



Оригинален научен труд

УДК 634.8-238(497.7)

## ПРИСУСТВО НА ВИРУСОТ НА СВИТКУВАЊЕ НА ЛИСТОВИТЕ КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА ВО МАКЕДОНИЈА

Емилија Костадиновска<sup>1</sup>, Саша Митрев<sup>1</sup>, Раде Русевски<sup>2</sup>,  
Илија Каров<sup>1</sup>, Виолета Димовска<sup>1</sup>

**Апстракт:** Растителните вируси се група на патогени кои придонесуваат за значителни загуби во приносот и имаат големо економско значење. Тие се облигатни паразити и за нивна репликација користат дел од растителните клетки на домаќинот.

Конкретно кај виновата лоза штетното дејство од вирусната инфекција се манифестира во намалување на приносот и квалитетот на грозјето, намалување на векот на лозите, во калемовото производство – намалување на приносот и квалитетот на резниците за калемење, како и слабо сраснување на спојното место.

Со примена на серолошка ELISA техника и молекуларна RT-PCR дијагностика извршивме утврдување на присуството на еден од најшироко распространетите флоемски вируси кај виновата лоза, вирусот на свиткување на листовите – Grapevine leafroll associated virus GLRaV (-1, -2, -3, -7).

Истражувањето опфати вкупно 382 изолати од вируси кај виновата лоза, во периодот од 2008 до 2014 година.

Од вирусните промени кај виновата лоза беше следено и потврдено присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза (Grapevine leafroll associated virus) со групите -1 и -3 од овој вирус (GLRaV-1, GLRaV-3).

**Клучни зборови:** *облигатни паразити, ELISA, RT-PCR, GLRaV.*

<sup>1</sup>Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

<sup>2</sup>Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје



## PRESENCE OF GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED VIRUS IN THE VINEYARDS IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Emilija Kostadinovska<sup>3</sup>, Sasa Mitrev<sup>3</sup>, Rade Rusevski<sup>4</sup>, Ilija Karov<sup>3</sup>,  
Violeta Dimovska<sup>3</sup>

**Abstract:** Plant viruses are group of pathogens that cause and important loses in grapevine production and they have and great economic importance. They are obligate parasite form and for their replication they used plant cells.

In particular vines, the harmful effects of viral infection manifests itself in reduced yield and quality of grapes, reducing the life of the vines in grapevine calem production- reducing the yield and quality of cuttings for grafting and weak adhesion of the coupling place.

By applying serological ELISA technique and RT-PCR molecular diagnostics, we determining the presence of most distributed phloemic viruses in grapevine - Grapevine leafroll associated virus GLRaV (-1, -2, -3, -7). The study covered a total of 382 isolates of grapevine viruses, in the period from 2008 till 2014.

In relation to grapevine viruses, we monitored the presence of the leafroll virus in grapevine (Grapevine leafroll associated virus) with groups -1 and -3 of this virus (GLRaV-1, GLRaV-3).

**Key words:** *obligate parasite, ELISA, RT-PCR, GLRaV.*

### 1. Вовед

Можностите за ефикасното искористување на земјоделското земјиште во Македонија се попречени од неговото фрагментирање во парцели, како резултат на претходните ограничувања на површини кои може да се користат и поседуваат, обичаите за наследство, како и традицијата за релациите на промет на земјиште (купопродажба) [9].

Слабиот промет на земјиште, кој не придонесе на консолидирањето (окупнувањето) на фармите, како и слабиот економски пораст и недостаток на социјална безбедност и понатаму го потхранува процесот на фрагментација и диверзификација на производството во мали парцели, со цел да се спречат пазарните флукуации и да се задоволат потребите од храна [9]. Како резултат на ваквите состојби и долгиот временски период на мали инвестиции, лозовите насади во Република Македонија се со неповолна старосна структура. Околу 60% од лозовите насади се постари од 15 години, а 38% од вкупната површина под лозови насади се на

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, Goce Delcev University, Stip, Macedonia

<sup>4</sup> Faculty of agriculture and food, St Kiril and Metodija University, Skopje



крајот од својот продуктивен живот. Истите треба приоритетно да бидат цел на инвестиција за нивно обновување (копачење / пресадување), за да се одржи производствениот (квантитативен и квалитативен) потенцијал [9].

Асортиманот на сортите на винско грозје е несоодветен во однос на неговиот квалитет, локацијата на производство и промовирање на пазар [9]. Сегашната застапеност на сортите на винско грозје, често не е во согласност со правните акти за сортна класификација, кои во моментот се на сила. Покрај тоа, висок процент на лозови насади се лоцирани во т.н. зони подложни на мразеви, каде што замрзнувањето на окцата е честа појава. Заменувањето на несоодветните сорти на грозје и на лозови насади, од зоните подложни на мразеви на подобри локации, ќе придонесе за подобрување на квалитетот и постабилни приноси [9].

Значајни промени кај виновата лоза во приносот предизвикуваат вирусите, како посебна група на патогени причинители [8].

Во најголем број случаи, промените кои настануваат кај виновата лоза предизвикани од вирусен причинител зависат од видот на вирусот, осетливоста на сортата на виновата лоза, начинот на ширење на вирусите итн. [8]. Според статистички податоци за појавата на виروزите кај виновата лоза [4], се смета дека тие спаѓаат во многу стари заболувања, но нивната економска штетност посебно дошла до израз кон половината на XIX век и била во тесна врска со појавата на филуксерата [4].

До денес се познати околу 70 групи вируси како главни причинители на болести кај виновата лоза [12]. Една од многу важните препораки пропишана од Интернационалното здружение за проучување на вирусите и слични организми на вирусите (International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine ICVG) од 2003 г. предлага задолжително лабораториско тестирање на садниот материјал, особено на економски многу значајни вирози кои директно влијаат врз растот на виновата лоза, квалитетот и квантитетот.

**Вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза (*Grapevine leafroll associated virus – GLRaV*)** - за првпат овој вирус е откриен во далечната 1958 година во Калифорнија, каде што било забележано дека вирусот предизвикува дисколорација на плодовите кај црвените сорти на винова лоза [11]. Припаѓа во фамилијата *Closteroviridae*, во родот *Ampelovirus* каде што припаѓаат девет асоцијативни видови [5].

Штетите предизвикани од *Grapevine leafroll associated virus* се движат во граници од 20 до 40%. Овој вирус најчесто предизвикува промена во бојата на листовите и нееднакво созревање на гроздовите [7,10]. Исто така, симптомите може да вклучат и свиткување на листовите кон внатрешната страна, промена на бојата (поцрвенување кај црвените/црните сорти, пожелтување (хлорозност) кај белите сорти) и некротизирање на одредени делови од листот, и разрушување на фломот [7,10].



Овој вирус често се појавува во мешана инфекција со други вируси или со друг патоген причинител. Во такви случаи може да предизвикува сушење и изумирање на лозата [7,10]. Теренските анализи на симптомите кај виновата лоза предизвикани од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, многу често може да личат со симптоми како резултат на механичко оштетување на стеблото кај виновата лоза, други болести на флоемското ткиво, оштетувања од инсекти и сл. [7,10].

Во нашете истражување направивме детална анализа за присуството на Grapevine leafroll associated virus со посебен акцент на групите GIRaV-1 и GIRaV-3.

## 2. Материјал и метод на работа

### 2.1. Колекционирање на материјалот за анализа во лозовите насади во Република Македонија

За да може да се добие вистинска слика за состојбата со појавата на вирусните промени кај виновата лоза во Република Македонија, 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) (шематски приказ 1).



**Шематски приказ 1.**

Годишен период за теренска анализа на лозовите насади во Македонија

**Scheme 1.** Period of field analyses in the vineyards in Macedonia

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 листа на примерок). При собирањето на лисна маса за секој примерок посебно се внимаваше да се земаат симптоматични листови, млади и без некротирана нерватура. Вака собраната и задолжително забележана лисна маса (сорта, локалитет, регион, датум) дополнително се подготвуваше во лабораториски услови: се користеше само лисната



нерватура (1 g по примерок) за испитување на фитоплазми и лисна маса (0.4/0.5 g нерватура или лисни вени) за испитување на присуството на вируси.

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

- по теренско донесување на материјал во лабораторија се вршеше шифрирање на истиот и чување на  $+4^{\circ}\text{C}$  за краток временски период (неколку дена до подготовка за анализа);
- бидејќи се работи за флоемски 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  $-20^{\circ}\text{C}$  за период од неколку месеци (додека да се направат анализите) или на температура од  $-80^{\circ}\text{C}$ , за подолг временски период.

На слика 1 се прикажани истражуваните локалитети на територијата на Македонија, според застапеноста на испитуваниот број на лозарски единици.



Слика 1. Мапа на Македонија - маркирани се испитуваните лозови насади  
Figure 1. Macedonian map – mark experimental grapevine fields

## 2.2. Методи за идентификација на проучуваните патогени

Имајќи ја предвид градбата на патогените кои беа предмет на ова истражување, за нивна дијагностика и идентификација беа користени најсовремени молекуларни лабораториски методи и техники прикажани во табела 1.



**Табела 1. Преглед на културата, испитуваните патогени и користените лабораториски методи на работа**

**Table 1. Culture, pathogens and used laboratory methods of work**

Култура Culture	Патогени Pathogens	Лабораториски методи на испитување Laboratory methods of work
Винова лоза / grapevine <i>Vitisvinifera</i> L.	Вируси / Viruses	1. DAS-ELISA – серолошка детекција на патогените 2. Екстракција на РНК 3. RT-PCR 4. Механичко пренесување на патогените

### 2.2.1. Серолошки метод (ELISA) за испитување на групите на *Grapevine leafroll associated virus*

Еден од методите за потврдување на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, GLRaV, кој беше користен за идентификација на сите примероци собрани за анализа беше DAS-ELISA серолошкиот метод (DAS-ELISA, double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Во текот на анализите беа користени готови китови од фирмата BIOREBA, Switzerland, со тест протокол за идентификација на комплекс **GLRaV-1+3, (микс GLRaV-1 и GLRaV-3)**, како и поединечни тестови за идентификација на следниве групи: **GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-7**. Освен китови на фирмата BIOREBA, за анализите беа користени и готови китови со антители за сендвич-програмата од SEDIAG, France, со пропишан протокол на работа.

### 2.2.2. Молекуларна реакција на детекција на GLRaV во растително ткиво од виновата лоза - протокол на екстракција на РНК од симптоматично растително ткиво

За изолација на вирусната РНК беа користени два метода на лабораториска работа: првиот метод беше со употреба на готови китови [6], а вториот метод со помош на силика [3]. На крај се проверуваше добиената РНК на спектрофотометар – нанодропна бранова должина од 260 nm за да се одреди концентрацијата. Овој модифициран протокол на екстракција работеше одлично кај дрвенести растителни видови, со посебен акцент „да се работи многу брзо, со цел да се добие поголема концентрација на РНК“.



### Multiplex RT-PCR

За овие анализи беа користени т.н. групи на прајмери кои се користат во Multiplex RT-PCR за детекција на различни групи вируси.

**Табела 2. Секвенци на прајмери употребувани во Multiplex RT-PCR**

**Table 2. Primer sequences used in Multiplex RT-PCR**

Реден број	Име на прајмер	Група на вирус	Секвенца 5' – 3'	Големина на амплифицирани бр (базни парови)
1.1.	18S-M1	GLRaV1	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844 bp
1.2.	18S-M2		TTCAGCCTTGCGACCATACT	
2.1.	GLRaV2-CP1	GLRaV2	GGTGATAACCGACGCCTCTA	543 bp
2.2.	GLRaV2-CP2		CCTAGCTGACGGAGATTGCT	
3.1.	GVB-M1	GVB	GTGCTAAGAACGCTTTCACAGC	460 bp
3.2.	GVB-M2		ATCAGCAAACACGCTTGAACCG	
4.1.	ARMV-9	ARMV	TGACAACATGGTATGAAGCACA	402 bp
4.2.	ARMV-10		TATAGGGCCTTTCATCACGAAT	
5.1.	GLRaV3-M3	GLRaV3	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	336 bp
5.2.	GLRaV3-N2		TGGGGCATTAATCTTCATGT	
6.1.	GVA-6591F	GVA	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	272 bp
6.2.	GVA-6862R		TCGAACATAACCTGTGGCTC	
7.1.	GLRaV1-M3	GLRaV1	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	232 bp
7.2.	GLRaV1-M4		GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	
8.1.	GFKV-M1	GFKV	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	179 bp
8.2.	GFKV-M2		TGGACAGGGAGGTGTAGGAG	
9.1.	GFLV-M3	GFLV	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	118 bp
9.2.	GFLV-M4		GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG	

Секој од овие прајмерски сетови добро работи и во simplex PCR (единичен), за идентификација само на една група.

Во текот на анализите беа користени и посебни групи на прајмери за одредување на GLRaV 3 група[13] (табела 3).

**Табела 3. Секвенци на прајмери употребувани за одредување на GLRaV 3 група**

**Table 3. Primer sequences used for GLRaV 3 detection group**

Реден број	Име на прајмер	Секвенца 5' – 3'	Големина на амплифицирани бр (базни парови)
1.1.	P3U	5' CGCTCATGGTGAAAGCAGACG-3'	653 bp
1.2.	P3D	5' CTTAGAACAAAAATATGGAGCAG-3'	
2.1.	CP3U	5' ATGGCAATTTGAACTGAAATAGGGC-3'	484 bp
2.2.	CP3D	5' CGGCGCCCATAACTTCTTACA-3'	



### 2.3. Пренесување на вирусите од виновата лоза на зелјести тест-растенија (биотестови)

Механичко пренесување на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза 1 и 3 група (GLRaV-1 и GLRaV3) беше направено на тест-растенија – тутун *Nicotiana benthamiana* L. Потенцијален извор на групите на вирус кои сакавме да ги пренесеме механички беше лисна маса (нерватура и лисно ткиво), симптоматична и веќе докажана со ELISA тест.

Тест-растенијата беа одгледувани во комора за раст на растенија (BINDERKBW720), со промена на интервалот на светло - темно, за период од 12 часа светло, 12 часа темно, на дневна температура од 25°C, а ноќна температура од 20°C. Инокулацијата беше направена во фаза на 6-8 добро развиени листа (по два месеца од поникнувањето). По инокулацијата тест-растенијата повторно беа вратени во контролирани услови. Пред почетокот на инокулацијата беше направена контрола на целото растение, за да провериме дали растението е здраво и добро пораснато.

## 3. Резултати и дискусија

### 3.1. Симптоматолошки промени кај виновата лоза – теренска анализа

Во текот на визуелниот преглед на лозовите насади беа следени вирусните промени. Во овие испитувања беше следен вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (флоемски патоген).

Врз основа на теренските испитувања и лабораториската потврда на патогенитетот ги истакнуваме следниве генерални ефекти на инфекцијата на виновата лоза со GLRaV:

- свиткување на листовите кон внатрешноста (зависно од осетливоста на сората). Во наши услови ова беше најјасно забележуван симптом кај сортите *вранец*, *црн бургундец*, *мерло*, *станушина*;
- промена на бојата – пожолтување / поцрвенување со задржување на нормална зелена боја околу лисната нерватура. Оваа изразена појава околу лисната нерватура е појасно забележувана кај црвените сорти, но неретко можеше да се забележи и кај белите сорти;
- автохтона сорта *станушина* - симптом на пожолтување на листовите, со изразена жолта пигментација и зелена нерватура, со крути хипертрофирани листови;
- нерамномерно созревање на гроздинките;
- намалени шеќерни единици и губење на квалитетот на грозјето;
- ненавремено и одложено созревање на грозјето.





**Вирусна инфекција кај сортата каберне совињон (симптоми)** беа со јасно изразено црвенило и зелена нерватура на лисната маса, без морфолошка деформација, и со целосно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови (слика 2). Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (слика 2).



**Слика 2.** Сорта *каберне совињон*, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, црвенило на листовите со зелена нерватура и со големи здрави гроздови, но со кисел вкус

**Figure 2.** Cabernet Sauvignon, locality Veles, Sopot - GLRaV, reddening of the leaves with green veins and large, healthy grapes, but sou rtaste

**Вирусна инфекција кај сортата мерло (симптоми)** - беа со јасно изразено црвенило и зелена нерватура на лисната маса, со морфолошка деформација (триаголен изглед), и со делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза (слика 3). Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот или, пак ,во некои случаи воопшто не се формираше грозд.



**Слика 3.** Сорта *мерло*, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV

**Figure 3.** Merlot, locality Argulica, Tupanec-bending strain of the vine leaves GLRaV

**Вирусна инфекција кај сортата *вранец* (симптоми):** беа со јасно изразено црвенило и зелена нерватура на лисната маса, без морфолошка деформација и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови. Кај некои лози се забележуваше и целосно поцрвенување на лисната маса на една лоза и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот. Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (слика 4 а,б).



**Слика 4 а, б.** Сорта *вранец*, локалитет с. Карбинци, м.в. Балабаница – GLRaV, симптоми на лисна маса, со јасна зелена нерватура и нерамномерно созревање на гроздовите

**Figure 4 a.b.** Variety Vranec, locality Karbinici, Balabanitca- GLRaV, symptoms of leaf mass, with clear green veins and uneven ripening of grapes

**Вирусна инфекција кај сортата *станушина* (симптоми):** беа со јасно изразено пожолтување и зелена нерватура на лисната маса, со јака морфолошка деформација (свиткување на листот кон внатрешноста и триаголен изглед), и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоремските спроводни садови. Кај некои лози се забележуваше целосно пожолтување на лисната маса на целата лоза и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот. Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (слика 5).



**Слика 5.** Сорта *станушина*, локалитет Кавадарци, м.в. Брловец – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, промена на бојата и свиткување на листовите кон внатрешноста

**Figure 5.** Stanusina, locality Kavadarci, Brlovec- GLRaV, strong foliage infection, discoloration of leaves and bending inward

**Вирусна инфекција кај сортата *црн бургундец* (симптоми):** беа со јасно изразено црвенило и зелена или жолта нерватура на лисната маса, со морфолошка деформација, и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови (слика 6). Кај некои лози се забележуваше и целосно поцрвенување на лисната маса на една лоза и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот (слика 6). Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот.



**Слика 6.** Сорта *црн бургундец*, локалитет Штип, м.в. Каваклија – GLRaV, инфекција на лисната маса, црвени листови со триаголен изглед  
**Figure 6.** Black Burgundy variety, locality Stip, Kavaklija- GLRaV, infection of foliage, red leaves with triangular appearance

### 3.2. Серолошка анализа со примена на ELISA методите за докажување на присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза

Серолошката техника на идентификација на присуство на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза беше направена со употреба на готови китови на производителите BIOREBA - Switzerland и SEDIAG - France, за докажување на -1, -2, -3 и -7 групите на вирусот.

Детален преглед за утврденото присуство и дистрибуцијата на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза е даден во табела 4.

Вкупно беа анализирани 382 примероци, кои беа тестирани на сите групи на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-7. Од вкупно 382 примероци, 215 беа позитивни на овој вирус на виновата лоза.

Од тестираните групи на вируси, нашите испитувани примероци беа позитивни на leafroll 1 и leafroll 3 групата на вируси. Често пати, во испитуваните примероци добивавме комбинација на двете групи GLRaV-1 + GLRaV-3.



**Табела 4.** Резултати од DAS ELISA методот за присуство на групите на leafroll вирусот

**Table 4.** DAS ELISA results for checking the leafroll viruses groups

Регион Region	Локалитет Locality	Сорта Variety	Лабораториски DAS ELISA резултати Laboratory DAS ELISA results					
			GLRaV 1+3	GLRaV 1	GLRaV 2	GLRaV 3	GLRaV 7	RT-PCR
Штип	с.Три Чешми	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
	м.в.Ежово	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	+
	с.Криви Дол	<i>вранец</i>	/	-	-	-	-	-
	с.Ново Село	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
	м.в.Каваклија	<i>црн бургундец</i>	+	+	-	+	-	+
	с.Долни Балван	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
	с.Батање	<i>вранец</i>	/	-	-	-	-	НТ
Кочан	м.в.Стари лозја	<i>црн бургундец</i>	/	+	-	-	-	+
Караорман	м.в. Балабанци	<i>вранец</i>	/	-	-	+	-	+
Аргулица	м.в. Тупанец	<i>вранец</i>	/	-	-	-	-	НТ
с.Сарчиево	с.Сарчиево	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	НТ
Свети Николе	с.Ерцелија	<i>италијански ризлинг</i>	-	+	-	+	-	НТ
с.Амзабегово с.Пеширово	м.в. Струга	<i>вранец</i>	/	+	-	-	-	НТ
с.Пеширово	с.Пеширово	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	НТ
с.Црнилиште	с.Црнилиште	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	НТ
Овче Поле	приватно лозје	<i>црн бургундец</i>	+	+	-	+	-	НТ
Велес	м.в. Сопот	<i>каберне совиньон</i>	+	-	-	+	-	НТ
Куманово	Кумановско	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	НТ
Валандово	с.Јосифово	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
Гевгелија	м.в.Авлаки	<i>франковка</i>	+	-	-	+	-	+
Скопје	м.в. Четири патишта	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	НТ
Битола	Битолско, Лозар	<i>италијански ризлинг</i>	-	-	-	-	-	НТ



продолжение на табела 4

Регион Region	Локалитет Locality	Сорта Variety	Лабораториски DAS ELISA резултати Laboratory DAS ELISA results					
			GLRaV 1+3	GLRaV 1	GLRaV 2	GLRaV 3	GLRaV 7	RT-PCR
Тиквешко виногорје	Кавадарци, с. Чемерско	<i>црн бургундец</i>	+	+	-	-	-	нт
	Кавадарци, с. Крњево, м.в. Брловец	<i>кратошија</i>	+	+	-	-	-	нт
		<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	+
	Кавадарци, Раец	<i>вранец</i>	+	+	-	-	-	нт
	Демир Капија	<i>вранец</i>	+	+	-	-	-	нт
	Неготино, м.в. Ило Виларов	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	нт
	Неготино, с. Лепово	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	нт

**+** - позитивни, **-** негативни; **нт** – не тестирани; **/ -** не се добиени резултати

### 3.3. Детекција на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза со метод на RT-PCR

Присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, поточно групите 1 и 3, беше дополнително утврдено со RT-PCR методот како квантитативна конфирмациона анализа. Примената на мултиплекс RT-PCR методот не ги даде очекуваните резултати. Електрофоретската сепарација на добиените продукти даде многу нејасни бандови. Тие според големината одговараат на неколку различни групи флоемски вируси од кои дел се вклучени во истражувањето, а дел од нив сè уште се необјавени. Дополнителните напори за пурификација и раздвојување на продуктите според висината на базните парови не вродија со плод. Затоа, за успешна детекција со помош на реверзно-транскриптивната полимеразна реакција ги користевме истите прајмерски секвенци како за мултиплекс, но во поединечна верижна реакција.

Присуството на GLRaV-1 беше потврдено со RT-PCR со примена на GLRaV1-M3 / GLRaV1-M4 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци (слика 7). Присуството на GLRaV-2 беше потврдено со RT-PCR со примена на GLRaV2-CP1 / GLRaV2-CP2 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки негативни примероци, затоа што ELISA анализата не даде позитивни примероци за оваа група



(слика 7). И покрај тоа што немавме позитивни за GLRaV-2 вирусот, направивме RT-PCR, за да го потврдиме ELISA тестот.

Присуството на GLRaV-3 беше потврдено со RT-PCR со примена на GLRaV3-M3 / GLRaV3-N2 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци (слика 7). Во табела 5 се дадени детални податоци за неколку примероци кои беа комплетно анализирани, со утврдени: концентрација на изолираната РНК исчитани на спектрофотометар нанодроп: резултати од DAS-ELISA тест и RT-PCR за GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3.

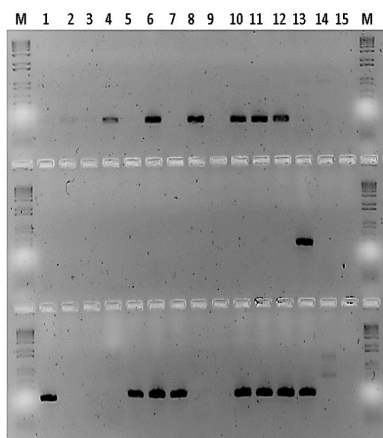
**Табела 5.** Примероци прикажани со комплетна анализа ELISA / RT-PCR  
**Table 5.** Tested samples with complete ELISA / RT-PCR techniques

Ред. бр. Nb.	Шифра на примерок Sample identification	Локалитет / Лозарска единица Locality	Сорта Variety	DAS-ELISA	Екстракција на RNA (Quiagen кит) концентрација	RT-PCR (GLRaV 1) (прајмерски пар M3 и M4) <b>232 bp</b>	RT-PCR (GLRaV2) (прајмерски пар CP1-CP2) <b>543 bp</b>	RT-PCR (GLRaV 3) (прајмерски пар M3 и N2) <b>336 bp</b>
1	31/12	Штип м.в. Ежово	вранец	GLRaV 3	187,6 ng/ul	-	-	+
2	03/12	Гевгелија м.в. Авлаки	франковка	GLRaV 1	158,8 ng/ul	+	-	-
3	05/12	Гевгелија м.в. Авлаки	вранец	GLRaV 3	154,2 ng/ul	+	-	-
4	06/12	Гевгелија м.в. Авлаки	франковка	GLRaV 3	164,5 ng/ul	+	-	+
5	07/12	Гевгелија м.в. Авлаки	вранец	GLRaV 1	187,3 ng/ul	-	-	-
6	09/12	Валандово с. Јосифово	вранец	GLRaV 1	189,7 ng/ul	+	-	+
7	13/12	Валандово с. Јосифово	вранец	GLRaV 3	43,3 ng/ul	-	-	+
8	14/12	Валандово с. Јосифово	вранец	GLRaV 1	77,7 ng/ul	+	-	-
9	22/12	Кавадарци с. Крњево	вранец	GLRaV 3	56,9 ng/ul	-	-	+
10	44/12	Штип м.в. Каваклија	црн бургундец	GLRaV 1	72,6 ng/ul	+	-	-

**Легенда:**

„+“ ----- позитивен примерок  
„-“ ----- негативен примерок





**Слика 7.1%** Агарозен гел на којшто се прикажани резултатите од RT-PCR детекцијата со примена на пражмерски комбинации за GLRaV -1, -2 и -3. Вкупната РНК е прикажана од десет репрезентативни примероци обележани од 1 до 10, со карактеристики за примероците во табела 5. М-маркер (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), 11, 12, 13 позитивна контроли GLRaV -1, -2 и -3 од референтни примероци од лабораторијата во Милано, 14 здрав примерок (здрава винова лоза), 15 негативна контрола

**Figure 7.1%** agarose gel showing the results of RT-PCR detection using the prajmerski combinations GLRaV -1, -2 and -3. The total RNA is shown in ten representative samples marked 1-10, features of the samples in Table 5. M -marker (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), 11, 12, 13 positive controls GLRaV -1, -2 and -3 of reference samples from the lab in Milan, 14 healthy sample (healthy vines), 15 negative control

### **3.4. Пренос на *Grapevine leafroll-associated virus 1* и 3 (GLRaV-1 и GLRaV3) на тест растенија *Nicotiana benthamiana* L.**

Механичкиот пренос на двете групи на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, -1 и -3, резултирало со појава на јасни симптоми кај тест растенијата, споредени во секој однос со негативната контрола. По инокулацијата, тест растенијата контролирано беа следени и фотографирани во текот на целиот процес на следење на развој на симптомите. Првите поинтензивни промени во изгледот на тест растенијата (промени на бојата на лисната маса) беа забележани 20 дена по инокулацијата. Покрај визуелните промени кои јасно се забележуваа на лисната маса (инокулираната и новоформираната), беше направена и конфирмациона DAS - ELISA анализа дијагностика на GLRaV-1 и GLRaV3. Материјалот за лабораториската анализа беше собран по 45 дена од инокулацијата (слика 8). По 45 дена беше направена серолошка реакција ELISA со користење на готови китови BIOREBA, според чекорите на протоколот за докажување на пренесување на вирусот на тест растенијата.



**Слика 8.** Симптоми предизвикани од GLRaV-1 (десно) и GLRaV-3 (лево), по 45 дена од инокулацијата, споредени со негативна контрола – дестилирана вода (во средина)  
**Figure 8.** Symptoms caused by GLRaV-1 (right) and GLRaV-3 (left), after 45 days from the inoculation, compared to the negative control-distilled water (middle)

#### 4. Заклучок

За флоемските вирусни патогени, меѓу кои спаѓа и групата на GLRaV вирусот, кај нас досега не постојат пишани податоци. Со овие истражувања се обидовме да направиме една мапа за присуството и степенот на застапеност на овој вирус кај нас.

Симптоматолошките анализи направени во текот на шестгодишниот период од истражувањето покажаа дека црните вински сорти – *вранец*, *црн бургундец*, *кратошија*, *франковка* имаат најчеста инфекција и јасно изразени симптоми на терен, предизвикани од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза.

Анализите го потврдија присуството на GLRaV-1 и GLRaV-3. Најчесто застапена е GLRaV-3 група на вирусот (60% од испитуваните примероци), а GLRaV-1 група е застапена со 40%. GLRaV-2 и GLRaV-7, и покрај обидите со модификација на серолошкиот протокол на работа, не беа потврдени. Овие добиени резултати, споредени со литературните податоци за присуството на GLRaV вирусот со групите кои припаѓаат кон овој вирус, покажуваат 20 до 40% застапеност, со посебен акцент на GLRaV-1 и GLRaV-3 група на leafroll вирусот.



При анализите на групите на вирусот беше направено и механичко пренесување на GLRaV-1 и GLRaV3 на тест растенија, тутун – *Nicotiana benthamiana* L, за да се докаже присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза и да се одржува во лабораториски услови, следејќи ја симптоматологијата и времето на одржување.

Присуството на GLRaV-1, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци, беше потврдено и со RT-PCR методот, при што беа користени GLRaV1-M3 / GLRaV1-M4 прајмерските парови. Дополнително, присуството на GLRaV-2, беше утврдено кај десет одбрани серолошки негативни примероци, со помош на RT-PCR методот со примена на GLRaV2-CP1 / GLRaV2-CP2 прајмерските парови. Присуството на GLRaV-3 беше потврдено со RT-PCR методот, со примена на GLRaV3-M3 / GLRaV3-N2 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци. Вакви истражувања за споредба на големината на геномските секвенци кај различните групи од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза се правени од страна на голем број научноистражувачки центри и досега постојат бројни публикации за групите на вирусот и нивните карактеристични профили.

## 5. Користена литература

- [1] Borgo M., Angelini E. (2002). Influence de l'enroulement foliaire GLRaV-3 sur les paramètres de la production du Merlot. Bullerin de l'O.I.V., 859-860.
- [2] Cabaleiro C., Seruga A. (1996). Efecto del enrollado de la vid (GLRaV-3) en un vinedo en plena producción del cultivar "Albarino". Investigation Agraria, Produccion y Proteccion Vegetal 11, 451-463.
- [3] Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq MJ., Candresse T. (2000). Polivalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PRO RT-PCR). 16<sup>th</sup> International Symposium of Virus and Virus-Like diseases on fruit trees. Canterbury p.48. Acta Agricultura, Vol 550, 37-43.
- [4] Hewit W.B. (1970). Virus and Virus diseases of the Grapevine. Review of Applied Mycology 47, 433-455.
- [5] International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). Virus taxonomy. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>
- [6] Mackenzie D. J., McLean M.A., Mukerji S., Green M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease 81. 222-226.
- [7] Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse



- T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C. Yoshikawa N. (2002a). The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology* 147, 2039-2043.
- [8] Martelli, G.P., Boudon-Padieu, E. (2006). Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes, Série B: N.55*, pp 297
- [9] Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015
- [10] Peake B.K., Mackie A.E., Sivasithamparam K., Habili N., Mckirdy S.J. (2004). First report of grapevine leafroll associated virus 9 (GLRaV-9) in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33: 445–446.
- [11] Rowhani A., Uyemoto J.K. (1997): A comparison between serological and biological assay in detecting grapevine leafroll associated viruses. *Plant Disease* 81, 799-801.
- [12] Sforza R., Boudon-Padieu 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.
- [13] Turturo C., Rott M. E., Minafra A., Saldarelli P., Jelkmann W., Martelli G. P. (2000). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of *Grapevine leafroll associated virus 7*. Extended abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 17-18.
- [14] Voncina D. (2011). Utvrđivanje virusa na autohtonim sortama vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Dalmaciji seroloskim, molekularnim i bioloskim metodama. Sveuciliste u Zagrebu, Agronomski fakultet (doktorska disertacija).