 (4,91%) и P4 (4,90%). Најголемо варирање на процентот на суви материи има во 2008 и 2010 година, кога вредноста на ова својство кај линијата P3 (4,23% - II година; 5,15% - IV година) е сигнификантно различна во споредба со контролата (5,35% - 2008; 4,70% - 2010).

Сигнификантна разлика на масата на семе од плод има кај просечните вредности за целиот истражувачки период, каде што масата на семето во плод во технолошка зрелост кај андрогенетските линии P3 (0,62 g) и P4 (0,59 g) е поголема во споредба со контролата (0,44 g). Масата на семе по плод покажува статистички значајна разлика во истражувачката 2008, кога вредноста на ова својство кај андрогенетските линии P3 (0,94 g) и P4 (1,03 g) е значително повисока во споредба со контролата (0,47 g).

Бројот на семки во плод е својство кое е директно поврзано со својството масата на семе од плод и очекувано разлики во бројот на семки има за испитуваните линии и контролата. Статистички сигнификантна варијабилност на бројот на семки во плод има во 2008 година, кога средната вредност од линијата P4 (174,75 семки) е значително поголема од вредноста кај контролата (115,5 семки). Добиените резултати за ова својство во останатите истражувачки години и целиот истражувачки период, не покажуваат сигнификантна разлика на андрогенетските линии во споредба со контролата, а просечниот број на семки е најголем кај контролата (130,03 семки), кај P3 изнесува 126,17 семки и кај P4 изнесува 123,29 семки.



Табела 2. Рандман, дебелина на перикарп, суви материи во свеж плод, маса и број на семки во плод на андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* во технолошка зрелост

Table 2. Fruit flash, pericarp thickness, dry matter of fresh fruit, weight and number of seeds in fruit of androgenic lines P3 and P4 and the control Piran in horticulturally mature stage

Година	Генотип	Рандман (%)	Дебелина на перикарп (cm)	Суви материи во свеж плод (%)	Маса на семе од плод (g)	Број на семки во плод
I	<i>пиран</i> Ø	81,43a	0,25a	5,76a	0,75a	100,30a
	P3	81,06a	0,25a	5,63a	0,41a	102,50a
	P4	82,54a	0,26a	5,64a	0,43a	129,00a
II	<i>пиран</i> Ø	81,94a	0,17b	5,35a	0,47b	115,5b
	P3	79,72b	0,23a	4,23b	0,94a	151,65ab
	P4	79,23b	0,24a	4,70ab	1,03a	174,75a
III	<i>пиран</i> Ø	78,25a	0,20a	4,65a	0,33a	129,20a
	P3	75,63a	0,22a	4,60a	0,49a	124,00a
	P4	77,63a	0,24a	4,50a	0,39a	95,15a
IV	<i>пиран</i> Ø	78,22a	0,35a	4,70b	0,69a	148,20a
	P3	75,64a	0,43a	5,15a	0,67a	129,25a
	P4	75,82a	0,35a	4,75b	0,52a	120,80a
Просек I-IV	<i>пиран</i> Ø	79,98 ^{a,1}	0,24 ^{a,1}	5,08 ^{a,1}	0,44 ^{b,1}	130,03 ^{a,1}
Просек I-IV	P3	77,98 ^{b,1}	0,29 ^{a,1}	4,91 ^{a,1}	0,62 ^{a,1}	126,17 ^{a,1}
Просек I-IV	P4	78,75 ^{ab,1}	0,27 ^{a,1}	4,90 ^{a,1}	0,59 ^{a,1}	123,29 ^{a,1}

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,05$ според тестот на Duncan.

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти броеви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,01$ според тестот на Duncan.

Во табела 3 се прикажани резултатите од испитуваните морфолошки својства на плодот во ботаничка зрелост од андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* за одделните години и просечните вредности за испитуваниот период.

Просечните вредности за должината на плодот во ботаничка зрелост кај андрогенетските линии и контролата за испитуваниот период покажуваат дека не постои сигнификантна разлика помеѓу двете андрогенетски линии, P3 и P4 и контролата за двете нивоа на сигнификантност, што упатува на заклучок дека контролата и линиите се одликуваат со стабилност и добра изедначеност во однос на должината на плодот.



Должината на плодот во ботаничка зрелост кај андрогенетските линии и контролата *пиран* не покажува сигнификантна разлика во текот на првите две истражувачки години. Во III истражувачка година должината на плодот на контролата сигнификантно се разликува од должината на плодот кај андрогенетската линија P4, а во 2010 година постои сигнификантна разлика помеѓу контролата и линијата P3. Најголема просечна должина на плодот е добиена кај контролата во 2009 година (15,41 cm), а најмала кај андрогенетската линија P3 (12,50 cm) во 2010 година, додека должина на плодот во текот на испитуваниот период се движи од 10,46 cm до 14,11 cm. Колева-Гудева и Трајкова [12] наведуваат дека должината на плодовите на *пиран* и негови андрогенетски линии се движи од 12,7 cm до 20,7 cm.

Табела 3. Должина, широчина, индекс, маса и број на комори на плодовите на андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* во ботаничка зрелост

Table 3. Length, width, index, weight and number of locules of fruits of androgenic lines P3 and P4 and the control Piran in physiologically mature stage

Година	Генотип	Должина на плод (cm)	Широчина на плод (cm)	Индекс на плод	Маса на плод (g)	Број на комори
I	<i>пиран</i> Ø	13,54a	3,37a	4,04a	32,17b	2,10a
	P3	14,41a	3,40a	4,28a	43,40a	2,00a
	P4	14,70a	3,50a	4,27a	48,00a	2,05a
II	<i>пиран</i> Ø	13,31a	3,40a	3,96a	35,77b	2,30a
	P3	12,97a	3,51a	3,81a	39,59ab	2,55a
	P4	13,82a	3,63a	3,89a	43,79a	2,20a
III	<i>пиран</i> Ø	12,88b	3,43b	3,79a	37,13b	2,10a
	P3	13,74b	3,66ab	3,79a	44,30a	2,15a
	P4	15,41a	3,78a	4,09a	50,10a	2,20a
IV	<i>пиран</i> Ø	14,12a	3,09b	4,61a	35,06ab	2,30a
	P3	12,50b	3,37a	4,17ab	37,55a	2,07a
	P4	13,75a	3,18a	3,95b	29,48b	2,35a
Просек I-IV	<i>пиран</i> Ø	13,46 ^{a,1}	3,32 ^{b,1}	4,10 ^{a,1}	35,03 ^{b,1}	2,20 ^{a,1}
Просек I-IV	P3	13,71 ^{a,1}	3,49 ^{a,1}	3,97 ^{a,1}	41,45 ^{a,2}	2,20 ^{a,1}
Просек I-IV	P4	14,11 ^{a,1}	3,52 ^{a,1}	4,05 ^{a,1}	42,84 ^{a,2}	2,20 ^{a,1}

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,05$ според тестот на Duncan.

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти броеви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,01$ според тестот на Duncan.



Просечните вредности за широчината на плодот покажуваат дека андрогенетските линии P3 (3,49 cm) и P4 (3,52 cm) се сигнификантно различни во споредба со контролата (3,32 cm) само на првото ниво на сигнификантност. Широчината на плодот во ботаничка зрелост кај андрогенетски линии кои потекнуваат од контролата *пиран* покажува различен степен на варирање во текот на истражувачките години и нивниот просек. Најголема широчина на плодот е утврдена кај P3 (3,66 cm) во 2009 г., а најмала кај контролата (3,09 cm) во IV година, при што и разликата помеѓу контролата и P3 и P4 е статистички значајна што е во согласност со резултатите објавени од Колева-Гудева и Трајкова [12].

Просечните вредности за индексот на плодот во ботаничка зрелост кај испитуваните генотипови се движат од 3,79 до 4,61. Единствено во IV експериментална година, андрогенетската линија P4 (3,95) е сигнификантно различна од контролата (4,61). Најмала вредност за индекс на плодот имаат линијата P3 (3,79) и контролата во III година, а најголема вредност контролата (4,61) во IV година. Статистичката анализа на просекот на ова својство за целиот истражувачки период не покажува сигнификантна разлика помеѓу андрогенетските линии P3 (3,97) P4 (4,05) и контролата *пиран* (4,10) за двете нивоа на сигнификантност од што може да се заклучи дека испитуваните линии имаат стабилна форма на плодот.

Просечната маса на плодот во ботаничка зрелост е најголема кај линијата P4 (42,84 g) во споредба со истата кај P3 (41,45 g) и контролата (35,03 g). Масата на плодот во ботаничка зрелост помеѓу андрогенетските линии и контролата покажува сигнификантна варијабилност во првите три истражувачки години, во кои масата на плодовите кај андрогенетските линии е секогаш поголема од истата кај контролата. Статистичката анализа на просекот на масата на плодот за целиот истражувачки период покажува сигнификантна разлика помеѓу андрогенетските линии P3 и P4 и контролата за двете нивоа на сигнификантност.

Бројот на коморите кај плодовите во ботаничка зрелост на испитуваните генотипови се движи од 2,0 до 2,55, но статистичката анализа не покажува сигнификантна разлика за ова својство за секоја истражувачка година и на ниво на просекот од сите истражувачки години за андрогенетските линии P3 и P4 во однос на контролата, каде што просечната вредност за ова својство е 2,2 за сите испитувани генотипови.

Во табела 4 се прикажани резултатите за својствата рандман, дебелина на перикарп, суви материи во свеж плод, маса и број на семки од плод за линиите P3, P4 и контрола *пиран* во ботаничка зрелост на плодот.



Табела 4. Рандман, дебелина на перикарп, суви материи во свеж плод, маса и број на семки од плод на андрогенетските линии P3, P4 и контролата *пиран* во ботаничка зрелост

Table 4. Fruit flash, pericarp thickness, dry matter of fresh fruit, weight and number of seeds in fruit of androgenic lines P3 and P4 and the control Piran in physiologically mature stage.

Година	Генотип	Рандман (%)	Дебелина на перикарп (cm)	Суви материи во свеж плод (%)	Маса на семе од плод (g)	Број на семки во плод
I	<i>пиран</i> Ø	81,83a	0,21a	8,98a	0,77b	138,40a
	P3	83,54a	0,22a	9,37a	1,35a	124,2a
	P4	81,73a	0,22a	9,31a	1,14ab	126,45a
II	<i>пиран</i> Ø	78,48a	0,17b	8,05a	1,31ab	235,20a
	P3	75,86a	0,27a	7,95a	1,10b	146,85b
	P4	76,53a	0,29a	7,08b	1,45a	181,40b
III	<i>пиран</i> Ø	73,22a	0,22a	7,45a	0,96a	197,40a
	P3	72,26a	0,24a	7,03ab	1,06a	159,50b
	P4	75,05a	0,23a	6,58b	1,10a	160,25b
IV	<i>пиран</i> Ø	77,05a	0,35a	7,00a	0,85a	159,30a
	P3	76,37a	0,30ab	7,10a	0,95a	146,60ab
	P4	73,54a	0,27b	6,53b	0,51b	108,20b
Просек I-IV	<i>пиран</i> Ø	77,65 ^{a,1}	0,23 ^{a,1}	7,87 ^{a,1}	0,97 ^{a,1}	182,57 ^{a,2}
Просек I-IV	P3	77,05 ^{a,1}	0,26 ^{a,1}	7,91 ^{a,1}	1,12 ^{a,1}	144,13 ^{b,1}
Просек I-IV	P4	76,71 ^{a,1}	0,25 ^{a,1}	7,37 ^{b,1}	1,05 ^{a,1}	144,06 ^{b,1}

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,05$ според тестот на Duncan.

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти броеви не се разликуваат сигнификантно за $p < 0,01$ според тестот на Duncan.

Процентот на рандман кај плодовите во ботаничка зрелост од андрогенетските линии P3 и P4 и контролата се движи од 83,54% кај P3 (I година) до 72,26% кај P3 (III година). Просечната вредност за ова својство за целиот истражувачки период за андрогенетската линија P3 изнесува 77,05%, кај P4 76,71%, а кај контролата 77,65%.

Просечната дебелина на перикарпот на плодот во ботаничка зрелост во текот на целиот истражувачки период кај андрогенетските линии P3 и P4 не покажува сигнификантна разлика во споредба со контролата. Дебелината на перикарпот кај плодовите од андрогенетските линии и



контролата *пиран* покажува статистички оправдано варирање во текот на четвртата истражувачка година, кога вредноста за ова својство кај андрогенетската линија P4 (0,27 cm) сигнификантно се разликува во споредба со контролата (0,30 cm). Перикарпот на плодовите во ботаничка зрелост е најдебел во последната истражувачка година.

Процентот на суви материи во свеж плод во ботаничка зрелост од андрогенетските линии и контролата различно варира во текот на целиот истражувачкиот период, при што просекот на процентот на суви материи во свеж плод е најголем кај P3 (7,91%), во однос на андрогенетската линија P4 (7,37%) и контролата (7,87%) и нема сигнификантна разлика кај андрогенетските линии споредени со контролата. Застапеноста на сувите материи во свеж плод е различна во текот на поединечните години. Во текот на II, III и IV година вредностите за ова својство сигнификантно се разликуваат помеѓу одделните андрогенетски линии, кога содржината на сувите материи во свеж плод е помала кај плодовите од андрогенетските линии во споредба со контролата.

Масата на семе од плод во ботаничка зрелост како својство покажува различен степен на варирање кај испитуваните андрогенетски линии P3 и P4 во однос на контролата, во текот на посебните истражувачки години. Резултатите покажуваат дека најголема масата на семе по плод е измерена кај андрогенетската линија P3 (1,35 g), а најмала кај P4 (0,51 g). Просечните вредности за целиот истражувачки период за својството масата на семето од плод во ботаничка зрелост кај андрогенетските линии P3 (1,12 g) и P4 (1,05 g) статистички е во иста група на сигнификантност во споредба со контролата (0,97 g).

Статистички сигнификантна разлика во бројот на семки во плод во ботаничка зрелост кај испитуваните генотипови има во сите години на испитување, освен во првата. Добиените резултати за ова својство кај андрогенетските линии се сигнификантно различни во однос на контролата за втората, третата и четвртата година. Статистички, исто се однесуваат просечните вредности за број на семки од плод за целиот испитуван период добиени од линиите во споредба со контролата, каде P3 има 144,13 семки во плод, P4 има 144,06 семки во плод, а контролата 108,20 семки во плод.

Споредбата и анализата на мерените параметри кај плодовите од андрогенетските линии P3 и P4 во технолошка и ботаничка зрелост на плодот покажуваат дека процентот на искористеност на плодот во ботаничка зрелост е помала од истата во технолошка зрелост на плодот, перикарпот е подебел во технолошката зрелост на плодовите, а содржината на сувите материи е поголема во ботаничката зрелост на плодовите. Својствата, маса и број на семе од плод, имаат поголеми вредности кај плодовите во ботаничка зрелост кај двете линии.



Во пластеник се испитувани различни андрогенетски линии добиени од *пиран* и утврдено е дека испитуваните својства на плодот во ботаничка зрелост имаат различна варијабилност во текот на истражувањето, но најзначајно варирање на вредностите на карактеристиките на плодовите од андрогенетските линии во однос на контролите статистички се докажани за следните својства: должина на плод, дебелина на перикарп и број и маса на семки од плод [12-13].

На слика 1 се прикажани плодовите од линиите P3 и P4 и плодовите од контролата *пиран* во технолошка и ботаничка зрелост.



Слика 1. Плодови од андрогенетските линии P3 и P4 и контролата *пиран* во технолошка и ботаничка зрелост

Figure 1. Fruits of androgenic lines P3 and P4 and the control Piran in horticulturally and physiologically mature stage

4. Заклучок

Анализата на резултатите од плодовите на андрогенетските линии P3 и P4 и контролата по години и просечно за испитуваниот период покажува дека контролата и испитуваните андрогенетски линии се одликуваат со стабилност во однос на карактеристиката должина на плодот.

Според добиените резултати за морфолошките карактеристики на плодот во технолошка и ботаничка зрелост кај испитуваните андрогенетски линии P3 и P4 и нивната споредба со родителскиот генотип *пиран*, андрогенетските линии според индексот на плодот се долги пиперки, според масата на плодот спаѓаат во групата на средно јадри плодови и според бројот на коморите се главно двокоморни пиперки. Дебелината на перикарпот ги одредува како средно месести пиперки.

Плодовите на андрогенетската линија P3 од плодовите на контролата *пиран* се разликуваат за три својства: маса на плод, индекс на плод и број на семки од плод.

Во однос на родителскиот генотип *пиран*, андрогенетската линија P4 се разликува за три својства: маса на плод, суви материи во свеж плод и број на семки во плод.



Користена литература

- [1] FAOSTAT, <https://faostat.fao.org>.
- [2] Bosland, P.W., and Votava, E.J. (2000). Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. CABI Publishing, New York., pp. 219.
- [3] Crosby, K., Pike, L., Jifon, J., and Yoo, K. (2005). Breeding vegetables for optimum levels of phytochemicals. Proceedings of FAV2005, Quebec City, Canada.
- [4] Национална сортна листа на Република Македонија (2008). Министерство за земјоделство, шумарство и водостопанство на Република Македонија, Управа за семе и саден материјал, Скопје, 2008, стр. 146.
- [5] Јанкуловски, Д. (1997). Пиперка и патлиџан. НИП „БАС-ТРАДЕ“, Скопје, стр. 126.
- [6] Спасов, Д., Митрев, С., Каров, И., и Ѓеорѓиевски, М. (2003). Влијанието на начинот на производство врз здравствената состојба на пиперката, Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури, 3: 139-144.
- [7] Колева-Гудева, Л., Трајкова, Ф., и Златковски, В. (2008). Биотехнологија и биодиверзитет: аспекти на подобрување на генотипови на земјоделските култури. Годишен зборник на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“–Штип, Vol. VIII: 57 – 66.
- [8] Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp.. Euphytica, 96:129–133.
- [9] Santana-Buzzy, N., Bello-Bello, J.J., Iglesias-Andreu, L.; Zúñiga-Aguilar, J.J., Canto-Flick, A., Avilés-Viñas, S.A., Lecona-Guzmán, C.A., Solís-Marroquín, D., Gómez-Uc, E., Balam-Uc, E., Arcos-Ortega, G.F., and Mijangos-Cortés, J.O. (2012). Tissue culture of *Capsicum* species. In: Peppers: botany, production and uses, Russo, V. (Ed.), pp. 72-86.
- [10] Irikova, T., Grozeva, S., and Rodeva, V. (2011). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro, Acta Physiol Plant, 33:1559–1570.
- [11] Kisiąła, A., Olszewska, D., Niklas-Nowak, A., and Nowaczyk P. (2011). Biometrical characteristics of r2 generation of anther-derived pepper (*Capsicum* spp.) plants. Acta Agrobotanica, Vol. 64 (3): 53-58, 2011.
- [12] Колева-Гудева, Л., и Трајкова, Ф. (2009). Морфолошки карактеристики на плодови од андрогенетски линии поперка (*Capsicum annuum* L.) одгледувани во пластеник (2007-2009). Годишен зборник на Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“–Штип, Vol. IX: 29-38.
- [13] Koleva Gudeva, L., and Trajkova, F. (2012). Anther culture of pepper: morphological characteristics of fruits of androgenetic pepper lines (*Capsicum annuum* L.). Journal of Research in Agriculture, 1(2), 136-145.



- [14] Lantos, C. (2009). In vitro androgenesis induction in wheat (*Triticum aestivum* L.), triticale (X *Triticosecale* Wittmack), spice pepper (*Capsicum annuum* L.) and integration of the results into breeding. Thesis of the Ph.D dissertation, Godolo, Hungary.
- [15] Olszewska, D., Niklas-Nowak, A., and Nowaczyk, P. (2010). Variation in the quantitative characters of androgenic pepper lines derived from hybrid *Capsicum frutescens* L. x *C. chinense* JACQ.. Vegetable Crops Research Bulletin, Volume 73/1, 5–11.
- [16] Pauk, J., Lantos, C., Somogyi, G., Vági, P., Ábrahám Táborosi, Z., Gémes Juhász, A., and Tímár, Z. (2010). Tradition, quality and biotechnology in Hungarian spice pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding. Acta Agronomica Hungarica, 58(3), 259-266.
- [17] Rodeva, V., Koleva-Gudeva, L., Grozeva, S., and Trajkova, F. (2007). Obtaining haploids in anther culture of pepper *Capsicum annuum* L. and their inclusion in the breeding process. Yearbook of Faculty of Agriculture, Goce Delcev University – Stip, Vol. 7: 7-17.
- [18] Shrestha, S.L, Luitel, B.P., and Kang, W.H. (2011). Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie). Hort. Environ. Biotechnol., 52/2, 196-203.
- [19] Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., Dimeska, G., and Spasenoski, M. (2009). Androgenesis efficiency in anther culture of pepper (*C. annuum* L.). Acta Hort. (ISHS) 830: 183-190.
- [20] Колева-Гудева, Л., и Трајкова, Ф. (2008). Примена на андрогенезата како метод за подобрување на разновидноста на земјоделските култури. III Конгрес на еколози на Македонија. Зборник на трудови: 284-290.
- [21] Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., and Spasenoski, M. (2007). Effectiveness of androgenesis induced in anther culture of pepper (*C. annuum* L.). Proceedings of the XIII EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant 5-7 Sep. Warsaw, Poland. Progress in Research on Capsicum & Eggplant: 385-392.
- [22] Колева-Гудева, Л., и Трајкова, Ф. (2005). Добивање на семе од пиперка добиена во *in vitro* култура на антери. Годишен зборник на Институт за јужни земјоделски култури - Струмица 2004/2005, Вол. IV/V: 85-93.
- [23] Колева-Гудева, Л., и Трајкова, Ф. (2008). Генетски ресурси на *Capsicum* spp. во генбанката на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури. Зборник на трудови, III Конгрес на еколозите на Македонија со меѓународно учество, Струга, 06-09.2007, 303-308.
- [24] Јанкулоски, Д. (1983). Проучување на биолошките, морфолошките и квалитетните својства на поважните популации долги пиперки во СР Македонија. Докторска дисертација, Земјоделски факултет, Скопје, стр. 174.



УДК: 614.86:631.372(497.7)“2008/2012”

Оригинален научен труд
Original research paper

ПОСЛЕДИЦИ И ТЕХНИЧКИ РЕШЕНИЈА ЗА НАМАЛУВАЊЕ НА СООБРАЌАЈНИТЕ НЕСРЕЌИ СО ТРАКТОРИ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Зоран Димитровски
Машински факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

Краток извадок

Во трудот се прикажани резултатите од истражувањата на трагичните последици во сообраќајните несреќи со трактори и предлог-превентивни мерки за зголемување на безбедноста во земјоделското производство во Република Македонија. Истражувани се причините кои довеле до несреќи со фатални последици во јавниот сообраќај, посебно патот од фармата до земјоделските парцели и назад. Според резултатите од истражувањата во Република Македонија во периодот од 2008 до 2012 година во сообраќајните несреќи со трактори загинале вкупно 47 лица, 168 се тешко повредени и 604 лица се добиле со лесни повреди. Во трудот се прикажани и техничките превентивни мерки со цел спречување и намалување на несреќите со трактори во земјоделското производство во Република Македонија.

Клучни зборови: трактори, причини за несреќи, видови несреќи, последици, технички мерки



CONSEQUENCES AND TECHICAL SOLUTIONS TO REDUCE TRACTOR TRAFFIC ACCIDENTS IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Zoran Dimitrovski

Faculty of Mechanical Engineering, University „Goce Delcev“, Štip

Abstract

The paper presented the results of research on the tragic consequences in accidents with tractors and proposed preventive measures to increase safety in agricultural production in the country. Explored the reasons that led to the fatal accidents in public transport, especially road from farm to farm plots and back. According to the results of research in the Republic of Macedonia in the period from 2008 to 2012 in accidents with tractors total killed 47 people, 168 were injured and 604 people were received with moderate injuries. In this paper are presented technical preventive measures to prevent and reduce accidents with tractors in agricultural production in Republic of Macedonia.

Key words: Tractors, causes of accidents, types of accidents, consequences, technical measures

1. Вовед

Современото земјоделско производство не може да се замисли без употреба на земјоделската механизација, а основна машина којашто има најширока употреба е тракторот. Меѓутоа, во многу околности презентирани во литературата тракторите се потенцијално многу опасни влечено-погонски машини, посебно во случаи кога не се користат според одредени безбедносни правила и законски регулативи.

Голем број фактори кои влијаат на експлоатацијата и безбедноста при користење на тракторско -машинскиот агрегат, како и нивната корелативна зависниот, ја отежнуваат примената на земјоделската техника на разни места и во различни услови. Поради овие причини доаѓа до голем број на несреќни случаи кои често завршуваат со трагични последици.

Човекот кој ракува со тракторот и ја контролира работата на приклучната машина е изложен на различни влијанија (11), а посебно на екстремни температури, силна врева, вибрации, издувни гасови и сл. Сето претходно наведено штетно влијае врз здравјето на ракувачот на тракторот и може да предизвика разни нарушувања во организмот. Имено, ракувачите многу често поминуваат и по цел работен ден (10 и повеќе часа дневно) работејќи со тракторот. Продолженото работно време, во интеракција со наведените негативни влијанија (кои доведуваат до брзо заморување на ракувачот) често се поврзуваат со појава на несреќи.



Заморот и влијанието на алкохолот (често консумиран од страна на ракувачите) техничката неисправност на тракторот, голема разлика во брзината на движење и други фактори придонесуваат за зголемување на ризикот од појава на несреќи во сообраќајот. Треба да се потенцира дека сето ова се случува најчесто ноќе, т.е. неисправните светлосно - сигнални уреди дополнително ги влошуваат условите и ја зголемуваат можноста од појава на несреќи на патиштата во Македонија. Денес во Македонија има приближно 50.000 трактори, со просечна старост од 26 години, што значи, дека безбедноста при работа со тракторите во земјоделското производство и другите области каде се користи е на мошне ниско ниво. Амортизираните трактори, како и неправилното одржување го зголемува ризикот и значајно го намалува степенот на безбедност при експлоатација на тракторите (немаат кабини, неисправни сигнални уреди и светла, неисправен систем за кочење и сл.) иако денес се далеку побезбедни од порано. Во прилог на оваа констатација е и податокот дека во Република Македонија пред 5-6 години од вкупно 50.000 трактори биле регистрирани само 2885, што претставува 5,77% од вкупниот број на трактори (7).

При експлоатацијата на овие трактори, во корелација со останатите причини доаѓа до појава на несреќи како резултат на: непочитување на сообраќајните знаци и прописи, невнимание на ракувачите на тракторите, лоша психофизичка состојба на ракувачите на трактори, грешки на пешаците, патниците и техничката неисправност на возилата. Резултат од овие причини во несреќите со трактори се голем број загинати и тешко повредени фармери во сообраќајните несреќи со трактори во земјоделското производство во Република Македонија. Во периодот на истражување од 2008 до 2012 година вкупно загинале 47 лица, тешко се повредени 168 лица, а лесно 604 лица.

За да се намали бројот на несреќите и повредени лица со трактори во земјоделското производство во Р. Македонија треба да се преземат соодветни превентивни мерки кои се поделени на: законски регулативи за безбедна експлоатација на ТМА (тракторско - машински агрегат), технички решенија за зголемување на безбедноста и сигурноста при работа со ТМА и организациони решенија при работа со ТМА.

Во овој труд ќе бидат претставени техничките решенија за зголемување на безбедноста при работа со тракторите, кои решенија треба итно да се прифатат и спроведат во праксата.

2. Материјал и метод на работа

Несреќите и повредите со трактори со фатални последици во јавниот сообраќај во Република Македонија се анализирани во периодот од пет



години 2008 – 2012 во областа: транспортни операции во јавниот сообраќај на патиштата во Македонија со учество на трактори и приклучната механизација.

Податоците за загинатите лица (21), (23), (24) се добиени од Државниот завод за статистика, Министерството за внатрешни работи, Клиничкиот центар и Здравствените установи во периодот од 2008 до 2012 година. Архивите и податоците на овие установи послужија во прибирањето на податоците за загинати и повредени фармери во земјоделското производство.

Податоците се табеларно и графички прикажани по години, причини и последици и на крајот е извршена нивна анализа.

3. Резултати и дискусија

Во земјоделското производство при експлоатација на тракторот, директно на нива или во јавниот сообраќај се случуваат голем број на несреќи (18), (23), (24). За жал, фармерите во овие несреќи најчесто се здобиваат со тешки телесни повреди или тоа се повреди со трагични последици. Така на пример (19), во периодот 1980-1988 година во земјоделското производство во Р. Србија загинале вкупно 900 ракувачи на трактори или просечно годишно по 112 лица. Според податоците од литературата во САД (25), (33) просечно во земјоделското производство се случуваат 1.300 несреќни случаи со трагични последици и 120.000 несреќи со тешки телесни повреди.

Во периодот на истражување во Р. Македонија, од 2008 до 2012 година, во несреќите со трактори настрадале вкупно 819 лица, од кои 47 (5,74%) загинале, 168 (20,51%) лица се тешко повредени а 604 (73,75%) лица се лесно повредени во сообраќајните несреќи со трактори (таб.1).

Табела 1. Последици од несреќите со трактори во Р. Македонија
Tab. 1. Consequences of tractor accidents in R. of Macedonia

Година	Загинати	Тешко повредени	Лесно повредени	Вкупно настрадани
2008	13	35	106	154
2009	6	33	104	143
2010	7	34	106	147
2011	8	35	167	210
2012	13	31	121	165
Вкупно	47	168	604	819
%	5.74	20.51	73.75	100



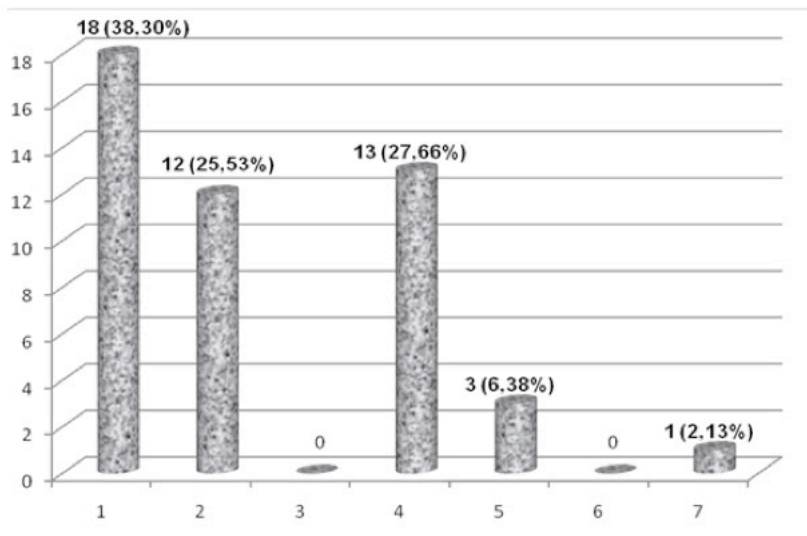
Доколку се анализираат причините кои довеле до смртни последици (таб.2) може да се констатира дека во сообраќајните несреќи во кои учествувале тракторите просечно годишно со смртни последици се 9,4 лица, а најголем број 27 (57,45%) лица загинале како резултат од непочитувањето на сообраќајните знаци и прописи. Како резултат на лошата психофизичка состојба и грешки на пешаците, патниците и техничката неисправност на возилата вкупно загинале 12 (23,53%) односно 8 (17,02%) лица.

Табела 2. Загинати лица во сообраќајните несреќи со трактори за период 2008-2012 година

Tab. 2. People with fatal consequences in traffic tractor accidents from 2008 to 2012

Последици	Причини за сообраќајните несреќи			Вкупно
	Непочитување на сообраќајните знаци и прописи	Психофизичка состојба	Грешки на пешаци, патници и тех. неисправност на возилата	
Загинати	27(57,45%)	12 (23,53%)	8 (17,02%)	47
Просек (5 години)	5,4	2,4	1,6	9,4

Најмногу лица 15 (55,56%) трагично настрадале како резултат на непригодната брзина на движење на возилата според сообраќајните знаци и условите на патот (таб.3). По голем број лица загинале поради непрописно движење на возилата, каде се евидентирани вкупно 6 (22,22%) лица, а како резултат на непочитување на првенство на минување загинале 3 (11,11%) лица. Најмалку лица 1(3,70%) загинале како резултат на грешки на ракувачите на трактори при застанување и паркирање на возилата.



Графикон 1. Вкупно загинати лица во сообраќајните несреќи со трактори во период од 2008 до 2012 година

Graf. 1. People with fatal consequences in traffic tractor accidents from 2008 to 2012

- 1 Меѓусебни судири на возилата
- 2 Излетување од пат
- 3 Пад од трактор, приколка
- 4 Превртување на трактор
- 5 Газење со трактор
- 6 Удар на тракторот во објект
- 7 Удар на тракторот во паркирано возило

Споредувајќи ги причините за сообраќајните несреќи во кои има настрадани со смртни последици со видовите сообраќајни несреќи со трактори (графикон 1) може да се констатира дека најмногу 18 (38,30%) лица загинале како резултат на судири на моторните возила со тракторите. Како резултат од превртувањето на тракторите односно излетување од патот загинале 13 (27,66%), односно 12 (25,53%) лица како најчести видови на несреќи со трактори со трагични последици.

Просечната старост на тракторите во Република Македонија изнесува 26 години (24), како стари и амортизирани трактори (често со неисправен систем за управување и кочење, неисправни сигнални светла и сл.) се



без кабини или заштитни рамки или други електронски уреди кои би ја зголемиле безбедноста. Во таква ситуација повредите, па и трагичните последици кај ракувачите на трактори или патниците на тракторот (кои се возат на браникот или на задниот дел од тракторот, без никаква заштита) се неизбежни.



Слика 1. Превртување на трактор со трагични последици
Figure. 1. Tractor rollover with fatal consequences

3.1. Технички решенија за зголемување на безбедноста при работа со тракторите во земјоделското производство

Техничките решенија кои можат да се применат на тракторите со цел намалување на бројот на несреќи и настрадани лица во тие несреќи, делумно се наведени во законските регулативи за управување со земјоделската механизација.

Во овој дел најнапред ќе биде опишана неопходноста од вградување на кабина или заштитна рамка во комбинација со сигурносен појас. Оваа опрема како техничко решение дава ефикасна пасивна заштита на ракувачот на тракторот во сообраќајните несреќи и несреќите со тракторот во работни услови.

Тргувајќи од фактот дека во Р. Македонија просечната старост на тракторите изнесува 26 години, може да се констатира дека над 70% од тракторите немаат вградена кабина или каква било заштитна рамка која би го заштитила ракувачот на тракторот во случај на превртување. Резултатите од истражувањата покажуваат дека превртувањето на тракторите е втор вид на несреќи 28,33% во сообраќајните несреќи со трактори и прва 62,10% во несреќите со трактори при работа директно во земјоделски услови (нива, ливада, шумски патишта и сл.). Безбедносната структура (сл.2.) која овозможува заштита при превртување или ROPS (roll-over protectiv structure) се специјални рамки, кафези или кабини, кои овозможуваат безбедна околина за ракувачот на тракторот во случај на превртување.



Употребата на кабини или заштитната рамка во комбинација со сигурносни појаси до 95% ги зголемуваат шансите на ракувачите на тракторите да преживеат при превртување и да поминат со помали повреди е констатација на повеќе автори кои се занимаваат со оваа проблематика (16), (22), (23), (24).



Сл. 2. Кабина и заштитна рамка за зголемување на безбедноста при работа (20)

Figure 2. Cabin and protective structure for increasing safety at work

За да ги подобрат експлоатациските карактеристики на земјоделските машини, денес во светот производителите на трактори користат електронски системи во кои ги вградуваат. Влијанието на електрониката не влијае само на подобрување на експлоатациските карактеристики, туку и на зголемување на безбедноста и сигурноста при работа со што се штити како ракувачот така и машината.

Еден од уредите кој кај мобилните земјоделски машини и трактори се вградува во поново време како електронски систем е индикатор на наклонот или инклинометар. Овој дел од опремата има задача да го предупреди ракувачот во случај на опасна ситуација кои се јавуваат на стрмни терени со поголем наклон. Денес постојат повеќе различни типови на инклинометри, кои му даваат важни информации на ракувачот во врска со стабилноста на машината на теренот. Овие инструменти покрај дигитални (електронски) можат да бидат и аналогни (сл.3.) Поголемиот број модели на инклинометри покрај визуелната информација имаат вградена и звучна сигнализација која се активира кога машината ќе ја достигне опасната точка на наклон пред моментот на превртување.



Сл. 3. Аналогни индикатори на наклон - инклинометри, Direct Industry (2012)

Figure 3. Analog indicators of slope - inclinometers

Покрај овој начин на предупредување на ракувачот постојат и други варијанти на инклинометри кои се интегрирани во компјутерскиот систем на тракторот или работната машината (сл. 4), така што кога тракторот ќе се доведе во опасни ситуации во поглед на навалување, машината автоматски застанува со известување на ракувачот преку звучен и визуелен сигнал. Овие системи денес се дел од стандардната опрема на современите трактори и самоодни машини на поголем број светски произведувачи.



Сл. 4. Дигитални модули за мерење на наклонот, Vigor Technology (2012)

Figure 4. Digital modules for measuring slope



Познато е дека во земјоделското производство самоодните машини и трактори првенствено се движат по земјишта со различна топографија. Многубројните трагични последици кои се резултат од ненадејно губење на контролата со превртување на тракторот можат да се избегнат со вградување на нови и напредни конструкции на заштитни делови и опрема на тракторот.

Едно од техничките решенија што појавата на повеќекратно превртување потполно ја елиминира е автоматската заштитна структура (сл.5). Во комбинација со електронските уреди за мерење на наклонот на машината, оваа заштитна структура автоматски се вклучува и со промена на геометријата на заштитната рамка, спречува повеќекратно превртување NIOSH (2001). Овој тип на заштитна структура настанал како резултат од истражувањата на Националниот институт за заштита при работа и здравје на САД (*The National Institute for Occupational Safety and Health*).



Сл. 5. Принцип на работа на автоматска заштитна рамка, NIOSH (2001)
Figure 5. Principle of operation of automatic protection structure

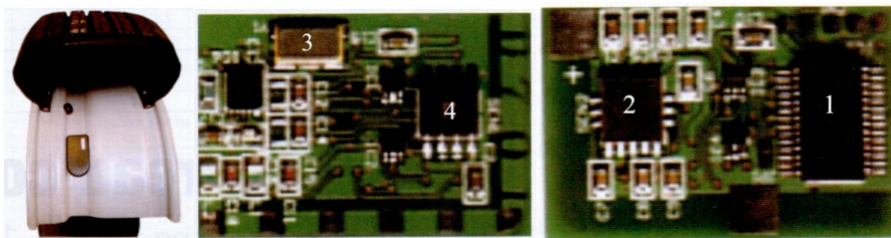
Уредот кој автоматски се активира во случај на превртување се наоѓа на горната хоризонтална пречка од заштитната рамка. Претставува пневматски цилиндар и клип со одредена големина. Во моментот на превртување, кога електронскиот систем ќе детектира почеток на превртување, се активира пневматиката го исфрла клипот и на тој начин се зголемува габаритот на заштитната рамка, во овој случај ширината. На овој начин се намалува можноста од повеќекратно превртување.

Електронскиот систем за контролата на притисокот на воздухот во пневматиците на тракторите и други работни машини (*TPM System – Tyre Pressure Monitor*) е уште еден од системите кои во голема мерка можат да влијаат како на експлоатационите карактеристики на машината, така и на безбедноста при нивната експлоатација. Можноста за регулација на



притисокот е уште еден од системите кои значајно можат да ја подобрат стабилноста и проодноста на тракторот и другите самоодни машини. Системот има задача да го прати притисокот на воздухот во пневматиците и да го менува во зависност на условите и потребите.

Од притисокот во пневматиците во голема мерка зависи големината на допирната површина на пневматикот. Со намалување се зголемува активната допирна површина со подлогата и на тој начин се овозможува подобра проодност и стабилност на тракторот. Од друга страна, кога машината се движи по цврста подлога (асфалт) потребно е да се зголеми притисокот до пропишаната граница со што се намалува триењето и трошењето на пневматикот.



Сл. 6. Положба на давачот на наплатката и електронски уреди (1. микропроцесор, 2. G сензор, 3. трансмитер, 4. сензор за притисок), Yutaka (2004)

Figure 6. Position of the provider of the wheel and electronic devices

Овој систем може да биде и посебен, со што ракувачот може сам да го контролира притисокот во зависност од потребите или да е дел од централизиран систем за автоматска регулација.

Една од експлоатационите карактеристики на современите трактори е можноста за зголемена брзина на движење, во некои случаи и до 70 km/h (сл. 7), со што се зголемува опасноста од појава на несреќи при нивната експлоатација. Овие брзини се далеку над препорачаните брзини на работните процеси во работни услови, но потребата од зголемена брзина на движење е неопходна при транспортните процеси.

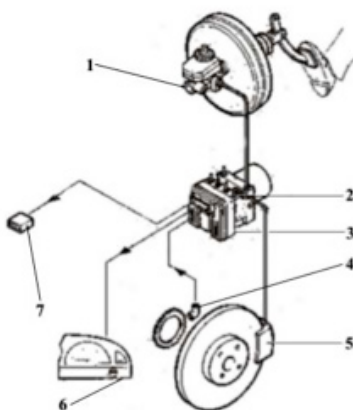


Сл. 7. JCB FastTrac 8250, модел на трактор со брзина на движење до 70 km/h и систем за кочење ABS (Anti-lock Breaking System), JCB (2006)

Со потребата од зголемување на брзината на движење, конструкторите морале да внимаваат и на безбедноста, односно потребно било и безбедно да се запре, со што морал да се модифицира и уредот за кочење. Кај тракторите JCB FastTrack при транспортна брзина од околу 70 km/h се јавуваат еднакви проблеми при процесот на кочење, како и кај патничките и товарни возила. Поради тоа кај тракторите уредот за кочење се развивал во ист правец односно почнува вградување на систем против блокирање на тркалата односно ABS систем.

ABS системот е уред кој функционира така што електронската командна единица врз основа на информациите од давачот, постојано, во кратки временски периоди го регулира притисокот во системот за кочење и ја менува силата на кочење со што спречува појава на блокирање на тркалата.

Шематски ABS системот со составните делови е претставен на сл. 8. Со употребата на ABS системот потполно се исклучува можноста за блокирање на тркалата, а ефикасноста на системот за кочење значајно се зголемува и битно се скратува патот што го поминува возилото до потполно застанување, притоа ракувачот има можност да го контролира правецот на движење на возилото.



Сл. 8. Компоненти на ABS системот, Gligorević (2007)
Figure 8. Components of ABS system

Поради различни мислења од страна на експертите за употребата на ABS системот кај тракторите од страна на Европската комисија донесен е нацрт-правилник со кој се регулира неговата примена. За да се задоволат и двете страни решението за примена на ABS системот кај земјоделската механизација е прикажан во донесените заклучоци и тоа:

- на тракторите со брзина на движење над 60 km/h мора да имаат ABS систем;
- за тракторите чија брзина на движење изнесува меѓу 40 и 60 km/h, треба да се спроведат дополнителни истражувања дали да се вградува овој систем;
- на тракторите чија брзина на движење на поминува 40 km/h не треба да се вградува ABS систем.

Поради сето претходно изложено, покрај техничките мерки кои произведувачите на земјоделска механизација ги спроведуваат, ракувачите мора доследно да се придржуваат и ги почитуваат организационите и законски мерки со цел намалување на бројот на несреќи и последици од несреќите во земјоделското производство во Р. Македонија.

Изгубениот човечки живот е непроценлива категорија, посебно во кругот на фамилијата на фармерите кои се грижеле и финансиски ја обезбедувале, па последиците се многу тешки и долготрајни. Од друга страна, несреќите се проследени со високи трошоци кои државата треба да ги плати за долготрајно лечење и рехабилитација на повредените фармери



и други учесници. Поради овие причини во Република Македонија треба да се прифатат и спроведат предложените технички мерки за намалување на несреќните случаи и последици кои имаат директно влијание на зголемување на степенот на безбедност и сигурност во земјоделското производство и сообраќајот.

4. Заклучок

Според резултатите од истражувањата на трагичните последици во сообраќајните несреќи со трактори во земјоделското производство во Р. Македонија од 2008 до 2012 година, може да се заклучи следното.

Во природот на истражувањето на сообраќајните несреќи со трактори вкупно настрадале 819 лица.

Најчести причини во сообраќајните несреќи со трактори кои придонеле до појава на трагични последици се: неприспособена брзина на движење според реалните услови на патот (15 лица), лоша психофизичка состојба (алкохол, дрога, болест, замор и сл.) (8 лица), техничка неисправност на возилата (6 лица).

Како главни технички мерки за зголемување на безбедноста и сигурноста при експлоатација на тракторите прикажани преку соодветни системи, конструкции и уреди се издвојуваат:

- вградување на кабина или заштитна рамка со сигурносни ремени на тракторот;
- вградување на инклинометри кои го мерат степенот на наклон на машината;
- вградување на автоматска заштитна рамка против повеќекратно превртување;
- вградување на електронскиот систем за контролата на притисокот на воздухот во пневматиците;
- вградување на ABS систем за кочење на тракторите со над 60 km/h на брзина на движење.



5. Користена литература

- [1] Dolenshek M., Oljača M. (2002) Sprečavanje udesa i očuvanje zdravlja radnika u poljoprivredi Republike Slovenije. Preventivno inženjstvo i osiguranje motornih vozila, radnih mašina, transportnih sredstava, sistema i opreme. Savetovanje sa međunarodnim učešćem, Beograd, str. 325-330
- [2] L.D. Ryan., John Hamilton (1995). Farm Accident Investigation
- [3] Taattola Kristi, Rissanen Paivi., (2000) Fatal occupational accidents in agriculture in 1988-1999 in Finland, Kupio Regional Institute of Occupational Health, Finland
- [4] William J. Becker 1994. An Analysis of agricultural Accidents in Florida – 1992. University of Florida, Institute of food and Agricultural Sciences
- [5] www.turva.me.tut.fi-iloagri-natu-rollo.htm
- [6] Zapisnici Sudske medicine, 1983 – 2003, Institut za sudsku medicinu, Skoplje
- [7] Izveštaji Sektora analitike MUP-a, (2004) Republike Makedonije, Skoplje
- [8] Izveštaji Državnog zavoda statistike Republike Makedonije, Statistički godišnjik 1995, 1998, 2003, 2004, Skoplje
- [9] Izveštaji sa arhive KIliničkog centra 1999-2003, Republike Makedonije
- [10] Radoja L., Oljača M., Ružićić L., Bandić J. (2000). Nesrećni slučajevi u toku rada poljoprivrednih mašina i njihovi uzroci. Preventivno inženjstvo i osiguranje motornih vozila, radnih mašina, transportnih sredstava, sistema i opreme. Savetovanje sa međunarodnim učešćem, str. 255-259, Beograd
- [11] T.M. Costello., M.D. Shulman., R.C. Luginbuhl (2002) : Understanding the public Health Impacts of Farm Veicle public Road Crashes in Nort Carolina. Journal of Agricultural safety and Healt
- [12] Zakon o bezbednosti saobraćaja na javnim putevima Republike Makedonije, Sližbeni vjesnik br. 14, 1998 god.
- [13] Schumacher, Leon G., James C. Frisby, Donald M. Johnson, John D. Harrison, William G. Hires, and J. Daniel Chappell (1989). “Tractor Safety; Are Farmers Using OEM Safety Devices? Presented at the 1989 international winter meeting, American Society of Agricultural Engineers, Dec.
- [14] University of Iowa Center for Agricultural Safety and Health, (2003), Preventing Tractor Accidents, Iowa, USA
- [15] Hetzel, Glen H. (1996). Guide for Safe Tractor Operation. Publication Number 442-091, September. Knowledge for the Common Wealth, Virginia Cooperative Extension.
- [16] www.turva.me.tut.fi-iloagri-natu-rollo.htm



- [17] Dolenšek M., Oljača M. (2002) Sprečavanje udesa i očuvanje zdravlja radnika u poljoprivredi Republike Slovenije. Preventivno inženjersvo i osiguranje motornih vozila, radnih mašina, transportnih sredstava, sistema i opreme. Savetovanje sa međunarodnim učešćem, Beograd, str. 325-330
- [18] Oljača V. M., Ružičić L., Tanevski D., Dimitrovski Z. (2004) Nesrećni događaji u radu poljoprivrednih mašina. Godišni zbornik radova. Fakultet poljoprivrednih nauka i hrane, Skopje
- [19] Pana-Cryan, R., Myers, M. L. (2000) Prevention Effectiveness of Rollover Protective Structures-Part III: Economic Analysis. Journal of Agriculture Safety and Health 6(1): pp. 57-70
- [20] www.imt.co.yu
- [21] Reduce farm accident risks on roads. (1994). Safe Farm / Promoting Agriculture Health & Safety, Pm-1563e, Iowa State University of Science & Technology, Cooperative Extension Service.
- [22] Becker, William J. (1991). ROPS, Riders, and Safety Belts. Fact Sheet AE-82, Florida Cooperative Extension Service, University of Florida, Gainesville, Florida, November
- [23] Murphy J. Dennis. (1990). The Extra Rider Hazard on Farm Vehicle, Pennsylvania State University Fact Sheet Safety 18, Pennsylvania Cooperative Extension Service.
- [24] Murphy, Dennis J. (1991). "An Agricultural Safety Perspective, Papers and Proceedings of the Surgeon General's Conference on Agricultural Safety and Health. Des Moines, IA, Apr. 30-May 3, pp. 199-203.
- [25] www.four-h.purdue.edu
- [26] Use tractors with ROPS to save lives. (1996). Safe Farm / Promoting Agriculture Health & Safety, Pm-1265d, Iowa State University of Science & Technology, Cooperative Extension Service, July
- [27] WA FACE Program-SARP 2001, Tractor overturn kills 16 year old tractor worker in Washington State, report No. 52-6
- [28] Baker David E., (1993) Safe Tractor Operation. Document GO1960, University Extension, University of Missouri-Columbia, MO, October.



УДК: 633.1-114.7:631.151.6

Стручен труд
Professional paper

ОРГАНСКО ПРОИЗВОДСТВО НА ЗДРУЖЕНИ ЖИТНИ ПОСЕВИ

Мите Илиевски¹, Драгица Спасова¹, Љупчо Михајлов¹, Наталија Маркова Руждиќ¹, Душан Спасов¹, Ристо Кукутанов¹, Милан Ѓеорѓиевски¹

¹ Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, Македонија

mite.ilievski@ugd.edu.mk, dragica.spasova@ugd.edu.mk, ljupco.mihajlov@ugd.edu.mk, natalija.markova@ugd.edu.mk, dusan.spasov@ugd.edu.mk, risto.kukutanov@ugd.edu.mk, milan.georgievski@ugd.edu.mk

Краток извадок

Како материјал за работа се користеа различни генотипови од три вида на житни растенија: мека пченица, `рж и тритикале, кои беа поставени во одредени комбинации на здружени посеви.

Од резултатите за приносот на зрно добиени во овој систем на растително производство на мешани житни растенија може да се види дека тој се движи во рамките од 4.240 kg/ha до 8.520 kg/ha.

Независно од годините и варијантите, општиот просечен принос на мешаните житни растенија при овој систем на производство изнесува 5.884,4 kg/ha.

Независно од годините на испитувањето, највисок просечен принос при овој систем на производство даде втората варијанта (*подобрена оровчанка* - мека пченица + *југо ТЦ 11* - тритикале), 6.220 kg/ha.

Клучни зборови: *пченица, `рж, тритикале, растенија, принос, култури*



ORGANIC PRODUCTION OF MIXED CEREAL CROPS

Mite Ilievski¹, Dragica Spasova¹, Ljupco Mihajlov¹, Natalia Markova Ruzdik¹, Dusan Spasov¹, Risto Kukutanov¹, Milan Georgievski¹

¹Faculty of Agriculture, Goce Delcev University - Stip, Macedonia
mite.ilievski@ugd.edu.mk, dragica.spasova@ugd.edu.mk, ljupco.mihajlov@ugd.edu.mk, natalija.markova@ugd.edu.mk, dusan.spasov@ugd.edu.mk, risto.kukutanov@ugd.edu.mk, milan.georgievski@ugd.edu.mk

Abstract

As the material for work using different genotypes of three types of cereals: soft wheat, rye and triticale, which were placed in some combinations of associated crops.

The results for the grain yield obtained in this system of plant production of mixed cereal crops can be seen that it is within the 4 240 kg/ha to 8 520 kg/ha.

Regardless of years and variants in the experiment, the general average yield of mixed cereal crops in the production system is 5 884.4 kg/ha.

Regardless of the years of the survey, the highest average yield in the system of production give a second variant (*Improved Orovchanka* - soft wheat + *Yugo TC II* - triticale), 6 220 kg/ha.

Key words: *wheat, rye, triticale, plant, yield, crops*

Вовед

(Introduction)

Денес сè повеќе ѝ се посветува големо внимание на здравата храна. Според Василевски, Г. (2004), во развиениот свет, па и не само кај нив, дојде до кулминација на употребата на хемиските средства. Остатоците од хемиски средства во храната почнаа да предизвикуваат значителни нарушувања на здравјето кај луѓето и загадување на животната средина [1].

Со развојот на системот за органско фармерското производство и поинтензивниот развој на сточарството кај нас се јавува зголемен интерес и потреба кај производителите од стабилизирање на органското производство на житни култури. За зголемување и стабилизирање на приносите, потребно е да се направи систематски приод во изборот на високо приносни генотипови, избор на соодветни комбинации за здружени посеви и примена на соодветна агротехника која гарантира успех и постигнување на целта.



Селекционерите досега успешно имаат креирано голем број на нови сорти кои по своите морфолошки, биолошки, продуктивни, квалитативни и други особини нудат можности за избирање на соодветни генотипови според потребите на индустријата и сточарството. Системот на органско производство на меката пченица во Република Македонија е дефиниран со закон за органско производство кој е во согласност со законите на ЕУ и СТО, така што се забранува или со исклучоци се дозволува употреба на минерални ѓубриња и разни хемиски средства за заштита на растенијата, а се тежнее правилно да се искористува почвата со нејзино чување, зголемување на нејзината плодност и биолошка активност, содржината на органски материи, подобрување на структурата, усогласување и правилно стопанисување во поглед на избор на посевет, растителните видови и генотипови, повеќегодишни плодореди, избор и начини на обработка на почвата, соодветно ѓубрење без употреба на вештачки минерални ѓубриња, заштита од болести, штетници и плевели со однапред зацртани мерки, а особено со биолошки агротехнички мерки, зајакнување на отпорноста кон напред наведените, односно избор и селекција на соодветни генотипови за овој тип на производство и др.

Без оглед на тоа каков систем на одгледување ќе биде применет, основна задача и стремеж на сите нас ни е да трасираме правилни патеки кон обезбедување на високо и стабилно производство без кое засега Р. Македонија и светот не може.

Материјал и метод на работа (Materials and methods)

Испитувањата се вршени во полски и лабораториски услови. Полските опити беа поставени на опитното поле на ДООЕЛ Унисервис - агро во Струмица, а лабораториските испитувања се вршени во лабораториите во Струмица на Земјоделскиот факултет при УГД - Штип.

Како материјал за работа се користеа различни генотипови од три вида житни растенија: мека пченица, `рж и тритикале, кои беа поставени во одредени комбинации на здружени посеви. Во опитот беа вклучени следните три варијанти:

- мека пченица (сорта *мила*) + `рж (сорта *пелистерка*);
- мека пченица (сорта *подобрена оровчанка*) + тритикале (сорта *југо ТЦ II*);
- мека пченица (сорта *лизинка*) + мека пченица (сорта *олга*).

Испитувањата беа вршени во производната 2008/2009 година, 2009/2010 и 2010/2011 година.



Опитот се состоеше од три повторувања со трите горенаведени варијанти, распоредени по методот на случаен блок-систем, со димензија на основна парцелка од 5 m².

Растојанието помеѓу варијантите беше 50 cm, а помеѓу повторувањата - 100 cm.

Во годините на испитување почвата беше подготвувана на идентичен начин. Основна обработка се вршеше со орање на површината на длабочина од 35 cm. Секоја година на површината е нанесувано кравјо арско ѓубре во количина од 20 t/ha. После нанесување на органското ѓубре, површината дополнително се подготвуваше за сеидба. Сеењето беше изведувано рачно, со мотика на длабочина од 5 до 6 cm, во оптимален временски период за сеидба на овие растенија.

Во текот на вегетацијата беше користена агротехника за органски систем на одгледување. Така, прихранувањето со минерални ѓубриња е изоставено. Меѓуредовото растојание беше 10 cm.

Мерен е приносот на зрно кој е пресметан во kg/ha.

Пред поставување на опитот, од парцелата се земени почвени проби за агрохемиски испитувања на почвата. Пробите се на длабочина од 0 до 20 cm и од 20 до 40 cm, по шаховски метод за мали парцели.

Анализите на почвата се извршени по познати и признати методи за таа цел. Реакцијата на почвата (pH) е определена електрометриски со стаклена електрода, содржината на CaCO₃ е определена волуметриски со Scheibler калциметар, процентот на хумус по методот на Kotzmann, вкупниот азот по макро методата на Kjeldahl, а леснодостапниот K₂O и леснодостапниот P₂O₅ по Al-методата по Enger - Riehm.

Почвено-климатски карактеристики на струмичкиот микрорегион

Soil and climatic characteristics of Strumica microregion

Нашите испитувања беа поставени во опитно поле каде што почвата е од типот на алувијален нанос.



Табела 1. Агрохемиски својства на почвата во опитот
Table 1. Agrochemical properties of soil in experiment

Година	Длабочина	СаСО ₃	рН во	Хумус	Вкупен азот	Лесно пристапен Mg/100 g по AI - метода	
	во cm					%	КCl
2008/09	0 - 20	0,84	5,92	1,57	0,07	30,10	22,05
	20 - 40	0,84	6,15	1,57	0,07	33,98	23,40
2009/10	0 - 20	0,42	6,39	1,73	0,09	24,75	18,27
	20 - 40	0,42	6,37	1,75	0,09	21,23	18,13
2010/11	0 - 20	0,42	6,23	1,31	0,08	23,15	18,22
	20 - 40	0,42	6,40	1,28	0,07	24,66	17,10

Во табела 1 се дадени резултатите за агрохемиските својства на почвата на длабочина од 0 до 20 и од 20 до 40 cm, добиени од испитувањето на просечни почвени мостри земени по подготовката на почвата пред сеидба на смеските со житни растенија.

Од податоците во табела 1 може да се види дека оваа почва е слабо карбонатна. Има слабо кисела реакција на средината (рН во КCl 5,92-6,40). По однос на обезбеденост на хумус, оваа почва припаѓа во класата на средно обезбедени почви со хумус, а додека со вкупен азот е сиромашно обезбедена. Со лесно пристапен Р₂О₅ и К₂О почвата е средно до добро обезбедена.

Според Филиповски и др. (1996), Струмичката Котлина се карактеризира со субмедитерански влијанија од Егејското Море на југ, но тоа влијание делумно е запрено од планинските масиви на Беласица, Огражден и Плачковица и од северозапад од континенталната клима на Овче Поле. Во споредба со другите котлини од оваа подрачје, во Струмица влијанието на медитеранската клима е засилено. Таа е на 200-300 m надморска височина и е во групата на континентално - субмедитеранско подрачје. Тоа е типично транслатациско подрачје и во него се комбинираат влијанијата на субмедитеранската и источноконтиненталната клима. Релативната влажност на воздухот е со обратен тек на температурата, односно доколку истата расте до толку влажноста опаѓа. Минимална релативната влажност на воздухот има во летните месеци со што се зголемува сушниот карактер на летото [11].



Табела 2. Средномесечни температури во Целзиусови степени (°C)
Table 2. Average monthly temperatures in degrees Celsius (°C)

Год.	М е с е ц и												Год. сума на темп.	Средна Год. Тем
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII		
2009	1,8	3,4	7,6	13,2	18,9	21,8	24,9	23,7	19,3	13,4	8,5	6,0	4444,5	12,2
2010	3,7	5,4	8,6	13,9	18,5	22,1	24,5	26,5	19,7	11,6	11,6	3,7	5180,3	14,2
2011	2,5	3,9	8,4	12,9	16,8	22,3	25,8	25,4	22,1	11,4	3,9	2,4	4818,9	13,2
1998/2008	1,3	3,8	7,7	13,2	18,6	22,7	25,6	24,9	18,9	14,0	7,3	2,7	4795,5	13,1

Според податоците во табела 2 може да се констатира дека средномесечните температури на воздухот за време вегетацијата во трите години на испитување се најниски во првите месеци од секоја година, односно во јануари и февруари (од 3,7 до 1,3°C), а највисоки во јули (24,9-25,8°C).

Средномесечните температури кои преовладуваа во вегетациониот период се сметаат како добри за одгледување на житните растенија.

Табела 3. Сума на месечни врнежи (mm)
Table 3. Summary of monthly precipitation (mm)

Год.	М е с е ц и												Год. сума на врнежи
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
2009	87,8	20,1	91,0	31,6	67,1	72,3	17,5	101	13,0	96,0	29,8	113,8	741,0
2010	28,1	86,6	53,2	36,2	22,9	57,9	49,0	0,7	85,5	196,5	37,6	94,6	748,8
2011	25,2	20,6	43,2	14,8	53,6	25,8	14,7	26,5	49,9	29,8	7,5	45,9	357,5
1998/2008	39,9	37,8	38,2	42,6	57,9	56,8	37,1	32,8	58,5	70,5	56,8	71,0	599,9

Резултати со дискусија (Results and discussion)

Резултатите за принос на зрно во kg/ha добиени во системот на органско производство на мешаните житни растенија се прикажани во табела 4.

Од резултатите за приносот на зрно добиени во овој систем на растително производство на мешани житни растенија може да се види дека тој се движи во рамките од 4.240 kg/ha до 8.520 kg/ha.



Независно од годините и варијантите, општиот просечен принос на мешаните житни растенија при овој систем на производство изнесува 5.884,4 kg/ha.

Во првата година од испитувањето (2004/2005), просечниот принос на зрно од мешани житни растенија, независно од варијантите, изнесуваше 5.193,4 kg/ha. Највисок принос на зрно во оваа година на испитување даде втората варијанта (5.560 kg/ha), а најмал (4.800 kg/ha) третата варијанта.

Во втората година од испитувањето (2005/2006), просечниот принос на зрно од мешани житни растенија, независно од варијантите, изнесуваше 7.546,7 kg/ha. Највисок принос на зрно во оваа година на испитување даде втората варијанта (8.520 kg/ha), а најмал (6.940 kg/ha) првата варијанта.

Во третата година од испитувањето (2006/2007), просечниот принос на зрно од мешани житни растенија, независно од варијантите, изнесуваше 4.913,4 kg/ha. Највисок принос на зрно во оваа година на испитување даде третата варијанта (5.920 kg/ha), а најмал (4.240 kg/ha) првата варијанта.

Табела 4. Принос на зрно во kg/ha добиен во систем на органско производство на мешаните житни растенија

Table 4. Yield of grain in kg/ha obtained in a system of organic production of mixed crops

Варијанти	Просек по варијанта			
	2008/2009	2009/2010	2010/2011	Просек 2008/2011
1. Мила + пелистерка	5220	6940	4240	5466,7
2. Подобрена оровчанка + југо ТЦ II	5560	8520	4580	6220,0
3. Лизинка + олга	4800	7180	5920	5966,7
Просек по година	5193,4	7546,7	4913,4	Општ просек 5884,5

Највисок просечен принос на зрно од мешани житни растенија од тригодишното испитување, независно од варијантите, е добиен во втората година (2009/2010), 7.546,7 kg/ha, што е апсолутно за 2 633,3 kg/ha или 34,9 % повеќе од приносот на зрно во третата година на испитување (4.913,4 kg/ha), кога се доби и најмал просечен принос од сите години на испитување.

Оваа разлика во просечниот принос при споредба на година со година при примена на идентични агротехнички мерки на исти варијанти се должи на различните агроклиматски услови кои преовладувале во годините на испитување.



Независно од годините на испитувањето, највисок просечен принос при овој систем на производство даде втората варијанта (*подобрена оровчанка* - мека пченица + *југо ТЦ II* - тритикале), 6 220 kg/ha.

Најмал просечен принос при овој систем на производство, независно од годините на испитување, даде првата варијанта (*мила* - мека пченица + *пелистерка* - рж), 5.466,7 kg/ha.

Заклучок (Concluding remarks)

Врз основа на тригодишните испитувања и добиените резултати за мешаните (здружени) житни посеви при органски систем на производство може да се извлечат следните поважни констатации и заклучоци:

1. Средномесечните температури на воздухот за време вегетацијата во трите години на испитување се најниски во првите месеци од секоја година, односно во јануари и февруари (од 3,7 до 1,3°C), а највисоки во јули (24,9-25,8°C).
2. Приносот на зрно добиен во овој систем на растително производство на мешаните житни растенија се движи од 4.240 kg/ha до 8.520 kg/ha.
3. Независно од годините и варијантите, општиот просечен принос на мешаните житни растенија при органски систем на производство изнесува 5.884,4 kg/ha.
4. Највисок просечен принос на зрно од мешани житни растенија од тригодишното испитување, независно од варијантите, е добиен во втората година (2009/2010), 7.546,7 kg/ha.
5. Независно од годините на испитувањето, највисок просечен принос при овој систем на производство даде втората варијанта (*подобрена оровчанка* - мека пченица + *југо ТЦ II* - тритикале), 6 220 kg/ha.

Користена литература (References)

- [1] Василевски, Г. (2004): Зрнести и клубенести култури (универзитетски учебник). Издавач Expresive graphics-Скопје.
- [2] Иваноски, М. (1995): Влијанието на агроколошките услови врз порастот, приносот и квалитетот на некои сорти пченица. Годишен зборник на Земјоделскиот институт-Скопје. Книга XV, стр.7-30, 1995, Скопје.
- [3] Илиевски, М. (2009): Сортна специфичност на меката пченица во услови на конвенционално и органско производство, Докторска дисертација, 2009, стр. 223, ФЗНХ - Скопје, Скопје.



- [4] Jones, S. (2006): Evaluating and developing varieties for organic systems. PROGRESS REPORT-CSANR Organic Cropping Research for the Northwest. JonesPR05Wheat.pdf-Adobe Reader. January 1, 2005 to December 31, 2005.
- [5] Каменарска Ирена, Ајановски, Х., Иваноски, М., Симеонова Емилија (2003): Застапен сортимент од пченица и јачмен во производната 2002/2003 година во Република Македонија. Зборник на трудови. XXVIII средба „Факултет-стопанство“ стр.91-100, 2003. Скопје.
- [6] Liatukas, Z., Leistrumaite, A. (2007): The main traits of winter cereals for soil covering in organic farming. Proceeding of the COST SUSVAR workshop on Varietal characteristics of cereals in different growing systems with special emphasis on below ground traits. Page: 141-145, 29-31 May 2007. Valence, Hungary.
- [7] Mišić, T., Petrović, S., Mladenov, N. (1998): Characteristics of major Novi Sad winter wheat cultivars carrying wheat-rye translocation. International symposium „Breeding of small grains“ proceedings, 85-95, Kragujevac. November 24-27, 1998, Kragujevac, Yugoslavia.
- [8] Strazdina Vija, Bleidere Mara (2004): Cereal varieties for the organic farming in Latvia. Proceedings of the first World Conference on Organic Seed. Challenges and Opportunities for Organic Agriculture and the Seed Industry. Page: 186-187, July 5-7, 2004, FAO Headquarters, Rome, Italy.
- [9] Спасова Драгица, Митрев, С., Иваноски, М., Спасов, Д. (2004/2005): Основни карактеристики на новата сорта мека пченица-Мила (*Triticum aestivum ssp. Vulgare*). Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури-Струмица. Година 4/5, стр.125-135, 2004/2005, Струмица.
- [10] Sarah Evans, Patriquin, D., Jennifer Scott (2004): Small plot comparisons of phenology, yield, disease, and weed tolerance of three heritage and two newer cultivars of bread wheat under a high fertility organic regime in eastern Canada. *A Report for the Old Wheats Web Site*. <http://members.shaw.ca/oldwheat/>
- [11] Филиповски, Ѓ., Ризовски, Р., Ристевски, П. (1996): Карактеристики на климатско-вегетациско-почвените зони (региони) во Република Македонија. МАНУ, Скопје.



УДК: 635.64-295.1(497.742)

Стручен труд
Professional paper

ЕФИКАСНОСТА НА НЕКОИ ИНСЕКТИЦИДИ – АКАРИЦИДИ ВО СУЗБИВАЊЕТО НА ЦРВЕНО-КАФЕАВОТО ПАЈАЧЕ (*ACULOPS LYCOPERSICAE* M.) КАЈ ДОМАТИТЕ ВО ЗАШТИТЕН ПРОСТОР

Душан Спасов, Драгица Спасова, Билјана Атанасова, Мите Илиевски, Милан Ѓеорѓиевски¹

¹Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип
dusan.spasov@ugd.edu.mk

Краток извадок

Целта на нашите испитувања беше да се оцени ефикасноста на некои инсектициди - акарициди кои најчесто се користат од страна на земјоделските производители врз контролата на црвено-кафеавото пајаче (*Aculops lycopersici* M.). Во опитот беа опфатени активните материи: spiroadiclofen, etoxazol, bifentrin, propargite и abamectin.

Испитувањата беа извршени на домати одгледувани во пластеници со површина од 0,1 ha, во реонот на село Бориево, во летно-есенски турнос на производство на домати. За утврдување на бројот на присутни адулти од црвено - кафеавото пајаче е вршено контрола на површините, контролата беше вршена од почетокот на јули до крајот на август 2013 и 2014 година, во интервал од 10 дена. Беа собирани листови од 100 растенија домати од долниот, средниот и горниот дел на растението. На листовите од собрани растенија беа броени адултните форми. Штетите се проценуваа според зафатеноста на пајачите на лисната маса и според штетите на плодовите кои се позначајни.

Контролата на ефикасноста на препаратот е утврдена врз основа на бројот на растенијата зафатени со пајачето по варијанти, а ефикасноста на инсектицидите – акарициди е пресметана според Abbott после 1, 3 и 7 дена по третирањето.

Клучни зборови: инсектициди - акарициди, домати, пајаче, штети, пластеници, ефикасност



EFFECTIVENESS OF SOME INSECTICIDE - ACARICIDE TO THE ERADICATION OF *ACULOPS LYCOPERSICAE* M. AT TOMATOES GROWN IN GREENHOUSES

Dusan Spasov, Dragica Spasova, Biljana Atanasova, Mite Ilievski, Milan Georgievski¹

¹Faculty of Agriculture, Goce Delcev University, Stip, Macedonia
dusan.spasov@ugd.edu.mk

Abstract

The aim of our investigation was to evaluate the efficiency of some insecticide - acaricide commonly used by farmers for controlling the mite *Aculops lycopersici* M. The following active substances were included in the experiment: spiroadiclofen, etoxazol, bifentrin, propargite and abamectin.

The examinations were carried out on tomatoes grown in greenhouses with an area of 0,1 ha, in the region of village Borievo, in the period of summer-autumn production of tomatoes. For determining the number of adult mites' present control on tomato plants was performed. The control was conducted from early July to late August, 2013 and 2014, at an interval of 10 days. Leaves were collected from 100 tomato plants from the lower, middle and upper part of the plant. The adult forms of the mite were counted on the collected leaves. Damages were estimated according to the occupancy of the mites at the foliage and of damages on fruits that are more important.

Control of the efficiency of the active ingredient is determined based on the number of affected plants and efficiency of insecticides - acaricides is calculated according to Abbott, after one, three and seven days after treatment.

Key words: *insecticide-acaricides, tomatoes, mite, damages, greenhouses, efficiency*

1. Вовед

Црвено-кафеавиот пајак, *Aculops lycopersici* Masee е штетник со големо економско значење во оранжериското производство на домати, пипер и други видови од фамилијата Solanaceae. За првпат бил опишан во Австралија (Masee, 1937), но сега е космополит по распространување, односно се среќава во многу делови од светот. Во нашата земја е забележан во Струмичкиот регион, каде што причинува големи штети на домати.



Црвено-кафеавиот пајак *Aculops lycopersici* Masee припаѓа на фамилијата Eriophyidae (Arachnida: Acarina). Телото му е издолжено, вретеновидно, со жолто-белузлава боја. Видовите кои припаѓаат на оваа фамилија се со микроскопски димензии, така што и тоа пајаче има должина од 180 μm и ширина од 80 μm . Дорзалниот штит е триаголен, со кус и широк израсток над рострумот. Има два пара нозе од кои првиот пар е нешто подолг од вториот. Гениталниот апарат му е кружен, со точкести структури во основата и 10 слабо изразени надолжни линии.

Црвено-кафеавото пајаче не ги поднесува ниските зимски температури, поради што може да презимува само кај растенијата кои се наоѓаат на скриени места. Кај него, до сега, не е забележана зимска форма. Оптимални услови за развото му се температура од околу 25°C и висока атмосферска влажност. На температура пониска од 10°C го прекинува развото. Заразувањето го извршуваат презимените видови во почетокот на вегетацијата и тоа заразувањето се врши и на доматиите одгледувани во затворен простор (оранжерии, пластеници), како и на оние кои се одгледуваат на отворено. Притоа, за пренесување на тој пајак голема улога имаат различните инсекти кои се среќаваат кај доматиите (лисни вошки, белокрылка), како и ветерот. Преку целото лето, пајачите од тој вид се среќаваат на зелените делови од растенијата, каде што се хранат со смукање на растителен сок.

Женскиот пајак јајцата ги полага на растението, при што избира покриени места, како што се аглите во основата на листовите, пукнатините итн. Преку целиот живот еден пајак снесува околу 50 јајца. Инкубациониот период при оптимални услови на развото трае околу 2 дена, така што целиот циклус на развото е околу 6-7 дена. Бидејќи се размножува преку целата година, тој вид дава голем број поколенија при што за кратко време достигнува висока бројност на популацијата. Се среќава по сите делови на нападнатото растение.

Во оваа проучување ќе биде опишана ефикасноста на некои инсектициди - акарициди кој најчесто се користат, од страна на земјоделските производители, врз контрола на црвено-кафеавото пајаче.

2. Материјал и метод на работа

Испитувањата за утврдување на ефикасноста на инсектицидите - акарициди во 2013 и 2014 година се вршени во Струмичкиот регион: кај домати во заштитен простор, сорта *измир*, во с. Бориево кај земјоделскиот производител Зоран Митев. Во опитот се вклучени активните материји: Spirodiclofen во концентрација од 0.05%, Etaxazol во концентрација од



0.05%, Bifentrin во концентрација од 0.05%, Propargite во концентрација од 0.04% и Abamectin во концентрација од 0.1%, за споредба и контролата - нетретирано (таб.1). Распоредот на варијантите е по случаен блок систем во четири повторувања, со големина на опитната парцела од 20 m². Извршени се по две третирање, во секоја испитувана година. Методот на апликација е прскање со грбна прскалка, со 10 l вода. Потрошениот раствор е 600 l/ha.

Оценката за ефикасноста на употребениот пестицид е извршена врз основа на бројот на растенијата зафатени со возрасно, црвено-кафеаво пајаче, после еден, три и седум дена од третирањето. Ефикасноста е пресметана според Abbott.

Табела 1. Инсектицид – акарициди употребени во опитот во 2013 и 2014 година

Table 1. Insecticide-acaridae used in the experiment in 2013 and 2014

Активна материја	Препарат	Концентрација
Spirodiclofen 240g/l	Envidor	0.05%
Etoxazol 110g/l	Zoom	0.05%
Bifentrin 100g/l	Talstar	0.05%
Propargite 57%	Omite	0.04%
Abamectin 18g/l	Vertimec	0.1%

3. Резултати и дискусија

Резултатите од испитувањата се дадени во табели 2 и 3 за 2013 година и табели 4 и 5 за 2014 година.

Нападот на црвено-кафеаво пајаче кај доматиците во заштитен простор во 2013 година беше со послаб интензитет во однос на интензитетот на нападот во 2014 година. Во 2013 година имаше околу 4% нападнати растенија од прегледаните. Во 2014 година интензитетот на нападот се движеше околу 10% нападнати растенија од прегледаните.

Во 2013 година по еден ден од третирањето spirodiclofen, etoxazol и propargite покажаа 100% ефикасност, додека bifentrin и abamectin покажаа 67% ефикасност. По 3 дена од третирањето spirodiclofen, etoxazol и propargite покажаа ефикасност од 100%, додека bifentrin и abamectin покажаа 75% ефикасност. По 7 дена од третирањето spirodiclofen, etoxazol и propargite покажаа ефикасност од 100%, додека bifentrin покажа 71% ефикасност, abamectin покажа 85% ефикасност.



Табела 2. Вкупен број прегледани растенија и број на растенија со возрасни единки од црвено-кафеаво пајаче по 1, 3 и 7 дена по третирањето, во 2013 година

Table 2. Total number of examined plants and number of plants with mites after 1, 3 7 days of treatment, in 2013

Активна материја	Концентрација (%)	Број на прегледани растенија	Растенија со црвено-кафеаво пајаче (број) по третирање		
			1 ден	3 дена	7 дена
Spirodiclofen 240g/l	0.05%	100	0	0	0
Etoxazol 110g/l	0.05%	100	0	0	0
Bifentrin 100g/l	0.05%	100	1	1	2
Propargite 57%	0.04%	100	0	0	0
Abamectin 18g/l	0.1%	100	1	1	1

Табела 3. Ефикасност на инсектицидите пресметана по Abbott по 1, 3 и 7 дена по третирањето, во 2013 година

Table 3. Efficiency of the insecticide-acaricides by Abbot, after 1, 3 and 7 days of treatment in 2013

Активна материја	Концентрација (%)	Ефикасност според Abbott		
		1 ден	3 дена	7 дена
Spirodiclofen 240g/l	0.05%	100	100	100
Etoxazol 110g/l	0.05%	100	100	100
Bifentrin 100g/l	0.05%	67	75	71
Propargite 57%	0.04%	100	100	100
Abamectin 18g/l	0.1%	67	75	85

Во 2014 година по еден ден од третирањето spirodiclofen, etoxazol и prorgargite покажаа 89% ефикасност, додека bifentrin и abamectin покажаа 78% ефикасност. По три дена од третирањето spirodiclofen, etoxazol и prorgargite покажаа ефикасност од 90%, додека bifentrin покажа 70% ефикасност и abamectin покажаа 80% ефикасност. По седум дена од третирањето spirodiclofen, etoxazol и prorgargite покажаа ефикасност од 92%, додека bifentrin покажа 75% ефикасност, abamectin покажа 83% ефикасност.



Табела 4. Вкупен број прегледани растенија и број на растенија со возрасни единки од црвено-кафеаво пајаче по 1, 3 и 7 дена по третирањето, во 2014 година

Table 4. Total number of examined plants and number of plants with mites after 1, 3 7 days of treatment, in 2013

Активна материја	Концентрација (%)	Број на прегледани растенија	Растенија со црвено-кафеаво пајаче (број) по третирање		
			1 ден	3 дена	7 дена
Spirodiclofen 240g/l	0.05%	100	1	1	1
Etoxazol 110g/l	0.05%	100	1	1	1
Bifentrin 100g/l	0.05%	100	3	3	3
Propargite 57%	0.04%	100	1	1	1
Abamectin 18g/l	0.1%	100	2	2	2

Поради високите температури во пластениците и делувањето преку пареите, активната материја propargite, и во двете испитувани години (2013, 2014), покажа фитотоксичен ефект врз третираните растенија од домати.

Табела 5. Ефикасност на инсектицидите пресметана по Abbott по 1, 3 и 7 дена по третирањето, во 2013 година

Table 5. Efficiency of the insecticide-acaricides by Abbot, after 1, 3 and 7 days of treatment in 2013

Инсектицид-акарицид	Концентрација (%)	Ефикасност според Abbott		
		1 ден	3 дена	7 дена
Spirodiclofen 240g/l	0.05%	89	90	92
Etoxazol 110g/l	0.05%	89	90	92
Bifentrin 100g/l	0.05%	67	70	75
Propargite 57%	0.04%	89	90	92
Abamectin 18g/l	0.1%	78	80	83



4. **Заклучок**

Врз основа на извршените испитувања и добиените резултати со примена на наведените инсектициди – акарициди може да го заклучиме следното:

- во 2013 година spirodiclofen, etoxazol и propargite покажаа висока 100% ефикасност, bifentrin покажа ефикасност од 70%, а abamectin покажа ефикасност од 80%;
- во 2014 година spirodiclofen, etoxazol и propargite покажаа ефикасност над 90%, bifentrin покажа ефикасност над 70%, додека abamectin покажа ефикасност над 80%;
- наведените инсектициди – акарициди се препорачува да се употребуваат за сузбивање на црвеното-кафеавото пајаче наизменично;
- активната материја propargite и покрај високата ефикасност не се препорачува за употреба во пластениците за сузбивање на пајачето поради искажаниот ефект на фитотоксичност или доколку се употребува апликацијата да се изведува при пониски температури.

5. **Литература**

- [1] Балеvски А., Начев П., Симова Спаска. 1982. Акари по селскостопанските растения. Земиздат. Софија 1-251
- [2] Naque M., Kawai A. 2003. Effect of temperature on development and reproduction of the tomato russet mite, *Aculops lycopersisi* (Masse) (Acari: Eriophidae). Appl. Entomol. Zool. 38 (1): 97-101.
- [3] Manson D. C. M. 1984. Eriophyoidea except Eriophyinae (Arachnida: Acari), Wellington, N.Z.: Science Information Publishing Centre, DSIR 142 p. ISBN 047706745X.



УДК: 635.649.076:581.192]:615.272

Оригинален научен труд
Original research paper

ОДРЕДУВАЊЕ НА ВКУПНИ АНТИОКСИДАТИВНИ ОСОБИНИ НА КАПСАИЦИНОИДИ ВО *CAPSICUM* ВИДОВИ КУЛТИВИРАНИ ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Викторија Максимова¹, Лилјана Колева-Гудева², Татјана
Рушковска¹, Рубин Гулабоски^{1,2}

¹ Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“,
Штип

viktorija.maksmova@ugd.edu.mk, tatjana.ruskovska@ugd.edu.mk,
rubin.gulaboski@ugd.edu.mk

² Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип
liljana.gudeva@ugd.edu.mk, rubin.gulaboski@ugd.edu.mk

Краток извадок

Капсаициноидите, кои се среќаваат исклучиво во родот *Capsicum*, фамилија *Solanaceae*, се група на алкалоиди кои според својата хемиска структура припаѓаат на фенилетиламинската група на алкалоиди. Меѓу нив капсаициноидот зафаќа до 69%, за разлика од другите капсаициноиди во пиперката кои се среќаваат во помали концентрации.

Антиоксидативниот ефект на плодот од лутата пиперка е еден од благотворните ефекти кои меѓу другите ги покажува ова растение. Затоа, целта на овој труд е да се одреди вкупната антиоксидативна способност на олеорезинот од *Capsicum annuum* L.

Како материјали за оваа цел се користени четири вариетети на пиперка култивирана во Република Македонија. Во етанолни екстракти добиени со Soxhlet методата, антиоксидативниот ефект беше испитуван со помош на FRAP методот.

Беше заклучено дека капсаициноидот покажува изразени антиоксидативни особини и притоа генотипот со највисока концентрација на капсаицин пројавува нависока антиоксидативна способност. Оттука може да заклучиме дека култивирањето на лута пиперка во Република Македонија е сосема оправдано, бидејќи таа може да се вброи во функционална исхрана, не само поради тоа што е богата со витамини и минерали, туку и поради тоа што поседува висока антиоксидативна способност.

Клучни зборови: алкалоиди, капсаициноиди, капсаицин, антиоксидативен капацитет, ФРАП, пиперка



DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDATIVE CAPACITIES OF CAPSAICINOIDS IN *CAPSICUM* SPECIES CULTIVATED IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Viktorija Maksimova¹, Liljana Koleva Gudeva², Tatjana Ruskovska¹,
Rubin Gulaboski^{1,2}

¹Faculty of Medical Sciences, Goce Delcev University - Stip
viktorija.maksmova@ugd.edu.mk, tatjana.ruskovska@ugd.edu.mk,
rubin.gulaboski@ugd.edu.mk

²Faculty of agriculture, Goce Delcev University - Stip
liljana.gudeva@ugd.edu.mk, rubin.gulaboski@ugd.edu.mk

Abstract

Capsaicinoids are present in the genus *Capsicum*, *Solanaceae* family. They are group of alkaloids that according to the chemical structure belong to phenyletilamin group of alkaloids. Among them capsaicin covers up to 69% of the analoges, while the other capsaicinoids are encountered in smaller concentrations.

The antioxidant effect of hot pepper fruits is one of the beneficial characteristics that this plant is possessing. Antioxidants of natural origin are particularly useful because of the ability to neutralize free radicals and usually do not have side effects for the organism. The purpose of this paper is to determine the total antioxidant capacity of oleoresins of *Capsicum annum*.L. As a materials for this purpose were used four varieties of pepper cultivated in our country. Their ethanolic extracts obtained by Soxlet method, were examined using FRAP method in order to examine the total antioxidative capacities of the extracts.

It was noticed that capsaicin showed pronounced antioxidant properties and thus the genotype with the highest concentration of capsaicin exhibited high antioxidant capacity. It was concluded that the hot pepper cultivation in our country is justified because it could be included in the group of functional food, not only because of its richness in vitamins and minerals, but also because of its high antioxidant capacity.

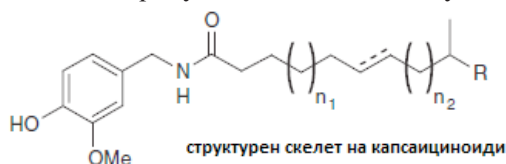
Keywords: *Alkaloids, capsaicinoids, capsaicin, antioxidative capacity, FRAP, pepper fruit*



1. Вовед

Капсаициноидите се јавуваат како комплексни мешавини од аналози, чиј профил е под епигенетска како и генетска контрола. Во рамките на еден вид, застапеноста на капсаициноидите се менува во различни органи кои се истражуваат, бидејќи дистрибуцијата од местото на синтеза на капсаициноидите е очигледно поефикасна за некои видови на капсаициноиди отколку за другите [1].

Повеќе од десетина капсаициноиди, прикажани на слика 1, се пронајдени во олеорезинот од пиперките, но, со оглед на тоа дека најголем дел од овие видови на лути пиперки никогаш не биле испитани хемиски, може да се каже дека бројот на капсаициноиди во природата може да го надмине сегашниот број. Покрај тоа, некои природни капсаициноиди се само привремено идентификувани без да бидат всушност изолирани.



n_1	Δ	n_2	R	Тривијално име
1	+	0	CH ₃	Капсаицин
1	-	0	CH ₃	Дихидрокапсаицин
3	+	0	CH ₃	Bis-хомокапсаицин
4	+	0	CH ₃	Tris-хомокапсаицин
0	+	0	CH ₃	Норкапсаицин
0	-	0	CH ₃	Нордихидрокапсаицин
1	+	1	CH ₃	Хомокапсаицин I
1	-	1	CH ₃	Хомодихидрокапсаицин I
1	+	0	CH ₃ CH ₂	Хомокапсаицин II
1	-	0	CH ₃ CH ₂	Хомодихидрокапсаицин II
0	-	0	CH ₃ CH ₂	Хомонордихидрокапсаицин II
1	-	0	H	Нонивамид
2	-	0	H	Децивамид
3	-	0	H	Ундецивамид
4	-	0	H	Додецивамид
1	+	0	CH ₂ OH	ω - хидроксикапсаицин
2	+	0	Me	Хомокапсаицин

Слика 1. Структура на капсаициноиди
Figure 1. Structure of capsaicinoids



Капсаициноот 8-метил-*N*-ванилил-6-нонеамид претставува главниот претставник од широката палета на капсаициноидни алкалоиди. Лутиот вкус на пиперката потекнува токму од големото присуство на капсаицин во неа. Чистиот капсаицин е хидрофобно, безбојно, без мирис, кристално до восочно соединение. Неговата карактеристична хемиска структура ги дава својствата кои тој ги поседува [1, 2, 3]. Досега се докажани неколку биолошки, односно фармаколошки особини на капсаициноот, како што се аналетското, антимикуробното, антитуморно, антиоксидативното дејство [4, 5, 6]. Антиоксидативното дејство на капсаициноот заедно со другите соединенија кои се присутни во олеорезинот ќе бидат објаснети во овој труд. Антиоксидансите се соединенија кои имаат способност да ги неутрализираат слободните радикали. Слободните радикали пак можат да вршат оксидација на мембранските структури во клетката и со тоа да доведуваат до многу дегенеративни промени во организмот. Поради тоа антиоксидативната способност на капсаициноидите екстрахирани во олеорезинот од лути пиперки во Република Македонија не е истражуван и е од особено значење [7, 8]. Целта на истражувањето е да се види значењето на пиперката како култура во Р. Македонија, не само како градинарски производ туку да се докаже и нејзиното медицинско значење. Односно, преку докажување на антиоксидативните ефекти на капсаициноот да се прошири и зголеми можноста за искористување на оваа градинарска култура.

2. Материјали и методи на работа

2.1. Примероци од пиперки

Како материјали за работа се користени 4 различни генотипови на *Capsicum annuum* L. Лути пиперки кои беа земени за анализа се: *везена*, *феферона* и *бомбона* наспроти *сивријата*, како блага контрола. Семето од овие генотипови е земено од Ген банката при Земјоделскиот факултет на Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип и беа култивирани во 2012 година во исти педолошки и климатски услови. Плодот од пиперките е собран во фаза на ботаничка зрелост во истата година, по што следеа фазите на сушење, и мелење [9, 10, 11]. Тие беа исушени до констатна маса, потоа веднаш пренесувани во ексикатор, и како такви се користени за добивање на олеорезини, односно нивни етанолни екстракти.

2.2. Метод за екстракција

Како постапка за екстракција е користен Soxlet методот [12], при што како растворувач беше искористен етанол (96% V/V), а од сушените



и мелени пиперки беа земени по 0,8 g од материјалот. Целокупната екстракција беше изведувана за времетраење од 5 часа. Добиените олеорезини се чувани во фрижидер на температура од +4°C.

2.3. Квантитативно одредување на капсаициноиди

Содржината на капсаициноиди беше определена со примена на UV спектрофотометрија [13, 14], со користење на UV-VIS спектрофотометар, модел Cary 100, 9.0. За конструирање на калибрациона крива извршено е спектрофотометриско мерење на серијата од стандардни раствори на капсаицин во концентрационен опсег од 0,05 до 0,3 mg/L. Од равенката за линеарна зависност добиени се задоволителни резултати со висока вредност на коефициент на корелација, $R=0,999$ (слика 2).

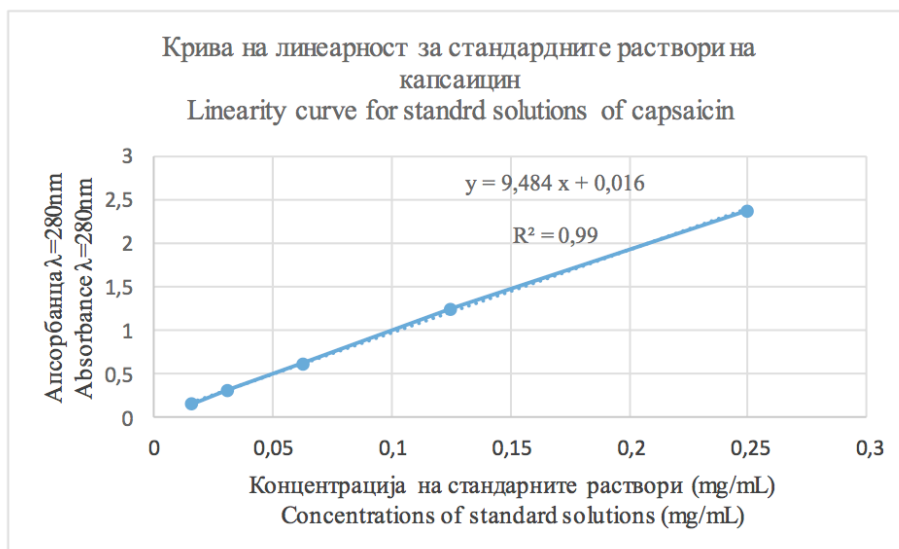
Мерењата за одредување на концентрација на капсаицин во олеорезините беа направени на истиот начин на бранова должина од 280 nm.

2.4. Одредување на антиоксидативниот капацитет

Како метод за одредување на антиоксидативниот капацитет беше употребен FRAP (Ferric reducing antioxidant power) методот според Benzie и Strain, со мали модификации [15]. Овој метод се базира на редукцијата на Fe^{3+} во Fe^{2+} , под дејство на супстанцата која ги пројавува антиоксидативните особини (редуктор). Детекцијата на финалното обојување на примероците се врши на бранова должина од 595 nm.

3. Резултати и дискусија

Иако според голем број автори [16, 17, 18] високоперформансната течна хроматографија претставува метода од избор за квантитативно одредување на капсаициноидите, UV спектрометријата дава задоволителни резултати при одредувањето на истиот. Линеарноста на методот е прикажана на слика 2. Со примена на равенката на линеарност $y = 9.484x + 0.016$, добиена за пет стандардни раствори на капсаицин, беше пресметана концентрацијата на капсаицин во испитуваните примероци од пиперка.



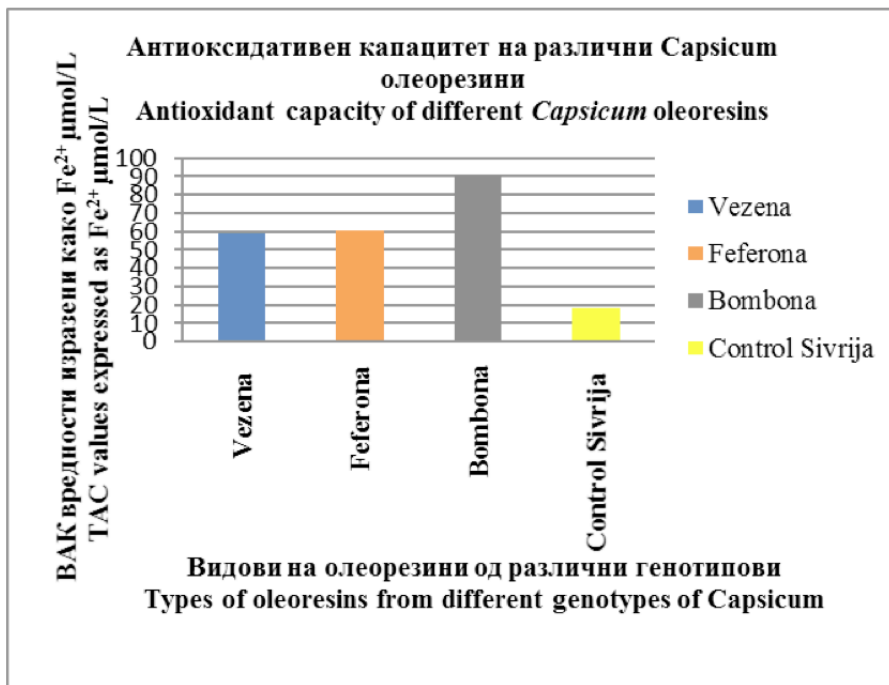
Слика 2. Крива на линеарност за стандардни раствори од капсаицин
Figure 2. Linearity curve for standard solutions of capsaicin

Во табелата 1 се дадени резултатите за концентрација на капсаицин и вкупен антиоксидативен капацитет во етанолните олеорезини. Антиоксидативниот потенцијал на овие екстракти во графички приказ е даден на слика 3. Резултатите за антиоксидативниот потенцијал се споредени со резултатите од вода (како негативна контрола) и витамин Ц како позитивна контрола.

Табела 1. Концентрација на капсаицин и вкупен антиоксидативен капацитет (БАК) во етанолните олеорезини

Table 1. Concentration of capsaicin and total antioxidant capacities in ethanolic oleoresins

Етанолни олеорезини од различни генотипови	Концентрација на капсаицин (mg/mL)	Апсорбанца добиена со FRAP методот	БАК (Fe^{2+} $\mu\text{mol/L}$)
везена	0.014	0.227	59
феферона	0.019	0.228	61
бомбона	0.052	0.249	90
сиврија	0.018	0.198	18



Слика 3. Антиоксидативен капацитет на различни *Capsicum* олеорезини
Figure 3. Antioxidative capacity of different varieties of *Capsicum* oleoresins

Дадените резултати покажуваат добра корелација помеѓу концентрацијата на капсаицин во примероците и нивниот вкупен антиоксидативен потенцијал. Притоа може да се забележи дека генотипот *бомбона* има највисока концентрација на капсаицин, а притоа пројавува и највисока антиоксидативна активност од опфатените генотипови во оваа студија. Вкупниот антиоксидативен капацитет на олеорезините добиени од генотиповите *везена* и *феферона*, соодветно на содржината на капсаицин во нив (0,014 и 0,019 mg/ml) е помал отколку кај генотипот *бомбона*. За разлика од нив, контролниот генотип *сиврија* има видно помала антиоксидативна способност, бидејќи не содржи капсаиноиди, туку капсаноиди кои имаат слична хемиска структура со капсаиноидите, но различни биолошки/фармаколошки особини.



4. Заклучок

Врз основа на добиените резултати може да заклучиме дека консумацијата на лути пиперки носи голем бенефит за здравјето на луѓето. Резултатите од ова испитување покажаа дека капсаицинолот во плодот од пиперката има изразено антиоксидативно својство. И покрај тоа што во пиперката се синтетизираат голем број на секундарни метаболити како што се витаминот Ц и Е, каротеноидите и други полифенолни соединенија, сепак капсаицинолот носи голем дел од антиоксидативните особини на пиперката [19, 20, 21]. Со тоа се оправдува широката примена на пиперката како земјоделска култура, бидејќи таа претставува не само нутриционистички извор туку и богат извор на фармаколошки активни компоненти како што се капсаиноидите.

Користена литература

- [1] Fattorusso E, Tagliatalata-Scafati O, (2008), *Modern alkaloids: Structure, isolation, synthesis, and biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, (book)
- [2] De Witt, D. (1999) “*The nature of capsaicin: The Chile Pepper Encyclopedia*”. Morrow Cookbooks, NY, USA (book).
- [3] Govindarajan, V.S. (1986) *Capsicum- production, technology, chemistry and quality - Part III. Chemistry of the colour, aroma and pungency stimuli*, CRC, Critical Review in Food Science and Nutrition., 24 (3): 254-355.
- [4] Perucka, I., Materska, M. (2003) “*Antioxidant activity and contents of capsaicinoids isolated from paprika fruits*”. Pol. J. Food Nutr. Sci., 12/53, 2, 15-18.
- [5] Masayuki U., Shingo Y., and Kazuo W., (1991) “The role of capsaicin afferent nerves in protective effect of capsaicin against absolute ethanol – induced gastric lesions in guts”, Japan. J. Pharmacol. 55, 279.
- [6] Shi-Yin Guo, Guo-Ping Yang, De-Jian Jiang, Feng Wang, Tao Song, Xing-He Tan, and Zhen-Qiu Sun, (2008) “*Protection of capsaicin against hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis of rat hippocampal neurons*”, Can. J. Physiol. Pharmacol., 86: 785–792
- [7] Turgut C., Newby B., Cutright J.T., (2004) “*Determination of optimal water solubility of capsaicin for its usage as a non-toxic antifoulant*” ESPR- Environ Sci & Pollut Res 2004, 11.(1) 7-10.
- [8] Koleva-Gudeva, L., Rafajlovska V., Spasenovski M. (2004) “*In vivo and in vitro content of capsaicin in pepper*” VIII Symposium Biotechnology and Agroindustry, Velika Plana, Serbia. Proceeding, pp. 252-259
- [9] Sanatombi K., Sharma G. J., (2008) “*Capsaicin content and pungency of Different Capsicum spp. cultivars*” Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj, 36 (2), 89-90.



- [10] *Descriptors for Capsicum (Capsicum spp.)*, 1995, International Plant Genetic Resources Institute. (book)
- [11] Contreras-Padilla, M., Yahia, E. M. (1998) “*Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity*”. J. Agric. Food Chem., 46, 2075-2079.
- [12] Rafajlovska V., Slavevska Raicki R., Klopcevska J., Srbinska M., “*Extraction of Oleoresin from Pungent Red Paprika Under Different Conditions*”.
- [13] Davis B.C., Markey E. C., Buscha. M., Busch W.K. “*Determination of Capsaicinoids in Habanero Peppers by Chemometric Analysis of UV Spectral Data*”.
- [14] Wagner E.C., Cahill M.T., Marshall A. P., (2011) “*Extraction, Purification, and Spectroscopic Characterization of a Mixture of Capsaicinoids*” J. Chem. Educ., 88, 1574–1579.
- [15] Benzie and strain
- [16] Basu, K.S. and De Krishna A. (eds). (2003). *Capsicum. Medicinal and aromatic Plants –Industrial Profiles*. London: Taylor & Francis.
- [17] Abdullah Al Othman Z., Badjah Hadj Ahmed Y., Abdelaty Habila M., Abdel Ghafar A., (2011) “*Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography*” *Molecules*, 16, 8919-8929.
- [18] Perucka I., Oleszek W., (2000) “*Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper Capsicum annumL. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography*”, *Food Chemistry*, 71, 287-291.
- [19] “*Final Report on the Safety Assessment of Capsicum Annuum Extract, Capsicum Annuum Fruit Extract, Capsicum Annuum Resin, Capsicum Annuum Fruit Powder, Capsicum Frutescens Fruit, Capsicum Frutescens Fruit Extract, Capsicum Frutescens Resin, and Capsaicin*” (2007), American College of Toxicology, *International Journal of Toxicology*, 26 (Suppl. 1): 3–106.
- [20] Maksimova Viktorija, Koleva G. Liljana, Ruskovska Tatjana, Cvetanovska Ana, Gulaboski Rubin, (2013) *Correlation between antioxidative potential of pure capsaicin and capsicum oleoresins*, 8th CMAPSEEC, Albania, Abstract book, 229
- [21] Palevitch, D., Craker, L. E.” *Nutritional and medicinal importance of red pepper (Capsicum spp.)*. J. Herbs Spices Med. Plants 1995,3, 55-83.



УДК:582.926-12:582.282.11(497.7)

Оригинален научен труд
Original research paper

ПЕПЕЛНИЦА (*MICROSPHAERA DIFFUSA*) НА ГОЦИ БЕРИ (*LYCIUM CHINENSE*) ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Илија Каров¹, Саша Митрев¹, Билјана Ковачевиќ¹, Емилија Костадиновска¹

¹Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип
emilija.kostadinovska@ugd.edu.mk

Краток извадок

Гоци бери (*Lycium chinense* Mill) е грмушка од фамилијата *Solanaceae* во која спаѓаат компирот и доматиите, и нивна главна карактеристика е присуството на алкалоидот соланин кој се отстранува со лупење и со термичка обработка. Гоци бери потекнува од југоисточна Азија, а најмногу се одгледува во Кина. Оваа култура расте од 1 до 3 метри висина, плодот е со црвеникава боја, со должина до 2 сантиметри и содржи од 20 до 40 ситни семчиња.

Истражувањата за значењето на плодовите од гоци бери потврдиле дека тие содржат 18 аминокиселини кои се неопходни за организмот, 21 минерал, сите главни и споредни витамини и останати состојки потребни за јакнење на имунитетот на организмот кои се предуслов за здрав и долг живот на човекот. Според сите овие карактеристики кои оваа култура ги носи со себе во медицината е позната како „црвен дијамант“.

Имајќи го предвид значењето на гоци бери како култура со многу квалитетни плодови, ова истражување дава посебен акцент на појавата на пепелницата (*Microsphaera diffusa*) кај гоци бери, следењето на текот на развојот на болеста и лабораториска дијагностика на патогенот.

Ова е прво истражување за здравствената состојба на гоци бери како култура на територијата на Република Македонија. Одгледувањето на гоци бери на нашата територија е од понов датум и заслужува поголемо внимание на здравствената состојба, за да не настанат сериозни последици при производството.

Клучни зборови: црвен дијамант, аминокиселини, минерали, пепелница



POWDERY MILDEWS (*MICROSPHAERA DIFFUSA*) ON GODJI BERI (*LYCIUM CHINENSE*) IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Plija Karov¹, Sasa Mitrev¹, Biljana Kovacevik¹, Emilija Kostadinovska¹

¹Faculty of Agriculture, Goce Delcev University, Stip, Macedonia
emilija.kostadinovska@ugd.edu.mk

Abstract

Goji berry (*Lycium chinense* Mill) is a shrub from the family *Solanaceae*, which includes potatoes and tomatoes, and their main feature is the presence of the alkaloid solanine, which is removed by peeling and thermal processing. Goji berry originates came from Southeast Asia and mostly grown in China. This culture grows from 1 to 3 meters height, the fruit is reddish in color, with a length of 2 inches and contains 20 to 40 tiny seeds.

Studies of the importance of fruits goji berry confirmed that they contain 18 amino acids that are essential for the body, 21 minerals, all main and secondary vitamins and other ingredients needed to build up the immune system that are prerequisite healthy and long life of man. According to all these, features that this culture brings in medicine known as “RED DIAMONDS”. Bearing in mind the importance of culture as goji berry with many quality fruit, this research gives special emphasis on the appearance of the powdery mildews (*Microspheara diffusa*) in goji berry, monitoring during the development of the disease and laboratory diagnosis of the pathogen.

This is the first study to highlight the importance of culture as goji berry and problems that occur during its breeding in the Republic of Macedonia. Breeding goji berry on our territory is a newborn and deserves greater attention to the health condition, lest serious consequences occur in production.

Key words: red diamonds, aminoacids, minerals, powdery mildey

1. Вовед

Гоџи бери (*Lycium chinense* Mill) е грмушка од фамилијата *Solanaceae* во која спаѓаат компирот и доматиите и нивна главна карактеристика е присуството на алкалоидот соланин кој се отстранува со лупење и со термичка обработка [1]. Гоџи бери потекнува од југоисточна Азија, а најмногу се одгледува во Кина и Кореја во медицински и хранливи (нутритивни) цели [2]. Оваа култура расте од 1 до 3 метри висина, плодот е со црвеникава боја, со должина до 2 сантиметри и содржи од 20 до 40 ситни семчиња.



Гоци бери најдобри приноси дава на исцедни и добро дренирани почви со рН од 8,2 до 8,6. Садењето се врши од половината на април, па сè до доцна есен, а кога се сади во лето, треба обилно да се наводнува. Најдобри се сончеви локации во текот на целиот ден. Се сади во јами со димензии 40 x 40 x 40 сантиметри, на растојание од околу еден метар и на дното на јамата се става прегорено арско губре, но сепак јамата да остане длабока од 15 до 20 сантиметри [2].

Истражувањата за значењето на Гоци бери плодовите потврдило дека тие содржат 18 аминокиселини кои се неопходни за организмот, 21 минерал, сите главни и споредни витамини и останати состојки потребни за јакнење на имунитетот на организмот кои се предуслов здрав и долг живот на човекот. Според сите овие карактеристики кои оваа култура ги носи со себе во медицината е позната како „црвен дијамант“ [3].

Покрај ботаничкиот опис, особено пред започнување на одгледувањето на една ваква атрактивна култура, неопходно е да се знаат условите за одгледување и осетливоста кон болести. Растенијата можат да бидат колонизирани од различни габни симбионти, вклучувајќи ектомикоризни габи (ectomycorrhizal ECM), арбускуларни микоризни габи (arbuscular AM) и темно септирани ендофитни габи (dark septate endophytic fungi DSE) [4].

Пепелницата спаѓа во една голема група на габни заболувања кои зафаќаат дрвенести, плевелни, украсни растенија како и градинарски, житни и овошни култури. Во групата на пепелниците спаѓаат околу 1.100 видови, класифицирани во неколку родови: *Erysiphe*, *Microsphaeta*, *Phyllactinia*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* и *Uncinula* [5]. Појавата на ова заболување многу зависи од староста на растенијата и условите за нивно одгледување, како и од временските услови во текот на сезоната. Климатските услови кои се најповолни за да се појави пепелницата се многу топли денови со ладни ноќи, а важен сегмент при одгледувањето во вакви услови е поставеноста на насадот. Доколку се работи за густ насад и слаба циркулација на воздухот, можноста за појава на пепелницата е поголема [4]. Во текот на животниот циклус на оваа патогена габа, производството на конидии, нивно ослободување, делба како и процесот на инфекција и производство на нова генерација на конидии може да биде за кратко и брзо време – 72 до 96 часа [5].

Имајќи го предвид значењето на пепелницата при одгледувањето на гоци бери, целта на ова истражување се базираше на: (1) маркирање на болеста на терен, (2) следење на текот на развојот на симптоматологијата и (3) лабораториска дијагностика на патогенот. Сето ова со амбиција, за да може да се проектира соодветна програма за заштита на оваа за нас



нова култура од причинителот на пепелницата. Сепак, главната цел на истражувањето беше да се даде акцент на непознатото и необјавено за наши простори, значењето на гоци бери и на пепелницата како патоген кој влијае на приносот и одгледувањето.

2. Материјал и метод на работа

2.1. Колекционирање на материјал за анализа – симптоматологија

Теренската анализа беше направена во природни услови на експериментално производство во с. Долни Подлог, Кочанско, во сезона 2014, во периодот од јули до октомври. Теренските испитувања, почнувајќи од првата половина на јули, беа базирани на следење на состојбата на терен, преку следење на вегетативниот развој на гоци бери, од една страна и појавата и текот на развој на симптомите предизвикани од причинителот на пепелницата – *Microsphaera diffusa*, од друга страна.

2.2. Лабораториска анализа на материјалот од гоци бери

Колекциониранитот материјал од симптоматична лисна маса од гоци бери беше тестиран лабораториски, со примена на микроскопски техники на анализа имајќи предвид дека се работи за патогена габа која е облигатен паразит т.е. изолацијата на хранлива подлога е невозможна.

3. Резултати и дискусија

3.1. Теренска анализа на материјал од гоци бери

Причинителот на пепелницата кај гоци бери – *Microsphaera diffusa* на почеток се јавува од лицето на листот, во вид на бела прашкаста материја на листовите, младите стебленца, цветовите, па дури и на формиранитот плод. Овие поединечни дамки постепено стануваат поголеми, сè додека не го зафатат целиот лист (слика 1). Белата прашкаста материја претставува мицелија од пепелницата богата со спори (кондии) кои се јавуваат на лицето на лисната маса. Подоцна во текот на сезоната, поединечните дамки се спојуваат една со друга и доаѓа до промена на бојата на мицелијата, од снежно бела станува светлокафеава (слика 2).



Слика 1. Пепелница на лисна маса кај гоџи бери (*Microsphaera diffusa*)



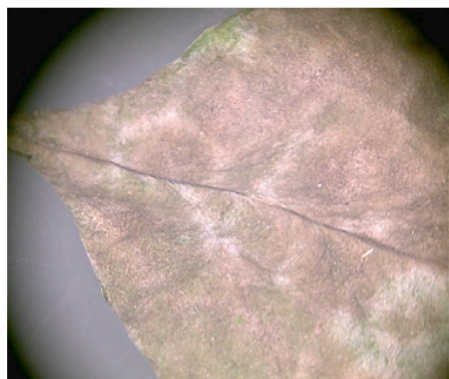
Слика 2. Застарена инфекција – пепелница на лисна маса

3.2. Микроскопска анализа на материјалот од гоџи бери

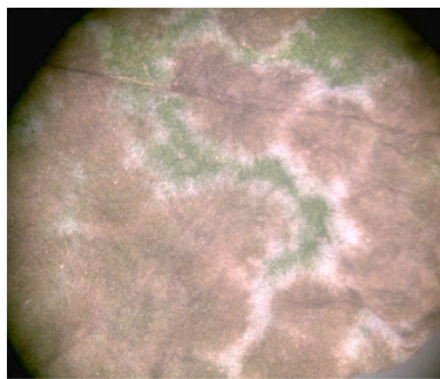
При анализата на собраниот материјал од терен, на почеток беше направен преглед на мицелиската превлака на лисната маса, со примена на бинокулар (бинокулар, C-DS, Toshiba, Japan). Целата лисна маса беше зафатена со мицелија на која кревите и се снежно бели, но внатрешноста од каде што започнала инфекцијата имаше светлокафеава боја (слика 4 а и б). Силно заразените листови имаат намален раст и се свиткуваат кон внатрешноста. Заразените цветовите се деформирани со честа појава на некротизирање (слика 3). Деформации се јавуваат и кај формираните плодови.



Слика 3. Здрава и симптоматична лисна маса со тек на развој на СИМПТОМОТ



а.



б.

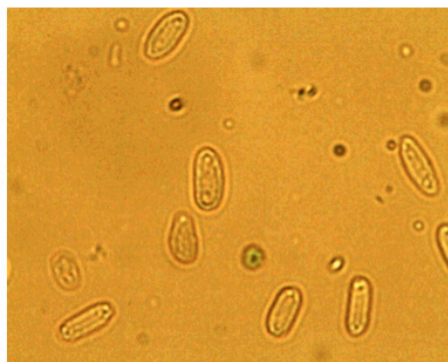
Слика 4. Бинокуларен преглед на лисна маса
а. врвен дел од симптоматичен лист
б. средишен дел од симптоматичен лист



Микроскопската анализа на препарат од мицелиската превлака покажа присуство на конидии од причинителот на пепелница, најчесто едноклеточни (слика 5 а и б).



а.



б.

Слика 5. Микроскопски преглед на пепелница кај гоци бери
а. изглед на конидии на 40x зголемување
б. изглед на конидии на 100x зголемување (олеоимерзионо)

4. Заклучок

Гоци бери е нов културен растителен вид за Република Македонија. Имајќи го предвид поширокото значењето на гоци бери како култура, особено е важно да се истражат и утврдат како компаративните услови за одгледување на ова растение кај нас, од една страна, така и проучувањето на можностите од појавата на различни причинители на болести, од друга страна.

Причинителот на пепелницата кај гоци бери (*Microsphaera diffusa*) претставува габно заболување од големо економско значење при одгледувањето и производството на гоци бери. Во наши услови, инфекцијата се развива и се шири многу бргу, имајќи ги предвид повољните услови кои ги бара патогенот (топли денови, пониски температури во вечерните часови). Присуството на патогенот *Microsphaera diffusa* предизвикува присуство на мицелиска превлака на лисната маса и стеблото, намален принос, како и деформиран плодови.

Следните истражувања ќе бидат базирани на следење на можностите за појава на пепелницата, примена на современи техники на молекуларна идентификација и на други патогени кои се јавуваат паралелно кај ослабените растенија.



5. Користена литература

- [1] Lu AM, Wang ML (2003). On the identification of the original plants in the modernization of Chinese herbal medicine – an example from the taxonomy and exploitation of “gougi”. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 23: 1077-1083.
- [2] Potterat O. (2010): Goji (*Lycium barbarum* or *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Plant Med.* 2010, 76, 7-19.
- [3] Narayan C.P., Hyang B.L., Ji H.L., Kyu S.S., Tae H.R., Hye R.K., Yeong K.K., Young N.Y., Seung H.Y. (2014). Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15272-15286.
- [4] Zvang H., Tang M., Chen H., Wang Y., Ban Y. (2010): Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes colonization status in medicinal plant *Lycium barbarum* L. in arid Northwestern China. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(18), 1914-1920.
- [5] Plant Disease (1987): Report on Powdery Mildew of ornamentals. RPD No. 617.



УДК: 634.51-248.2(497.7)

Оригинален научен труд
Original research paper

***GNOMONIA LEPTOSTYLA* (Fr.) Ces. et de Not. ПРИЧИНИТЕЛ НА
АНТРАКНОЗА КАЈ ОРЕВОТ ВО ИСТОЧНИОТ РЕГИОН НА
РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

**Илија Каров¹, Саша Митрев¹, Билјана Ковачевиќ¹, Зорница
Стојанова², Емилија Костадиновска¹, Росица Родева²**

**¹Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип
biljana.kovacevik@ugd.edu.mk**

**²Institute of Plant Physiology and Genetics, 1113 Sofia, Bulgaria
r.rodeva@abv.bg**

Апстракт

Антракнозата кај оревоот (*Juglans regia* L.) претставува една од најдеструктивните болести насекаде во светот. Причинител е аскомицетната габа *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. со анаморфниот стадиум *Marssonina juglandis* (Lib.) Magn. Во последната декада симптоми од антракноза на оревоот се забележани во повеќе области од источниот регион на Република Македонија. Патогенот ги напаѓа листовите, плодовите и гранките. На листовите се појавуваат темнокафеави кружни дамки кои подоцна се спојуваат и зафаќаат поголема некротирана површина од растителното ткиво. Темнокафеави кружни плодни тела наречени ацервули се развиваат насекаде на некротираната површина од листот најчесто од долната страна. Ацервулите во себе носат голем број на конидии. Конидиите се безбојни, со српест облик, на едниот крај зашипени а на другиот заоблени и имаат една септа со која се поделени на два дела. Силната зараза може да предизвика дефолијација на заболеното растение. Дамките на лисните дршки се поситни и издолжени во чија внатрешност исто така се образуваат ацервули. Раната инфекција може да доведе до деформација и опаѓање на плодовите. Напролет телеоморфниот стадиум *G. leptostyla* е забележан на опаднатите листови кои презимиле во вид на перитеции. Перитециите имаат долг врат и носат голем број на аспуси со аскоспори кои всушност се примарен инокулум од габата. Аскоспорите се прозирни, издолжени и две-ќелијни. Истражувањата покажаа дека и двата стадиума од габата се присутни и остваруваат инфекција кај оревоот во Република Македонија. Собирањето и уништувањето на заболениот растителен материјал може значително да го намали инокулумот од габата.

Клучни зборови: *Juglans regia*, *Gnomonia leptostyla*, *Marssonina juglandis*



***GNOMONIA LEPTOSTYLA* (Fr.) Ces. et de Not. CAUSER OF WALNUT ANTHRACNOSE IN THE EAST PART OF THE REPUBLIC OF MACEDONIA**

**Ilija Karov¹, Sasa Mitrev¹, Biljana Kovacevik¹, Zornitsa Stoyanova²,
Emilija Kostadinovska¹, Rossitza Rodeva²**

¹Agriculture Faculty, Goce Delcev University, Stip, Macedonia

biljana.kovacevik@ugd.edu.mk

²Institute of Plant Physiology and Genetics, 1113 Sofia, Bulgaria

r.rodeva@abv.bg

Abstract

The anthracnose is one of the most destructive diseases of walnut (*Juglans regia* L.) worldwide. The causal agent is an ascomycetous fungus (*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not.) (anamorph *Marssonina juglandis* (Lib.) Magn.). In the last years symptoms of the disease were observed with increasing frequency in Macedonia. The leaves, nuts, and occasionally shoots were affected. Leaf spots were dark brown, more or less circular and often coalesced forming larger dead areas. Black minute fruiting bodies called acervuli developed more abundantly on the under side than on the upper side of leaflets and produced a lot of conidia. Conidia were colorless, usually crescent-shaped, rounded at one end and tapered at the other and divided by septa into two approximately equal cells. The severe attack caused defoliation in infected trees. The spots on the walnut husks were sunken and smaller than on the leaves. Early infection could lead to fruit deformation and they prematurely dropped. In the spring the perfect or sexual fungus *G. leptostyla* was found on fallen overwintered walnut leaves. Perithecia with long necks discharged numerous asci with ascospores serving as primary inoculum. Ascospores were hyaline, fusiform and bicellular. Our results showed that both stages were involved in the disease under climatic condition of Macedonia. Collecting and burning or plowing the infected plant materials would aid in the control of this disease.

Key words: *Juglans regia*, *Gnomonia leptostyla*, *Marssonina juglandis*



1. Introduction

Republic of Macedonia is a country with significant potential in terms of soil and climate conditions for growing nut trees. According to the State Statistical Office of the Republic of Macedonia in 2011 there were 183 024 total planted walnut trees of which 162 160 were native. The most important region for walnut growing is municipality of Kriva Palanka with 11 955 trees, then municipality of Struga with 9 500 trees and Skopje with 9 015 trees [23]. Besides being cultivated on large productive area walnut is one of the most widespread wild growing trees in the country.

The genus *Juglans* consists of about 21 species occurring over North and South America, Europe and Asia. In Europe the most spread is the species *Juglans regia* known as Persian walnut, followed by *J. hindsii*, *J. nigra*, *J. mandshurica* and *J. sieboldiana* [5].

Anthraxnose is one of the most important and widely distributed walnut diseases in almost all the walnut producing regions worldwide. The inciter of walnut anthracnose is the ascomycetous fungus *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. (anamorph *Marssonina juglandis* (Lib.) Magn.) [19, 22]. The pathogen causes walnut disease in Europe, USA, South Africa and Asia [7]. In Bulgaria the disease was found and described for the first time by Malkov in 1905 and 1906 [11, 12] and further investigated by several other authors [8, 16, 17, 21]. Detailed studies on the biology, ecology and pathophysiology of its causative agent were carried out by Dimova (2003) [9]. The fungus was also identified in Serbia [4], Croatia [5], Slovenia [20], Greece [2] and Italy [6].

Last decade on the territory of the Republic of Macedonia the development of walnut anthracnose was noticed covering wide territory range and causing yield and quality reduction. In 2004 symptoms were observed in the village of Dolni Podlog, near the town of Kochani at first and later in other parts of the country. Since then the occurrence of walnut anthracnose has been recorded each year with increasing intensity. Although the disease was noticed 10 years ago there are no records about the presence of ascomyceteous fungus *G. leptostyla* (anamorph *M. juglandis*) published in the literature in the Republic of Macedonia. The present report aimed to describe the disease symptoms and to isolate, identify and characterize the causal agent of walnut anthracnose.

2. Materials and methods

Plant material was collected from the diseased walnut trees in area of Kochani, Strumica, Shtip and St. Nikole. Binocular and macroscopic investigations were performed on the symptomatic plant material including leaves, shoots and fruits. Isolations were made on nutrient media potato dextrose agar (PDA) at 22°C in dark. Identification was accomplished on the



basis of morphological characteristics like conidial size and shape, presence or absence of teleomorph, colony morphology and growth rate on PDA [19].

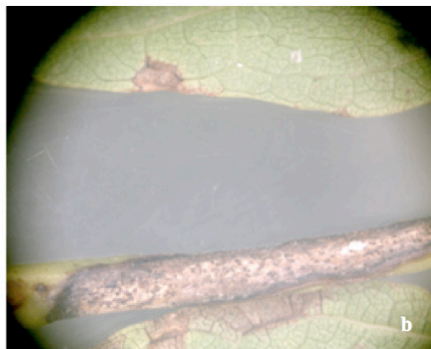
3. Results and discussion

3.1 Symptoms

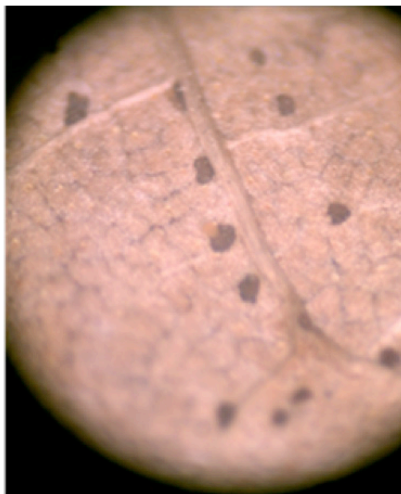
Symptoms of walnut anthracnose appeared on all aboveground parts of the plant mostly on leaves, young shoots and fruits. At first, symptoms were observed in the village of Dolni Podlog near the town of Kochani in 2004. Since then walnut anthracnose symptoms were observed every year in almost all regions of the country. Depending on the weather conditions, symptoms occurred with lower or greater intensity. First symptoms appeared in form of chlorotic lightening on leaves at the end of May. Soon, small dark spots developed and began to spread. The leaf tissue became necrotic covering greater surface of the leaves. In the diseased tissue dark small fruiting bodies called acervuli were formed in a great number. They represented the anamorphic stage of the pathogen (Fig. 2). The presence of acervuli was most abundant on the under side than on the upper side of the leaves. On the upper side they were distributed mostly near the leaf veins. When the weather conditions were favorable for the disease development especially under rainy conditions, leaf stalks began to dry and defoliation occurred. Symptoms on young shoots appeared in the form of elliptic necrotic lesions with poor white mycelium in the central part where acervuli were also formed but in small quantity (Fig. 1). Young infected nuts were with dark spots on the surface and usually dropped before to reach maturation. At the end of the autumn and in winter perithecia were formed on fallen walnut leaves. Ascospores caused the primary infections of walnut leaves in the spring.

3.2 Microscopic observations

Microscopic observations revealed the presence of the black-brown acervuli arranged in concentric circles in the necrotic tissue. Acervuli could be seen with the naked eye (Fig. 3). They liberated a jelly substance bearing a lot of macro- and small number of microconidia. Macroconidia were hyaline having one septa and crescent shape. They were pointed on the one end and rounded on the other. Microconidia were hyaline, one-celled and much smaller (Fig. 4). Perithecia produced on the overwintered walnut leaves were brown to black with long neck, breaking through the necrotic tissue (Fig. 5). The length was around 0,6 mm (Fig 6). Single layer asci bearing eight ascospores liberated through the long neck (Fig. 7). Ascospores were two-celled with one or more fatty drops in each cell (Fig. 8). Some differences were observed in the growth and colony morphology of the isolates obtained from ascospore and conidia (Fig. 9).



Сл. 1. Симптоми од антракноза на гранки од орев (a, b)
Fig. 1. Symptoms of walnut anthracnose on young shoots



Сл. 2. Симптоми од антракноза на лист од орев
Fig. 2. Symptoms of walnut anthracnose on leaves

Сл. 3. Ацервули на некротиран дел од лист
Fig. 3. Acervuli on the necrotic leaf tissue

Our findings confirmed the conclusions of Kessler (1988) that infections were much severe in rainy years [10]. Submediterranean climate and moderate amounts of rainfalls as characteristic of the climate profile of the country created favorable conditions for development of teleomorphic and anamorphic stage of the pathogen. Ascospores served as initial inoculum infecting the emerging leaves in spring while secondary infections were performed by the anamorphic



stage. Not all walnut species were equally susceptible to the disease. Field observations showed that some wild growing species were less susceptible to the pathogen attack. Differences in the susceptibility of walnut cultivars were found by several authors [1, 3, 4, 6, 13, 18]. According to Anselmi (2005), *J. nigra* could be considered as resistant species while *J. regia* as susceptible one [1]. The interspecific hybrids (*J. nigra* x *J. regia*) were considered to possess intermediate resistance. Neely (1986) found out that fertilization with nitrogen reduced the severity of anthracnose caused by *G. leptostyla* due to the highest content of total nitrogen content in the leaves [15].

The most important measure control is destroying the infected leaves from the soil surface in order to decrease the amount of the inoculum and the use of fungicides on the base of copper [14, 17].

4. Concluding remarks

The causal agent of the walnut disease in the Republic of Macedonia was identified as the *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. (anamorph *Marssonina juglandis* (Lib.) Magn.) on the basis of disease symptoms, anamorph and teleomorph characteristics of the fungus and its growth and colony morphology on PDA. The pathogen belongs to the phylum *Ascomycota*, class *Sordariomycetes*, order *Diaporthales*, family *Gnomoniaceae*, genus *Gnomonia*. In 2008 the teleomorphic stage *G. leptostyla* received a new name *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov [15], although the name *G. leptostyla* is still widely used. The present research showed that walnut anthracnose is widely distributed in almost entire territory of the Republic of Macedonia. The disease causes damage on walnut trees each year and the intensity of the disease depends on the weather conditions.



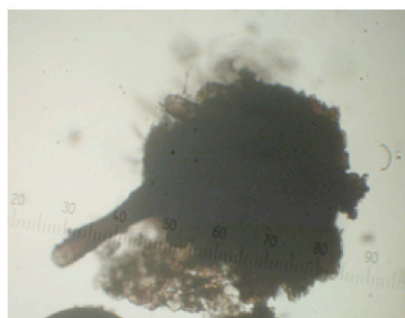
Сл. 4. Макроконидии и микроконидии од *Marssonina juglandis*

Fig. 4. Macro- and micro-conidia of *Marssonina juglandis*



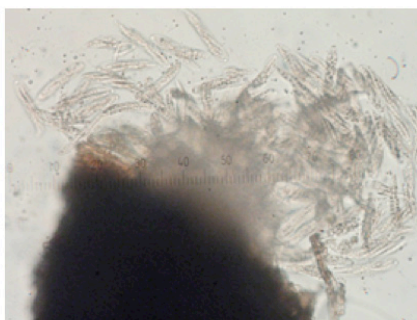
Сл. 5. Перитецији од *Gnomonia leptostyla* во некротиран дел од лист на орев

Fig. 5. Perithecia of *Gnomonia leptostyla* on necrotic walnut leaf



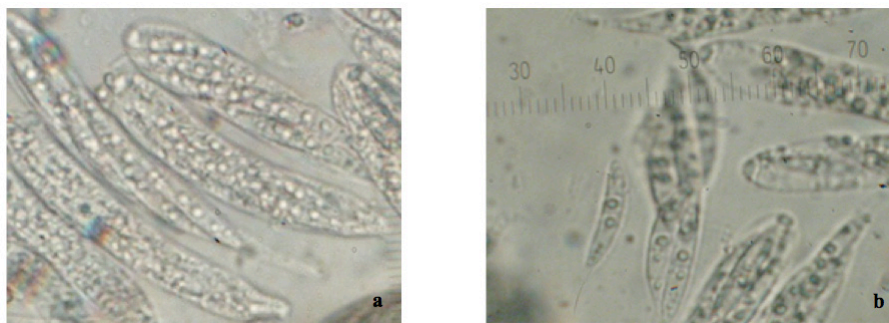
Сл. 6. Микроскопски изглед на перитеција од *Gnomonia leptostyla*

Fig. 6. Microscopic view of *Gnomonia leptostyla* perithecium

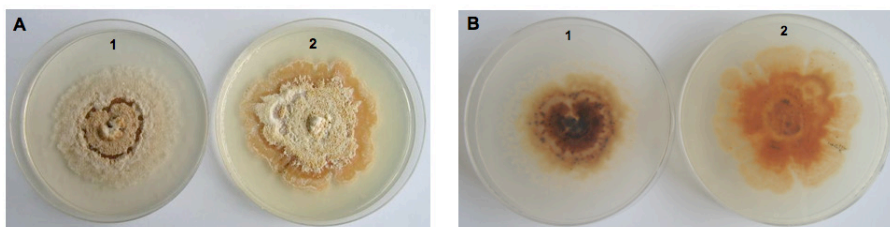


Сл. 7. Ослободување на аскуси од перитеција

Fig. 7. Liberating asci from perithecium



Сл. 8. Аски со аскоспори од *Gnomonia leptostyla* (а, б)
Fig. 8. Asci and ascospores *Gnomonia leptostyla* (a, b)



Сл. 9. Раст и морфологија на колонија на КДА
Fig. 9. Growth and colony morphology on PDA: 1 - isolated from ascospore,
2 – isolated from conidia;
A – from above side, B – from reverse side



5. References

- [1] Anselmi, N., Mazzaglia, A., Scaramuccia, L., De Pace, C. (2005) Resistance attitude of *Juglans regia* L. provenances towards anthracnose (*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not.). *Acta Horticulturae* (ISHS), 705, 409-416.
- [2] Apostolides, C.A. (1952) *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki*, 6, 2, 62-78.
- [3] Arnaudov, V.A., Gandev, S.I. (2009) Susceptibility of some walnut cultivars to *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. *Acta Horticulturae* (ISHS), 825, 407-412.
- [4] Balaž, J., Korać, M., Cerović, S. (1991) Osetljivost genotipova oraha prema *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. de Not. prouzrokovaju lišne pegavosti. *Jugoslovensko Voćarstvo*, 25, 1-2, 91-94.
- [5] Barić, L., Diminić, D., Glavaš, M., Hrašovec, B. (2008) Zdravstveno stanje drveća u gradu Pakracus posebnim osvrtom na bolesti I štetnike lišca. *Radovi - Šumarski Institut Jastrebarsko*, 43, 1, 59-70.
- [6] Belisario, A., Scotton, M., Santori, A., Onofri, S. (2008). Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, homothalism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. *Forest Pathology*, 38, 2, 129-145.
- [7] CAB International (2013) *Distribution Maps of Plant Diseases*, 1986, October (Edition 3), pp Map 384.
- [8] Dimova, M. (2001). Anthracnose on walnut. *Agricultural University-Plovdiv, Bulgaria, Scientific Work*, XLVI, 3, 269-274 (Bg).
- [9] Dimova, M. (2003) Walnut anthracnose (*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces et de Not) - Ph.D. Thesis, 129 p. (Bg).
- [10] Kessler, K.J., Jr. (1988) Walnut anthracnose. In: Burde, E.L., ed. *Walnut notes*. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station.
- [11] Malkov, K. (1905) Annual report of Research Station in Sadovo for 1904 (Bg).
- [12] Malkov, K. (1906) A contribution to the parasitic fungi in Bulgaria. *Works of the Bulgarian Naturalist Society*, 3 (Bg).
- [13] Mitrović, M., Miletić, R., Rakicević, M., Blagojević, M., Glišić, I. (2007) Biological and pomological properties of some walnut selections from the native population. *Genetika*, 39, 1, 39-46.
- [14] Nakova, M., Dimova, M. (2003) Anthracnose disease (*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not) on walnuts – chemicals for control. *Plan Science* (Sofia), 40, 366-369.
- [15] Neely, D. (1986). Total leaf nitrogen correlated with walnut anthracnose resistance. *Journal of Arboriculture*, 12, 12, 312-315.



- [16] Rosnev, B., Petkov, P. 1986. Pathologic causes for deteriorating the state of health of certain coniferous plantations in Bulgaria. *Nauka za gorata*, 23, 3, 74-82 (Bg).
- [17] Rosnev, B., Tsanova, P. 1980. On the distribution and control of anthracnose to reduce damage from it in walnut (*Juglans regia* L.) in the country. *Forestry Science*, 3, 44-55 (Bg).
- [18] Saremi, H., Amiri, M.E. (2010) Evaluation of resistance to anthracnose (*Marssonina juglandis*) among diverse Iranian clones of walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8, 2, 375-378.
- [19] Sogonov, M.V., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Mejia, L.C., White, J.F. (2008) Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. *Studies in Mycology*, 62, 1-79.
- [20] Solar, A. Štampar, F. (2005) Evaluation of some perspective walnut genotypes in Slovenia. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 705, 131-136.
- [21] Trifonov, D. (1962) Walnut anthracnose (*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not). *Plant Protection*, 10, 1, 21-32 (Bg).
- [22] Walker, M.D., Castdebury, A.L., Sogonov, V.M., White, F.J. (2010) Systematics of genus *Gnomoniopsis* (Gnomoniaceae, Diaporthales) based on a three gene phylogeny, host associations and morphology. *Mycologia*, 102, 6, 1479-1496.
- [23] Државен завод за статистика на РМ (2011) Статистички преглед: Земјоделство 5.4.12.01/711.