

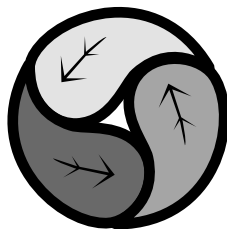
УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

UDC 63(058)

ISSN 1409-987X



ГОДИШЕН ЗБОРНИК
2008
YEARBOOK



ГОДИНА 8

VOLUME VIII

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 Борис Крстев
Проф. д-р Илија Каров
Проф. д-р Блажо Боев
Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева
М-р Ристо Костуранов

Editorial board

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

Редакциски одбор

Проф. д-р Саша Митрев
Проф. д-р Борис Крстев
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
Доц. д-р Душан Спасов

Editorial staff

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

Одговорен уредник

Проф. д-р Саша Митрев

Editor in chief

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D

Главен уредник

Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева

Managing editor

Prof. Liljana Koleva-Gudeva, Ph.D

Јазично уредување

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

Language editor

Danica Gavrilovska-Atanasova
(Macedonian)
Marija Kukubajska, M.Sc
(English)

Техничко уредување

Благој Михов

Technical editor

Blagoj Mihov

Редакција и администрација

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

Address of editorial office

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



СОДРЖИНА CONTENT

Саша Митрев, Мирко Спасеноски, Емилија Костадиновска Молекуларна детекција и карактеризација на фитоплазмите присутни кај виновата лоза во Македонија	
Sasa Mitrev, Mirko Spasenoski, Emilija Kostadinovska Molecular detection and characterization of grapevine phytoplasmas in Macedonia	
..... 7	
Илија Каров, Саша Митрев, Билјана Ковачевиќ, Емилија Костадиновска <i>Mycosphaerella graminicola</i> (FUCKEL.) Schroter (Anamorf: <i>Septoria tritici</i> ROB ex DESM.) - причинител на сива дамкавост на листовите (септориоза) кај пченицата	
Ilija Karov, Sasa Mitrev, Biljana Kovacevic, Emilija Kostadinovska <i>Mycosphaerella graminicola</i> (FUCKEL.) Schroter (Anamorf: <i>Septoria tritici</i> ROB ex DESM.) - Causer of leaf blotch diseases (septoriosa) on wheat	
..... 19	
Верица Илиева, Даница Андреевска, Добре Андонов, Наталија Маркова Развојни и производно-технолошки карактеристики кај интродуирани генотипови ориз (<i>Oryza sativa</i> L.) во агроколошки услови на кочанскиот регион	
Verica Pieva, Danica Andreevska, Dobre Andonov, Natalija Markova Growth and productional - technological characteristics of introductional genotypes of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) in agroecological conditions in the region of Kocani	
..... 27	
Илија Каров, Саша Митрев, Билјана Ковачевиќ, Емилија Костадиновска Инвентаризација на паразитната микрофлора на пченицата и јачменот во Република Македонија	
Ilija Karov, Sasa Mitrev, Biljana Kovacevic, Emilija Kostadinovska Survey of barley and wheat parasitic microflora in the Republic of Macedonia	
..... 37	
Васка Сандева Историски развој и современа состојба на зелените површини во Град Скопје, Р. Македонија	
Vaska Sandeva Historical development and modern condition of the green areas in the city of Skopje, Republic of Macedonia	
..... 47	



Лилјана Колева-Гудева, Фиданка Трајкова, Васко Златковски Биотехнологија и биодиверзитет: аспекти на подобрување на генотипот на земјоделските култури Liljana Koleva-Gudeva, Fidanka Trajkova, Vasko Zlatkovski Biotechnology and biodiversity: aspects of improvement of genotype of agricultures	57
Мите Илиевски, Гоце Василевски, Драгица Спасова, Раде Млинар Седиментациона вредност на зрно од мека пченица произведена во систем на органско одгледување Mite Ilievski, Goce Vasilevski, Dragica Spasova, Rade Mlinar The sedimentation value in grain of aestivum wheat producing on organic cropping management system	67
Plamen Atanasov Marinov-Serafimov, Cvetanka Dimitrova, Ljupco Mihajlov Determination of survival and restoration ability of a soyabean stand on a natural background of weed infestation Пламен Атанасов Маринов-Серафимов, Цветанка Димитрова, Љупчо Михајлов Определување на преживувањето и регенеративната способност на посеви од соја при природни услови на заплевување	75
Ivan Saldzhiev, Dragica Spasova Cotton irrigation regime under conditions of regulated water deficit Иван Салџиев, Драгица Спасова Норми на наводнување на памукот со регулиран полски воден капацитет	87
Љупчо Михајлов, Петар Клетникоски Економски ефекти од производство на органска луцерка во услови на наводнување во Овче Поле Ljupco Mihajlov, Petar Kletnikoski Economical effects from production of organic alfalfa under irrigation in Ovce Pole	95
Мите Илиевски, Драгица Спасова, Милан Ѓорѓиевски Статусна состојба во производството на некои култури од фамилијата <i>Cucurbitaceae</i> во Република Македонија за периодот 2000-2006 година Mite Ilievski, Dragica Spasova, Milan Georgievski Production standing of same plants from <i>Cucurbitaceae</i> family in Republic of Macedonia from period 2000-2006	107
Критериуми за објавување во Зборникот	115
Criteria for publishing in the Yearbook	119



ПРЕДГОВОР

Универзитетот „Гоце Делчев“ во Штип, со донесување на Законот за основање на Државен универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, започна со работа на 27 март 2007 година како високообразовна институција со четири факултетски единици и со дисперзија на наставата во Штип, Струмица и Кочани. Денес, за само две години од своето постоење, оваа институција прерасна во еден од водечките високообразовни центри во Република Македонија, втор по големина, со 13 факултети и 1 висока школа и со дисперзија на наставата во 12 општини: Штип, Струмица, Кавадарци, Гевгелија, Кочани, Свети Николе, Винаца, Берово, Радовиш, Прилеп и Скопје. На прагот од третата академска година, во нашите современо опремени амфитеатри, предавални, лаборатории и кабинети, својата иднина ќе ја градат околу 10.000 студенти кои заедно со околу 500 вработени ќе ги доградуваат темелите на овој млад, но модерен и перспективен Универзитет.

Земјоделскиот факултет, како интегриран дел од Универзитетот „Гоце Делчев“ - Штип, ги следи модерните и современите трендови на високото образование. Според потребите на пазарот на трудот во државава, наставата се организира во 4 општини и тоа: Штип, Струмица, Кавадарци и Свети Николе. Тригодишните студии се на Општа насока, а четиригодишните студии се организирани по модули: модул Агроменаџмент (Штип); модул Интегрално земјоделско производство (Струмица); модул Енологија (Кавадарци) и модул Преработка на земјоделски производи (Свети Николе).

Покрај наставно-образовната дејност, голем дел од своите активности Земјоделскиот факултет ги посветува на науката и истражувањето. Како плод од стручно-апликативната и научноистражувачката дејност на Земјоделскиот факултет произлегува и оваа издание на Годишниот зборник, што во континуитет се објавува по осми пат.

Македонското земјоделско производство има долгогодишно искуство и богата традиција, така што нашите земјоделски производи се познати по квалитет во регионов и пошироко. Инволвирањето на науката во аграрот е еден од нашите водечки приоритети, со што го унапредуваме производството на здрава храна по квалитет и по квантитет, придонесуваме за развојот на индустријата за преработка на земјоделските производи, влијаеме во управувањето на македонските природни ресурси, а со тоа непосредно и во развојот на руралната и урбаната средина.

Ова издание на Годишниот зборник на Земјоделскиот факултет при Универзитетот „Гоце Делчев“ е уште една потврда за нашата секупуна активност и стремез за негување, подобрување и осовременување на македонското земјоделско производство.

Издавачки одбор
Штип, септември 2009 год.

Одговорен уредник
Ректор, проф. д-р Саша Митрев



INTRODUCTION

The “Goce Delcev” University – Stip, resumed operation following the enactment of the Law that founded it. The university opened on March 27th, 2007, and established itself as an institution of higher learning made up of four colleges and three affiliates located in Stip, Strumica and Kochani.

Today, a mere two years after its establishment, this university has developed into one of the leading centers of higher education in the Republic of Macedonia. It is now the second largest in the country, and consists of 14 colleges and affiliates in different municipalities, including Stip, Strumica, Kavadarci, Gevgelija, Kochani, Sveti Nikole, Vinica, Berovo, Radovish, Prilep and Skopje.

The university has entered its third academic year and already acquired state-of-the-art equipment for its amphitheatres, lecture rooms, laboratories and offices. In that short time 10.000 students and 500 employees came together to build their future and upgrade the foundation of this young, modern, but remarkably prosperous university.

As an integral part of the “Goce Delcev” University – Stip, the College of Agriculture pursued contemporary trends in higher education that complement the requirements of the national labor market. The college has organized its teaching and scientific work in four different municipalities: Stip, Strumica, Kavadarci and Sveti Nikole. The College of Agriculture, within its department of general studies that offers a three and a four year degree, is organized according to various modules: agricultural management in Stip, integrated agricultural production in Strumica, enology in Kavadarci and production and manufacturing of agricultural produce in Sveti Nikole.

The College of Agriculture dedicates a large portion of its activities to science and research, in addition to its educational/teaching function. This annual edition, the eight in a series, is the result of applied expertise and scientific research performed at the “Goce Delcev” University College of Agriculture.

Macedonian agricultural production has long experience and a rich tradition that has led to its excellent reputation in the broader region. Introducing science into the agrarian sector has been a priority in advancing the qualitative and quantitative production of healthy foods. This process contributes to the development of food manufacturing, and to the university’s scientific impact on the proper management of Macedonia’s natural resources. This has had a positive effect on the development of rural and urban environment.

This issue further confirms that our overall activity facilitates the goal of fostering, improving and modernizing Macedonian agricultural production.

Editorial Board
Stip, September, 2009

Editor in chief
Rector, Prof. Dr. Sasa Mitrev



UDC:634.8-235:577.21(497.7)“2006/08”

Оригинален научен труд
Original research paper

МОЛЕКУЛАРНА ДЕТЕКЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА НА ФИТОПЛАЗМИТЕ ПРИСУТНИ КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА ВО МАКЕДОНИЈА

Саша Митрев*, Мирко Спасеноски**, Емилија Костадиновска*

Краток извадок

Во периодот од 2006 до 2008 година, континуирано беше следена состојбата на виновата лоза за утврдување на присуството и процентуалната застапеност на фитоплазматските промени кај виновата лоза. За колекционирањето на материјалот за анализа беа опфатени седум региони со тринаесет локалитети. За докажување на присуството на фитоплазмите, со помош на полимеразно-верижна реакција извршивме молекуларна детекција на фитоплазмите. На детектираните фитоплазми направивме карактеризација со помош на методот на полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти. Направените анализи го докажаа присуството на фитоплазмата столбур (група 16SrXII-A), а преку методот на карактеризацијата го потврдивме присуството на фитоплазмата *Bois noir*, тип II.

Клучни зборови: *Bois noir*, 16SrXII-A, полимеразно-верижна реакција, полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти

*Универзитет „Гоце Делчев“, Земјоделски факултет, – Штип, Република Македонија

**Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Институт за биологија, Скопје

*Goce Delcev University, Faculty of Agriculture – Stip, Republic of Macedonia

**University “St Kiril and Methodius”, Faculty of natural Sciences and mathematics, Institute of Biology, Skopje



MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERISATION OF GRAPEVINE PHYTOPLASMAS IN MACEDONIA

Sasa Mitrev*, Mirko Spasenoski**, Emilija Kostadinovska*

Abstract

In the period from 2006 till 2008, continually were checking the field grapevine symptoms, with primary aim to confirm presence and representation of phytoplasmas diseases in per sent. For collection of material for analyzes, we check seven region with thirteen location.

Samples were assayed for phytoplasma infection by polymerase chain reaction (PCR) assays. Detected phytoplasma were characterized by restriction fragment length polymorphism (RFLP). All analyzes confirm the presence of stolbur phytoplasma (group 16SrXII-A), *Bois noir*, type II.

Key words: *Bois noir*, 16SrXII-A, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism.

1. Вовед

Фитоплазмите се група на фитопатогени бактерии кои ѝ припаѓаат на класата *Mollicutes* и се домаќини на повеќе од 700 растителни видови, кај кои најчесто предизвикуваат симптоми во промена на бојата и формата на листовите (поцрвенување или пожолтување на целиот лист или лисната нерватура, свивање на лисните краеве надолу, во облик на триаголник, и некротирање). Од растение на растение се пренесуваат со помош на инсекти- вектори. Фитоплазмите се размножуваат во цитоплазмата и кај растенијата и кај инсектите-вектори. Кај растенијата, фитоплазмите го користат само хранливо богатото флоемско ткиво.

Фитоплазмите се прокариоти без клеточен ѕид и според нивната клеточна (0,1-0,8 μm во дијаметар) и геномска големина (0,5-1,3 Mbp) тие се помали од бактериите. Според нивните карактеристики, нивниот метаболички пат и односот со домаќинот, тие се доста интересни за земјоделската пракса и претставуваат цел на истражување на голем број научници.

Во Република Македонија одгледувањето на виновата лоза зазема сè поголеми размери, а со тоа е зголемен увозот на саден материјал и појавата и пренесувањето на болестите.

Од јули 2006 година континуирано е следена состојбата кај виновата лоза, со цел да се одреди присуството и процентуалната застапеност на фитоплазмите кај винските сорти на винова лоза во поголемите лозарски региони.



Според најновата класификација на фитоплазмите, врз основа на 16S rDNA генот, тие се класифицирани во 15 групи кои носат тривијално име и шифра од 16SrI до 16SrXV, и повеќе од 40 подгрупи (Lee et al., 2000, Montano et al., 2001).

Во Европа најголем акцент им се дава на следниве две групи на фитоплазми: *Flavescence dorée* (FD), до денес откриена во Франција, Италија, Шпанија и Португалија, со која се поврзани фитоплазмите од групата 16SrV и *Bois noir* (BN) со кој се поврзани фитоплазмите од групата 16SrXII (подгрупа столбур), а оваа група е откриена речиси во сите европски земји (Франција, Германија, Италија, Швајцарија, Шпанија, Хрватска, Словенија) и некои азиски земји (Израел и Либан), (Osler et al., 1996, Varga et al., 2000, Boudon-Padieu, 2003).

Значајна група на фитоплазми за нашите испитувани локалитети е фитоплазмата *Bois noir*, предизвикана од групата столбур. Освен кај виновата лоза, оваа група на фитоплазми многу често се среќава и кај плевелната вегетација која е примарен домаќин на BN фитоплазмата, и кај други култивирани растенија (Marcone et al., 1997, Schneider et al., 1997).

Како примарни домаќини на оваа фитоплазма се плевелните растенија: *Convolvulus arvensis* и *Urtica dioica*, кои претставуваат природен резервоар на фитоплазмата столбур. До денес, единствен познат вектор на овие фитоплазми кај виновата лоза е цикадата *Hyalestes obsoletus Signoret* (Boudon-Padieu, 2003).

Целта на нашето истражување се базираше на теренско дијагностицирање на фитоплазматските промени кај виновата лоза, како и нивна лабораториска молекуларна детекција и карактеризација.

За одредување на процентот на инфекција користевме дата база на податоци, со цел да се овозможи навремена контрола и заштита на виновата лоза од фитоплазматските промени.

2. Материјал и методи

За определување на присуството на фитоплазматските заболувања во поголемите лозарски региони на територијата на Република Македонија беше извршено колекционирање на материјал за анализа од заболените сорти лоза, во периодот од јули 2006 до октомври 2007 година.

За лабораториската анализа беа колекционирани примероци од различни сорти на винова лоза (fam. *Vitaceae*, *Vitis vinifera* L.), претежно од винските сорти (бидејќи забележавме дека кај трпезните сорти има незначителен процент или воопшто нема инфекција од фитоплазмите). Анализата беше направена на седум поголеми лозарски региони, со тринаесет прегледани виногорја, со цел да се потврди присуството/отсуството на фитоплазмите.



Собраните примероци покажуваа симптоми карактеристични за жолтилата кај виновата лоза, како што се: пожолтување на листовите со свиткување на лисните краеви навнатре и добивање на карактеристичен триаголен изглед, неправилно задрвенување на ластарите, сушење на плодовите и изумирање на целата лозинка (слика 1 и 2).

Во лозовите насади, каде визуелно не можеа да се согледаат карактеристични симптоми, се колекционирани асимптоматични примероци, кои беа посебно маркирани на терен и забележувани за евиденција во лабораториски услови.

За молекуларна детекција на фитоплазмите од колекционираниот материјал, прво беше извршена екстракција на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК). Од колекционираниите симптоматични примероци е користено 1g ткиво (од главната нерватура), што се чува смрзнато до употреба (-20°C). Екстракцијата на ДНК од ткивото беше извршена по СТАВ протокол на работа (Angelini et al., 2001).

Задиректниот PCR беше употребена универзалната група на прајмери P1/P7 и добиените продукти беа со големина од 1,8 kbp. Во вгнездениот PCR се користат следниве групи на прајмери: M1B6, IF1R1 или VF1R1, кои се употребуваат за универзална детекција на фитоплазмите - за потврдување на позитивна или негативна ДНК. Позитивните примероци кои се добиени со користење на универзалната група на прајмери за сите типови на фитоплазми даваат електрофоретски линии на агарозниот гел со должина од 1,2 kbp.

Групите на прајмери специфични за *tuf* генот, Ftuf1-Rtuf1 (директен PCR) и Ftuf-Rtuf AY (вгнезден, nested PCR), се користеа откако го потврдиме присуството на позитивна фитоплазматска ДНК.

Секоја PCR реакција се изведува во реакциски тотален волумен од 20 µl, со содржина од 100 ng од матичната DNA.

За контрола на резултатите при исчитувањето во 1% агарозен гел електрофореза, во PCR-от користевме негативна (дејонизирана вода) и веќе потврдена референтна позитивна контрола (AY1).

По завршениот nested PCR, позитивните примероци се дигестираат со рестрикциски ендонуклеази *TagI*, *Tru9I* и *HpaII* (MBI Fermentas), за дигестија на амплифицираните фрагменти на 16Sr DNA регионот и *tuf* генот, по посебен протокол за секој ензим. Дигестијата се одвиваше 16 часа на 37°C. Бандовите се раздвојуваат со 13% полиакриламидна гел електрофореза, со отстојување на гелот во етидиум бромид и фотодокументирање на резултатите на УВ-трансилуминатор.



3. Резултати и дискусија

Во сите тринаесет испитувани локалитети фитоплазмите беа идентификувани кај симптоматични растенија од некои сорти. Со употреба на прајмерскиот сет R16 P1/P7 во директниот PCR и на R16 M1/B6 во вгнездениот (nested PCR) ги добивме очекуваните амплифицирани продукти со големина од 1050 bp (слика 3).

Кај сите позитивни примероци, исто така, го анализиравме и *tuf* генот (специфичниот ген за BN), со употреба на прајмерите за овој ген, *rtuf1-rtuf1* (директен PCR) и *rtufAY-rtufAY* (nested PCR), со цел да се потврди присуството на фитоплазмата *Bois noir*. Со оваа анализа ги добивме очекуваните амплифицирани продукти со големина од 950 bp.

Добиените резултати од анализа на примероците од винова лоза со употреба на универзална и специфична група на прајмери се прикажани во табела 1.

Единствено групата 16SrXII-A - фитоплазмата *Bois noir* беше идентификувана по анализата со полиморфизмот по должината на рестрикциските фрагменти (слика 4). Комбинациите на прајмери/ензими кои беа користени при анализата RFLP се: *tufAY/TaqI*, *tufAY/HpaII*, *M1B6/Tru9I*. Со оваа анализа го потврдивме присуството на столбур (група 16SrXII-A) - некарантинската фитоплазма, во сите испитувани локалитети.

4. Заклучок

Фитоплазмите спаѓаат во групата на фитопатогени бактерии кои ѝ припаѓаат на класата *Mollicutes* и се домаќини на повеќе од 700 растителни видови. Тоа се прокариотски организми без клеточен ѕид, и според нивната клеточна (0,1-0,8 μm во дијаметар) и геномска големина (0,5-1,3 Мbp) тие се помали од бактериите. Според нивните карактеристики, нивниот метаболички пат и односот со домаќинот, тие се доста интересни за земјоделската пракса и цел на истражување на голем број научници.

Во последните десетина година интензитетот на одгледување на виновата лоза е значително зголемен, а со тоа се зголемени и можностите за увоз и пренесување на болестите.

Проучувањето на фитоплазматските промени кај виновата лоза во Република Македонија е доста слабо и започнува релативно доцна во однос на проучувањата во светот.

Од јули 2006 година континуирано е следена состојбата кај виновата лоза, со цел да се одреди присуството и процентуалната застапеност на фитоплазмите кај винските сорти на винова лоза во поголемите лозарски региони.



Значајна група на фитоплазми за нашите испитувани локалитети е фитоплазмата *Bois noir*, предизвикана од групата столбур. Освен кај виновата лоза, оваа група на фитоплазми многу често се среќава и кај плевелната вегетација, која е примарен домаќин на BN фитоплазмата, и кај други култивирани растенија (Marcone et al., 1997, Schneider et al., 1997).

Со употреба на современите молекуларни техники (PCR/RFLP), во нашето истражување, извршивме молекуларна детекција и карактеризација на присутните фитоплазми во поголемите лозарски региони во Македонија.

Во испитуваните локалитети (вкупно тринаесет), фитоплазмите беа идентификувани кај симптоматични растенија од некои сорти. Со употреба на прајмерскиот сет R16 P1/P7 во директниот PCR и на R16 M1/B6 во вгнездениот (nested PCR) ги добивме очекуваните амплифицирани продукти со големина од 1050 bp.

По анализата со полиморфизмот по должината на рестрикциските фрагменти, единствено групата 16SrXII-A - фитоплазмата *Bois noir* беше идентификувана.

Во нашите досегашни континуирани следења на лозовите насади во Македонија, единствена присутна фитоплазма е *Bois noir*, некарантинска, но сепак е причинител на значителни штети и привлекува големо внимание.

5. Литература

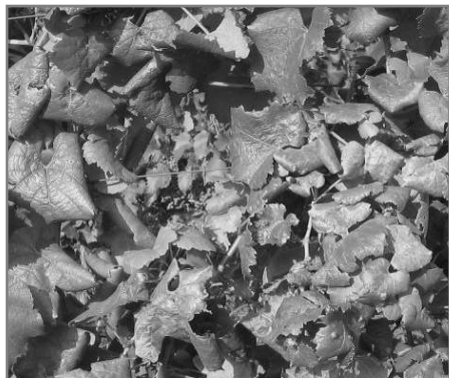
- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E., (2001): *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder phytoplasma. *Vitis*, 40: 79-86.
- Boudon-Padieu, E. (2003): 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).
- Lee I.M, Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.
- Marcone C, Ragozzino A, Seemuller E. (1997): Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in Southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 79: 211-7.
- Montano HG, Davis RE, Dally EL, Hogenhout S, Pimentel JP, Brioso PST (2001): "Candidatus Phytoplasma brasiliense", a new phytoplasma



- taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *Int J Syst Evol. Microbiol* 51: 1109-1118
- 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
- Schneider B, Gibb KS, Seemuller E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381-9
- Varga, K., Kölber, M., Martini, M., Pondrelli, M., Ember, I., Tökés, G., Lázár, J., Mikulás, J., Papp, E., Szendrey, G., Schweigert, A. and Bertaccini, A., (2000): Phytoplasma identification in Hungarian grapevines by two nested-PCR systems. Extended abstracts of 13th meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 113-115



ПРИЛОГ



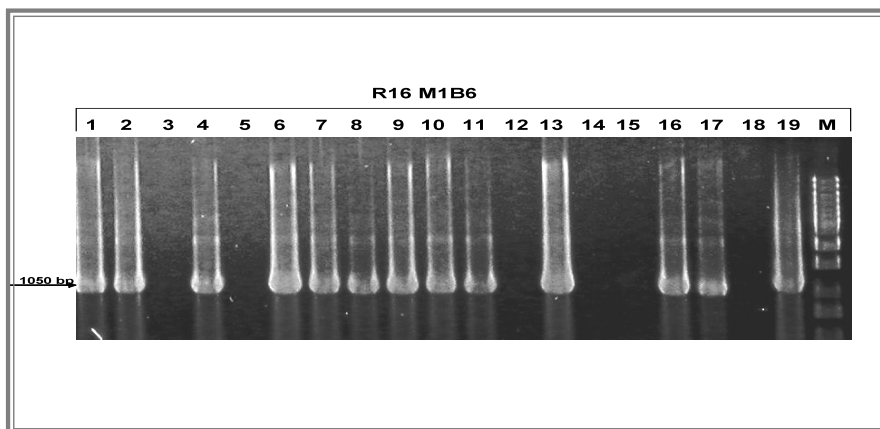
Слика 1. Карактеристични симптоми на фитоплазматски промени кај сортата *шардоне* во локалитетот Сопот, Велес и во Ило Виларов, Неготино

Figure 1. Typical symptoms of phytoplasmas on *chardonnay* in locality Sopot, Veles and Ilo Vilarov, Negotino



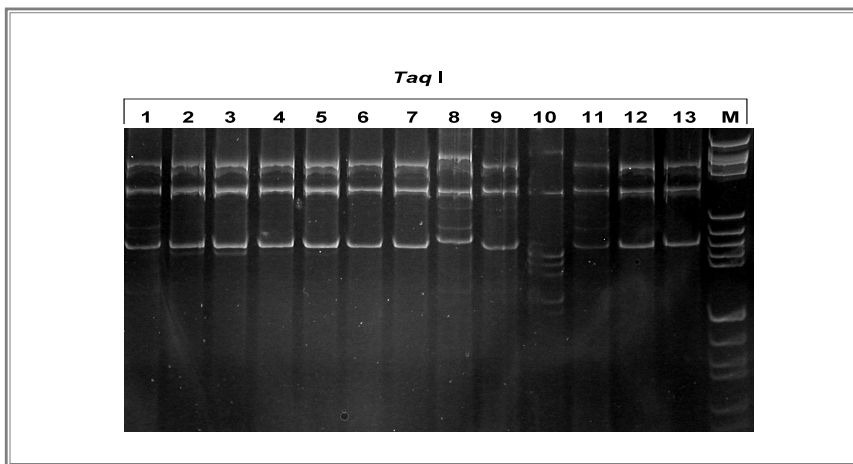
Слика 2. Карактеристични симптоми на фитоплазматски промени кај сортата *бургундец црн* во локалитетот Три Чешми, Штип

Figure 2. Typical symptoms of phytoplasmas on *pinot noir* in locality Tri Cesmi, Stip



Слика 3. Резултат од електрофорезата во 1% агарозен гел на PCR амплифицираните продукти на фитоплазматскиот ген со користење на прајмерскиот пар R16 P1P7- M1B6 1-примерок-*смедеревка*, Неготино; 2-примерок-*врапец*, Неготино; 3-примерок-*италијански ризлинг*, Неготино; 4-примерок-*белан*, Неготино; 5-примерок-*ркцатели*, Неготино; 6-примерок-*шардоне*, Кавадарци; 7-примерок-*белан*, Струмица; 8-примерок-*смедеревка*, Радовиш; 9-примерок-*врапец*, Радовиш; 10-примерок-*бургундец црн*, Штип; 11-примерок, *смедеревка*, Штип; 12-примерок, *бургундец црн*, Штип; 13-примерок, *бургундец црн*, Штип; 14-примерок, *афус али*, Штип; 15-примерок, *рајнски ризлинг*, Штип; 16 - примерок, *врапец*, Штип; 17 - примерок, *шардоне*, Велес; 18 - негативна контрола, дејонизирана вода; 19 - AY1, стандарден сој на фитоплазма (од лабораторијата CRA во Италија). M - стандарден сој за одредување на молекулската маса (1kb DNA ladder) со следнава големина (одгоре-надолу): 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 базни парови.

Figure 3. PCR amplify phytoplasmas products in 1% agarose gel electrophoresis by using R16 P1P7 - M1B6 primer pair 1-smederevka, Negotino; 2-vranec Negotino; 3-italian riesling Negotino; 4-grenache blanc, Negotino; 5-rkcateli, Negotino; 6-chardonnay, Kavadarci; 7- grenache blanc, Strumica; 8-smederevka, Radovis; 9-vranec, Radovis; 10-pinot noir, Stip; 11-smederevka, Stip; 12-pinot noir, Stip; 10-pinot noir, Stip; 11-smederevka, Stip; 12-pinot noir, Stip; 13-pinot noir, Stip; 14-afus ali, Stip; 15-rajnски rizling, Stip; 16-vranec, Stip; 17- chardonnay, Veles; 18-negative control, water; 19- AY1, phytoplasma standard (from CRA lab in Italy). M-marker (1kb DNA ladder) with length: 10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300 bp.



Слика 4. Рестрикциски профили (на ампликоните добиени со nested PCR-от, со прајмерскиот пар M1B6), добиени со помош на *TaqI* рестрикцискиот ензим, визуализирани во 13% полиакриламиден гел
1-12 позитивни примероци од винова лоза
13 - AY1, референтен изолат (E. Boudon Padieu, Dijon, France)
M - pBR322 маркерот е со 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.

Figure 4. Restriction profile (amplicons from nested PCR using primer set M1B6), using *TaqI* restriction enzyme and 13% polyacrilamide gel 1-12 positive grapevine samples 13 - AY1, referent isolate (E. Boudon Padieu, Dijon, France)M - pBR322 marker with 15 fragments with length (bp) 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80.



Табела 1. Резултати добиени со користење на различни групи на прајмери за докажување на присуството на фитоплазмите
Figure 1. Results using different group of primers for checking presence of Phytoplasmas

Регион	Локалитет	Сорта	Присуство на фитоплазматскиот ген докажан со следниве групи на прајмери		
			M1/B6	IF1/R1	Ftuf/Rtuf AY
Неготино	Ило Виларов	<i>итал.ризлинг</i>	-	-	-
		<i>смедеревка</i>	+	+	+
		<i>вранец</i>	+	+	+
		<i>белан</i>	+	+	+
		<i>траминец бел</i>	-	-	-
	Дуброво	<i>мускат отонел</i>	-	-	-
		<i>'ркцатели</i>	-	-	-
		<i>траминец бел</i>	-	-	-
Кавадарци	П.Е. Љубаш	<i>кратошија</i>	-	-	-
		<i>мускат италиа</i>	-	-	-
		<i>афус али</i>	-	-	-
		<i>смедеревка</i>	+	+	+
Струмица	Хамзали	<i>шардоне</i>	+	+	+
		<i>вранец</i>	+	+	+
Радовиш	Добридол	<i>викторија</i>	-	-	-
		<i>смедеревка</i>	-	-	-
Штип	Каваклија	<i>вранец</i>	+	+	+
		<i>афус али</i>	-	-	-
	Ежово	<i>смедеревка</i>	+	+	+
		<i>афус али</i>	-	-	-
	Три Чешми	<i>вранец</i>	+	+	+
		<i>смедеревка</i>	+	+	+
	Врсаково	<i>бургундец црн</i>	+	+	+
Куманово	Табановце	<i>вранец</i>	+	+	+
		<i>бургундец црн</i>	-	-	-
	Петрличани	<i>шардоне</i>	-	-	-
Велес	Сопот	<i>шардоне</i>	+	+	+
		<i>каберне</i>	-	-	-
		<i>совињон</i>	-	-	-