

КОНГРЕС НА ЕКОЛОЗИТЕ НА МАКЕДОНИЈА

со меѓународно учество и одбележување на 80 години
од животот и 60 години активна научна работа на
проф. д-р Љупчо Групче

CONGRESS OF ECOLOGISTS OF MACEDONIA

with international participation and marking the
80 anniversary of Prof. Dr Ljupčo Grupče's life
and 60 years scientific work

06 ОКТОМВРИ
09 OCTOBER
2007

Струга, Р. Македонија
Struga, Macedonia



Македонско еколошко друштво
Macedonian Ecological Society

Скопје 2008 Skopje

ЗБОРНИК НА ТРУЛОВИ PROCEEDINGS

**МАКЕДОНСКО ЕКОЛОШКО ДРУШТВО
MACEDONIAN ECOLOGICAL SOCIETY**

**III КОНГРЕС НА ЕКОЛОЗИТЕ НА МАКЕДОНИЈА
СО МЕЃУНАРОДНО УЧЕСТВО**

Организациони одбор:

Претседател: д-р Љупчо Меловски

д-р Дана Прелиќ
д-р Никола Николов
д-р Владимир Цабирски
д-р Марјана Љубенова
д-р Димитар Лакушиќ
д-р Славчо Христовски
м-р Зоран Спирковски
дипл. инж. биол. Светлана Арсовска

Научен одбор:

Претседател: д-р Љупчо Групче

д-р Тодор Ановски
д-р Иван Блишков
д-р Видоје Трпески
д-р Сретен Андонов
д-р Владо Матевски
д-р Бранка Стевановиќ
д-р Драган Колчаковски
д-р Трајче Наумовски
д-р Светислав Крстиќ
д-р Трајче Стафилов
д-р Џоко Кунгуловски
д-р Весна Сидоровска

**III CONGRESS OF ECOLOGISTS OF THE REPUBLIC OF
MACEDONIA WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION**

Organization committee:

President: Ph.D. Ljupčo Melovski

Ph.D. Dana Prelić
Ph.D. Nikola Nikolov
Ph.D. Vladimir Dzabirski
Ph.D. Marjana Ljubenova
Ph.D. Dimitar Lakušić
Ph.D. Slavčo Hristovski
M.Sci. Zoran Spirkovski
Biol. eng. Svetlana Arsovska

Scientific committee:

President: Ph.D. Ljupčo Grupče

Ph.D. Todor Anovski
Ph.D. Ivan Blinkov
Ph.D. Vidoe Trpeski
Ph.D. Sreten Andonov
Ph.D. Vlado Matevski
Ph.D. Branka Stevanović
Ph.D. Dragan Kolčakovski
Ph.D. Trajče Naumovski
Ph.D. Svetislav Krstić
Ph.D. Trajče Stafilov
Ph.D. Dzoko Kungulovski
Ph.D. Vesna Sidorovska

ПРИСУСТВО НА ФИТОПЛАЗМИТЕ КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА ВО 2006 ГОДИНА

Саша МИТРЕВ¹, Филип ПЕЈЧИНОВСКИ² и Емилија НАКОВА¹

¹ Универзитет "Гоце Делчев" Штип, Земјоделски Факултет, "Крсте Мисирков" бб, Штип

² Факултет за земјоделски науки и храна, Бул. "Александар Македонски" бб, 1000 Скопје.

ИЗВОД

Митрев С., Пејчиновски Ф. и Накова Е. (2008): Присуство на фитоплазмите кај виновата лоза во Република Македонија во 2006 год. Зборник на трудови од III Конгрес на еколозите на Македонија со меѓународно учество, 06-09.10.2007, Струга. Посебни изданија на Македонското еколошко друштво, Кн. 8, Скопје.

Присуство на симптоматичен материјал за анализа на парцели под винова лоза, лабораториски PCR и RFLP анализи на 16Sr DNA регионот, се користени за детекција и идентификација на присутните фитоплазми во вегетационата сезона 2006 на територијата на Република Македонија. Материјалот за анализа од различни сорти беше колекциониран од поголемите лозарски реони (Неготино, Кавадарци, Струмица, Велес, Радовиш и Штип) со цел да се определи присуството и видот на фитоплазмите низ земјата. Единствено фитоплазмите кои припаѓаат на *Bois Noir* (подгрупа 16SrXII-A или столбур) групата беа пронајдени на испитуваните парцели од винова лоза.

Поради широката распространетост на фитоплазматските заболувања во светот и нивното карантинско дејство, нашиот акцент во ова истражување го ставивме на присуството и дистрибуцијата на фитоплазмите во виногорјата во Македонија, илнво утврдување со молекуларни анализи, како и проценување на штетите кои ги предизвикуваат врз лозовите насади.

Клучни зборови: PCR, RFLP, 16S rDNA, винова лоза, *Bois Noir*.

ABSTRACT

Mitrev S., Pejčinovski F. & Nakova E. (2008): Presence of grapevine phytoplasmas in summer 2006 in the Republic of Macedonia. Proceedings of the III Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation, 06-09.10.2007, Struga. Special issues of Macedonian Ecological Society, Vol. 8, Skopje.

Presence of symptomatic material for analyzes from vineyards, PCR and RFLP analyzes on 16Sr DNA region, were used to detect and identify phytoplasmas infecting grapevines in the period of summer 2006 in Republic of Macedonia. The most important and bigger vineyards in the areas of Negotino, Kavadarci, Strumica, Veles, Radovis, and Shtip, were chosen for these survey. Only phytoplasmas belong to the *Bois Noir* (subgroup 16SrXII-A or stolbur) were found in the studied vineyards in Macedonia.

The aim of this study was to characterize presence of phytoplasmas isolates associated with grapevine yellows in Macedonian viticulture by molecular analyzes and to check there distribution in the most bigger vineyards, because this diseases are spreader all around the world and causes a lot of damages.

Key words: PCR, RFLP, 16S rDNA, grapevine, *Bois Noir*

Вовед

Виновата лоза е една од најраспространетите земјоделски култури како во светот, така и кај нас, зафаќајќи површина од околу 26.000 хектари, Национална Статистика на Македонија (2001). Особено своето значење кај нас, виновата лоза го потенцира во последните неколку де-

цени. Кај виновата лоза како проблем во одгледувањето се јавуваат голем број болести и штетници, кои секоја година нанесуваат сериозни загуби во приносот.

Фитоплазмите се прокариотски организми без клеточен ѕид, кои живеат во флоемските садови на растенијата и се причинители на повеќе од 600 болести кај стотици растителни ви-

дови (McCoy et al. 1989).

Симптомите кои се појавуваат кај инфицираните растенија се манифестираат како: пожолтување или поцрвенување на листовите, скратување на растот на интернодиумите, малечки листови, стерилни цветови, некроза на флоемското ткиво, генерано престанување на растот и изумирање на растението (Agrios 1997; McCoy et al. 1989).

Знаејќи ја симптоматологијата на заболениите растенија како и степенот на загуби во приносот во светот, а притоа земајќи ја во предвид минималноста во контролата и испитувањата во Македонија, беа главен предуслов за да се размислува кон сериозно следење на промените кај виновата лоза како и лабораториски тестирања со цел да се докажат причинителите на тие промени.

Развојот на молекуларните алатки како DNA екстракција, PCR метода проследена со RFLP анализа, даваат брзи, едноставни и сигурни резултати во дијагностицирањето на овие патогени.

Во 2003 год., се извршени првите подетални молекуларни анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите на територијата на Република Македонија (Seruga et al. 2003). Тогаш беа земени само две територии како цели на испитување, но во текот на ова истражување се зе-

мени повеќе поголеми региони под винова лоза со цел да се одреди присуството на фитоплазмите кај виновата лоза во Македонија.

Единствено фитоплазмите кои припаѓаат на *Bois Noir* (подгрупа 16SrXII-A или столбур) беа пронајдени на испитуваните парцели од винова лоза.

Bois Noir фитоплазма спаѓа во столбур групата и е широко распространета во Европа и Медитеранските земји, и освен виновата лоза како домаќин, оваа фитоплазма може да се сретне и кај голем број на диви и култивирани растенија (Marccone et al. 1997, 1999; Schneider et al. 1997a).

Вектор на пренесување на оваа фитоплазма е шкалата *Hyalestes obsoletus* (Signoret 1867; Maixner et al. 1995).

Материјал и методи

Колекционирање на материјал за анализа

Во тек на летото 2006, колекционирањето на материјалот беше извршено од симптоматични растенија од девет локалитети, од шест региони под винова лоза во Македонија: Неготино (Ило Виларов), Каваларци (Љубаш), Струмица (Хамзали), Радовиш (Добридол), Штип (Каваклија, Ежово, Три Чешми, Врсаково) и Велес (Сопот) (Таб. 1).



Сл. 1. Симптоми на пожолтување и поцрвенување на листовите кај сортата шардоне и вранец
Fig. 1. Yellowing and redening symptomatic leaves from shardonay and vranec

Присуство на фитоплазмите кај виновата лоза во Република Македонија во 2006 год.

Беше извршен детален преглед на лозовите насади во горенаведените региони, и се утврди застапеност на фитоплазматските заболувања во сите испитани подрачја. Симптомите беа најраспространети кај сортата шардоне и вранец (Сл. 1).

DNA екстракција и PCR амплификација

Екстракцијата на DNA беше извршена од 1 gr свежи или замрзнати главни нерви по стандарден СТАВ протокол на работа (Angelini et al. (2001).

За амплификација на 16Sr DNA регионот, направен е директен PCR, проследен со вгнезден (nested) PCR, со употреба на универзална и специфична група на прајмери.

Универзална група на прајмери која беше користена е: R16 P1/P7 (директен PCR), Deng & Hiruki (1991), и R16 M1/B6 (nested PCR), Martini et al. (1999) и специфична група на прајмери I F1R1(16Sr1)fr, Lee et al. 1994, (nested PCR), како и специфични прајмери за *tuf* генот, *tuf1*-*rtuf1* (директен PCR), Schneider et al. (1997), *tufAY*-*rtufAY*, Langer and Maixner (2004) (nested PCR), специфични за идентификација на BN фитоплазма. После добиените резултати од nested PCR-от, ре-амплифицираниот дел од 16Sr DNA регионот, се подложува на уште еден nested PCR со специфична група на прајмери I F1R1. Секоја реакција се изведува во тотален волумен од 20 µl. За

Таб. 1. Резултати од Nested PCR за детекција на фитоплазмите од 16SrXII-A подгрупата кај примероци од различни виногорја во Република Македонија

Tab. 1. Results of nested PCR assays in grapevine samples from different viticulture regions in the Republic of Macedonia.

Регион	Локалитет	Сорта	Симптоми	Детекција со прајмерите M1/B6 IF1R1 <i>tuf/rtufAY</i>		
Неготино	Ило Виларов	Италијански ризлинг	+?	-	-	-
		Смедеревка (1)*	+	+	+	++
		Вранец (2)*	+++	++	+	++
		Белан (3)*	+	+++	+	+
		Ркцатели	-	-	-	-
Жилавка (4)*	+	+++	+++	+		
Кавадарци	П.Е. Љубаш	Мускат италиа	-	-	-	-
		Афус али	+?	-	-	-
		Смедеревка	-?	-	-	-
		Шардоне (5)*	+	++	+	+
Струмица	Хамзали	Белан (6)*	+	+	+	+?
		Вранец	+?	-	-	-
		Ркцатели	+?	-	-	-
		Смедеревка	+	-	-	-
Радовиш	Добридол	Пловдина	-	-	-	-
		Смедеревка(7)*	+	+++	+++	+
		Рајнски ризлинг	-	-	-	-
		Вранец (8)*	++	+++	+++	+
Штип	Каваклија	Рајнски ризлинг	?	-	-	-
		Бургундец	++	-	-	-
		Афус али	-	-	-	-
	Ежово	Афус али	-	-	-	-
		Вранец (9)*	++	+++	+++	+
Три Чешми	Смедеревка (10)*	+	+++	+++	+	
	Рајнски ризлинг Бургундец (11)*	- ++	- ++	- +	- +	
Врсаково	Вранец (12)*		++	++	+	+
			++	++	+	+
Велес	Сопот	Шардоне (13)*	+++	++	+	+
		Афус али	-?	-	-	-

+?/? сомнителни симптоми/резултати
+ позитивни резултати
- негативни резултати
* Бројот го означува бансот на Сл. 2

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

Како позитивна контрола при PCR анализите се користеше AY1, потврдена фитоплазма од групата 16SrXII-A, од лабораторијата на Elisabeth Boudon-Padieu, Dijon, France.

RFLP анализа

После 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% полиакриламиден гел електрофореза, со отстојување на гелот во етидиум-бромид и фотодокументирање на резултатите на UV-трансилуминатор.

Резултати

Резултатите од опишаните симптоми на примероците собрани од терен беа потврдени со резултатите од лабораториските анализи (Таб. 1).

PCR амплификација

Првиот PCR (директен) со универзална група на пражмери, R16 P1/P7, не даде некој јасен резултат и затоа во сите испитувања беше направен и вгнезден (nested) PCR со R16 M1/B6 пар на пражмери и потоа со специфична група на пражмери I F1R1 за I група на фитоплазми.

Од вкупно 29 анализирани примероци, 13 позитивни примероци беа потврдени во nested

PCR-от со пражмерскиот сет R16 M1/B6, каде амплифицираните фрагменти беа со големина од 1050bp.

Со цел да се потврди BN фитоплазмата кај сите позитивни примероци исто така го анализиравме и *tuf* генот, со употреба на посебна група на пражмери за овој ген, *fluf1-rtuf1* (директен PCR) и *flufAY-rtufAY* (nested PCR), (Сл. 2).

RFLP анализа

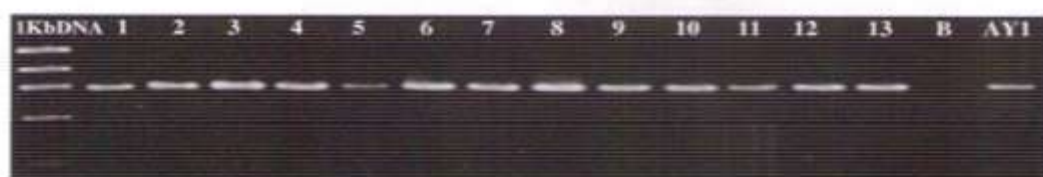
16SrDNA фрагментите амплифицирани во nested PCR-от од фитоплазмите кај виновата лоза беа детерминирани со RFLP анализа, дигестирани со рестрикциски ендонуклеази *TagI*, *Tru9I* и *HpaII*. Дигестија на фрагментите амплифицирани со R16 M1/B6 пражмер парот се вршеше со *TagI* рестрикциската ендонуклеаза.

Заклучок

Првите детални молекуларни испитувања направени во 2003 год., во Скопското и Велешкото виногорје, го докажаа присуството на *Bois Noir* фитоплазмата (Seruga et al. 2003).

Целта на нашето испитување во текот на вегетационата сезона 2006, беше да се следат што повеќе и поголеми виногорја на територијата на Република Македонија, сè со цел да се потврди присуството и видот на фитоплазмите. Добените резултати покажаа дека на нашата територија распространета е само *Bois Noir* фитоплазмата (подгрупа 16SrXII-A или столбур), која причинува значителни штети и загуби во приносот на виновата лоза.

Статистиките и заклучоците наведуваат дека BN има широк ареал на распространување, особено имајќи го во предвид фактот дека во сите земји околу Македонија (Бугарија, Србија, Албанија и Грција) BN е одамна евиденти-



Сл. 2. Агарозна гел електрофореза (1%) на nested PCR амплификациски примероци на фитоплазми 16SrDNA од винова лоза (Таб. 1) со *flufAY-rtufAY* парот на пражмери, специфичен за *tuf* генот. 1 kb DNA ladder Invitrogen со големина на фрагментите 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp, 13 се позитивните анализирани примероци, AY1 е позитивната контрола и B е негативна контрола.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis (1%) of nested PCR amplicons on 16SrDNA grapevine phytoplasmas amplified with *flufAY-rtufAY* primer pair specific for *tuf* gene. 1 kb DNA ladder Invitrogen with fragment sizes 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp, 13 positive samples, AY1 positive control and B is blank (negative control).

рана (Davis et al. 1997; Duduk et al. 2004; EPPO Reporting Service 2006).

Литература

- Agrios, G. N. (1997): Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. In Plant Pathology, 4th, pp. 457-470. Edited by G. N. Agrios. New York: Academic Press.
- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A. & Boudon-Padiou 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.
- Davis R. E., Dally E. L., Tanne E. & Rumbos I.C. (1997): Phytoplasma associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the stolbur phytoplasma subgroup 16SrXII-A. *Journal of Plant Pathology*, 79: 181-187.
- Deng S. J. & Hiruki C. (1991): Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-9.
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstić, B., Dukić, N. & Bertaccini, A. (2004): Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia. *J. Phytopathology* 152, 575-579.
- EPPO Reporting Service (2006): First report of stolbur phytoplasma causing *Bois noir* on grapevine in Bulgaria, 8: 2006/167.
- Langer M. & Maixner M. (2004): Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP - analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43: 191-199.
- Maixner, M., Ahrens, U. & Seemüller, E. (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 241-250.
- 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.
- Marcone C, Hergenahn F, Ragozzino A. & Seemuller E. (1999): Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, Rubus stunt, Picris echinoides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. *Journal of Phytopathology* *Phytopathologische Zeitschrift* 147: 187-92.
- Martini M, Murari E, Mori N. & Bertaccini A. (1999): Identification and epidemic distribution of two flavescence doree-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Diseases* 83, 925-930.
- McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chykowski, L.N., Cousin, M.T., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M. & Seemüller, E. (1989): Plant diseases associated with mycoplasma like organisms. In: Whitcomb, R. F. and J. G. Tully (eds), *The Mycoplasmas* 5, pp. 545-640. Academic Press, New York, USA.
- Schneider B, Cousin MT, Klinkong S. & Seemuller E. (1995): Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with diseases of faba bean, sunnhemp, sesame, soybean, and eggplant. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 102: 225-32
- Schneider B, Marcone C, Kampmann M, Ragozzino A. & Lederer W. (1997a): Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 675-86
- Schneider B, Gibb K.S. & Seemuller E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381-9
- Šeruga, M., Curković, P., Škorić, D., Kozina, B., Mirosevic, N., Šarić, A., Bertaccini, A., & Krajačić, M. (2000): Geographical Distribution of Bois Noir Phytoplasmas Infecting Grapevines in Croatia. *J. Phytopathology* 148, 239-242.
- Šeruga, M., Škorić, D., Kozina, B. Mitrev, S., Krajačić, M. & Curković, P. (2003): Molecular identification of a phytoplasma infecting grapevine in the Republic of Macedonia. *VITIS Band/Volume* 42 181-185.

PRESENCE OF GRAPEVINE PHYTOPLASMAS IN SUMMER 2006 IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Saša MITREV¹, Filip PEJČINOVSKI² and Emilija NAKOVA¹

¹ University of Stip, "Goce Delčev", Faculty of Agriculture, "Krstе Misirkov" bb, Stip

² Faculty of Agriculture and Food, Bul. "Aleksandar Makedonski" bb, 1000 Skopje,

Summary

Viticulture is one of the most spread cultures in Macedonia and grapevine vineyards cover about 26.000 hectares, National Statistic of Macedonia (2001). A large number of diseases and pests are present in vineyards, among them GY.

Grapevine yellows (GY) are serious diseases often occurring in vineyards. They are caused by phytoplasmas, bacteria-like organisms without cell wall. GY present in Europe are essentially two: *Flavescence dorée* (FD) and *Bois noir* (BN).

Flavescence dorée (FD) has been a very epidemic disease since its first appearance in Europe, i.e. in France in the second half of 1950 years (Caudwell, 1957) and it is listed as a quarantine disease.

On the opposite, *Bois Noir* (BN) is ubiquitous in Europe and in the Mediterranean basin. It is considered an endemic disease, due to its lower spreading compared to FD and to the fact that infected grapevines are usually in low number in the vineyard, even if in the last two years an increasing of BN in many European viticulture regions was noticed.

Bois noir disease presence was registered on grapevine in all countries around Macedonia: Bulgaria, Serbia, Albania and Greece (Davis et al. 1997; Duduk et al, 2004; EPPO Reporting Service, 2006).

On the opposite, FD phytoplasma and its vector, *Scaphoideus titanus*, have been reported only in Serbia so far (Duduk et al., 2004; Magud and Toševski). FD phytoplasma was not found in grapevine collected during this survey; however, more extensive investigations are needed to check the presence of FD phytoplasma and its vector in Macedonia, given the fact that they are widespread in the neighboring Serbia.

This research is very important for Macedonia, because it is first detailed step in protection of grapevine, prevention of spreading the diseases and control of young grapevines who come in our country from abroad.

Our results from symptomatic samples collected in summer 2006 is associated with *Bois Noir* (subgroup 16SrXII-A or stolbur) phytoplasmas in all viticultural areas in Macedonia. This is the first report about presence and distribution of BN in Macedonia, which include most important and bigger vineyards in the areas of Negotino, Kavadarci, Strumica, Veles, Stip and Radovis. These results confirmed previous studies carried out in a limited area of Macedonia (Seruga et al. 2003). All grapevines were infected with VKII isolate, the BN strain found also on convolvulus (Langer and Maixner, 2004). Further studies, already in course, are needed to verify the presence of BN vectors in affected areas, in order to control the spread of the disease.