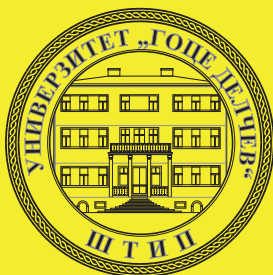


УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ” - ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

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 SO ₂ И РЕДУЦИРАЧКИ ШЕЌЕРИ ВО МАКЕДОНСКИ ВИНА Violeta Ivanova-Petropulos, Sasa Mitrev DETERMINATION OF SO ₂ 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 (<i>Solanum tuberosum</i> L.) Liljana Koleva Gudeva, Fidanka Trajkova and Irena Stojkova MICROTUBERIZATION OF POTATO (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	37
Фиданка Трајкова, Лилјана Колева-Гудева АНАЛИЗА НА ПЛОДОВИ ОД АНДРОГЕНЕТСКИТЕ ЛИНИИ ПИПЕРКА P3 И P4 (<i>Capsicum annuum</i> L. сорта пиран) ВО РАЗЛИЧНИ ФАЗИ НА ЗРЕЛОСТ Fidanka Trajkova, Liljana Koleva Gudeva FRUIT ANALYSIS OF PEPPER ANDROGENIC LINES P3 AND P4 (<i>Capsicum annuum</i> 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 РУЈДИЌ, ДУШАН СПАСОВ, РИСТО КУКУТАНОВ, МИЛАН ЃЕОРГИЕВСКИ 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



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.

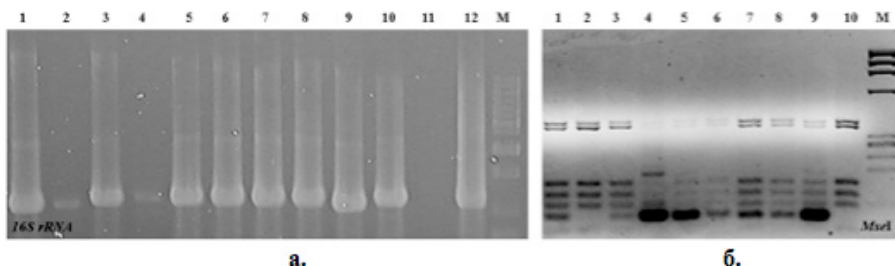
Табела 8. Резултати од лабораториските испитувања на четири различни генски локуси

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

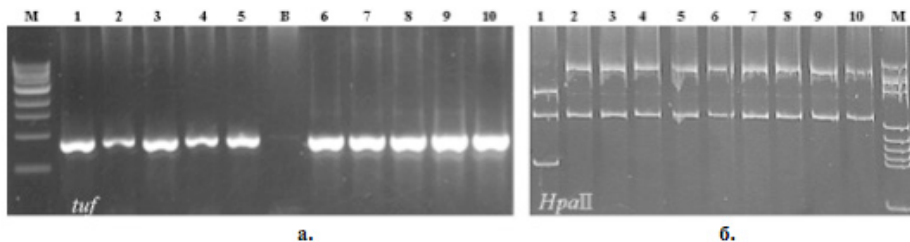


Слика 3а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, со примена на 16SP1P7 - F2nR2 прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од табела 3. 11 – здрав примерок од сортата *станушина*, 12. AY – asrer yellow phytoplasma референтен 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 продуктите 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.

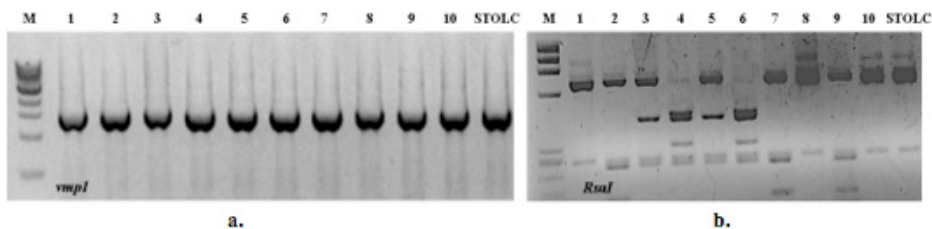


Слика 4а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *tuf* ген, со примена на ftufAY-rtufAY прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од табела 3. М – маркер 1Кб DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

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. М – 1Кб DNA ladder.

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

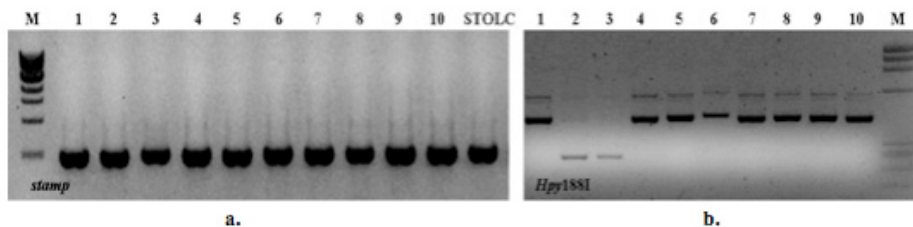


Слика 5а. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *vmp1* ген, со примена на Н10F2 – Н10R2 прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од табела 3. М – маркер 1Кб DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

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. М – 1Кб 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.