

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ - ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ЗА ЗАШТИТА НА РАСТЕНИЈАТА И ЖИВОТНАТА СРЕДИНА



М-Р ЕМИЛИЈА КОСТАДИНОВСКА

**ФЛОЕМСКИ ОГРАНИЧЕНИ ПАТОГЕНИ
КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА
ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Штип, 2014

ИНТЕРЕН МЕНТОР:	Проф д-р Саша Митрев редовен професор, Земјоделски факултет Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип
ЕКСТЕРЕН МЕНТОР:	Проф д-р Раде Русевски редовен професор, Факултет за Земјоделски науки и храна, Универзитет „Св Кирил и Методиј“ Скопје

ЧЛЕНОВИ НА КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНКА И ОДБРАНА:

ПРЕТСЕДАТЕЛ	Проф д-р Илија Каров редовен професор, Земјоделски факултет Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип
ЧЛЕН	Проф д-р Душан Спасов вонредовен професор, Земјоделски факултет Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип
ЧЛЕН	Проф д-р Виолета Димовска вонредовен професор, Земјоделски факултет Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип
НАУЧНО ПОЛЕ:	Биотехнологија
НАУЧНА ОБЛАСТ:	Заштита на растенијата
ДАТУМ НА ОДБРАНА:	24.11.2014 год.
ДАТУМ НА ПРОМОЦИЈА:	

ИЗЈАВА

Изјавувам дека ова е оригинален научен труд, производ на мојата истражувачка работа и содржи податоци кои согласно законот за високо образование, член 14, од законот за изменување и дополнување на законот за високото образование (службен весник 17/2011), се објавени во неколку меѓународни часописи и часописи со импакт фактор.

М-р Емилија Костадиновска

РЕЦЕНЗИРАНИ И ОБЈАВЕНИ ТРУДОВИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО

Kostadinovska E., Quaglino F., Mitrev S., Casati P., Bulgari D., Bianco P. A. (2014). Multiple gene analyses identified distinct 'bois noir' phytoplasma genotypes in the Republic of Macedonia, *Phytopathologia Mediterranea* (**impact factor 1.293**)
DOI number 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14517 (in press).

Kostadinovska E., Mitrev S., Casati P., Bianco P. A., Bulgari D. (2014). First Report of Grapevine virus A (GVA) and Grapevine fleck virus (GFkV) in the Republic of Macedonia, *Plant diseases Journal*. (**impact factor 2.46**)
(Accepted for publication <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0518-PDN>).

Mitrev S., **Kostadinovska E.** (2013). Presence of stolbur phytoplasma in grapevine and other natural hosts in the Republic of Macedonia. In: Abstracts, 3rd European Bois Noir Workshop, March 22-23, 2013, Barcelona, Spain, 44–45.

Mitrev S., **Kostadinovska E.** (2012). Detection of a Grapevine leafroll associated viruses in the Republic of Macedonia. Poster Presentation. 5th Croatian Congress of Microbiology with International Participants. Book of Abstracts. pp 100.

Mitrev S., Karov I., **Kostadinovska E.** (2011). Grapevine yellows in the Republic of Macedonia: molecular identification of stolbur phytoplasma strains in grapevine and weeds. 2nd European Bois noir Workshop 2011 (37-38).

Оваа докторска дисертација е изработена во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина при Земјоделскиот факултет, на Универзитетот „Гоце Делчев“ во Штип, под раководство на проф. д-р Саша Митрев. Дел од лабораториските анализи се направени во Лабораторијата при Катедрата за земјоделски науки и животна средина, на Универзитетот во Милано под менторство на проф. д-р Пиеро Атилио Бианко, во рамките на ЕРАЗМУС програмата.

БЛАГОДАРНОСТ

Најискрена и огромна благодарност изразувам до мојот ментор и професор – проф д-р Саша Митрев, кој несебично и искрено веруваше во мене и кој ми ги отвори вратите на лабораторијата и ми овозможи да го разјасниме непознатото во океанот наречен заштита на растенијата.

Благодарност до мојот екстерен ментор, проф д-р Раде Русевски, за концизните коментари и совети при изработката и пишувањето на оваа дисертација.

Благодарност до деканот на Земјоделски факултет, а воедно и претседател на комисијата, проф д-р Илија Каров, како и до останатите членови за оваа докторска дисертација, кои ми даваа поддршка и одговор на прашањата кои се провлекуваа во текот на шестгодишниот период на истражување.

Особена благодарност изразувам до проф д-р Пиеро Атилио Бианко од Универзитетот во Милано, кој ме прими во својата лабораторија, ми ги стави на располагање сите методи и техники на работа и ме прифати како дел од неговиот работен тим.

Бескрајно сум благодарна на моите родители кои се заслужни за она што сум денес. На патот на една раскрсница на која требаше да одлучам каде понатаму да продолжам – мојот ценет брат го имаше последниот збор: продолжи со мастер-студии!

*Докторската дисертација ја посветувам на
моето најголемо и најсветло сонце во животот –*

мојот син Драган Костадиновски

КРАТОК ИЗВАДОК
НА СОДРЖИНАТА НА ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА СО НАСЛОВ:
**ФЛОЕМСКИ ОГРАНИЧЕНИ ПАТОГЕНИ КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА
ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА**

М-р Емилија Костадиновска
Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип
Земјоделски факултет
Катедра за заштита на растенијата и животната средина

Фитоплазматските промени, како и вирусните појави кај една од најперспективните култури на територијата на Република Македонија, виновата лоза, се едни од 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 практиката.

Во текот на периодот предвиден за истражување во оваа докторска дисертација (2008-2013), континуирано беше следена состојбата на терен од симптоматолошка гледна точка. Од колекционираниот материјал за анализа, во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, беше направена типизација на присутните патогени со примена на најсовремени молекуларни методи PCR/RFLP, со проучување на седум фитоплазматски генски локуси: *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1* ген (*stol-1H0*), *stamp* ген, *trxA-truB* ген, *rplS – csdB* ген, *cbiQ – glyA* ген, за детекција на видот на присутните фитоплазми.

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

Освен виновата лоза, беше следена и состојбата на околната вегетација, непосредно во лозовиот насад од каде што беше колекциониран симптоматичен материјал за анализа, со цел да се направи корелација на преодот на фитоплазмите од плевелната вегетација на виновата лоза.

Истражувањето опфати вкупно 766 изолати од фитоплазми кај виновата лоза, 40 изолати од фитоплазми кај околната вегетација и 382 изолати од вируси кај виновата лоза.

Во текот на истражуваниот период беше докажано присуството на столбурфитоплазма кај виновата лоза и плевелната вегетација (Bois noir, 16SrXII – A subgroup - stolbur) – тип I и II (type a и type b) (VKI & VKII).

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: фитоплазми, *Mollicutes*, Bois noir, вирус на свиткување на листовите, PCR/RFLP, ELISA

(174 страници, 69 слики, 8 шематски прикази, 41 табела, 200 литературни цитати, оригинален труд на македонски јазик)

BASIC DOCUMENTATION CARD OF DOCTORAL DISERTATION WITH TITEL:
**PHLOEM LIMITED PATHOGENS ON GRAPEVINE IN THE
REPUBLIC OF MACEDONIA**

MsC Emilija Kostadinovska

Goce Delcev University

Faculty of Agriculture

Department for Plant and Environmental Protection

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.

During the period dedicated to the research in this PhD thesis (2008-2013), the situation was constantly monitored from the aspect of symptomatology. The collected material was analyzed in the Laboratory of plant and environment protection, and typification of the present pathogens was carried out by using modern molecular methods of PCR / RFLP, by studying seven phytoplasmic gene loci: *16S rRNA*, *tuf*, *vmp1* gene (*stol - 1H0*), *stamp* gene, *trxA-truB* gene, *rplS - csdB* gene, *cbiQ - glyA* gene for the detection of the type of the present phytoplasmas.

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).

In addition to grapevine as a cultivated plant and a very important crop in the country, we also monitored the surrounding vegetation in the vineyards from which symptomatic material was collected for analysis in order to determine the transition of phytoplasmas from the weed vegetation to the grapevine.

The study covered a total of 766 isolates of grapevine phytoplasmas, 40 isolates of phytoplasmas from the surrounding vegetation and 382 isolates of grapevine viruses. During the investigated period, the presence of stolbur phytoplasmas in the grapevine

and the weed vegetation was established (Bois noir, 16SrXII - A subgroup - stolbur) - Type I and II (type a & type b) (VKI & VKII).

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: phytoplasmas, *Mollicutes*, *Grapevine leafroll associated virus*,
PCR/RFLP, ELISA

(174 pages, 69 figures, 8 schemes, 41 tables, 200 references,
original in Macedonian)

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД	1
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА	5
2.1. Географска застапеност на лозовите насади во Република Македонија	5
2.2. Структура на лозовите насади во Република Македонија	5
2.3. Поважни причинители на флоремски болести на виновата лоза	7
2.3.1. Поважни фитоплазматски промени кај виновата лоза	8
2.3.1.1. Карактеристики на столбур-фитоплазмата (Bois noir или црно дрво)	10
2.3.1.2. Дијагностика на фитоплазмите кај виновата лоза како основа за нивна класификација (групирање)	12
2.3.2. Поважни вирусни болести на виновата лоза	16
2.3.2.1. Вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза (<i>Grapevine leafroll associated virus – GILRaV</i>)	19
2.3.2.2. Вирусот на инфективна дегенерација кај виновата лоза (<i>Grapevine fanleaf virus – GFLV</i>)	22
2.3.2.3. Лабораториски методи за дијагностика на вирусните болести на виновата лоза	23
2.4. Мерки за заштита и контрола на фитоплазматските и вирусните болести на виновата лоза	24
2.5. Преглед на досегашните истражувања за фитоплазматските и вирусните промени во Република Македонија	25
3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО	27
ЕСКПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ	
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА	30
4.1. Колекционирање на материјалот за анализа во лозовите насади во Република Македонија	30
4.1.1. Активности во тек на теренската анализа	33
4.2. Методи за идентификација на проучуваните патогени	46
4.2.1. Молекуларни методи и современи лабораториски тестови за докажување на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза	47
4.2.1.1. Протокол на ДНК-екстракција - Angelini et al., 2001 (со модификација)	47
4.2.1.2. Молекуларна дијагностика и типизација на видот на фитоплазмата	49
4.2.1.3. Молекуларни методи и современи лабораториски тестови за докажување на присуството на вирусите кај виновата лоза	54
4.2.1.3.1. Серолошки метод (ELISA) за испитување на групите на <i>Grapevine leafroll associated virus</i>	54
4.2.1.3.2. Молекуларна реакција на детекција на видот на вирус во растително ткиво од винова лоза	57
4.2.1.4. Пренесување на вирусите од виновата лоза на зелјести тест-растенија (биотестови)	64

5. РЕЗУЛТАТИ	70
5.1. Состојба со флоремски ограничени патогени кај виновата лоза	70
5.2. Симптоматолошки промени кај виновата лоза – теренска анализа	70
5.2.1. Фитоплазматска инфекција кај лозовите насади во периодот 2008-2013 година	70
5.2.2. Вирус на инфекција кај лозовите насади	92
5.3. Мапа на дистрибуција на флоремските патогени	101
5.4. Лабораториски анализи за докажување на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза	105
5.4.1. Умножување на делови од геномот на столбур фитоплазмата	105
5.4.1.1. Ген за <i>16S rRNA</i>	107
5.4.1.2. <i>tuf</i> ген	109
5.4.1.3. <i>vmp1</i> ген (stol - 1H10)	112
5.4.1.4. <i>stamp</i> ген	112
5.4.1.5. <i>trxA-truB</i> ген	113
5.4.1.6. <i>rplS – csdB</i> ген	114
5.4.1.7. <i>cbiQ – glyA</i> ген	115
5.4.2. Полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (RFLP)	115
5.4.2.1. Ген за <i>16S rRNA</i>	115
5.4.2.2. <i>tuf</i> ген	116
5.4.2.3. <i>vmp1</i> ген (stol - 1H10)	117
5.4.2.4. <i>stamp</i> ген	118
5.4.2.5. <i>trxA-truB</i> ген	118
5.4.2.6. <i>rplS – csdB</i> ген	119
5.4.2.7. <i>cbiQ – glyA</i> ген	120
5.5. Лабораториско докажување на присуство на фитоплазмите кај плевелната вегетација	120
5.5.1. PCR-RFLP анализа	120
5.5.1.1. <i>tuf</i> ген – PCR анализа	122
5.5.1.2. <i>tuf</i> ген – RFLP анализа	123
5.6. Лабораториски анализи за докажување на присуството на вирусите	124
5.6.1. Серолошка анализа со примена на ELISA методите за докажување на присуство на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза	124
5.6.2. Детекција на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза со метод на RT-PCR	127
5.6.3. Пренос на <i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> и <i>3</i> (GLRaV-1 и GLRaV3) на тест-растенија <i>Nicotiana benthamiana</i> L	129
6. ДИСКУСИЈА	132
6.1. Распространетост на флоремските патогени во Македонија	133
6.2. Симптоматологија	134
6.3. Осетливост на различни сорти винова лоза кон проучуваните патогени	136
6.4. Методолошки пристап кон детекција на флоремските патогени кај виновата лоза	137
6.5. Можности за контрола на флоремски ограничени патогени	140
7. ЗАКЛУЧОК	143
8. ЛИТЕРАТУРА	145
ПРИЛОГ	164

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ

Табела 1.	Класификација (групирање) на фитоплазмите според 16Srl гените	13
Табела 2.	Поважни причинители на вирусни заболувања на виновата лоза	18
Табела 3.	Асоцијативни групи на GLRaV и нивни вектори	21
Табела 4.	Теренска анализа на различни локалитети и региони во периодот од 2008 до 2013	32
Табела 5.	Евиденција на карактеристиките на терен	34
Табела 6.	Опис на интензитетот на симптомите на собраниот материјал за анализа	34
Табела 7.	Оценување на интензитетот на заболување (10 реда по 100 лози)	34
Табела 8.	Колекционирани примероци во сезона 2008, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза	35
Табела 9.	Колекционирани примероци во сезона 2009, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза	36
Табела 10.	Колекционирани примероци во сезона 2010, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза	37
Табела 11.	Колекционирани примероци во сезона 2011, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза	38
Табела 12.	Колекционирани примероци во сезона 2012, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза	39
Табела 13.	Колекционирани примероци во сезона 2013, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза	40
Табела 14.	Колекционирани примероци во сезона 2008/2009, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза	41
Табела 15.	Колекционирани примероци во сезона 2010, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза	42
Табела 16.	Колекционирани примероци во сезона 2011, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза	43
Табела 17.	Колекционирани примероци во сезона 2012, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза	44
Табела 18.	Колекционирани примероци во сезона 2013, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза	44
Табела 19.	Колекционирани примероци од плевелна вегетација во сезона 2008-2013	45
Табела 20.	Преглед на културата, испитуваните патогени и користените лабораториски методи на работа	47
Табела 21.	Употреба на универзална група на прајмери за директен PCR – P1P7	49
Табела 22.	Употреба на универзална група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR- F2nR2	49
Табела 23.	Употреба на специфична група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR- F1R1	49
Табела 24.	Употреба на специфична група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR- P1aP7a	50
Табела 25.	Прајмерски сет за специфичен <i>tuf</i> ген	50
Табела 26.	Прајмерски сет за специфичниот ген <i>cbiQ-glyA</i>	50

Табела 27. Прајмерски сет за специфичниот ген <i>csdB-tyrS-rplS</i>	51
Табела 28. Прајмерски сет за специфичниот ген <i>trxA-truB</i>	51
Табела 29. Прајмерски сет за специфичниот <i>vmp1</i> ген	51
Табела 30. Прајмерски сет за специфичниот <i>stamp</i> ген	52
Табела 31. Секвенци на прајмери употребувани во Multiplex RT-PCR	61
Табела 32. Секвенци на прајмери употребувани за одредување на GLRaV 3 група	62
Табела 33. Приказ на процентот на фитоплазматска инфекција, по сортимент и години на испитување, пресметани според Mc-Kinney	101
Табела 34. Приказ на процентот на инфекција со GLRaV, по сортимент и години на испитување, пресметани според Mc-Kinney	104
Табела 35. Изолати од 2012 година, од различен сортимент, тествани на четири гени и дигестирање со четири ензими специфични за секој ген	106
Табела 36. Изолати од 2012 година, од различен сортимент, тествани на три гени и дигестирање со три групи на ензими специфични за секој ген	107
Табела 37. Вкупен број на анализирани примероци од различни сорти, со број на позитивни примероци за <i>tuf</i> ген	110
Табела 38. Примероци од плевелна вегетација во сезона 2008-2013 година, со број на позитивни примероци	122
Табела 39. Преглед на податоците за вкупен број на анализирани и број на позитивни примероци за вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - GLRaV	125
Табела 40. Резултати од DAS ELISA методот за присуство на групите на leafroll вирусот	126
Табела 41. Примероци прикажани со комплетна анализа ELISA / RT-PCR	128

ЛИСТА НА СЛИКИ

Слика 1.	Мапа на Македонија - маркирани испитуваните лозови насади во периодот 2008-2013 година.	33
Слика 2.	Симптоми предизвикани од столбур фитоплазмата Bois noir кај сортата Шардоне, локација Сопот, Велес, август 2012.	71
Слика 3.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од локација Сопот, Велес – економски штети, сушење на гроздовите - сезона 2012.	72
Слика 4.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – јака инфекција и сушење на гроздовите - сезона 2012.	72
Слика 5.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица с. Лепово, Неготино – јака инфекција на лисната маса – сезона 2011.	72
Слика 6.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица с. Лепово, Неготино – целосно зафатена лоза - сезона 2011.	72
Слика 7.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица с. Лепово, Неготино – почетен стадиум на сушење на гроздот - сезона 2011.	73
Слика 8.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – зелен, нелигнифициран ластар со скратени интернодии – сезона 2010.	73
Слика 9.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – триаголни листови и нелигнифицирани ластари – сезона 2010.	73
Слика 10.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – зелен, многу јака инфекција и сушење на гроздовите – сезона 2008.	74
Слика 11.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – промена на бојата на лисната маса – сезона 2013.	75
Слика 12.	Локалитет Сарчиево, сорта Вранец, триаглест изглед на листовите заболени со столбур - сезона 2009.	75
Слика 13.	Мешана инфекција кај сортата Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – столбур фитоплазма / leafroll вирус – сезона 2013.	75
Слика 14.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци - нелигнифициран ластар со скратени интернодии – сезона 2013.	76
Слика 15а.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – изглед на грозд – сезона 2013.	76

Слика 15б.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – целосно исушен грозд – сезона 2013.	76
Слика 15в.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – симптоми на лист и гроздовите – сезона 2013.	77
Слика 16.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – парцијално инфицирана лоза – сезона 2013.	77
Слика 17.	Сорта Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – здрава лоза земена како негативна контрола – сезона 2013.	77
Слика 18а.	Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Кратошија, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – симптоми на лист и сушење на гроздот.	79
Слика 18б.	Мешана инфекција - симптоми од столбур фитоплазмата и leafroll вирус кај сортата Кратошија, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – симптоми на лист – сезона 2013.	79
Слика 19.	Автохтона сорта Станушина, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – здрава лоза како негативна контрола – сезона 2013.	81
Слика 20а.	Автохтона сорта Станушина, локација м.в. Брловец, Кавадарци – целосно зафатена лоза-сезона 2013.	81
Слика 20б.	Автохтона сорта Станушина, локација м.в. Брловец, Кавадарци – целосно зафатена лоза – сезона 2013.	81
Слика 21.	Автохтона сорта Станушина, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – зелен ластар, нерамномерно созревање на грозјето и сушење на зрната – сезона 2013.	82
Слика 22а.	Сорта Франковка, лозарска единица Авлаки, Гевгелија – симптоми на лисната маса од столбур фитоплазма – сезона 2012.	84
Слика 22б.	Сорта Франковка, лозарска единица Авлаки, Гевгелија – симптоми на лисната маса од столбур фитоплазма – сезона 2012.	84
Слика 23.	Сорта Каберне совиньон, лозарска единица с. Амзабегово – с. Пеширово, м.в. Струга – симптоми на лисната маса од столбур фитоплазма – сезона 2012.	85
Слика 24.	Сорта Каберне совиньон, лозарска единица с. Амзабегово - с. Пеширово, м.в. Струга – парцијални симптоми, незадрвенет ластар и кратки интернодии – сезона 2012.	86
Слика 25а.	Сорта Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – лажни симптоми предизвикани од инсектот <i>Stictocephala bisonia</i> - сезона 2012	87
Слика 25 б,в.	Сорта Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – лажни симптоми предизвикани од инсектот <i>Stictocephala bisonia</i> - сезона 2012.	87
Слика 26.	<i>Clematis vitalba</i> , околу лозов насад кај лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – сезона 2013.	89
Слика 27.	<i>Ecballium elaterium</i> , под симптоматична лоза, сорта Шардоне, локалитет Велес, Сопот, - сезона 2008.	89

Слика 28.	<i>Ecballium elaterium</i> , под симптоматична лоза, сорта Шардоне, локалитет Велес, Сопот – сезона 2008.	89
Слика 29.	<i>Cuscuta</i> spp., под симптоматична лоза, сорта Шардоне, Велес, Сопот - сезона 2008.	90
Слика 30.	<i>Cuscuta</i> spp., околу симптоматична едногодишна лоза, сорта Шардоне, с. Аргулица, м.в. Тупанец - сезона 2010.	90
Слика 31.	<i>Solanum nigrum</i> , во близина на симптоматична лоза, Вранец, с. Аргулица, м.в. Тупанец - сезона 2010.	90
Слика 32.	<i>Convolvulus arvensis</i> , под симптоматична лоза, сорта Шардоне, Амзабегово - Пеширово, м.в. Струга - сезона 2012.	91
Слика 33.	<i>Portulaca oleracea</i> , под симптоматична лоза, сорта Вранец, с. Пеширово - сезона 2012.	91
Слика 34.	<i>Portulaca oleracea</i> , под симптоматична лоза, сорта Вранец, Радовиш, сезона 2008.	91
Слика 35 а.	Сорта Каберне совиньон, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, црвенило на листовите со зелена нерватура и со големи, здрави гроздови, но со кисел вкус – сезона 2009.	93
Слика 35 б.	Сорта Каберне совиньон, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, јака инфекција на лисната маса, сезона 2009.	93
Слика 35 в.	Сорта Каберне совиньон, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, целосно поцрвенување на лисната маса, сезона 2009.	93
Слика 36 а.	Сорта Мерло, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV - сезона 2010.	94
Слика 36 б.	Сорта Мерло, локација с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV - сезона 2010.	94
Слика 36 в.	Сорта Мерло, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV - сезона 2010.	95
Слика 37 а,б.	Сорта Вранец, локалитет с. Карбинци, м.в. Балабаница – GLRaV, симптоми на лисна маса, со јасна зелена нерватура и нерамномерно созревање на гроздовите - сезона 2010.	96
Слика 37 в.	Сорта Вранец, локалитет с. Карбинци, м.в. Балабаница – GLRaV, симптоми на две соседни лози - сезона 2010.	96
Слика 38 а, б.	Сорта Вранец, локалитет с. Криви дол – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, свиткување на листовите, промена на бојата и зелена нерватура, сезона 2010.	97
Слика 38 в.	Сорта Вранец, локација с. Криви дол – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, сезона 2010.	97
Слика 39 а, б.	Сорта Станушина, локација Кавадарци, м.в. Брловец – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, сезона 2012.	98
Слика 39 в.	Сорта Станушина, локација Кавадарци, м.в. Брловец – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, промена на бојата и свиткување на листовите кон внатрешноста, сезона 2012.	99
Слика 40 а.	Сорта Црн бургундец, локација Штип, м.в. Каваклија – GLRaV, инфекција на лисната маса, црвени листови со триаглест изглед – сезона 2013.	100
Слика 40 б.	Сорта Црн бургундец, локација Штип, м.в. Каваклија – GLRaV, црвенило со зелена нерватура – сезона 2013.	100

Слика 41.	Маркер 1 Kb DNA ladder.	108
Слика 42.	Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот <i>16S rRNA</i> ген, со примена на F1/R1 (I) прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од Табела 35. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови AY – asreg yellow, EY1-elm yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).	108
Слика 43.	Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот <i>16S rRNA</i> ген, со примена на F1/R1 (I) прајмерскиот пар. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови AY – asreg yellow, EY1- elm yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).	109
Слика 44.	Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот <i>tuf</i> ген, со примена на ftufAY-rtufAY прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од Табела 35. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови AY – asreg yellow, EY1- elm yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).	109
Слика 45.	Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот <i>tuf</i> ген, со примена на ftufAY-rtufAY прајмерскиот пар. 1-11, сорта Станушина, локалитет Кавадарци, м.в. Брловец, 12 – здрави примероци од сортата Станушина, како негативна контрола, 13 – STOL C - референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).	110
Слика 46.	Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот <i>vmp1</i> ген, со примена на H10F2 – H10R2 прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од Табела 35. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови, AY – asreg yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано), В – blank или негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина.	112
Слика 47.	Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот <i>stamp</i> ген, со примена на stampF1– stampR1 прајмерскиот пар. Ознаките на гелот се однесуваат на: 1-5, сорта Станушина, Кавадарци, Крњево, м.в. Брловец, 6-8 Шардоне, Велес, Сопот, 9 – Вранец, Скопје, м.в. Четири патишта, 10-14 Кратошија, Долни Балван, 15 – Шардоне, Аргулица, м.в. Тупанец. AY – asreg yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано). М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.	113

- Слика 48.** 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 35. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови. АУ – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано). 113
- Слика 49.** Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *trxA–truB* ген, со примена на trxAF2-truBR4 прајмерскиот пар во вториот или вгнездениот PCR. Распоредот на продуктите: одговара на шифрите на примероците од Табела 36. 18 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина, Крњево, м.в. Брловец, 19 - негативна контрола, здрав примерок од сортата Шардоне, Велес, Сопот 20 – негативна контрола, вода. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови АУ – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано). 114
- Слика 50.** Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *rpIS – csdB* ген, со примена на rpISF2-csdBR2 прајмерскиот пар во вториот или вгнездениот PCR. Распоред на продуктите: одговара на шифрите на примероците од Табела 36. В – бланк, вода како негативна контрола 18 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина, Крњево, м.в. Брловец, 19 - негативна контрола, здрав примерок од сортата Шардоне, Велес, Сопот, АУ – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано), 20 – негативна контрола, вода (само од вториот PCR). М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови. 114
- Слика 51.** Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *cbiQ – glyA* ген, со примена на rpISF2-csdBR2 прајмерскиот пар во вториот или вгнездениот PCR. Распоред на продуктите: одговара на шифрите на примероците од Табела 36. В – бланк, вода како негативна контрола 18 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина, Крњево, м.в. Брловец, 19 – симптоматичен примерок од сортата Шардоне, Велес, Сопот АУ – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано), 20 – негативна контрола, вода (само од вториот PCR). М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови. 115
- Слика 52.** Маркер Фх174 со големина на базните парови. 116
- Слика 53.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот ген за *16S rRNA* добиени со промена на R16F1/R16R0 и *MseI* ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола АУ – asrer yellow phytoplasma М - маркер, Фх174 стандард за одредување на молекуларната маса 116

- Слика 54.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *tuf* ген, добиени со примена на *Hpa*II ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asger yellow phytoplasma. M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса. 117
- Слика 55.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *vmp1* ген, добиени со примена на *Rsa*I ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asger yellow phytoplasma. M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса. 117
- Слика 56.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *stamp* генот, добиени со примена на *Hpy*188I ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asger yellow phytoplasma. M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса. 118
- Слика 57.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *trxA-truB* генот, добиени со примена на *Bsa*II ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 36, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asger yellow phytoplasma. M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса. 119
- Слика 58.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *rplS – csdB* генот, добиени со примена на *Hpy*CH4V ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 36, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asger yellow phytoplasma. M - маркер Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса. 119
- Слика 59.** Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *cbiQ – glyA* генот, добиени со промена на *Hpy*188I ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 36, од поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asger yellow phytoplasma. M - маркер Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса. 120

- Слика 60.** Продукти од полимеразната реакција, со примена на *ftufAY-rtufAY* прајмерскиот пар, за потврда на *tuf* генот кај плевелната вегетација. М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови. 1 - *Cuscuta* sp. – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Велес, Сопот, 2 - *Cuscuta* sp. – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Аргулица, Тупанец, 3 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кавадарци, П.Е. Љубаш, 4 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Сарчиево, 5 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кумановско, В – бланк, негативна контрола, вода. STOL C – позитивен референтен примерок. 123
- Слика 61.** Рестрикциски профили во 3% агарозен гел со примена на *HpaII* ензимот за дигестирање. 1 – *Cuscuta* sp., плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Велес, Сопот, 2 - *Cuscuta* sp. – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Аргулица, Тупанец, 3 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кавадарци, П.Е. Љубаш, 4 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Сарчиево, 5 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кумановско. 123
- Слика 62.** 1% Агарозен гел на кој се прикажани резултатите од RT-PCR детекцијата со примена на прајмерски комбинации за GLRaV -1, -2 и -3. Вкупната РНК е прикажана од десет репрезентативни примероци обележани од 1-10, со карактеристики за примероците во Табела 41. 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. 129
- Слика 63.** Тест растенија *N. benthamiana*, по инокулација, поставени во комора на 25°C/светло, 20°C/темно (BINDER, KBW 720). 130
- Слика 64 а.** Изглед на тест растение веднаш по инокулација. 130
- Слика 64 б.** Изглед на тест растение по инокулација со вода – контрола. 130
- Слика 65.** Симптоми предизвикани од GLRaV-1, по 20 дена од инокулација. 131
- Слика 66.** Симптоми предизвикани од GLRaV-1, лево инокулација со вирусот, десно негативна контрола, инокулација со вода. 131
- Слика 67.** Симптоми предизвикани од GLRaV-3, по 20 дена од инокулација. 131
- Слика 68.** Симптоми предизвикани од GLRaV-3, по 45 дена од инокулацијата, десно инокулација со вирусот, лево негативна контрола, инокулација со вода. 131
- Слика 69.** Симптоми предизвикани од GLRaV-1 (десно) и GLRaV-3 (лево), по 45 дена од инокулацијата, споредени со негативна контрола – дестилирана вода (во средина). 131

ШЕМАТСКИ ПРИКАЗ

Шематски приказ 1.	Годишен период за теренска анализа на лозовите насади во Македонија	29
Шематски приказ 2.	Компаративни карактеристики меѓу испитуваните патогени	46
Шематски приказ 3.	Услови за полимеразно-верижна реакција за идентификација на неколку фитоплазматски генски региони	52
Шематски приказ 4.	Услови за полимеразно-верижна реакција за идентификација на специфичниот <i>tuf</i> генот на столбур фитоплазмата	53
Шематски приказ 5.	Испитување на leafroll complex со DAS-ELISA	56
Шематски приказ 6.	Примена на различни групи на хемикалии во текот на анализите спроведени во периодот 2008-2013	68
Шематски приказ 7.	Користена апаратура при изведување на анализите во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, Земјоделски факултет	69
Шематски приказ 8.	Мапа на дистрибуција на симптомите на терен	105

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

КРАТЕНКА	ЗНАЧЕЊЕ
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
РНК	рибонуклеинска киселина
PCR	полимеразна верижна реакција
RFLP	полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти
dNTP	деоксинуклеозид трифосфат
dATP	деоксиаденозин трифосфат
dGTP	деоксигуанозин трифосфат
dTTP	деокситимидин трифосфат
СТАВ	цетил триметил амониум бромид
EDTA	етилен диамино тетраоцетна киселина
TBE	Tris-Borat-EDTA пуфер
TE	Tris-EDTA пуфер
TEMED	N,N,N',N' – тетраметил етилендиамин
EtBr	ethidium bromide
MLOs	<i>'Mycoplasma like organisms'</i>
BN	Bois noir
FD	Flavescence doree
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
GLRaV	<i>Grapevine leafroll associated virus</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
ArMV	<i>Arabis mosaic virus</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
DAS-ELISA	double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

1. ВОВЕД

Еволуцијата на виновата лоза (*Vitis vinifera* L.) се мери во милиони години, додека еволуцијата на човекот, до разумниот *Homo sapiens*, траела стотина илјада години. Оттука, неоспорен е фактот дека човекот имал можност долго да ужива во сочните, слатки плодови на виновата лоза (Христов, 2002). Со создавањето на најстарите цивилизации започнува и одгледувањето на виновата лоза, од кога датираат и првите почетоци на лозарството. Палеонтолозите сметаат дека вината од свежо овошје му биле познати на човекот уште пред 100.000 години (Вајн и сор., 2007).

Според најстарите азиски и египетски споменици, се смета дека почетокот на културната лоза бил пред 7.000 години пред нашата ера, а за ова сведочеле и хиероглифите на кои се прикажани гроздови како се сушат на сонце (Buric, 1972). Исто така, остатоците од египетските слики, преку кои било прикажано одгледувањето, бербата и преработката на грозјето, покажувало на фактот дека фараоните во своите градини одгледувале винова лоза (Христов, 2002). Најголемите површини под винова лоза биле на териториите на Персија, Асирија, Палестина, Феникија, Месопотамија и Египет, а на Балканскиот Полуостров за прв пат виновата лоза била донесена пред 3.000 години (Христов, 2002). Според Агенцијата за храна и земјоделство (Food and Agriculture Organization FAO 2007), 75.866 km² на светот се искористени за одгледување на винова лоза и производство на грозје. Околу 71 % од производството на грозје во светот, се користи во преработка за добивање на квалитетно вино, 27 % се употребува како свежо овошје, и 2 % како преработено суво грозје (FAO 2003 и 2007, преземено од Abdulkareem & Maulood, 2011). Дел од производството на грозје оди во производство на сок од грозје, „бездодаден шеќер“ и „100 % природен“. Областите посветени на лозови насади се зголемуваат за околу 2 % годишно (Христов, 2002).

Според поновите литературни и статистички податоци, одгледувањето на виновата лоза бележи раст, и не постојат информации за намалување на површините под винова лоза и производство на грозје од различен сортимент, на светско ниво (Lacirignola & Digiago, 1999; OIV, 2014). Во Република Македонија, виновата лоза била донесена од Азија, преку Црно Море, по должината на реката Марица, пред 3.000 години.

Најголемиот развој го достигнала во времето на Римската Империја, кога биле извршени и првите научни испитувања кај лозата како култура и биле добиени значајни сознанија за грозјето, како култура и за производството на вино (Христов, 2002). За време на владеењето на Византија (до VII век), виното се користело како симбол за крвта на Исус Христос во разни христијански обреди.

За време на Отоманската империја (XIV-XX век), доминантност при одгледувањето имале трпезните сорти. До почетокот на XX век, виновата лоза во Република Македонија била застапена на вкупна површина од околу 30.000 ha, кои во периодот од 1912 до 1914 година биле целосно уништени од појавата на филоксерата (*Dactylosphaera vitifoliae*) (Вајн и сор., 2007; Димовска и Белески, 2014). Обновувањето на лозарството (подигнување на нови лозови насади), започнало со калемени лозови садници, користејќи подлоги од американски видови отпорни на филоксерата, а максимумот од 38.759 ha бил достигнат во далечната 1981 година кога имало доминација на приватниот сектор (Христов, 2002).

Денешната структура на земјоделските фарми во Република Македонија била создавана во периодот до 1990 година, при што се карактеризира со повеќе мали приватни фарми (индивидуален сектор) кои опфаќаат 80 % од целокупното земјоделско земјиште, и ограничен број поголеми земјоделски фирми кои обработуваат 20 % од земјиштето (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015). Покрај ова, структурата на денешните лозарски реони се должи на фактот дека во минатото површината на обработлива земја која можела да ја поседува приватното лице била ограничена. Ова ограничување, заедно со постапката на наследување на земјата, резултирало со висок степен на фрагментирање на приватните фарми (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Ваквата состојба од минатото имала големо влијание врз лозарството и процесот на производството на вино. На пазарот се вклучени околу 25.000 фарми од областа на лозарството, од кои 70 % се индивидуални стопанства и 30 % се земјоделски фирми. Просечната површина на парцелите се движи помеѓу 1.1 ha и 1.3 ha, фрагментирана во неколку парцели со површина од 0.3 до 0.4 ha (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Според денешната структура, Македонија е мала земја со вкупна површина на простирање од 25.713 km², со околу 2 милиони жители и местоположба во југозападниот дел на Балканскиот Полуостров. Вкупната површина под лозови насади, пресметано за периодот од 2004 до 2007 година, од 21.312 ha е значително намалена за околу 14 % (од 24.777 ha во 2004 на 21.312 ha во 2007 година) (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Спротивно на овој негативен тренд на опаѓање на површините под лозови насади (2004-2007 година), во 2008 година е забележан пораст од 1.089 ha во однос на 2007 година. Ова зголемување на површините под лозови насади, продолжува и во 2009 година со 2.376 ha повеќе во однос на 2008 година, што се должи на воведувањето на мерката за финансиската поддршка при подигање на нови лозови насади, се со цел подобрување на старосната и сортната структура на лозовите насади (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Според статистика за периодот од 2004 до 2009 година, површината под лозови насади во просек изнесува 23.762 ha (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015). При подигање и одгледување на лозовите насади, температурата претставува многу важен климатски фактор која има големо влијание врз климата на еден реон и врз развојот на виновата лоза во текот на целиот вегетациски период. За нормален развој на виновата лоза потребно е топла и сува клима, средно дневна температура од 12 до 14°C за почеток на фенофазата цветање, а за почеток на созревање на грозјето 15-17°C (Христов, 2002).

Виновата лоза, како и секоја останата земјоделска култура, се соочува со проблеми во текот на одгледувањето поради појавата на голем број болести, штетници и плевели кои нанесуваат сериозни загуби во приносот (Martelli, 2003; Sforza, 2003; Carisse et al., 2006; Kube et al., 2012; Santi et al., 2013). Како резултат на истражувањата кои се правени со години наназад, природата на повеќето болести е добро проучена и постојат мерки за заштита од нив, меѓутоа кај извесни патогени промени, примената на мерки за заштита за нивно уништување е тешко или пак природата на промените е од непознато потекло (Carisse et al., 2006; Kube et al., 2012; Santi et al. 2013).

Според литературните податоци, виновата лоза е култура домаќин на голем број патогени микроорганизми (Nakaune et al. 2008; Martelli & Boudon-Padieu, 2006). Денес се смета дека виновата лоза е домаќин на повеќе од 32 патогени габни заболувања, повеќе од 70 вирусни и 3 бактериски заболувања (Pearson & Goheen, 1988; Martelli, 2003; Sforza, 2003).

Покрај високиот подем на развој на науката, како и практиката со примена на соодветните мерки за заштита, сепак најшироко распространети габните заболувања кај виновата лоза се: пепелница (*Erysiphe necator*), пламеница (*Plasmopara viticola*) и сиво гниење кај лозата (*Botrytis cinerea*) (Schneeet et al., 2013). Во последната деценија, се поголемо внимание се посветува на присуството

на флоемските патогени (фитоплазмите и вирусите) кои се едни од главните фактори за надворешниот изглед на еден лозов насад, но и за производството на квалитетно грозје и вино (Sforza, 2003; Kube et al., 2012; Santi et al., 2013).

Бројни црвенила / жолтила кои се појавуваат кај виновата лоза од типот на патогени заболувања, се верува дека се предизвикани од вируси, со оглед на нивната инфективна природа на ширење, симптоматологија, како и пренос со инсекти вектори (Kunkel, 1926, 1931, 1955; McCoy et al., 1989; Maramorosch, 2008).

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

2.1. Географска застапеност на лозовите насади во Република Македонија

Во Република Македонија постои еден лозарски реон кој се совпаѓа со целата територија на Републиката. Името на географската област - реонот е Македонија (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Основното производство е лоцирано по течението на реката Вардар со следниве виногорја: скопско, велешко, тиквешко и гевгелиско-валандовско виногорје, кои опфаќаат околу 83 % од вкупното производство на грозје и вино (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015). Останатите виногорја во кои се врши производство на грозје и вино, со околу 17 %, се следниве: струмичко-радовишко, овчеполско, кочанско-виничко, кумановско, кратовско, прилепско, битолско и охридско виногорје (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Во реонот Македонија има 16 подрегиони (виногорја), кои се карактеризираат со различни производствени услови и различен интензитет на производство. Имено, тиквешкото виногорје е област на која отпаѓа најголемиот дел од производството на грозје и вино во Република Македонија (околу 30 %). По него, следат гевгелиско-валандовското виногорје, струмичко-радовишкото виногорје, скопското виногорје, велешкото виногорје (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

2.2. Структура на лозовите насади во Република Македонија

Можностите за ефикасното искористување на земјоделското земјиште во Македонија се попречени од неговото фрагментирањето 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) (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Слабиот промет на земјиште, кој ќе придонесе за 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 (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Како резултат на ваквите состојби и долгиот временски период на мали инвестиции, лозовите насади во Република Македонија сè со неповолна старосна структура. Околу 60 % од лозовите насади се постари од 15 години, а 38 % од вкупната површина под лозови насади се на крајот на 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 (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Асортиманот на сортите на винско грозје е несоодветен во однос на неговиот квалитет, локацијата на производство и промовирање на пазар (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015). 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 (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Употребата на процесите базирани врз механизација во производството на лозови насади е незначителна (моментално се користи механизација само за обработка на почвата и за заштита на виновата лоза). За ампело-техничките мерки, бербата и сл. не се користи соодветна механизација (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Постојните трактори и помошната опрема се технички и економски застарени, со чести расипувања и висока потрошувачка на гориво и масло. Оттука, потребно е обновување на механизацијата и специјализираната опрема која се користи при одгледување на виновата лоза, за да се намалат производствените трошоци, да се подобри квалитетот и навреме да се преземаат сите потребни процесии мерки во лозарството (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Долгорочно, постоењето на мали и фрагментирани парцели на лозови насади, дури и при производство со среден интензитет, не овозможува поинтензивна модернизација и механизација, при што доведува до помала конкурентност на пазарот (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Во последниве години, неколку компании кои дејствуваат во други економски сектори различни од земјоделството, започнаа да инвестираат во лозовите насади

и производството на вино. Како резултат на овие инвестиции, лозовите насади се значително обновени во некои од познатите области, посебно на погодните почви во тиквешкото и гевгелиско-валандовското виногорје. Во овие области, генерално е зголемено производството на грозје и во индивидуалниот сектор (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

2.3. Поважни причинители на флоемски болести кај виновата лоза

Одгледувањето на виновата лоза не само во наши услови, туку глобално на светско ниво, е процес на соочување со голем број болести и штетници, кои секоја година последователно предизвикуваат штети во квантитетот и квалитетот на производството на грозје (Martelli, 2003; Sforza, 2003; Carisse et al., 2006; Kube et al., 2012; Santi et al., 2013; Schneeet et al., 2013; Kostadinovska et al., 2014). 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 (Thind et al., 2004; Sosnowski & Wicks, 2007).

Според поновите литературни податоци, многу испитувања се фокусирани на детално проучување на врската помеѓу виновата лоза како домаќин, симптоматологијата на патогенот и условите на средината, посебно за три значајни патогени габи (пепелница (*Uncinula necator*), пламеница (*Plasmopara viticola*) и антракноза (*Gleosporium ampelophagum*) (Thind et al., 2004).

Најновите истражувања и публикувани податоци, сè поголем акцент ставаат на изготвување на контролна стратегија за заштита на виновата лоза од фитоплазматските промени, едни од групата на патогени промени кои многу лесно, брзо се шират а за заштита од нив потреба е многу енергија, труд, знаење и временски период (Pavan et al., 2012; Ertunk, 2013). „Flavescence doree“ (FD) и „Bois noir“ (BN), се две групи на фитоплазми кои предизвикуваат сериозни загуби кај голем број европски лозови насади (Kube et al., 2012; Santi et al., 2013; Schneeet et al., 2013).

За обезбедување на едно квалитетно земјоделско производство, особено внимание треба да се посвети на појавата и присуството на вирусните заболувања, кои имаат големо економско значење. Од групите на вирусни заболувања кои ја напаѓаат виновата лоза, најшироко распространет и економски штетен вирус е вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза – *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (Rayapati et al., 2008).

2.3.1. Поважни фитоплазматски промени кај виновата лоза

Како најчести и досега недоволно проучени промени кои се јавуваат на виновата лоза, се т.н. „жолтилата“, односно „црвенилата“, за кои се одговорни групи на патогени причинители, како што се фитоплазмозите, вирусите или пак група абиотски фактори кои можат да предизвикаат исти или слични симптоми (Daire et al., 1993; Bertaccini et al., 1995; Boudon-Padieu, 2000; Angelini et al., 2001; Botti & Bertaccini, 2007).

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 инсекти. Фитоплазмите дивергирале во текот на својот развој од грам-позитивни бактерии, кои припаѓаат на родот „*Candidatus Phytoplasma*“, и на класата *Mollicutes* (IRPCM, 2004). Тие се плеоморфни (со непостојана форма), без клеточен ѕид, со дијаметар помал од еден μm , и многу мала големина на геномот (680-1.600 kb) (Niemark & Kirckpatrick, 1993; Marcone et al., 1999; Bertaccini & Duduk, 2009).

Детекцијата и идентификацијата на фитоплазмите подолг временски период се базирала врз 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 (Lee et al., 2000).

Според најновите истражувања на тимот на Contaldo N., во 2012 година за прв пат е објавено култивирање на фитоплазмите на хранлив медиум (Contaldo et al., 2012). 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, рибозомалниот протеински ген, како и фактор на елонгација TU (*tuf* gene), сè уште се основни алатки за молекуларна идентификација, карактеризација и класификација на фитоплазмите (Santi et al., 2013; Schneet et al., 2013; Kostadinovska et al., 2014).

Фитоплазмите, заедно со вирусите кои се пренесуваат на перзистентен пропагативен начин, спаѓаат во ретка група микроорганизми кои се способни да паразитираат во растителните и животинските микроорганизми (Hull, 2009). Најчесто предизвикуваат жолтила, заостанување во растот, абнормална пролиферација на делови од растението, како што се листовите, стеблата, гранките, деловите од цветот (phyllody), за на крај да доведат до постепено пропаѓање на растенијата (Bertaccini & Duduk, 2009).

Фитоплазмите се регистрирани како нестроги специфични патогени, затоа што често може да се сретнат и кај други растителни видови и фамилии (Bertaccini, 2007; Bertaccini & Duduk, 2009; Maejima et al., 2014). 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 (Boudon-Padieu, 2000, 2003). Основна карактеристика на фитоплазмите кај виновата лоза е брзото ширење и големата економска штета, кои често доведуваат до сушење на лозите и пропаѓање на насадот (Davis & Dally, 2001; Boudon-Padieu, 2000, 2003).

Во природни услови фитоплазмите се пренесуваат со помош на инсекти – цикади од фамилијата *Cicadellidae* (leafhoppers), *Fulgoridae* (planthoppers) и *Psyllidae*, редот *Homoptera*, кои се исхрануваат со растителните сокови од флоемското ткиво од заболено растение и вршат пренос на здрава лисна маса од винова лоза (Osler et al., 1996; Agrios, 1997; Jones, 2002; Marzachi et al., 2004; Weintraub and Beanland, 2006).

Фитоплазмите се наоѓаат во неколку делови кај инсектите вектори, каде што навлегуваат преку усниот апарат при исхрана на инсектите, поминуваат во внатрешноста на инсектот, во цревниот дел и преминуваат во хемолимфата. Од тука фитоплазмите преминуваат во плунковите жлезди, процес кој може да биде во времетраење од неколку недели (Weintraub and Beanland, 2006). Периодот од всмукување на фитоплазмите во телото на инсектот вектор до моментот на достигнување на фитоплазмите до плунковите жлезди (за да може да се пренесуваат) се нарекува латентен период (Weintraub and Beanland, 2006).

Различни инсекти вектори се преносители на различни групи на фитоплазми: *Hyalestes obsoletus* / stolbur (Osler et al., 1996, Agrios, 1997, Jones, 2002), *Scaphoideus titanus* / aster yellows (Danielli et al., 1996; Alma et al., 1997); *Hishimonoides sellatifomis* / mulberry dwarf (Kawakita et al., 2000), *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) / sugarcane white leaf (Hanboonsong et al., 2002), и *Cacopsylla melanoneura* (Tedeschi et al., 2006).

Пренесувањето на фитоплазмите може да се врши и преку процесот на калемење (grafting) од заболена на здрава лоза, преку микропропагација. Освен горенаведените начини на пренесување, фитоплазмите како и некои групи на вируси, може да се пренесуваат преку инфицирано растение – паразитен цветник (*Cuscuta* sp.) (Bertaccini & Duduk, 2009; Kostadinovska et al., 2014). Литературната статистика покажува дека една од најдеструктивните групи на фитоплазми која

се јавува само кај виновата лоза е Flavescence dorée (FD) фитоплазмата, која предизвикува златно жолтење со катастрофални последици за виновата лоза (Danielli et al., 1996; Alma et al., 1997; Boudon-Padieu, 2003; Roggia et al., 2014).

Симптомите предизвикани од FD фитоплазмата, се карактеризираат како намалена виталност на виновата лоза, намалување на родот, а намалениот квалитет на виното се должи на високата киселинска шеќер на содржина на гроздот од инфицирани растенија (Roggia et al., 2014). Без соодветни мерки за заштита, болеста се шири многу брзо и достигнува висок процент, од 80 до 100 % загуба на лозата, за временски период од неколку години. Flavescence dorée има замав во уништување на големи површини под лозови насади во Италија, Франција и Корзика (Davis & Dally, 2001; Boudon-Padieu, 2003; Bertaccini & Duduk, 2009). Нејзиното ширење тешко се спречува и покрај задолжителните програми за контрола. Денес, нејзиното присуство е евидентирано во сите поголеми винарски региони во светот, како што се: Франција, Италија, Шпанија, Словенија и Србија (Avramov Z., 2008).

2.3.1.1. Карактеристики на столбур фитоплазмата (Vois noir или црно дрво)

Во голем број земји *Vitis vinifera* е инфицирана во најголем процент со фитоплазмата Vois noir, која е некултивирана, флоемски ограничена фитоплазма, и припаѓа на столбур-групата (16SrXII-A), уште позната како „*Candidatus Phytoplasma solani*“, што пак, се пренесува со инсект-вектор *Hyalestes obsoletus* Signoret (*Homoptera, Cixiidae*) (Seemuller et al., 1998; Santi, 2013, Quaglino et al., 2013).

Најновите истражувања во областа на одгледувањето на фитоплазмите, независно од растението домаќин, покажале успех во одгледувањето на хранлив медиум (Contaldo et al., 2012).

Претпоставки се дека развојниот пат на фитоплазмите се разгранувал од грам-позитивните бактерии од *Bacillus / Clostridium* група, која припаѓала на класата *Mollicutes*, коишто биле слични со микоплазмите со многу мал геном (680-1.600 kb) (Bertaccini & Duduk, 2009). Како резултат на малата големина на геномот, овие организми развиле независен метаболизам кои им овозможува да преживеат во различна средина како растителен флоем или хемолимфа на инсектите (Weintraub and Beanland, 2006; Bertaccini & Duduk, 2009).

Овој единствен развиен циклус кај оваа група на микроорганизми е компаративен единствено со некои животински или растителни видови на вируси.

Првите симптоми со жолтила кај виновата лоза на територијата на Македонија биле забележани при крајот на седумдесеттите години, а првите пишани податоци со лабораториска потврда за присуството на столбур-фитоплазмата потекнуваат од 2003 година (Seruga et al., 2003). Од тогаш па сè до денес, континуирано се следи состојбата на терен, за контрола на присуството, раширувањето на столбур-фитоплазмата и биолошкото закрепнување на виновата лоза. Во досегашните истражувања, сè уште не се пронајдени комплетно отпорни сорти на виновна лоза спрема фитоплазматските промени (Musetti et al., 2007; Bertaccini & Duduk, 2009; Endershaw et al., 2012).

Растенијата инфицирани со фитоплазми покажуваат низа симптоми кои укажуваат на длабоки промени во нормалната рамнотежа на растителните хормони и регулаторите на порастот (Lee et al., 2000). Особено често се забележуваат симптоми на цветните делови, како на пример: виресценција – озеленување на цветните делови и губење на нормалниот цветен пигмент, филодија (трансформација на цветните делови во листови, како и стерилност на цветовите) (Bertamini et al., 2002; Musetti et al., 2007; Endershaw et al., 2012).

Многу чести и јасно забележливи се промените во бојата на листовите, жолтеене или црвенило на листовите, завиткување на краевите на листовите кон внатре, намалување на големината на листовите, како и скратени интернодии. Појавата на симптомите зависи од видот на фитоплазмата, процентот на инфекција и сортата на виновна лоза, а завршната фаза секогаш резултира со изумирање на растението (Bertaccini & Duduk, 2009).

Од самиот почеток на истражувањата за постоењето на фитоплазмите, дијагностиката се базирала само врз карактеристично присутните симптоми на терен и преку анализа на честиците кои наликуваат на микоплазмите на електронско-микроскопска снимка направена од симптоматичен растителен материјал (Doi et al., 1967; McCoy et al., 1989). Подоцна, во 80-тите години на 20-тиот век, со добивање на поликлонални и моноклонални антитела и клонирање на фитоплазматската ДНК, дошло до значителен напредок во дијагностика на фитоплазматските болести (Bertaccini & Duduk, 2009).

2.3.1.2. Дијагностика на фитоплазмите кај виновата лоза како основа за нивна класификација (групирање)

Од самиот почеток на истражувањата за постоењето на фитоплазмите, дијагностиката се базирала само врз карактеристично присутните симптоми на терен и преку анализа на честиците кои наликуваат на микоплазмите на електронско-микроскопска снимка направена од симптоматичен растителен материјал (Doi et al., 1967; McCoy et al., 1989).

Подоцна, во 80-тите години на 20-тиот век, со добивање на поликлонални и моноклонални антители и клонирање на фитоплазматската ДНК, дошло до значителен напредок во дијагностика на фитоплазматските болести (Lee et al., 1998; Jomantiene et al., 2002).

Со воведување на лабораториските методи на работи – полимеразна верижна реакција и рестрикциски полиморфизам на добиените фитоплазматски фрагменти, разработени се денешните најкористени методи за рутинска детекција и идентификација на фитоплазмите (Namba et al., 1993).

Според поновите литературни податоци (Baric & Dalla-Via, 2004; Jarausch et al., 2004; Torres et al., 2005), во дијагностиката сè повеќе се применува Real time – PCR методот, кој има одредена предност во однос на конвенционалниот PCR метод, пред сè за намалување на ризикот од контаминација и неспецифично умножување.

До денес, развојот на лабораториските методи за детекција на фитоплазмите овозможува неограничени можности, но понекогаш добиените резултати се комплицирани за интерпретација и анализа. Фитоплазмите се идентификувани со помош на полимеразна верижна реакција (PCR-polymerase chain reaction), со амплификација со фитоплазматски генетски прајмери за *16S rRNA* гени и прајмери специфични за фитоплазматската група (Lee et al., 2000).

Овој систем ги има класифицирано фитоплазмите во 19 групи и повеќе од 40 подгрупи и овој начин на класификација станал најстариот сеопфатен и широко прифатен фитоплазматски систем според Lee и сор., објавен дачечната 1998 година.

Денешната класифицирана форма на групите, базирана врз RFLP анализа на *16S rRNA* генот на фитоплазми е прикажан во Табела 1:

Табела 1. Класификација (групирање) на фитоплазмите според 16Sr генот

16 Sr група	Вид на фитоплазма	Референца
16SrI: Aster yellows		
I-A	Aster yellows witches broom (AYWB)	Bai et al., 2006
I-A	Tomato big bud (BB)	Lee et al., 1992
I-B	Onion yellows mild strain (OY-M)	Oshima et al., 2004
I-B	“Ca. <i>Phytoplasma asteris</i> ”	Lee et al., 2004a
I-C	Clover phyllody (CPh)	Lee et al., 2004a
I-D	Paulownia witches’ broom (PaWB)	Lee et al., 2004a
I-E	Blueberry stunt (BBS3)	Lee et al., 2004a
I-F	Aster yellows from apricot –Spain (ACLR-AY)	Lee et al., 2004a
I-I	Strawberry witches’ broom (STRAWB1)	Jomantiene et al., 1998a; b
I-K	Strawberry witches’ broom (STRAWB2)	Jomantiene et al., 1998a; b
I-L	Aster yellows (AV2192)	Lee et al., 2003
I-M	Aster yellows (AVUT)	Lee et al., 2004a
I-N	Aster yellows (IoWB)	Lee et al., 2004a
I-O	Soybean purple stem (SPS)	Lee et al., 2002
I-P	Aster yellows from <i>Populus</i>	Seruga et al., 2003
I-Q	Cherry little leaf (ChLL)	Valiunas et al., 2005
I-R	Strawberry phylloid fruit (StrawbPhF)	Jomantiene et al., 2002a
16SrII: Peanut WB		
II-A	Peanut witches’ broom (PnWB)	Gundersen et al., 1994
II-B	“Ca. <i>P. aurantifolia</i> ” (witches’ broom of lime, WBDL)	Zreik et al., 1995
II-C	Faba bean phyllody (FBP)	Schneider et al., 1995
II-D	Sweet potato little leaf (SPLL)	Gibb et al., 1995
II-E	<i>Pichris echioides</i> phyllody (PEY)	Seemuller et al., 1998a
II-F	Cotton phyllody (CoP)	Martini et al., 2007
16SrIII: X-disease		
III-A	Western X-disease (WX)	Liefting and Kirkpatrick, 2003
III-B	Clover yellow edge (CYE)	Gundersen et al., 1994
III-C	Pecan bunch (PB)	Martini et al., 2007
III-D	Goldenrod yellows (GRI)	Martini et al., 2007
III-E	Spiraea stunt (SPI)	Jomantiene and Davis, 1999
III-F	Milkweed yellows (MW1)	Davis and Dally, 2002
III-G	Walnut witches’ broom (WWB)	Jomantiene and Davis, 1999
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	Jomantiene and Davis, 1999
III-I	Virginia grapevine yellows (VGYIII)	Davis et al., 1998

III-J	Chayote witches' broom (ChWBIII)	Montano et al., 2000
III-K	Strawberry leafy fruit	Jomantiene and Davis, 2000
III-L	Cassava frog skin disease	Alvarez et al., 2009
III-P	Dandelion virescence	Jomantiene and Davis, 2001
III-Q	Black raspberry witches' broom (BRWB7)	Davis et al., 2001
III-T	Sweet and sour cherry (ChD)	Valiunas et al., 2009
III-U	Cirsium white leaf (CWL)	
16SrIV: Coconut lethal yellows		
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	Harrison et al., 2002
IV-B	Yucatan coconut lethal decline (LDY)	Harrison et al., 1994
IV-C	Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	Harrison et al., 1994
16SrV: Elm yellows		
V-A	Ca. <i>P. ulmi</i> (EY)	Lee et al., 2004b
V-B	Ca. <i>P. ziziphi</i> (Jujube witches' broom, JWB-G1)	Jung et al., 2003a
V-C	Alder yellows (ALY882)	Lee et al., 2004b
V-C	Flavescence doree (FD-C)	Daire et al., 1992
V-D	Flavescence doree (FD-D)	Torres et al., 2005
V-E	Rubus stunt (RuS)	Seemuller et al., 1998a
16SrVI: Clover proliferation		
VI-A	Ca. <i>P. trifolii</i> (CP)	Hiruki and Wang, 2004
VI-B	<i>Fragaria multicipita</i>	Jomantiene et al., 1998a
VI-C	Illinois Elm Yellows (ILEY)	Jacobs et al., 2003
16SrVII: Ash yellows		
VII-A	Ca. <i>P. fraxini</i> (AshY)	Griffiths et al., 1999
VII-B	Erigeron witches' broom	Barros et al., 2002
16SrVIII: Loofah witches' broom		
VIII-A	Loofah witches' broom	Ho et al., 2001
16SrIX: Pigeon pea witches' broom		
IX-A	Pigeon pea witches' broom	Davis and Dally, 2000
IX-B	Ca. <i>P. phoenicium</i>	Verdin et al., 2002
IX-C	Naxos periwinkle virescence	Heinrich et al., 2001
16SrX: Apple proliferation		
X-A	Ca. <i>P. mali</i>	Seemuller and Schneider, 2004
X-B	Ca. <i>P. prunorum</i>	Seemuller and Schneider, 2004
X-C	Ca. <i>P. pyri</i>	Seemuller and Schneider, 2004
X-D	Ca. <i>P. spatii</i>	Marcone et al., 2004a
X-E	Black alder witches'- broom BAWB (Buckthorn witches' broom BWB)	Seemuller et al., 1994

16SrXI: Rice yellow dwarf		
XI-A	Ca <i>P. oryzae</i>	Jung et al., 2003b
XI-B	Sugarcane white leaf SCWL	Lee et al., 1997b
XI-C	Leafhopper-borne BVK	Seemuller et al., 1994
16SrXII: Stolbur		
XII-A	Stolbur STOL (<i>Capsicum annum</i>)	Seemuller et al., 1994
XII-B	Ca. <i>P. australiense</i> (Australian grapevine yellows, AUSGY)	Davis et al., 1997
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence		
XIII-A	Mexican periwinkle virescence PMV	Dally et al., 2000
XIII-B	Strawberry green petal (Florida)	Jomantiene et al., 1998b
16SrXIV: Bermudagrass white leaf		
XIV-A	Ca <i>P. cyanodontis</i>	Marcone et al., 2004b
16SrXV: Hibiscus witches' broom		
XV-A	Ca <i>P. brasiliense</i>	Montano et al., 2001
16SrXVI: Sugarcane yellow leaf syndrome		
XVII-A	Ca <i>P. graminis</i>	Arocha et al., 2005
16SrXVII: Papaya bunchy top		
XVII-A	Ca <i>P. caricae</i>	Arocha et al., 2005
16SrXVIII: American potato purple top wilt		
XVIII-A	Ca. <i>P. americanum</i>	Lee et al., 2006
16SrXIX: Cassia witches' broom		
XIX-A	Ca <i>P. omanense</i>	Al-Saady et al., 2008

За идентификација на одредена фитоплазматска секвенца (серија), се користат и специфични прајмерски групи, како што е за генот за издолжување – фактор – Tu (*tuf*), други рибозомални гени, *23S rDNA* и *16/23S rDNA* интергенски регион, познат како рибозомална DNA секвенција (низа) - (non ribosomal DNA sequences), која се користи како самостојна или во комбинација со *16S rDNA* за утврдување на фитоплазматската разлика (Gundersen et al., 1996; Smart et al. 1996; Vibio et al., 1996; Boudon-Padieu et al., 1997; Daire et al., 1997a; Schneider et al., 1997; Lee et al., 1998; Marcone et al., 2000).

Како што може да се види од Табела 1, фитоплазмите се причинители на голем број на растителни болести, кај илјадници растителни видови, вклучувајќи важни видови во исхраната, градинарски и овошни култури, винова лоза, декоративни растенија како и голем број на дрвенести растенија (Ahrens et al., 1993; Andersen et al., 1998; Davis et al., 1998; Errampalli et al., 1991; Zreik et al., 1995).

Листата на нови болести кај различни култури, предизвикани како резултат на присуство на фитоплазми, постојано се зголемува (пр. болеста кај цитруси - citrus

Huanglongbing disease предизвикана од aster yellows-related phytoplasmas во Кина (16SrI) (Chen et al., 2008), како и вештеркини метли кај грашокот предизвикани од фитоплазма - pigeon pea witches' broom-related phytoplasmas (16SrIX) во Бразил (Teixeira et al., 2009). Производството на ориз особено е загрозувано во неколку региони во југоисточна Азија, како резултат на причинител од групата на фитоплазми кој предизвикува жолта заостанатост во порастот (rice yellow dwarf) (Bertaccini, 2007). Исто така, од понов датум е и пријавата за фитоплазма, како фитоплазматски причинител на вештеркини метли кај компирот и пченката во Централна и Јужна Америка (Bertaccini, 2007).

Економските загуби кои се предизвикани како резултат на присуство на фитоплазмите кај различни култури се особено големи, од причина што фитоплазмите директно делуваат на приносот. Честопати, кај заразените растенија со фитоплазми нема ниту производство ниту приноси (Bertaccini, 2007).

Затоа, поради големите економски загуби, увозот на растителни видови од страна, во секоја држава треба да биде регулиран од карантинската служба (Lee et al., 2000; Bertaccini, 2007).

2.3.2. Поважни вирусни болести на виновата лоза

Освен фитоплазмите, значајни промени кај виновата лоза во приносот предизвикуваат и вирусите, како посебна група на патогени причинители (Marteli & Boudon-Padieu, 2006).

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 (Marteli & Boudon-Padieu, 2006).

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 (Marteli & Boudon-Padieu, 2006).

Во најголем број случаи, промените кои настануваат кај виновата лоза предизвикани од вирусен причинител, зависат од видот на вирусот, осетливоста на сората на виновата лоза, начинот на ширење на вирусите итн. (Marteli & Boudon-

Radieu, 2006). Според статистички податоци за појавата на вирусите кај виновата лоза (Hewitt, 1970), 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 филоксерата (Hewitt, 1970).

Поради големата осетливост на европската лоза, решението било пронајдено со калемење на осетливите европски сорти на американска лозна подлога која се покажала како отпорна на филоксерата. На овој начин се овозможило брзо раширување на вирусите, затоа што од еден заразен матичен чокот од европската лоза се добивале неколку заразени калеми (Walter & Martelli, 1996). Особено големите економски штети кај лозовите насади настануваат како резултат на неконтролирана размена и промет на лозов саден материјал во милионски количества (Walter & Martelli, 1996).

Масовното ширење на вирусите кај виновата лоза, покрај со садниот материјал, настанува и како резултат на векторите, и тоа главно на ектопаразитните нематоди од редот *Dorylaimidae* (Trudgill, 1983; Walter & Martelli, 1996).

До денес познати се околу 70 групи вируси како главни причинители на болести кај виновата лоза (Sforza, 2003). 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 вирусите кои директно влијаат врз самиот раст на виновата лоза, квалитетот и квантитетот, а тоа се:

1. Вирус на инфективна дегенерација на листот кај виновата лоза (*Grapevine fanleaf virus* – GFLV) – перовирус; според најновата класификација припаѓа на: ред *Picornavirales* → фам. *Secoviridae* → потфам *Comovirinae* → род *Nepovirus* → вид. *Grapevine fanleaf virus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2013);
2. Вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза (*Grapevine leafroll virus* – GLRaV) – *closterovirus* – групи GLRaV-1 – GLRaV-10, (кај нас застапени GLRaV-1 и GLRaV-3);
3. Комплекс на набраност на дрвото кај виновата лоза (*Grapevine virus-A–B–D*, ред *Tymovirales* → фам. *Betaflexiviridae* → род *Vitivirus*) (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2013).

Според нашиот пропишан правилник за трговија со материјал за вегетативно размножување на виновата лоза (Службен весник бр. 116, август 2011), освен наведените групи на вируси проишани од Интернационалното здружение, лозовите насади наменети за производство на почетен материјал за размножување не треба да ја содржат и следнива група на штетни организми:

- вирус на мозаикот на гушарката на листот на виновата лоза (*Arabis mosaic virus* ArMV), (според најновата класификациона шема припаѓа на ред *Picornavirales* ->фам. *Secoviridae* -> потфам. *Comovirinae* -> род *Nepovirus*) (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2013).

Табела 2. Поважни причинители на вирусни заболувања на виновата лоза

Фамилија	Карактеристики	Вирус	Симптоми	Вектор
<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus</i> Subgroup I	<i>Grapevine leafroll associated virus</i> -4, 5, 6, 9	Завиткување на листовите	<i>Pseudococcidi</i>
	Subgroup II	GLRaV-Pr, -De, -Car, -1, -3	Завиткување на листовите	Coccidi / <i>Pseudococcidi</i>
	<i>Closterovirus</i>	GLRaV-2	Некомпатибилност на калемот	Непознат
	<i>Velarivirus</i>	GLRaV-7	Некомпатибилност на калемот	Непознат
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Vitivirus</i>	GVA / GVB / GVC / GVD / GVE		<i>Coccidi</i> <i>Pseudococcidi</i>
	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine Rupestris stem pitting associated virus</i> - GRSPaV	Некроза низ нерватурата	Непознат
	<i>Trichovirus</i>	<i>Grapevine berry inner necrosis virus</i> – GRVFV <i>Grapevine Pinot gris virus</i> - GPGV		Непознат
<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i> GFKV <i>Grapevine red globe virus</i> - GRGV	Латентност	Непознат
	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine Rupestris vein featherin virus</i> – GFVfV <i>Grapevine asteroid mosaic virus</i> – GAMV <i>Grapevine Syrah virus</i> I-GSyV-I	Свездест мозаик	Непознат

продолжеток на табела 2

Secoviridae	Nepovirus Подгрупа А	<i>Arabis mosaic virus</i> - ArMV	Дегенеративни промени	Нематода	
		<i>Grapevine fanleaf virus</i> – GFLV	Дегенеративни промени	Нематода	
		<i>Grapevine deformation virus</i> - GDefV	Дегенеративни промени	Непознат	
		<i>Raspberry ringspot virus</i> - RpRSV	Дегенеративни промени	Нематоди	
		<i>Tobacco ringspot virus</i> - TRSV	Распаѓање на ткивото / Дегенеративни промени	Нематода	
	Nepovirus Подгрупа В	<i>Artichoke Italian latent virus</i> – AILV	Дегенеративни промени	Нематоди	
		<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> – GCMV	Дегенеративни промени	Непознат	
		<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> - GARMV	Дегенеративни промени	Непознат	
		<i>Tomato black ring virus</i> - TBRV	Дегенеративни промени	Нематода	
	Nepovirus Подгрупа С	<i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i> – GTRSV	Дегенеративни промени	Непознат	
		<i>Cherry leafroll virus</i> GLRV	Дегенеративни промени	Непознат	
		<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i> – GBLV	Дегенеративни промени	Непознат	
		<i>Tomato ring spot virus</i> – ToRSV	Дегенеративни промени	Нематоди	
		<i>Peach rosette mosaic virus</i> – PRMV	Дегенеративни промени	Нематоди	
		<i>Blueberry leaf mottle virus</i> - BBLMoV	Дегенеративни промени	Непознат	
	Sadwavirus	<i>Strawberry latent ringspot virus</i> – SLRSV	Дегенеративни промени	Нематода	
	Bromoviridae	Ilarvirus	<i>Grapevine angular mosaic virus</i> – GAMV	Мозаичност на листовите околу нерватурата	Непознат
			<i>Grapevine line pattern virus</i> – GLPV	Мозаичност на листовите околу нерватурата	Непознат

2.3.2.1. Вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза (*Grapevine leafroll associated virus* – GLRaV)

За прв пат овој вирус е откриен далечната 1958 година во Калифорнија, каде што било забележано дека вирусот предизвикува дисколорација на плодовите кај црвените сорти на винова лоза (Rowhani & Uyemoto, 1997).

Припаѓа во фамилијата *Closteroviridae*, во родот *Ampelovirus* (ICTV, 2011) каде што припаѓаат девет асоцијативни видови.

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 (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004). Исто така, симптомите може да вклучат и свиткување на листовите кон внатрешната страна, промена на бојата (поцрвенување кај црвените/црните сорти, пожолтување (хлорозност) кај белите сорти) и некротизирање на одредени делови од листот, и разрушување на флоемот (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004).

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 (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004). 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. (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004).

Карактеристики на вирусот. Вирусните честичи претставуваат искривени филаменти со должина од 1800 до 2200 nm (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004).

Фамилијата *Closteroviridae* има три рода:

1. *Closterovirus*: вирионот најчесто е 1250 - 2200 nm во должина со содржина од единичен молекул од линеарна, единична РНК со големина 15.5 – 19.3 kb (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2011);
2. *Ampelovirus*: вид *Grapevine leafroll virus 3*, големина на геном 16.9 - 19.5 kb;
3. *Crinivirus*: 15.3 – 19 kb големина, вид *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV).

Овие вируси се генерално локализирани во васкуларното растително ткиво (флоем), и поради тоа често се пренесуваат преку краење или калемење, преку ножиците од заболено растително ткиво на здраво (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004). Начинот на пренесување на вирусот се врши со помош на неколку видови лисни вошки од фамилиите *Pseudococcidae* (пр. *Pseudococcus maritimus*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus viburni*) и *Coccoidea*, на семиперзистентен начин (Табела 3). Со помош на лисните вошки се пренесуваат GLRaV-1, -3, -4, -5 и -9, додека за останатите вируси потенцијални вектори - преносители се непознати (Табела 3).

Табела 3. Асоцијативни групи на GLRaV и нивни вектори

Вирус	Вектор	Извор
GLRaV-1	<i>Heliooccus bohemicus</i> Sulc.	Sforza et all., 2000
	<i>Phenacoccus aceris</i> Sigh.	Sforza et all., 2000
	<i>Parthenolecanium corni</i> Bouche	Fortusini et all., 1997; Sforza et all., 2000
	<i>Neopulvinaria innumerabilis</i> Rath.	Fortusini et all., 1997
	<i>Planococcus ficus</i> Sign.	Tsai et all., 2010
GLRaV-2	<i>Pseudococcus longispinus</i> Targ.	Golino et all., 1995
	<i>Pseudococcus affinis</i> Mask.	Golino et all., 1995
GLRaV-3	<i>Pulvinaria vitis</i> L.	Fortusini et all., 1997
	<i>Heliooccus bohemicus</i> Sulc.	Sforza et all., 2000
	<i>Phenacoccus aceris</i> Sign.	Sforza et all., 2000
	<i>Pseudococcus longispinus</i> Targ.	Petersen & Charles, 1997; Sforza et all., 2000; Tanne et all., 1989
	<i>Pseudococcus affinis</i> Mask.	Golino et all., 1995
	<i>Pseudococcus viburni</i> Sign.	Golino et all., 1998
	<i>Pseudococcus maritimus</i> Ehrh.	Golino et all., 1998
	<i>Pseudococcus calceolariae</i> Mask.	Petersobn & Charles, 1997; Sforza et all., 2000
	<i>Planococcus ficus</i> Sign.	Rosciglione & Charles, 1997; Tsai et all., 2010
	<i>Planococcus citri</i> Risso	Naima & Dhouibi Chabbouh, 2002; Sforza et all., 2000
GLRaV-4	<i>Planococcus ficus</i> Sign.	Tsai et all., 2010
GLRaV-5	<i>Pseudococcus longispinus</i> Targ.	Golino et all., 2002
	<i>Planococcus ficus</i> Sign.	Tsai et all., 2010
GLRaV-9	<i>Pseudococcus longispinus</i> Targ.	Tsai et all., 2010
	<i>Planococcus ficus</i> Sign.	Tsai et all., 2010

Оваа група вируси се одржува во заразен материјал (пупки, подлога, калеми), и поради ова распространувањето на големи далечини се одвива преку заразениот саден материјал (Harmon & Snyder, 1946; Scheu, 1935).

Досега не се забележани отпорни сорти европска лоза или подлога. Штетноста која ја предизвикуваат овие вируси зависи од сортата на винова лоза, климатските услови, пристапот на виновата лоза до хранливи материји, како и видовите на вируси кои ја инфицираат лозата (Marteli & Boudon-Padieu, 2006).

За GLRaV-3 потврдено е дека делува врз намалување на содржината на шеќери и титрациската киселост (Borgo & Angelini, 2002; Cabaleiro & Seruga, 1996). После отстранување на вирусот, оздравените растенија покажуваат подобри квалитативни и квантитативни својства (Mannini & Credi, 2000).

Симптомите предизвикани од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, главно се забележуваат на листовите и гроздовите, а почетокот на развој на симптомите може да се забележи во средината на летото. Кај црвените сорти на листовите се појавува црвенило меѓу нерватурата. На почеток црвенилото е дифузно и слабо изразено, но постепено се шири, станува потемно, па во периодот пред започнување на есента може да ја зафати целата површина на листот, освен просторот околу нерватурата кој останува зелен.

Освен промената на бојата, доаѓа и до морфолошка промена со свиткување на листот спрема опачината, и таквите симптоматични листови стануваат лесно кршливи (Martelli & Boudon-Padieu, 2006). Кај белите сорти, симптомите на промената на бојата и совивање на листовите, се послабо изразени и потешки за следење. Во случај кога ќе се забележат симптомите, при крајот на летото листовите имаат жолта боја која постепено ја зафаќа целата површина на листот, освен делот околу нерватурата, како и кај црвените сорти каде што останува зелен. Овие симптоми кај белите сорти за почеток се јавуваат кај најстарите листови (Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

2.3.2.2. Вирус на инфективна дегенерација кај виновата лоза (*Grapevine fanleaf virus* – GFLV)

Класификација: ред *Picornavirales*-> фам. *Secoviridae*->потфам. *Comovirinae*-> род. *Nepovirus*-> вид. *Grapevine fanleaf virus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2013).

Познат вид од оваа фамилија е *Tobacco ringspot virus* (Murphy et al., 1995). Поради брзината на раширување и големото економско значење, GFLV е еден од најзначајните вируси кај виновата лоза. Сите култури и хибриди можат да бидат домаќини на GFLV (Bovey et al., 1990; Martelli & Savino, 1990; Raski et al., 1983). Инфекциите од овој вирус можат да предизвикаат брзо раширување во растението и изумирање или за подолг временски период редукција на растот.

Симптомите варираат во зависност од видот на вирусот и од осетливоста на сортата на винова лоза. Генералните симптоми се манифестираат како системичен зелен или жолт мозаик, прстенести и линиски промени низ листовите. Гроздовите се редуцирани во големината и бројноста (Martelli & Boudon-Padieu, 2006).

Вирусот се пренесува преку нематодите: *Xiphinema index* и *X. italiae*. Поради начинот на пренесување, инфицираните растенија обично се среќаваат во кружни области во лозовиот насад (McFarlane et al., 2002; Taylor & Raski, 1964; Димовска и Белески, 2014). Најчесто пренесување на вирусот на далечина, може да се случи преку транспорт на инфициран растителен материјал и калем или подлога за калем (Andret-Linket al., 2004; Димовска и Белески, 2014).

Освен тоа што како главна причина за намалување на приносот и квалитетот на грозјето се јавуваат биотските фактори, постојат и абиотски фактори кој можат да ги предизвикаат истите или слични симптоми, со помало или поголемо влијание врз приносот.

2.3.2.3. Лабораториски методи за дијагностика на вирусните болести на виновата лоза

Кога се проучуваат лабораториските можности за дијагностицирање на вирусните промени кај виновата лоза, изборот на методологијата се базира врз најсовремените техники на лабораториска работа, но наедно и едни од најосетливите кога се работи за интерпретација на резултатите (Borgo, 1990; Gugerli, 2009). Како едни од најчесто користените методи при дијагностиката на вирусите се: серолошка идентификација - ELISA тест („enzyme-linked immunosorbent assay“) и молекуларна идентификација или реверзно транскриптивна – полимеразно верижна реакција (RT-PCR „reverse transcriptase – polymerase chain reaction“) (Borgo, 1990; Gugerli, 2009).

При серолошка дијагностика, се користат поликлонални и моноклонални антитела, од кои поголем број се комерцијално достапни (Gugerli, 2009). Како најдобар извор на антигени за серолошка детекција кај сортата *Vitis vinifera*, се користи лисно ткиво или нерватура од постари листови, како и дел од флоемското ткиво (Borgo, 1990). За да се избегнат лажно негативните резултати, потребно е да се работи со мешани примероци (Rowhani & Uyemnoto, 1997).

Една од често користените лабораториски техники на полимеразна верижна реакција во молекуларната биологија, при детекција на РНК експресијата е реверзната транскриптаза (Saldarelli et al., 1998; Routh et al., 1998).

2.4. Мерки за заштита и контрола на фитоплазматските и вирусните болести на виновата лоза

Најкорисна мерка за заштита од фитоплазматски и вирусни промени кај виновата лоза е употребата на тестиран саден материјал т.е. производство на саден материјал преку строга сертификациска програма, со примена на напредни серолошки и молекуларни дијагностички методи (Cabaleiro, 2009; Службен весник бр. 116, август 2011; Димовска и Белески, 2014). Расадниците задолжително треба да бидат изложени на строги контроли, така што ќе се спречи инфекцијата на сертифицираните матични растенија, особено на подлогата која многу често не покажува симптоми на инфекција (Cabaleiro, 2009).

Кога се работи за контрола на вирусните појави кај виновата лоза, отстранувањето на вирусите од растителниот материјал може да се постигне со примена на конвенционални (Goheen & Luhn, 1973) или модифицирани термотерапевтски методи (Stellmach, 1980), или примена на метод на култура на апикалниот меристем во *in vitro* услови (Barlass et al., 1982).

Во случај на спроведување на терапија против вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, оздравување на растителниот материјал може да се постигне со продолжена терапија (60 до 120 дена на 38 °C), термотерапија *in vitro*, според Галзиев метод (Valat & Mur, 1976) и култура на меристемот *in vitro* (Barlass et al., 1982).

Интересен, но сè уште недоволно проучен аспект на односот меѓу патогените и растенијата домаќини, претставува процесот на заздравување „recovery“ кој претставува губење на симптомите кај претходно маркирани симптоматични растенија (Santi et al., 2013).

Заздравените растенија развиваат механизам на отпорност кој се однесува на ултраструктурната и биохемиска промена во спроводните садови (Santi et al., 2013).

2.5. Преглед на досегашните истражувања за фитоплазматските и вирусните промени во Република Македонија

Кога ќе се спомене поимот фитоплазматски или вирусни промени кај виновата лоза, кај нас на терен, сè уште агрономите, лозарите, одгледувачите на винова лоза, ги прифаќаат овие поими со резерва, верувајќи дека кај нас сè уште нема таква опасност. Меѓутоа, реалноста на терен е сосема поинаква, во некои региони и алармантна, како резултат на појава и брзо ширење на овие две групи на патогени, кои опишани во рамките на оваа дисертација се именувани како флоемски ограничени патогени.

Фитоплазматските промени кај виновата лоза на терен кај нас, за прв пат биле забележани при крајот на седумдесеттите години, при здравствен преглед на лозовите насади во Скопскиот и Кумановскиот регион (усна комуникација со проф. Пејчиновски). За жал, во тој период лабораториската дијагностика не била на завидно ниво, па затоа можност за нивна потврда била одложена сè до 2000 год., кога Митрев и сор. ги извршиле првите подетални теренски истражувања, но бил направен и првиот молекуларен доказ за присуството на фитоплазмите во Македонија. Во рамките на овие првични подетални истражувања, биле земени само два региона (Скопје и Велес), со истражување на фитоплазмите кај двете најосетливи сорти (Шардоне и Вранец) (Seruga et al., 2003).

Во периодот од 2006 година па до денес, во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, при Земјоделскиот факултет, УГД - Штип, се прават најсовремени молекуларни испитувања за дијагностика на видот на фитоплазмата и разлики во геномската структура на фитоплазмите (Mitrev et al., 2013, 2011, 2009, 2008, 2007).

За појавата и присуството на вирусните промени кај виновата лоза во Македонија, податоците потекнуваат од далечните седумдесетти години, кога Пејчиновски правел истражувања на симптоматологијата и објаснување на различните групи на вируси. Првите податоци за појавата на вирусот на заразна дегенерација кај виновата лоза се однесуваат на истражувачкиот период од 1971 до 1973 година, објавени од страна на Пејчиновски (1975).

Анализите кои биле направени за идентификација на заразната дегенерација се однесувале на симптоматолошка идентификација, како и механичка инокулација на тест-растенија и примена на серолошки тестови. Сите понатамошни истражувања спроведени за дијагностика на вирусните промени кај

виновата лоза, се базираат врз симптоматологијата и механичко пренесување на вирусот (Пејчиновски, 1975, 1979).

За флоремските вирусни патогени, меѓу кои спаѓа и групата која беше предмет на наше проучување (вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза), досега не постојат пишани податоци, и со ова истражување ќе направиме една мапа за присуство/процент на застапеност, дистрибуција, лабораториска идентификација на видот на вирусните флоремски промени кај нас.

3. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Виновата лоза како култура е многу атрактивна и широко распространета на територијата на Република Македонија, а во поново време сè повеќе се шири ареалот на распространување и подигање на нови лозови насади (Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015).

Меѓутоа, оваа култура ја следат голем број патогени промени, кои се јавуваат почесто или поретко зависно од климатските промени. Посебно значајни, особено од економски аспект ќе ги потенцираме фитоплазматските и некои вируси промени кои припаѓаат на т.н. група на флоемски патогени (ги населуваат флоемските спроводни садови).

Причината за нивната појавата и засилено ширење, се сè уште нејасно утврдени и дефинирани. За овие групи на патогени, од научен и комерцијален аспект, може да ги дефинираме следниве генерални карактеристики:

- фитоплазмите директно влијаат врз сушење на гроздот и изумирање на лозата, додека вирусните заболувања делуваат на виталноста на самото растение и на намалување на шеќерните единици во гроздот (Lee et al., 2000; Bertaccini, 2007).

За да може навремено да се заштити виновата лоза, за да се добие поголем и поквалитетен принос, а со тоа и да се добие појасен преглед за состојбата со лозовите насади на територијата на Македонија, оваа дисертација ги има јасно прецизирано следниве цели:

1. Теренска анализа на поголемите лозарски локалитети со лозарски единици, на територијата на Република Македонија (Штипски, Велешки, Кумановски, Св. Николски, Радовишки, Струмички, Скопскиот регион, тиквешко виногорје (Неготинско–Кавадаречки, Валандовски, Гевгелиски регион) – фотодокументирање, запис на податоци од терен и собирање материјал за лабораториска анализа;
2. Анализа на повеќегодишни (стари) лозови насади за определување на фитоплазматскиот и вирусниот статус – процент на инфекцијата, врз основа на маркираните парцели (10 реда по 100 лози на една парцела на сорта);
3. Анализа на едногодишни (млади) лозови насади за проверка на фитоплазматскиот и вирусниот статус;

4. Експериментално маркирање на парцели (Штипско – м.в. Ежово, Св. Николско – с. Пеширово, Велешко – м.в. Сопот) за следење на можноста за биолошко закрепнување на лозата (губење на симптомите) (recovery);
5. Испитување на лозовите насади на различна надморска височина, за да се испитаат надворешните услови - влијанието врз осетливоста на сортите спрема болестите;
6. Детерминација на присутните патогени во испитуваните локалитети со помош на современи лабораториски техники - молекуларни и серолошки анализи, типизација на видот на фитопламите и вирусите;
7. Проучување на начинот на пренесување на фитоплазмите, преку контрола на плевелната вегетација од симптоматологија и фитоплазматски статус;
8. Влијание на агротехничките мерки и надворешните услови врз здравствената состојба на лозата – споредба на процентот на инфекција следено во истражуваниот период, 2008-2013 година.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

4.1. Колекционирање на материјалот за анализа во лозовите насади во Република Македонија

Виновата лоза како една од широко распространетите култури на територијата на нашата земја, домаќин е на голем број повеќе или помалку проучени патогени кои предизвикуваат помали или поголеми штети на квалитетот и квантитетот на грозјето, зависно од видот на патогенот (Lee et al., 2000; Martelli, 2003; Sforza, 2003; Carisse et al., 2006; Bertaccini, 2007; Kube et al., 2012; Santi et al., 2013; Schneet et al., 2013; Kostadinovska et al., 2014).

За да може да се добие вистинска слика за состојбата со појавата на фитоплазматските и 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

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

Освен примероците од виновата лоза, на поголем дел од локалитетите се собирани и примероци од околната вегетација, вклучувајќи голем број плевелни растенија за кои претходно постојат податоци дека можат да бидат домаќини на фитоплазмите.

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 задолжитено 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:

- после 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 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°C за период од неколку месеци (додека да се направат анализите) или на температура од – 80°C, за подолг временски период.

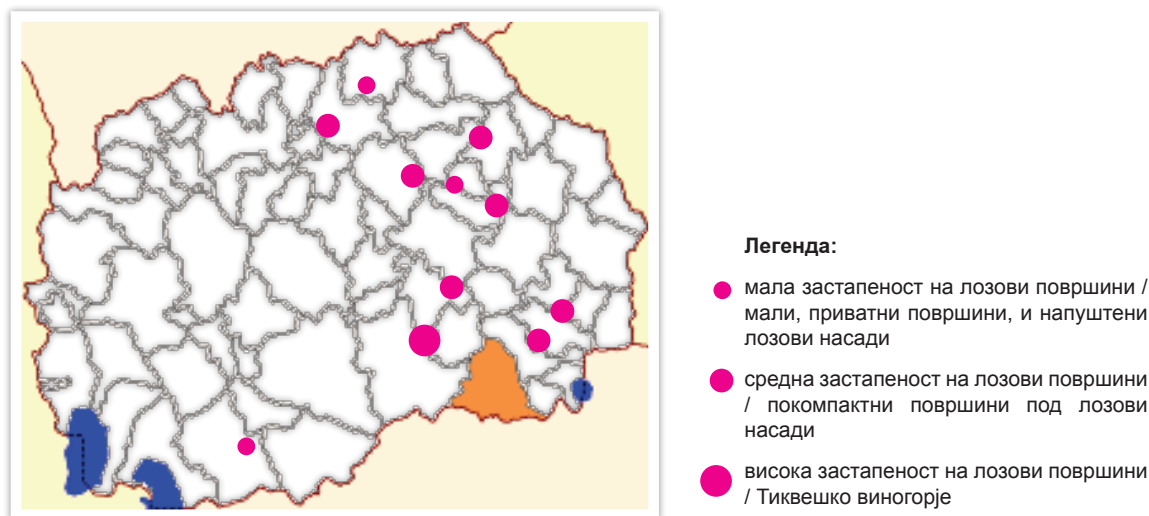
Во оваа докторска дисертација се презентирани резултатите од шестгодишен период (2008-2013) на континуирано следење на состојба на терен и компаративни лабораториски анализи на испитуваниот материјал.

Во Табела 4 е даден приказ на теренските анализи на различни локалитети и лозарски единици, во периодот од 2008 до 2013 година:

Табела 4. Теренска анализа на различни локалитети и лозарски единици, во периодот од 2008 до 2014

Локалитет	Лозарска единица	Година на испитување
Штип	с. Три чешми	2008-2010
	м.в. Ежово	2008-2010
	м.в. Врпка	2008
	м.в. Рајкова чука	2008
	с. Криви Дол	2008-2012
	с. Ново Село	2009
с. Караорман	м.в. Балабанци	2010
с. Аргулица	м.в. Тупанец	2010
с. Сарчиево	с. Сарчиево	2008-2013
Свети Николе	с. Ерџелија	2009
с. Амзабегово / с. Пеширово	с. Амзабегово / с. Пеширово	2012-2013
с. Пеширово	с. Пеширово	2012-2013
с. Црнилиште	с. Црнилиште	2012-2013
Овче Поле	Приватно, покрај пат	2012-2013
Велес	м.в. Сопот	2008, 2010
Тиквешко виногорје	Кавадарци, Гоце Делчев, П.Е. Љубаш	2008
	с. Долни Дисан	2008
	Кавадарци, м.в. Крњево	2011-2013
	Демир Капија	2011-2013
	Кавадарци, с. Раец	2013
	Неготино, Ило Виларов	2011
Куманово	Кумановско	2010
Валандово	с. Јосифово	2009-2012
Струмица	с. Хамзали	2008-2010
Гевгелија	м.в. Авлаки	2011-2012
Скопје	м.в. Четири патишта Маркова Сушица (Сковин)	2011-2012
Битола	Битолско, Лозар	2011

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 испитуваните лозови насади во периодот 2008-2013 година

4.1.1. Активности во тек на теренската анализа

Период на следење на состојбата на терен: мај/јуни – септември/октомври, временски период: 2008-2013 година.

Теренска анализа: При теренските анализи, ги следевме симптомите кај различни сорти винова лоза (бели и црни / црвени, трпезни и вински). Врз основа на претходни сопствени сознанија (Mitrev et al., 2007, 2008, 2009; Seruga et al., 2003) и искуствата на други автори (Daire et al., 1993; Bertaccini et al., 1995; Boudon-Padieu, 2000; Angelini et al., 2001; Botti & Bertaccini, 2007; Quaglino et al., 2009), во овие анализи фокусот беше даден на промената во бојата на листовите кај набљудуваните растенија.

Колекционирање на растителниот материјал за анализа – лисна маса се вршеше на тој начин што симптоматични листови до 10 од поединечна лоза се прибираа од сомнителни лози и тој материјал се третираше како репрезентативен број за една лоза.

Исто така, за различни корелациони анализи, вршевме колекционирање на материјал од едногодишните симптоматични лозови калеми. Посебен акцент, исто така, беше даден и на увезениот садниот материјал. Во текот на истражувањето беше колекциониран и материјал од плевелна вегетација која се јавува како примарен домаќин на столбур-фитоплазмата. За одредување на процентот на

инфекција (оценување на интензитетот на заболувањето), од секоја испитувана парцела беа следени по 10 реда (со 100 лози во ред). При секое прибирање на растителен материјал, беше водена соодветна евиденција (Табела 5).

Табела 5. Евиденција на карактеристиките на терен

Град	Локалитет	Географска локација (надморска висина)	Сорта на винова лоза	Година на подигнување на лозовиот насад	Датум на собирање на материјалот	% на инфекција	Потекло на саден материјал

Забелешка: Користење на GPS за точно одредување на координатите.

При следењето на симптомите и запишување на карактеристиките на собраниот материјал за анализа, во опис на интензитетот на целокупните симптоми на терен, користени беа следниве ознаки, опишани во Табела 6:

Табела 6. Опис на интензитетот на симптомите на собраниот материјал за анализа

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	/

Ова бележење на симптоматологијата од терен, имаше многу важна улога при лабораториската дијагностика на патогенот, односно при споредба на теренските и лабораториски анализи и интерпретација на добиените резултати, како и за оценувањето на интензитетот на заболувањето за целиот период на истражувањето.

Врз основа на бројот на следени растенија (од секоја сорта во испитуваниот локалитет беа следени по 100 растенија на 10 реда), се пресметуваше индексот на заболувањето според формулата на Mc-Kinney (1923) (Табела 7).

Табела 7. Оценување на интензитетот на заболување (10 реда по 100 лози)

Сорта / опис на симптоми од терен:									
Година на анализа:									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Во наредните табели (Табела 8 до Табела 19), дадени се сите позначајни карактеристики водени во текот на теренските анализи. Значењето на интензитетот на симптомите на терен се опишани во Табела 6.

Табела 8. Колекционирани примероци во сезона 2008, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Штип	с. Три чешми	41°46'21.46"N 22°8'8.78"E 300 m н.в.	Смедеревка	15	++
Штип	с. Ежово	41°46'56.18"N 22°7'58.03"E 314 m н.в.	Вранец хамбург	31	++
Штип	м.в. Врпка	41°46'24.23"N 22°13'37.44"E 387 m н.в.	Смедеревка	12	++
Штип	м.в. Рајкова чука	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 381 m н.в.	Вранец	10	+++
Штип	с. Криви дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 m н.в.	Вранец	3	+++
с.Сарчиево	с.Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 m н.в.	Вранец	15	+++
			Италијански ризлинг	1	++
			Рајнски ризлинг	1	+
с.Караорман	м.в. Балабаница	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 337 m н.в.	Вранец	8	++
			Шардоне	1	++
			Плавац мали	5	++
			Црн бургундец	8	++
Струмица	с. Хамзали	41°46'08.50"N 22°13'10.22"E 280 m н.в.	Вранец	16	+++
			Мерло	13	++
			Каберне совињон	12	++
			Сирах	1	+?

продолжување на табела 8.

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Неготино	с. Долни Дисан	41°25'24.44"N 22°05'37.40"E 352 m н.в.	Хамбург	11	+++
			Палер мишел	2	+
			Траминец	3	+?
			Вранец	23	+++
			Шардоне	5	++
Велес	м.в. Сопот	41°46'37.87"N 21°44'33.48"E 235 m н.в.	Шардоне	13	+++
			Темјаника	2	+?
			Рајнски ризлинг	9	+++
Кавадарци	П.Е. Љубаш	41°25'52.97"N 21°59'43.78"E	Шардоне	21	+++
			Вранец	14	+++
			Мерло	1	++
			Рајнски ризлинг	2	++

* вкупно примероци за анализа 263.

Табела 9. Колекционирани примероци во сезона 2009, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Штип	с. Ново Село	41°44'5.72"N 22°8'8.78"E 270 m н.в.	Вранец	2	++
Штип	с. Ежово	41°46'56.18"N 22°7'58.03"E 314 m н.в.	Вранец	15	+++
Штип	с. Три чешми	41°46'21.46"N 22°8'8.78"E 300 m н.в.	Вранец	1	++
с. Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 m н.в.	Вранец	12	+++
Штип	с. Криви Дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 m н.в.	Вранец	3	+++
			Смедеревка	1	++
Кочани	м.в. Стари лозја	41°54'17.79"N 22°24'43.38"E	Вранец	3	+++
			Смедеревка	1	+?

продолжување на табела 9.

Свети Николе	с. Ерџелија	41°50'16.59"N 22°0'55.68"E 255 m н.в.	Вранец	8	+++
Валандово	с.Јосифово	41°20'03.35"N 22°28'38.40"E 73 m н.в.	Молдавија	1	+++
			Страшинска	1	+++

* вкупно примероци за анализа 64.

Табела 10. Колекционирани примероци во сезона 2010, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Штип	м.в. Каваклија	41°43'48.70"N 22°12'20.89"E 396 m н.в.	Црн бургундец	1	++
Штип	с. Три чешми	41°46'21.46"N 22°8'8.78"E 300 m н.в.	Смедеревка	5	+++
Штип	м.в. Ежово	41°46'56.18"N 22°7'58.03"E 314 m н.в.	Смедеревка	2	++
с.Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 m н.в.	Вранец	7	+++
			Рајнски ризлинг	1	+++
Штип	с. Криви Дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 m н.в.	Вранец	3	+++
			Смедеревка	1	+++
с.Караорман	м.в. Балабаница	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 337 m н.в.	Вранец	1	++
			Шардоне	6	++
Велес	м.в. Сопот	41°46'37.87"N 21°44'33.48"E 235 m н.в.	Шардоне	8	+++
			Рајнски ризлинг	3	+++
с. Аргулица	м.в. Тупанец	41°48'56.91"N 22°16'53.22"E 1623m	Вранец	20	+++
			Шардоне	7	+++
			Мерло	5	+
			Италијански мускат	1	++
Куманово	Куманово	41°59'48.34"N 21°54'5.41"E	Вранец	20	+++
			Смедеревка	1	+++

* вкупно примероци за анализа 92.

Табела 11. Колекционирани примероци во сезона 2011, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Демир Капија	Попова кула	41°24'36.66"N	Жилавка	4	++
		22°13'38.88"E 170 m н.в.	Вранец	1	+?
Овче Поле	Покрај пат (приватно)	41°52'12.24"N 21°56'54.01"E	Вранец	3	++
с. Пеширово	с. Пеширово	41°48'39.93"N 21°58'56.79"E	Вранец	6	+++
с. Црнилиште	с. Црнилиште	41°48'9.04"N 21°57'55.80"E	Вранец	2	+++
Неготино	Ило Виларов	41°27'42.81"N	Вранец	8	+++
		22° 3'59.48"E 356m н.в.	Шардоне	5	+++
Неготино	с. Лепово (Бовин)	41°30'38.21"N 22°6'17.13"E	Вранец	8	++
Неготино	с. Ридиште (Бовин)	41°31'5.60"N	Шардоне	15	+++
		22° 6'41.52"E	Афус али	1	+?
Кавадарци	с. Крњево м.в. Брловец	41°24'13.71"N	Траминец	4	+?
		21°59'36.70"E	Вранец	3	+++
		650m н.в.	Станушина	10	+++
Кавадарци	с. Чемерско м.в. Селиште	41°25'7.87"N 22°4'43.25"E	Црн бургундец	1	++
Битола	Битолско Лозар	41°17'58.36"N	Рајнски ризлинг	9	+?
		21°25'39.46"E	Мерло	4	+?
Скопје	м.в. Четири патишта	41°58'6.27"N	Смедеревка	6	+++
			Шардоне	15	+++
	Маркова Сушица	21° 9'29.86"E	Црн бургундец	2	++
			Вранец	5	++

* вкупно примероци за анализа 112.

Табела 12. Колекционирани примероци во сезона 2012, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Кавадарци	с. Крњево м.в. Брловец	41°24'13.71"N 21°59'36.70"E 650м н.в.	Станушина	19	++
с. Пеширово	с. Пеширово	41°48'39.93"N 21°58'56.79"E	Вранец	19	+++
Велес	м.в. Сопот	41°46'37.87"N 21°44'33.48"E 235 м н.в.	Шардоне	19	+++
Штип	с. Криви Дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 м н.в.	Вранец	5	+++
Валандово	с. Јосифово	41°19'45.99"N 22°28'16.17"E	Вранец	10	+++
			Кратошија	1	+++
			Шардоне	1	+++
			Смедеревка	1	+?
Валандово	с. Балинци	41°17'21.12"N 22°30'48.96"E	Шардоне	6	+++
Гевгелија	м.в. Авлаки	41°14'23.26"N 22°28'21.11"E	Вранец	5	+++
с. Амзабегово / с. Пеширово	м.в. Струга	41°48'56.89"N 21°59'36.36"E	Шардоне	3	+++
			Вранец	5	+++
			Каберне совињон	1	+++
с. Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 м н.в.	Вранец	15	+++

* вкупно примероци за анализа 110.

Табела 13. Колекционирани примероци во сезона 2013, со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Штип	Каваклија	41°43'48.70"N 22°12'20.89"E 396 m н.в.	Црн бургундец	1	++
с. Амзабегово / с. Пеширово	м.в. Струга	41°48'56.89"N 21°59'36.36"E	Шардоне	7	+++
			Вранец	5	+++
Кавадарци	Крњево м.в. Брловец	41°24'13.71"N 21°59'36.70"E 650m н.в.	Станушина	10	+++
			Вранец	14	+++
			Кратошија	2	+++
			Шардоне	4	+++
с. Амзабегово	Лозје Уни Сервис АГРО	41°48'50.30"N 21°59'52.21"E	Вранец	2	++
с. Црнилиште	с. Црнилиште	41°48'9.04"N 21°57'55.80"E	Вранец	3	+++
с. Пеширово	с. Пеширово	41°48'39.93"N 21°58'56.79"E	Вранец	12	+++
с. Долни Балван	с. Долни Балван	41°48'22.87"N 22°11'57.50"E	Кратошија	5	+++
			Вранец	4	+++
			Смедеревка	3	+++
с. Батање	с. Батање	41°48'29.92"N 22°12'15.57"E	Вранец	10	+++
			Кратошија	2	+++
Кавадарци	с. Раец	41°24'12.60"N 21°50'44.14"E	Станушина	10	+++
			Вранец	3	+++
			Шардоне	7	+++
			Кратошија	1	+++
Кавадарци	м.в. Прпорец	41°26'50.53"N 21°55'22.70"E	Вранец	2	++
Свети Николе / Куманово	Покрај пат	41°59'43.24"N 22° 0'51.81"E	Вранец	7	+++
Куманово	Кумановско (покрај пат)	42°2'9.90"N 21°57'24.73"E	Вранец	5	+++
Свети Николе	Покрај пат (Бониер)	41°55'34.75"N 22° 3'28.77"E	Италијански ризлинг	3	+++

* вкупно примероци за анализа 125.

Табела 14. Колекционирани примероци во сезона 2008/2009, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
с. Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 m н.в.	Вранец	21	+++
Штип	с. Ново Село	41°44'5.72"N 22°8'8.78"E 270 m н.в.	Вранец	1	++
Штип	м.в. Ежово	41°46'56.18"N 22°7'58.03"E 314 m н.в.	Вранец	4	++
Штип	с. Три чешми	41°46'21.46"N 22°8'8.78"E 300 m н.в.	Вранец	2	+++
Штип	м.в. Каваклија	41°43'48.70"N 22°12'20.89"E 396 m н.в.	Вранец	5	++
Кочани	м.в. Стари лозја	41°54'17.79"N 22°24'43.38"E	Вранец	21	+
Свети Николе	с. Ерцелија	41°50'16.59"N 22°0'55.68"E 255 m н.в.	Вранец	18	+++
Штип	с. Криви Дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 m н.в.	Вранец	5	+
Велес	м.в. Сопот	41°46'37.87"N 21°44'33.48"E 235 m н.в.	Каберне совињон	10	++
Валандово	с. Јосифово	41°20'03.35"N 22°28'38.40"E 73 m н.в.	Молдавија	6	+++
			Страшинска	4	+++

* вкупно примероци за анализа 97.

Табела 15. Колекционирани примероци во сезона 2010, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Штип	м.в. Каваклија	41°43'48.70"N 22°12'20.89"E 396 m н.в.	Црн бургундец	4	++
с. Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 m н.в.	Вранец	22	+++
Штип	м.в. Ежово	41°46'56.18"N 22°7'58.03"E 314 m н.в.	Црн бургундец	8	++
с. Караорман	м.в. Балабаница	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 337 m н.в.	Вранец	6	++
Велес	м.в. Сопот	41°46'37.87"N 21°44'33.48"E 235 m н.в.	Каберне совињон	5	++
			Рајнски ризлинг	1	++
с. Аргулица	м.в. Тупанец	41°48'56.91"N 22°16'53.22"E 1623m	Мерло	6	++
			Вранец	14	++
Штип	с. Криви Дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 m н.в.	Вранец	9	++
Куманово	Кумановско (покрај пат)	42°2'9.90"N 21°57'24.73"E	Вранец	5	++

* вкупно примероци за анализа 80.

Табела 16. Колекционирани примероци во сезона 2011, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупен број на примероци за анализа*	Симптоми од терен
Демир Капија	Попова кула	41°24'36.66"N 22°13'38.88"E 170 m н.в.	Жилавка	7	++
			Вранец	2	++
Валандово	с. Јосифово	41°19'45.99"N 22°28'16.17"E	Молдавија	1	++
Овче Поле	Покрај пат (приватно)	41°52'12.24"N 21°56'54.01"E	Вранец	2	++
с. Пеширово	с. Пеширово	41°48'39.93"N 21°58'56.79"E	Вранец	23	++
с.Црнилиште	с. Црнилиште	41°48'9.04"N 21°57'55.80"E	Вранец	4	++
Неготино	Ило Виларов	41°27'42.81"N 22° 3'59.48"E 356m н.в.	Вранец	9	++
Неготино	с. Лепово (Бовин)	41°30'38.21"N 22° 6'17.13"E	Вранец	6	++
Кавадарци	с. Крњево м.в. Брловец	41°24'13.71"N 21°59'36.70"E 650m н.в.	Вранец	16	++
Штип	м.в. Каваклија	41°43'48.70"N 22°12'20.89"E 396 m н.в.	Црн бургундец	11	++
Кавадарци	с. Чемерско м.в. Селиште	41°25'7.87"N 22° 4'43.25"E	Црн бургундец	19	+++
Битола	Битолско „Лозар“	41°17'58.36"N 21°25'39.46"E	Италијански ризлинг	4	+?
			Мерло	1	+?
Свети Николе	Дудин Дол	41°52'55.12"N 21°44'36.21"E	Црн бургундец	2	+?
Скопје	м.в. Четири патишта Маркова Сушица	41°58'6.27"N 21°9'29.86"E	Шардоне	5	+?
			Црн бургундец	15	++

* вкупно примероци за анализа 127.

Табела 17. Колекционирани примероци во сезона 2012, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Гевгелија	м.в. Авлаки	41°14'23.26"N 22°28'21.11"E	Вранец	4	+++
			Франковка	3	++
Валандово	с. Јосифово	41°19'45.99"N 22°28'16.17"E	Вранец	7	+++
			Кратошија	1	+++
с. Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 м н.в.	Вранец	7	+++
Кавадарци	Крњево	41°24'13.71"N 21°59'36.70"E 650м н.в.	Вранец	6	+++
	м.в. Брловец		Станушина	2	+++
Штип	м.в. Ежово	41°46'56.18"N 22°7'58.03"E 314 м н.в.	Вранец	4	+++

* вкупно примероци за анализа 34.

Табела 18. Колекционирани примероци во сезона 2013, со симптоми на вирусни промени кај виновата лоза

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Сорта	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Штип	м.в. Каваклија	41°43'48.70"N 22°12'20.89"E 396 м н.в.	Црн бургундец	5	+++
Кавадарци	Крњево м.в. Брловец	41°24'13.71"N 21°59'36.70"E 650м н.в.	Станушина	12	+++
с.Црнилиште	с. Црнилиште	41°48'9.04"N 21°57'55.80"E	Вранец	4	+++
с.Долни Балван	с. Долни Балван	41°48'22.87"N 22°11'57.50"E	Црн бургундец	4	+++
			Вранец	2	+++
с. Батање	с. Батање	41°48'29.92"N 22°12'15.57"E	Вранец	4	+++
Кавадарци	с. Раец	41°24'12.60"N 21°50'44.14"E	Станушина	6	++
			Вранец	3	++
Свети Николе / Куманово	Покрај пат	41°59'43.24"N 22° 0'51.81"E	Вранец	4	++

* вкупно примероци за анализа 44.

Табела 19. Колекционирани примероци од плевелна вегетација во сезона 2008-2013

Локалитет	Лозарска единица	Координати	Плевел	Вкупно примероци за анализа*	Симптоми од терен
Велес	м.в. Сопот	41°46'37.87"N 21°44'33.48"E 235 м н.в.	<i>Sorgum sp.</i>	1	/
			<i>Ecbalium elaterium</i>	1	
			<i>Colutea arborescens</i>	1	
			<i>Portulaca oleracea</i>	1	
			<i>Malva sylvestris</i>	1	
			<i>Chenopodium album</i>	1	
			<i>Cuscuta sp.</i>	1	
Кавадарци	П.Е. Љубаш	41°25'52.97"N 21°59'43.78"E	<i>Chenopodium album</i>	1	/
			<i>Convolvulus arvensis</i>	1	
			<i>Portulaca oleracea</i>	1	
			<i>Sorgum halepense</i>	1	
			<i>Polygonum convolvulus</i>	1	
			<i>Clematis vitalba</i>	1	
			<i>Setaria viridis</i>	1	
			<i>Solanum nigrum</i>	1	
с. Сарчиево	с. Сарчиево	41°46'29.61"N 22°13'33.87"E 325 м н.в.	<i>Convolvulus arvensis</i>	1	/
			<i>Portulaca oleracea</i>	1	
Кочани	м.в. Стари лозја	41°54'17.79"N 22°24'43.38"E	<i>Amarantus retroflexus</i>	1	/
Штип	с. Криви Дол	41°47'28.30"N 22°06'37.49"E 294 м н.в.	<i>Sorgum sp.</i>	1	/
с. Аргулица	м.в. Тупанец	41°48'56.91"N 22°16'53.22"E 1623m	<i>Cuscuta sp.</i>	1	/
			<i>Solanum nigrum</i>	2	
			<i>Convolvulus arvensis</i>	1	
Куманово	Кумановско (покрај пат)	42°2'9.90"N 21°57'24.73"E	<i>Amarantus retroflexus</i>	3	/
			<i>Solanum nigrum</i>	1	
			<i>Convolvulus arvensis</i>	4	

* вкупно примероци за анализа 40.

Теренските испитувања, исто така, беа искористени за евидентирање на одредени квалитативни и квантитативни ефекти на проучуваните патогени врз производните својства на испитуваните лози (Шематски приказ 2).



Шематски приказ 2. Компаративни карактеристики меѓу испитуваните патогени

4.2. 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.

Во Табела 20 редоследно се прикажани текот на анализите за идентификација на проучуваните патогени, кај виновата лоза и плевелната вегетација.

Табела 20. Преглед на културата, испитуваните патогени и користените лабораториски методи на работа

Култура	Патогени	Лабораториски методи на испитување
Винова лоза <i>Vitis vinifera</i> L.	Фитоплазми	1. Екстракција на ДНК 2. PCR анализа - со универзална и специфична група на прајмери 3. RFLP анализа – типизација на различни геноми на фитоплазми
Плевелна вегетација (покрај виновата лоза)	Фитоплазми	1. Екстракција на ДНК 2. PCR анализа - со универзална и специфична група на прајмери 3. RFLP анализа – типизација на различни геноми на фитоплазми
Винова лоза <i>Vitis vinifera</i> L.	Вируси	1. DAS-ELISA – серолошка детекција на патогените 2. екстракција на РНК 3. RT-PCR

4.2.1. Молекуларни методи и современи лабораториски тестови за докажување на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза

4.2.1.1. Протокол на ДНК екстракција - Angelini et al., 2001 (со модификација)

Генерално употребуваниот метод за ДНК-екстракцијата се состоеше во неколку чекори:

1. Одмерување на 0.5 g (или 1 g) од растителното ткиво (лисни вени, зелен листен флоем, или лисни дршки), свежо или чувано на -20°C или -80°C, во пластична ќесичка (BIOREBA);
2. Хомогенизирање на примерокот за анализа - со течен азот или во пластични ќеси заедно со пуферот за екстракција (со додавање на 4 ml од 2,5 % СТАВ пуфер, со 0.5 % аскорбинска киселина, која се додаваше пред употреба);
3. Префрлање на хомогенатот – 0.8 ml од целиот примерок во тубичка од 2 ml и инкубација на 65°C за време од 30 мин. (со нежно промешување на секој 5 мин.);
4. Додавање на ист волумен (800 µl) од хлороформ:изоамил алкохол 24:1, промешување на вортекс, ицентрифугирање на температура од 4°C, на 13.000 грт, за време од 15 мин. (чекор со модификација од стандардниот протокол на Angelini et al., 2001);
5. При центрифугирање настануваше одделување на транспарентна од органска фаза, и се земаше 0.6 ml (600 µl) од транспарентната фаза во нова тубичка од 1,5 ml;

6. Преципитација се вршеше со додавање на 2/3 изопропанол (-20°C), проследена со нежно промешување. Се оставаат примероците на температура -20/-30°C за време од 30 мин.;
7. Центрифугирање на 13.000 rpm за време од 10 мин. на 4°C, исфрлање на течноста и сушење на добиениот талог на собна температура или на 37°C;
8. Откако талогот беше убаво исушен (по 1 или 2 часа на собна температура), се раствори во топол ТЕ-пуфер (се чуваше на собна температура и се загреваше на 65°C);
9. Додавање на 400 µl ТЕ-пуфер на сувиот талог и промешување на вортекс;
10. Преципитација (исталожување) на ДНК со додавање на 1/10 волумен (40 µl) од натриум ацетат (3M) (pH 5.2) и два волумена од 99 % етанол (-20°C) (800 µl), со нежно промешување;
11. Центрифугирање на 14.000 rpm за време од 2 мин. на собна температура, исфрлање на течната фаза и промивање на талогот со 70% етанол (800 µl), 5 мин. на собна температура;
12. Центрифугирање на 14.000 rpm за време од 2 мин. на собна температура, исфрлање на течната фаза и промивање на талогот со 80% етанол (800 µl), 5 мин. на собна температура;
13. Центрифугирање на 13.000 rpm за време од 5 мин., отфрлање на течната фаза и сушење на талогот на собна температура;
14. Додавање на ТЕ-пуфер (100 µl) и оставање да се раствори талогот (време од 24 часа), и потоа спектрофотометриски одредување на концентрацијата на ДНК или лодирање на агарозенот гел.

Протоколот одлично работи за екстракција на фитоплазматска ДНК од дрвенести видови, како што се винова лоза, слива, праска.

4.2.1.2. Молекуларна дијагностика и типизација на видот на фитоплазмата

Имајќи го предвид економското делување на фитоплазматското присуство кај виновата лоза, од големо научно и комерцијално значење е одредувањето на видот на фитоплазмите присутни во лозовите насади во Македонија. За таа цел беа користени молекуларни методи со неколку групи на прајмерски сетови за детекција на различни геноми од фитоплазмите. Условите за реализација на една полимеразно верижна реакција, како и прајмерските сетови за *16S rRNA* регионот, како и за *tuf* генот, работени се според веќе опишани протоколи на работа (Deng & Hiruki, 1991; Lee et al., 1995; Schneider et al., 1997).

Во прилог во табеларни прикази дадени се различни комбинации на прајмери за различни геномски региони кај фитоплазмите:

Табела 21. Употреба на универзална група на прајмери за директен PCR – P1P7

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>16S rRNA</i>	P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAT-3'	Директен	1850 bp	<i>Tru9I</i>
	P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	Директен		

Табела 22. Употреба на универзална група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR-F2nR2

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

Табела 23. Употреба на специфична група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR-F1R1

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>16S rRNA</i>	F1(I)	5'-TAAAAGACCTAGCAATAGG-3'	Вгнезден (nested)	1100 bp	<i>Tru9I</i>
	R1(I)	5'-CAATCCGAACTGAGACTGT-3'	Вгнезден (nested)		

Табела 24. Употреба на специфична група на прајмери за вгнездениот (nested) PCR-P1aP7a

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>16S rRNA</i>	P1a	5'-ACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC-3'	Вгнезден (nested)	1750 bp	/
	P7a	5'-CCTTCATCGGCTCTTAGTGC-3'	Вгнезден (nested)		

Прајмерски сет за одредување на *tuf* специфичниот ген за столбур фитоплазмата со помош на PCR\RFLP анализа (Табела 25).

Табела 25. Прајмерски сет за специфичен *tuf* ген

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>tuf</i>	fTufI	5'-CACATTGACCCGGTAAAAC-3'	Директен	1100 bp	<i>HpaII</i>
	rTufI	5'-CCACCTTCACGAATAGAGAAC-3'	Директен		
	fTufAY	5'-GCTAAAAGCAGAGCTTATGA-3'	Вгнезден (nested)	900 bp	
	rTufAY	5'-CGTTGTCACCTGGCATTACC-3'	Вгнезден (nested)		

Прајмерски сет за одредување на *cbiQ-glyA* специфичниот ген за столбур фитоплазмата со помош на PCR\RFLP анализа (Табела 26).

Табела 26. Прајмерски сет за специфичниот ген *cbiQ-glyA*

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>cbiQ-glyA</i>	cbiQF1	5'-AGAGGTTATGTATTGGGAGCG-3'	Директен / вгнезден (nested)	1100 bp	<i>HpuI</i> 188I
	glyAR1	5'-CAAAGAACTTGCAAGAGTTGGGC-3'	Директен		
	glyAR2	5'-TGTTGATAATCTTTAAAGGCAGG-3'	Вгнезден (nested)	1060 bp	

Прајмерски сет за одредување на *csdB-tyrS-rpIS* специфичниот ген за столбур фитоплазмата со помош на PCR\RFLP анализа (Табела 27).

Табела 27. Прајмерски сет за специфичниот ген *csdB-tyrS-rplS*

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>csdB-tyrS-rplS</i>	rplSF1	5'-CCTGTGCACTCCCCTAATAACGA-3'	Директен	1830 bp	Hpy CH4V
	csdBR1	5'-ACCTTCTGGAGTGTTTCGCCTAGAC-3'	Директен		
	rplSF2	5'-CGTCGTGCTAAGTCGCATTACG-3'	Вгнезден (nested)	1550 bp	
	csdBR2	5'-GTTTCAAAGAGGTAGCCGCATTATCG-3'	Вгнезден (nested)		

Прајмерски сет за одредување на *trxA-truB* специфичниот ген за столбур фитоплазмата со помош на PCR\RFLP анализа (Табела 28).

Табела 28. Прајмерски сет за специфичниот ген *trxA-truB*

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>trxA-truB</i>	trxAF1	5'-TGCCAATTGGTGTGGTCCATGTC-3'	Директен	1450 bp	BsaHI
	truBR3	5'-GCCTCTATGATCAAATCAAGGACAG-3'	Директен		
	trxAF2	5'-GAATTATCACAATCAGAACAGGGTG-3'	Вгнезден (nested)	1330 bp	
	truBR4	5'-TCTTTGGCGGTCGAAAGGTAGCC-3'	Вгнезден (nested)		

Прајмерски сет за одредување на *vmp1* специфичниот ген за столбур фитоплазмата со помош на PCR\RFLP анализа (Табела 29).

Табела 29. Прајмерски сет за специфичниот *vmp1* ген

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>vmp1</i>	H10F1	5'-AGGTTGTA AAAATCTTTTATGT-3'	Директен	2070 bp	RsaI
	H10R1	5'-GCGGATGGCTTTTCA TTATTTGAC-3'	Директен		
	H10F2	5'-TGTCACAGGGAAACAGACAG-3'	Вгнезден (nested)	1570 bp	
	H10R2	5'-CACA AACATGATGATTATCAACGA-3'	Вгнезден (nested)		

Прајмерски сет за одредување на *stamp* специфичниот ген за столбур фитоплазмата со помош на PCR\RFLP анализа (Табела 30).

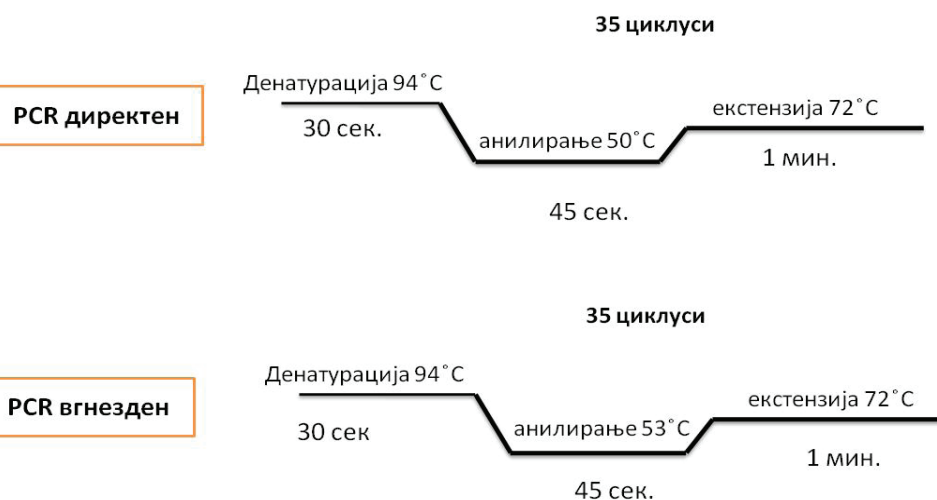
Табела 30. Прајмерски сет за специфичниот *stamp* ген

Ген	Прајмер	Секвенца	PCR	Големина на ампликонот	RFLP
<i>stamp</i>	stampF	5'-GTAGGTTTTGGATGTTTAAAG-3'	директен	794 bp	Hру 188I
	stampR0	5'-AAATAAAGAACAAGTATAGACGA-3'	директен		
	stampF1	5'-TTCTTTAAACACACCAAGAC-3'	Вгнезден (nested)	550 bp	
	stampR1	5'-AAGCCAGAATTTAATCTAGC-3'	Вгнезден (nested)		

* секвенците на прајмерите се веќе објавени во трудови од Cimerman et al. 2006, Quaglio et al., 2009.

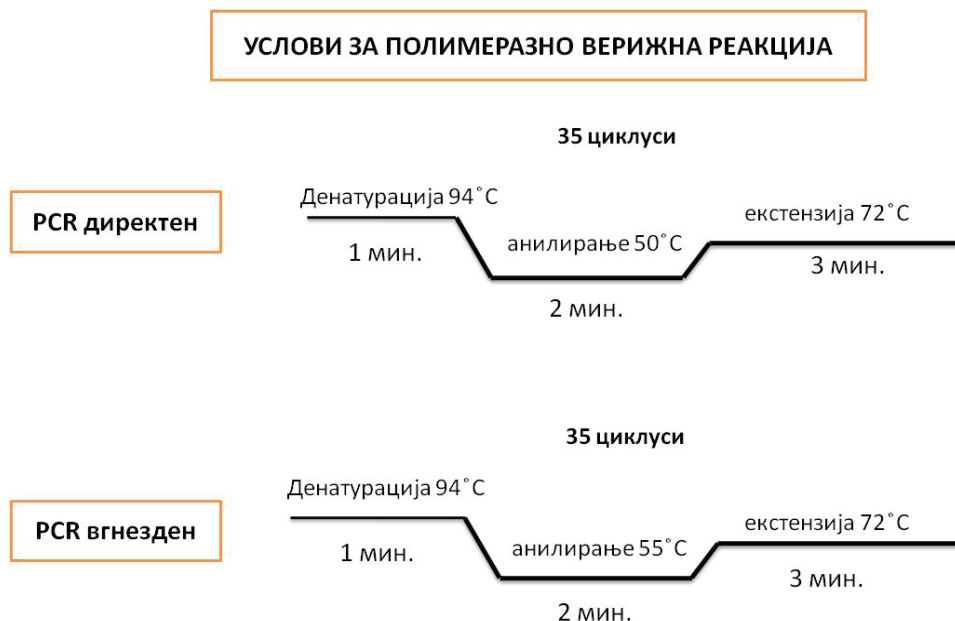
За идентификација на *16Sr DNA* регионот, *cbiQ-glyA*, *trxA-truB*, *csdB-tyrS-rplS*, беа користени условите прикажани на Шематски приказ 3:

УСЛОВИ ЗА ПОЛИМЕРАЗНО ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА



Шематски приказ 3. Услови за полимеразно-верижна реакција за идентификација на неколку фитоплазматски генски региони

За идентификација на *tuf* генот, беа користени условите прикажани на Шематски приказ 4:



Шематски приказ 4. Услови за полимеразно-верижна реакција за идентификација на специфичниот *tuf* генот на столбур фитоплазмата

Тотален волумен на една полимеразно-верижна реакција беше 25 μ l, составена од: колоритен (зелен) пуфер или безбоен пуфер (5x или 10x), MgCl 25 mM, прајмерски сет 0.4 μ M секој, dNTPs 0.2 μ M, Taq polymerase 0.025U/ μ l.

ДНК во реакцијата најчесто беше користена 1 μ l од матичната (изолираната) ДНК, или при проблеми во реакцијата беа правени комбинации на разредувања на матичната ДНК, 1:10, 1:30 или 1:50. При правење на анализите, од директна кон вгнездена PCR реакција, се одеше директно без разредување, и со варијанти во разредување 1:10, 1:30 и 1:50.

Резултатите од полимеразно-верижната реакција беа исчитувани на 1 % агарозен гел, и беа визуелизирани со употреба на боја етидиум бромид или Midori Green и исчитувани на УВ-трансилуминатор. Реакција на ензиматска дигестија (RFLP analyses – Restriction Fragment Length Polymorphisam), беше користена кај позитивни PCR продукти, со употреба на соодветни ензими за дигестирање, со цел да се види идентичноста или различноста во профилите на испитуваните фитоплазми, а со тоа да се направи карактеризација на видот и подвидот во групата на присутни фитоплазми.

Ензимите кои беа користени во дигестијата, соодветно за секој ген и прајмерски сет, прикажани се во табелите со секвенциите на прајмерите (Табела 21 до 30). Реакцијата беше изведувана во тотален волумен од 20 µl, 2-5 µl од PCR продуктите (зависно од големината и квалитетот на PCR продуктот на агарозен гел), 0.5 µl од ензимот, 2 µl од пуферот кој оди заедно со ензимот (2X), и доколку според упатството за употреба на ензимот е пропишано употреба на Бовин Серум Албумин (BSA) 0.2 µl. Кај секоја дигестија, ензиматската реакција се одвиваше на 37 степени преку ноќ. Резултатите беа исчитувани на 3 % агарозен гел или на 8 % полиакриламиден гел. Профилите од рестрикцијата беа анализирани софтверски со употреба на УВ-трансилуминатор.

4.2.1.3. Молекуларни методи и современи лабораториски тестови за докажување на присуство на вирусите кај виновата лоза

4.2.1.3.1. 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 во периодот од 2008 до 2013 година, 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 (Шематски приказ 5). Освен китови на фирмата BIOREBA, за анализите беа користени и готови китови со антитела за сендвич-програмата од SEDIAG, France, со пропишан протокол на работа.

ELISA техниката е ефикасен метод за детекција на вирусите кај виновата лоза. Концентрацијата на вирусот варира во зависност од материјалот за анализа, временските услови и периодот на колекционирање на материјалот. Серолошките метод за анализа, беа користени за испитување на присуство на вирусот во материјал колекциониран од терен, симптоматична лисна маса, материјал од маркирани ластари во текот на зимскиот период, како и во калем-гранки и посадочен материјал за проверка на присуство на горенаведените групи на GLRaV.

Комплетниот кит за анализа содржи пуфер за хомогенирање (екстракциски пуфер), пуфер за обложување на плочите, пуфер за конјугација, супстратен и пуфер за проплакнување на плочите, кои се со матична концентрација, од која беше подготвена работна концентрација со употреба на дестилирана вода. При детекцијата беа користени микротитарски плочи (Nunk, Danska), со реакциски волумен од 200 μ l на работно место (бунарче), во двојно повторување за секој тестиран примерок. Исчитувањето на резултатите беше направено на спектрофотометриски читач на микроплочи, Thermo Fisher Scientific, 355, по 30 и 60 мин. (зависно од комерцијалниот кит) од поставувањето на супстратниот пуфер (инкубацијата се вршеше на собна температура во темна комора).

Користената постапката на DAS-ELISA, изгледаше вака:

1. Обложување на микротитарските плочи (coating step):

- а) разредување на специфичните антитела IgG (1000x), во пуфер за обложување на работните места (бунарчиња), во микротитарската плоча;
- б) поставување по 200 μ l во секое бунарче;
- в) инкубација на плочата, на температура од 30°C, за време од 4 часа, или на температура од 4 до 6°C преку ноќ;
- г) проплакнување на плочите со пуфер за проплакнување, 3 пати на ELISA апарат за испирање плочи, Thermo BIOREBA, Switzerland.

2. Поставување на примероците за анализа:

- а) претходно подготвените примероци (хомогенирани и префрлени во тубичка од 2 ml), се поставуваат во по две работни места (бунарчиња), во содржина од 200 μ l. На секоја плоча се оставаат 4 работни места, две за позитивна референтна контрола и две за негативна контрола (доаѓаат со китот);
- б) инкубација на плочата на 4 °C преку ноќ;
- в) следниот ден, проплакнување на плочата 3 пати на ELISA апарат за испирање плочи.

3. Нанесување на конјугираните антитела (conjugate enzyme labeled antibody):

- а) разредување на конјугираните антитела (1000x), во конјугиран пуфер;
- б) поставување по 200 μ l во секое бунарче;
- в) инкубација на плочата, на температура од 30 °C, за време од 5 часа;
- г) проплакнување на плочите со пуфер за проплакнување, 3 пати на ELISA апарат испирање на плочи.

4. Додавање супстратен пуфер:

- а) растопување на субстратот pNPP (para-nitrophenyl-phosphate) 1 mg/ml во супстратниот пуфер;
- б) поставување по 200 µl во секое бунарче;
- в) инкубација на собна температура (20-25 °C), на темно.

5. Исчитување на резултатите:

- а) на спектрофотометар – читач на микротитарски плочи, на бранова должина од 405 nm, за време од 30, односно 60 мин. прво исчитување и 60 или 120 мин. второ исчитување (зависно од комерцијалниот кит BIOREBA или SEDIAG).

На Шематски приказ 5, даден е преглед на лабораториските испитувани групи на вируси:



Шематски приказ 5. Испитување на leafroll complex со DAS-ELISA

Овој ELISA серолошки метод на работа се однесуваше за сите четири групи на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза. За седмата група (*Grapevine leafroll associated virus 7 - GLRaV-7*), поради резултатите кои ги добивавме, но и од литературни податоци (Voncina, 2011), анализите беа повторени со користењето на готов комплетен кит SEDIAG, France.

Модификацијата на протоколот беше направена во делот на екстракцијата (хомогенизирањето) на примерокот, каде што во екстракцискиот пуфер пред самиот процес беше ставено 2 % обезмастено млеко во прав (Voncina, 2011).

Протоколот на работа, со примена на SEDIAG готов комплетен кит, беше реализиран во следниве чекори:

1. Обложување на микротитарските плочи со 100 μ l обложувачки пуфер (coating buffer), со поликлонални антитела:

- а) инкубација на температура од 37 °C за време од 2 часа;
- б) плакнење на плочата, 3x.

2. Нанесување на примероците (хомогенатите), 100 μ l во едно работно место:

- а) инкубација 16 часа на 4 °C;
- б) плакнење на плочата, 5x.

3. Нанесување на биотин-конјугираните антитела:

- а) инкубација на температура од 37 °C за време од 2 часа;
- б) плакнење на плочата, 3x.

4. Нанесување на алкална фосфатаза-конјугиран AP-streptavidin:

- а) инкубација на температура од 37 °C за време од 30 мин.;
- б) плакнење на плочата, 3x.

5. Нанесување на супстратниот пуфер:

- а) инкубација на температура од 37 °C за време од 1 и 2 часа.

Резултатите беа исчитани спектрофотометриски, на бранова должина од 405 nm, со прво исчитување по еден час, и второ исчитување по 2 часа.

4.2.1.3.2. Молекуларна реакција на детекција на GLRaV во растително ткиво од винова 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 (MacKenzie et al., 1997), а вториот метод со помош на силика (Foissac et al., 2000).

I метод: Комбинираниот протокол на екстракција со кит и претходно подготвен пуфер, според MacKenzie et al., (1997), се состоеше во следново:

1. Подготовка на материјал за анализа – промивање на ткивото (во случај на употреба на хемиски третмани да се измијат пестицидите кои можат да влијаат врз понатамошните анализи);
2. Растително ткиво 0.5 (0.4 или 0.6 g) се ставаше во пластична вреќичка за хомогенирање на примерокот, со додавање на 5 ml (4 или 6 ml) изолациски пуфер (4M guanidine thiocyanate, 0,2 M sodium acetat, pH 5, 25 mM EDTA, 2,5 % PVP-40), и пред употреба задолжително се додава sodium metabiosulfite со финална концентрација 1%;
3. Пред започнување со екстракцијата, се припремаат тубичките за секој соодветен примерок (се користат тубички од 1,5 ml);
4. Во секоја од тубичките со хомогенизираниот примерок се додаваше 100 µl од 20 % sarcosyl (sodium lauril sarkosyl (SLS));
5. Се инкубираат примероците на 70 °C, за време од 10 мин. (со постојано промешување на примероците во текот на инкубацијата на секој две минути);
6. По инкубацијата во водената бања, примероците се промешуваат и се започнува работа во тубичките од китот - префрлање на содржината во нови тубички од китот. Центрифугирање за време од 2 мин. на 13.000 rpm;
7. После центрифугирањето течната фаза се префрла во нова тубичка од 1,5 ml;
8. На волуменот префрлен во нова 1,5 ml тубичка, се додава половина волумен 96-100 % етанол и се промешува рачно;
9. Следната фаза оди во колекционирачката тубичка од китот, во која се префрла содржината од 1,5 ml тубичка (обично околу 650 µl од целиот волумен);
10. Се центрифугира на 10.000 rpm за време од 2 мин.;
11. Се отфрла течната фаза од колекционираниот дел во тубичката и се додава останатата содржина од 1,5 ml тубичка;
12. Се центрифугира на 10.000 rpm за време од 2 мин.;
13. Се отфрла течната фаза од колекционираниот дел од тубичката и се започнува со прочистување на собраната РНК во делот над филтерот;
14. Се додава 700 µl Buffer RW1 во RNeasy spin column;

15. Се центрифугира на 10.000 rpm за време од 2 мин.;
16. Се додава 500 μ l Buffer RPE во RNeasy spin column);
17. Се центрифугира на 10.000 rpm за време од 2 мин.;
18. Се додава 500 μ l Buffer RPE во RNeasy spin column (во делот на розе тубичката над филтерчето) (овој чекор на прочистување на изолираната РНК се повторува 2 пати);
19. Се центрифугира на 13.000 rpm за време од 2 мин.;
20. Се отфрла течната фаза и се центрифугира уште еднаш за да се исуши убаво мембраната (над филтерчето) - исталожената РНК (13.000 rpm за време од 2 мин.);
21. Префрлање на RNeasy spin column (пунк) во нова тубичка од 1,5 ml и додавање на RNase free water (од китот) – 50 μ l;
22. Центрифугирање (една мин. на 10.000 rpm) и префрлање веднаш на добиената РНК во мраз (затоа што многу бргу се распаѓа на собна температура);
23. Овој чекор може да се повтори два пати (после примарното собирање на РНК, се промиваше мембранскиот филтер уште еднаш со 50 μ l RNase free water и се споредуваше првата и втората добиена концентрација).

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“.

II метод: Модифициран протокол на целосна екстракција на РНК со помош на силика (Foissac et al., 2000):

1. Припрема на ткивото за РНК анализа – одмерување на 0,5 g ткиво во вреќичка за хомогенирање и додавање 5 ml пуфер за екстракција со 2 % натриум метабиосулфид (за разорување на клетките и излегување на РНК молекулот);
2. Хомогенираното ткиво се става во тубичка од 1,5 ml (500 μ l од хомогенатот) во која има претходно спремено 100 μ l 10 % саркосил;
3. Инкубација на тубичките на 70 °C за време од 10 минути;

4. Потоа тубичките веднаш се ставаат 5 мин. во мраз;
5. Центрифугирање на 13.000 rpm за време од 10 минути;
6. 300 μ l се префрла во нова тубичка од 1,5 ml во која веќе има подготвено 300 μ l NaI, 150 μ l EtOH (апсолутен) и 25 μ l силика;
7. 10 минути инкубација на собна температура, на хоризонтална мешалка;
8. Центрифугирање 2 минути на 6.000 rpm;
9. Отфрлање на течната фаза, и промивање на добиениот талог со пуфер за испирање – 500 μ l;
10. Центрифугирање една минута на 6.000 rpm;
11. Повторно повторување на чекорот на промивање и центрифугирање;
12. На крај добиениот талог се раствора во RNase вода;
13. Се центрифугира на 13.000 rpm за време од 5 минути;
14. Префрлање на течната фаза – изолираната РНК во нова тубичка и чување на изолатот на -20°C до употреба.

III метод: Употреба на готов кит - FastRNA Pro kit (FastRNA PRO™ GREEN KIT, MP Biomedicals)

1. Во центрифугални тубички од 2 ml се одмерува 300-500 mg растително ткиво;
2. Центрифугирање во FastPrep апаратот за време од 40 сек. на брзина 6.0;
3. Повторно центрифугирање во центрифуга на 4°C за време од 5 мин., на 12.000 rpm;
4. Префрлање на горната течна фаза, без мешање на тубичките при вадење од центрифугата;
5. Инкубација за време од 5 мин. на собна температура;
6. Додавање 300 μ l хлороформ и мешање на вортекс;
7. Инкубација за време од 5 мин. на собна температура;
8. Центрифугирање на 12.000 rpm за време од 5 мин., на температура од 4°C ;
9. Префрлање на горната фаза во нова микроцентрифугална тубичка;
10. Додавање 500 μ l на апсолутен алкохол, промешување неколку пати и оставање

на -20°C за време од 30 мин.;

11. Центрифугирање на 12.000 rpm за време од 15 мин., на температура од 4°C ;
12. Отфрлање на супернатантот (течната фаза), и промивање на РНК талогот со 500 μl на 75 % етанол (направен со вода DEPC);
13. Отстранување на етанолот и сушење на талогот на собна температура;
14. Растворање на талогот во 100 μl DEPC вода.

- 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.

Тие се прикажани во следнива Табела:

Табела 31. Секвенци на прајмери употребувани во Multiplex RT-PCR

Реден број	Име на прајмер	Секвенца 5' – 3'	Големина на амплифицирани bp (базни парови)
1.1.	18S-M1	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844 bp
1.2.	18S-M2	TTCAGCCTTGCGACCATACT	
2.1.	GLRaV2-CP1	GGTGATAACCGACGCCTCTA	543 bp
2.2.	GLRaV2-CP2	CCTAGCTGACGGAGATTGCT	
3.1.	CVB-M1	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	460 bp
3.2.	CVB-M2	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG	
4.1.	ARMV-9	TGACAACATGGTATGAAGCACA	402 bp
4.2.	ARMV-10	TATAGGGCCTTTCATCACGAAT	
5.1.	GLRaV3-M3	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	336 bp
5.2.	GLRaV3-N2	TGGGGCATTAAATCTTCATTGT	
6.1.	GVA-6591F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	272 bp
6.2.	GVA-6862R	TCGAACATAACCTGTGGCTC	
7.1.	GLRaV1-M3	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	232 bp
7.2.	GLRaV1-M4	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	
8.1.	GFKV-M1	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	179 bp
8.2.	GFKV-M2	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG	
9.1.	GFLV-M3	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 (Turturo et al., 2000) (Табела 32).

Табела 32. Секвенци на прајмери употребувани за одредување на GLRaV 3 група

Реден број	Име на прајмер	Секвенца 5' – 3'	Големина на амплифицирани bp (базни парови)
1.1.	P3U	5' CGCTCATGGTCAAAGCAGACG-3'	653 bp
1.2.	P3D	5' CTTAGAACAATAATATGGAGCAG-3'	
2.1.	CP3U	5' ATGGCATTGAACTGAAATTAGGGC-3'	484 bp
2.2.	CP3D	5' CGGCGCCATAACSTTCTTACA-3'	

- Услови за реверзна транскриптаза (RT) и полимеразно верижна реакција (PCR – multiplex \ simplex)

Молекуларната детекција на GLRaV подразбираше и употреба на методот на реверзна транскрипција, со цел добивање на cDNA на посакуваниот геномски регион. Кога го користивме овој метод во единична полимеразна реакција (MacKenzie et al., 1997), тој се одвиваше во следниве неколку чекори:

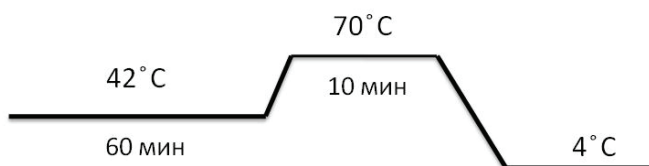
1 чекор:

- 1 µl random primers
- 11.75 µl RNase free water
- + 5 µl РНК за секоја реакција посебно



2 чекор:

- DTT 0,1M
- dNTP 10 mM
- 10xBuffer
- MMLV
- MgCl₂ 25 mM



Кога го користевме методот на реверзна транскриптаза за добивање на cDNA, при единична полимеразна реакција, тоа се одвиваше во следниве чекори:

1 чекор:

1 μ l random primers

8 μ l РНК за секоја реакција посебно



2 чекор:

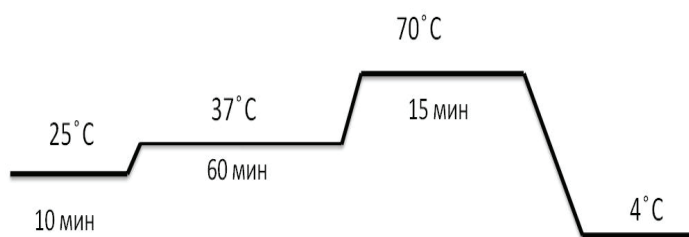
10xBuffer

MDTT

RNase inhibitor

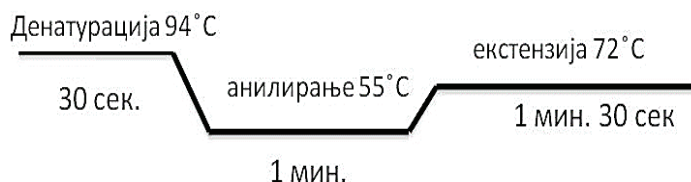
MMLV

MgCl₂ 25 mM



Услови за реализација на една единична – simplex или збирна - multiplex полимеразна реакција се:

35 циклуси



- Агарозна електрофореза на умножените фрагменти

Добиените продукти од примената на RT-PCR методот, беа аплицирани на 3% агарозен гел, припреман во 0.5xTBE пуфер. Во секое работно место на гелот беа аплицирани по 5 μ l од примерокот помешани со еден дел (1 μ l) 6 x loading buffer (припреман во лабораторијата).

Истиот пуфер кој беше користен за подготвување на гелот, беше употребуван и за течењето на електрофорезата, во времетраење од 2 часа на 120V. Како стандард за одредување на големината на базните парови, користевме 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen. Во самиот агарозен гел, беше употребена „есо боја“ за визуелизација на гелот, Midori green color. Освен оваа „есо боја“ за визуелизација, беше користен и

етидиум бромид (со отстојување на гелот по електрофорезата за време од 5 мин. во раствор на EtBr).

Отчитувањето на резултатите на гелот беше направено на систем за фотодокументација BDA digital, BIOMETRA, Germany.

4.2.1.4. 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 (BINDER KBW720), 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.

Начинот на механичка инокулација на тест-растенијата се одвиваше во неколку чекори:

1. Избор на шифра на примерок т.е. симптоматична лисна маса, кој веќе е потврден дека е позитивен на една од групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза;
2. Вкупно беа одбрани 5 примероци позитивни на GLRaV-1 и 5 примероци позитивни на GLRaV-3;
3. Инокулумот за тест-растенијата беше припреман со одмерување на 0,5 g од примероците, и додавање на екстракциски пуфер;
4. Вака подготвениот и хомогенизиран материјал, директно се нанесуваше на добро развиената лисната маса на *N. benthamiana*, на која претходно беше посипан карборундум (silicon carbid 400 mesh);

5. Инокулацијата беше направена во две повторувања за секој примерок;
6. Како негативна контрола, здраво тест-растенија, беше направена инокулација со дестилирана вода;
7. По инокулацијата листовите беа напрскани со вода.

Пуфери и раствори кои беа користени при лабораториските анализи

- Пуфери и раствори за изолација и чување на ДНК од растителниот материјал

Во лабораториските анализи беа користени повеќе пуфери и раствори и тоа:

2.5 % СТАВ пуфер за екстракција („extraction buffer“)

За 1000 ml пуфер се користеше:

СТАВ	финална концентрација 2,5 %
Tris	финална концентрација 1 M
NaCl	финална концентрација 1,4 M
EDTA 0,5 M	финална концентрација 20 mM
	редестилирана вода до 1000 ml

pH 8.0 (регулирање со концентрирана HCl)

Подготвениот раствор беше чуван на темно. На подготвениот работен раствор за екстракцијата се додава 1% PVP-40.

EDTA 0,5 M pH 8.0

За 100 ml пуфер беа растворени 18,61 g Na_2EDTA во 50 ml вода. Беше регулирана pH на 8.0, додаден NaOH и дополнето до 100 ml со вода.

хлороформ:изоамил алкохол ---- подготвен во сооднос 24:1

изопропанол (2-пропанол) ---- чуван на -20°C до пред употреба

етанол 70% ---- чуван на -20°C до пред употребата

TE пуфер pH 8.0

За подготвување на растворот за чување на екстрахираната ДНК, беше користен 10 mM Tris и 1 mM EDTA. Растворот се чуваше во фрижидер на -20°C до пред употребата.

- Пуфери и раствори за електрофореза во агарозен гел**5xTBE пуфер pH 8.0**

Tris	90 mM
Борна киселина	90 mM
EDTA	1 mM

Работната концентрација за агарозниот гел и електрофорезата беше 1xTBE или 0.5xTBE.

агароза

Гел агарозата (1 %) беше припремена со растворање на 1.5 g агароза во 150 ml 0.5xTBE пуфер. Гел агарозата (3%) беше подготвена со растворање на 4,5 g агароза во 150 ml 0.5xTBE пуфер. 1% агарозен гел се употребуваше при визуелизација и исчитување на резултатите од полимеразната реакција, додека 3% агарозен гел користевме при дигестирање и фрагментација на примероците.

обоен пуфер за електрофореза („loading buffer“)

бром-фенол-плаво (BFB)	0,25 %
глицерол	30 %

етидиум бромид или есо боја midori green

Концентрираниот раствор од етидиум бромид (10mg/ml) беше подготвен со растворање 10 mg EtBr во 1 ml редестилирана вода. За боење беше користено 30 µl од концентрираниот раствор во 300 ml вода т.е. EtBr беше со работна концентрација од 1 µg/ml.

Midori green боја која ја има истата функција како и етидиум бромидот, но со помал степен на штетно (канцерогено дејство), се користеше во разредување во однос 1:5.

- Пуфери и раствори за електрофореза во полиакриламиден гел**TBE пуфер pH 8.0**

Се подготвуваше на ист начин како и за електрофореза во агарозен гел и при приготвувањето беше користен матичниот раствор од TBE (5x).

Полиакриламид

Акриламид/бисакриламид, 40%, раствор во сооднос 29:1. Се чуваше во темно шише на 4°C.

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

Се чуваше во фрижидер на 4°C.

амониум персулфат (APS) 40%.

Се раствора 0.4 g APS во 1 ml редестилирана вода и растворот секогаш беше припреман свеж, еднаш неделно. Се чуваше во фрижидер на 4°C.

обоен пуфер за електрофореза („loading buffer“)

бром-фенол-плаво (BFB)	0,25%
глицерол	30%

етидиум бромид

Концентрираниот раствор од етидиум бромид (10mg/ml) е подготвен на ист начин како и кај агарозната гел електрофореза.

- Ензими

TaqI, *HpaII*, *MseI*, *BSAHI*, *HpyCH4V*, *Hpy188I*, кои одат заедно со соодветни реакциски пуфери (Invitrogen).

- Стандарди за одредување на молекулската маса**1 Kb DNA Ladder, Invitrogen**

Смеса на фрагменти за одредување на големината на двојно спиралниот ДНК молекул од 500 bp до 12 kb. Содржи 13 фрагменти со следнава должина (во bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 300.

Plasmid pBR322, Invitrogen

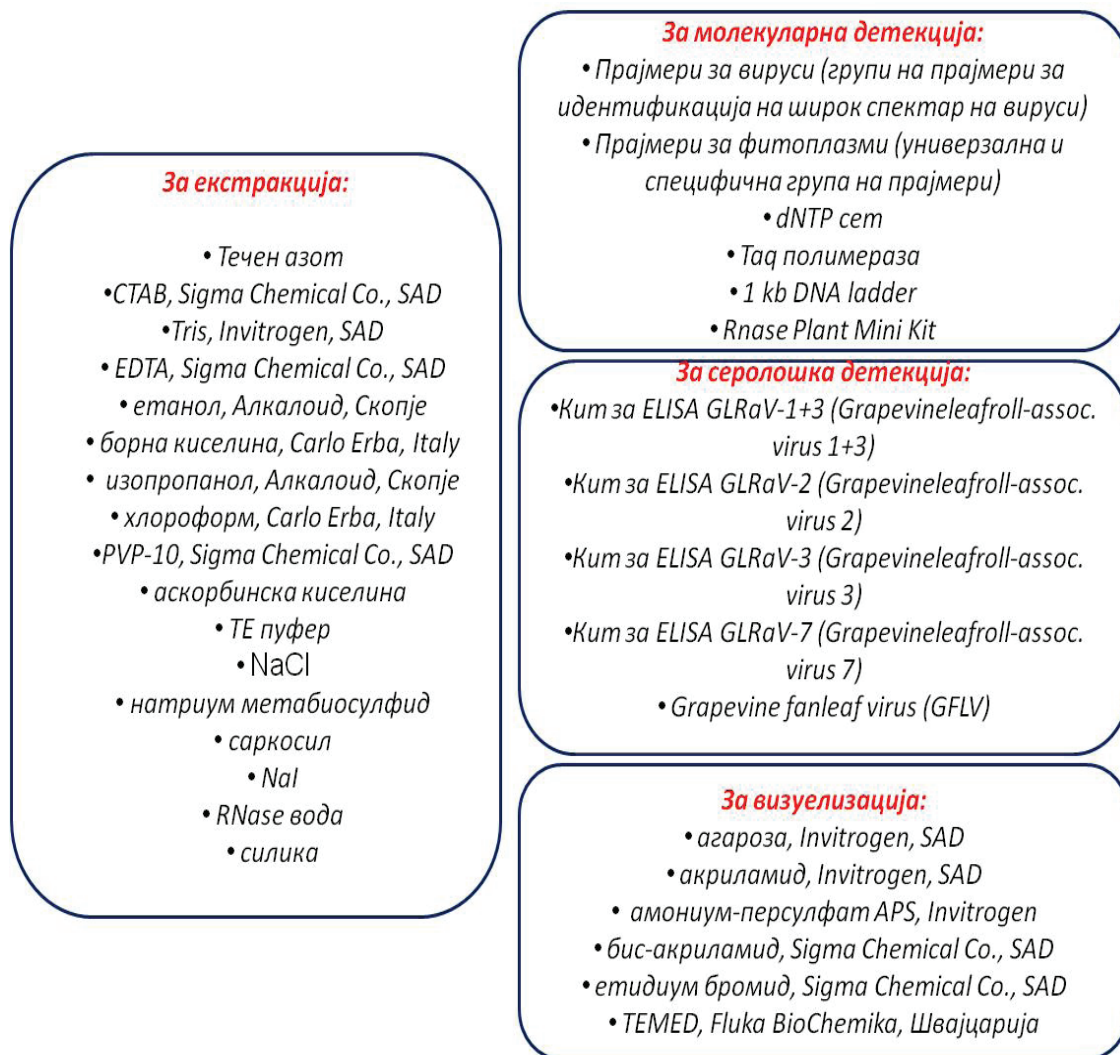
Смеса на фрагменти добиена со прочистување на *E. coli*, DH10B. Содржи 15 фрагменти со следнава должина (во bp): 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80 bp.

ФХ174

Содржи 11 фрагменти со следнава должина (во bp): 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp.

- Хемикалии

Исто така во лабораториските испитувања беа користени и поголем број дополнителни хемикалии прикажани на Шематски приказ 6:



Шематски приказ 6. Примена на различни групи на хемикалии во текот на анализите спроведени во периодот 2008-2013

- Потребна апаратура

Дел од апаратурата користена во одделението за бактериологија и вирусологија при Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, употребувана при анализите во текот на истражуваниот период, е дадена на Шематски приказ 7:

За одржување на примероците:

- Фрижидер на 4С
- Фрижидер на -20С
- Фрижидер на -80С

За одмерување на примероците:

- Аналитичка вага (до четири децимали)
- Прецизна вага (до три децимали)

За стерилизација и чистота при работата:

- Автоклав
- Дестилатор за вода
- Апарат за ултрачиста вода

За изработка на серолошките и молекуларните анализи:

- Фитотрон – комора за одгледување на растенија
 - Дигестор
- Канистер за течен азот (10 и 50L)
 - Електрично водено купатило
 - Водено купатило со тресалка
 - Вортекс
 - Центрифуга (Eppendorf)
- Fast Prep – изолатор на ДНА, РНА и протеини
 - Термоциклер – PCR
 - Градиентен PCR
- Кадичка за хоризонтална електрофореза
 - Извор за напојување
 - Вертикална електрофореза
- Систем за фотодокументација (BIOMETRA)
 - ELISA хомогенизатор на ткиво
 - ELISA промивач
 - ELISA читач
 - Ламинар

Шематски приказ 7. Користена апаратура при изведување на анализите во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, Земјоделски факултет

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Состојба со флоемски ограничени патогени кај виновата лоза

Имајќи предвид дека виновата лоза се одгледува на големи површина на територијата на Македонија, со различна застапеност во поедини подрачја (Нацрт стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015), потребно беше да се утврди појавата и интензитетот на флоемските патогени (фитоплазматски и вирусни промени) на оваа култура. За реализација на оваа идеја, беше потребен подолготраен период на теренска анализа на материјалот и лабораториска потврда на собраните симптоматичните примероци.

Истовремено, набљудувана е процентуалната застапеност на симптомите, осетливоста на сортата во рамките на лозовиот насад и споредено со други лозови насади, како и можност за појава на фитоплазматска и вирусна инфекција на една лоза (мешана инфекција).

5.2. Симптоматолошки промени кај виновата лоза – теренска анализа

5.2.1. Фитоплазматска инфекција кај лозовите насади во периодот 2008-2013 година

Теренските анализи беа извршени во периодот од 2008 до 2013 година, почнувајќи од јуни, па сè до октомври. Врз основа на претходни искуства (Накова, 2008), но и врз практиката од терен, се покажа дека најинтензивни и најјасно препознатливи симптоми на фитоплазматски инфекции се појавуваат при крајот на јули, па сè до почетокот на октомври.

Од аспект на препознатливост и карактеристичност на симптомите, на фитоплазматските инфекции на различни лозови насади во Македонија, во оваа прилика го истакнуваме доцниот летен период во 2008 година. Во овој период, споредено со другите години на истражување, симптомите од фитоплазматските промени кај набљудуваните лози (промена на бојата на листовите, изгледот на ластарите, скратените интернодии и сушење на гроздовите), беа најјасно забележителни.

При секоја теренска анализа, во секој локалитет беше следена состојбата на терен, осетливоста на сортата лоза, но и плевелната вегетација, како примарен домаќин на столбур-фитоплазмата.

Во зависност од осетливоста на сортиментот, на следниве фотографии се прикажани различни сорти од различни локации со опис на симптомите.

- Фитоплазматска инфекција кај сортата Шардоне (симптоми)

Сортата Шардоне (суровина за производство на бели вина), е една од најосетливите сорти на проучуваните групи на фитоплазми (Carraro et al., 1994; Pavan et al., 1997; Refatti et al., 1998; Mutton et al., 2002 Milkus et al., 2004, Vered & Tirza, 2011, Pavan et al., 2012). Симптомите кај оваа сорта се забележуваат при крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно можат да се забележат во септември.

Симптомите кај оваа сорта се забележуваат при крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно можат да се забележат во септември (Накова, 2008). Промените кои најчесто беа забележани кај речиси сите испитувани локалитети и региони во Македонија, изгледаат вака:

Симптоми кај листовите: листовите беа мали, светло зелени до жолти, со послабо или посилено изразена некроза, совиени кон внатрешноста, со триаголен изглед и поставени како ќерамиди една врз друга (Слика 2 до 10).



Слика 2. Симптоми предизвикани од столбур фитоплазмата (BN) кај сортата Шардоне, лозарска единица Сопот, Велес, сезона 2012.



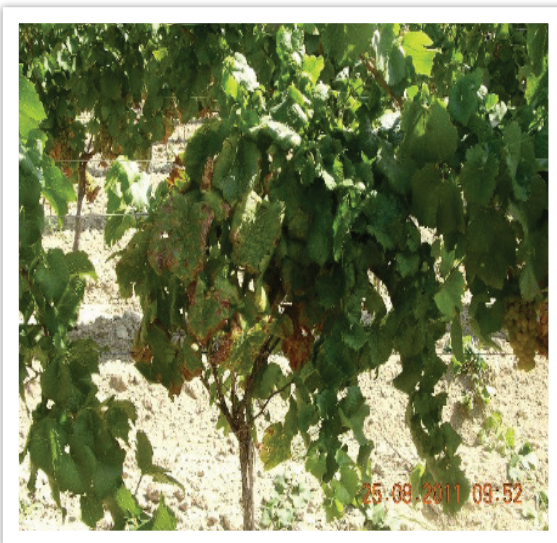
Слика 3. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – економски штети, сушење на гроздовите - сезона 2012.



Слика 4. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – јака инфекција и сушење на гроздовите - сезона 2012.



Слика 5. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица с. Лепово, Неготино – јака инфекција на лисната маса – сезона 2011.



Слика 6. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица с. Лепово, Неготино – целосно зафатена лоза - сезона 2011.



Слика 7. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица с. Лепово, Неготино – почетен стадиум на сушење на гроздот - сезона 2011.

Симптоми кај ластарите: кај зрелите ластари се развиваа скратени интернодии, а тие беа еластични и зелени (не лигнифициран) на крајот на вегетацијата (Слика 8).



Слика 8. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – зелен, нелигнифициран ластар со скратени интернодии – сезона 2010.



Слика 9. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – триаголни листови и нелигнифицирани ластари – сезона 2010.

Симптоми кај гроздовите: зрната кај заразените лози беа мали, најчесто во почетна инфекција, недоволно созреани, се собираа и сушеа во фаза на берба на грозјето (Слика 10). Една од симптоматолошките карактеристики на фитоплазмите во однос на вирусните патогени, се однесува на економскиот праг т.е. делува на намалувањето на приносот на грозје.



Слика 10. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Шардоне, од лозарска единица Сопот, Велес – зелен, многу јака инфекција и сушење на гроздовите – сезона 2008.

- Фитоплазматска инфекција кај сортата Вранец (симптоми)

Сортата Вранец (суровина за производство на црвени вина), е исто така многу осетлива сорта на проучуваните групи на фитоплазми (Mitrev et al., 2007).

Оваа сорта е осетлива на ниски температури и затоа не се препорачува да се сади на ниски терени и депресивни локации (Божиновиќ, 2005). Оваа негативна карактеристика поради слабо созревање на ластарите е дополнително потенцирана кај растенијата инфицирани со фитоплазми (Mitrev et al., 2007, 2009, 2011).

Симптомите кај оваа сорта се забележуваат при крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно можат да се забележат во септември (Mitrev et al., 2007). Најчестите промени кај сортата Вранец, во периодот при крајот на летото (крај на август почеток на септември), изгледаат вака:

Симптоми кај листовите: беа мали, делумно или целосно црвени, со послабо или посилено изразена некроза, свиткани кон внатрешноста, и со не многу изразен триаголен изглед (Слика 11, 12). При теренска анализа, многу јасно се забележуваат во редот и од далеку, поради карактеристичната промена на бојата на лисната маса во црвена, која во многу случаи може да биде причина и од некоја вирусна инфекција или пак комбинација на фитоплазматска и вирусна (мешана) инфекција (Слика 13).



Слика 11. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – промена на бојата на лисната маса – сезона 2013.



Слика 12. Локалитет Сарчиево, сорта Вранец, триаглен изглед на листовите заболени со столбур - сезона 2009.



Слика 13. Мешана инфекција кај сортата Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – столбур фитопазма / leafroll вирус – сезона 2013.

Симптоми кај ластарите: зрелите ластари беа со скратени интернодии, еластични и зелени (не лигнифицирани), на крајот на вегетацијата (Слика 14).



Слика 14. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци - нелигнифициран ластар со скратени интернодии – сезона 2013

Симптоми кај гроздовите: зрната беа мали, најчесто во почетна инфекција недоволно созреани, собирани, суви во фаза на берба на грозјето (слика 15а, б, в).



Слика 15а. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – изглед на грозд – сезона 2013.



Слика 15б. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – целосно исушен грозд – сезона 2013.

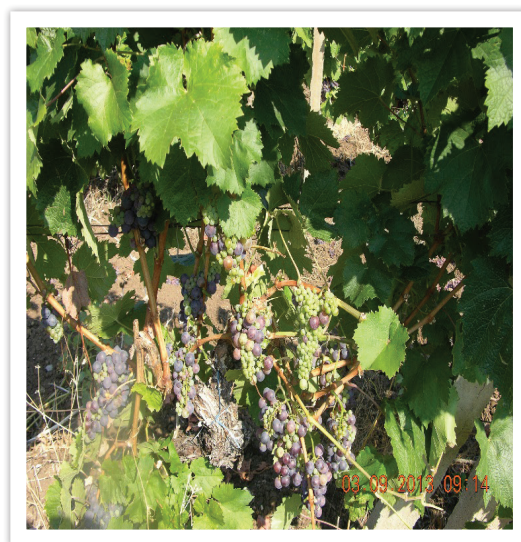


Слика 15в. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – симптоми на лист и гроздовите – сезона 2013.

На Слика 16 е прикажана делумно инфицирана лоза, материјал колекциониран од локалитет Кавадарци, лозарска единица м.в. Брловец, во сезона 2013, додека Слика 17 прикажува здрава лоза (несимптоматична), од која беше собран материјал за анализа – како негативна контрола.



Слика 16. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – парцијално инфицирана лоза – сезона 2013.



Слика 17. Сорта Вранец, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – здрава лоза земена како негативна контрола – сезона 2013.

- Фитоплазматска инфекција кај сортата Кратошија (симптоми)

Сортата Кратошија (суровина за производство на квалитетни и врвни црвени вина), е црногорска автохтона сорта (Божиновиќ, 2005).

На сите анализирани теренски површини (Табела 11, 12, 16), забележавме мал процент на останати лози од Кратошија во лозов насад со Вранец, т.е. сортата Кратошија се одгледува како придружна сорта за купажа со сортата Вранец, со количество до 5 % (Божиновиќ, 2005).

Како сорта, Кратошијата е осетлива на ниски температури, и затоа треба особено да се внимава при изборот на микролокации за подигање на насади (Божиновиќ, 2005). Имајќи предвид дека има помала родност од соратата Вранец, слични агробиолошки карактеристики и послаб квалитет на виното, во наши услови не се препорачува за самостојно одгледување (Божиновиќ, 2005).

Симптомите кај оваа сорта се забележуваат во истиот временски период, како и во случај со симптомите и кај другите сорти (при крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно можат да се забележат во септември).

Симптомите кои ги забележавме во текот на теренските истражувања, можеме да ги опишеме на следниов начин:

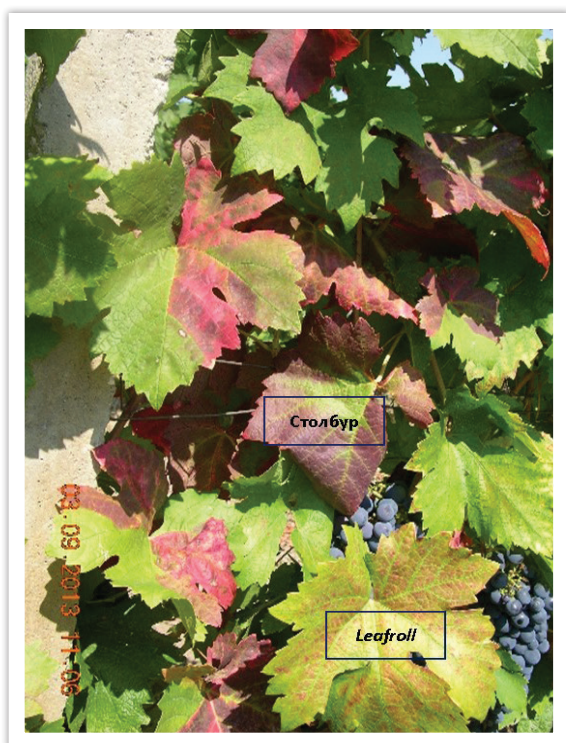
Симптоми кај листовите: листовите беа делумно или целосно црвени, со послабо или посилно изразена некроза, помалку или повеќе свиткани кон внатрешноста, со слабо изразен триаголен изглед (Слика 18 б). На еден дел од симптомите прикажани на Слика 18 б, се забележува и вирусна инфекција (ситни црвени точкести дамки - мешана симптоматологија на една лоза).

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

Симптоми кај гроздовите: зрната кај заразените лози беа мали, најчесто во почетна инфекција недоволно созреани, кои во фаза на берба на грозјето се собираа и сушеа (Слика 18 а).



Слика 18 а. Симптоми од столбур фитоплазмата кај сортата Кратошија, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – симптоми на лист и сушење на гроздот – сезона 2013.



Слика 18 б. Мешана инфекција - симптоми од столбур фитоплазмата и leafroll вирус кај сортата Кратошија, од лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – симптоми на лист – сезона 2013.

- Фитоплазматска инфекција кај сортата Станушина (симптоми)

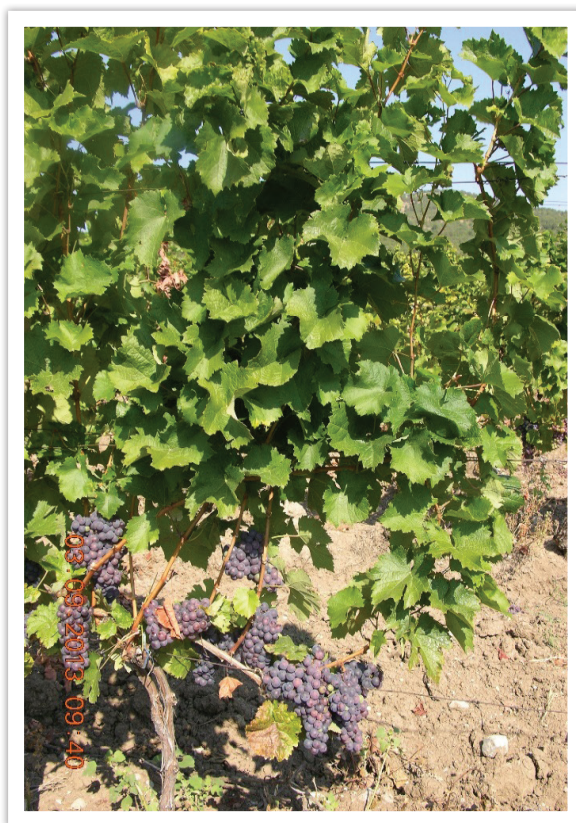
Сортата Станушина (суровина за производство на црвени вина) е домашна автохтона сорта од тиквешкото виногорје каде што сè уште се одгледува. Тоа е сорта која го карактеризира типот на црвените, јаки и тешки вина (Божиновиќ, 2005).

Инаку сортата Станушина обезбедува суровина за производство на црвени и розе вина. Се одржува на суви, сиромашни и варовити почви. Таа е сорта која најрационално ги користи слабите терени и е една од најотпорните сорти на суша (Божиновиќ, 2005).

Оваа сорта, во споредба со високоосетливите сорти Шардоне и Вранец, помалку е осетлива на проучуваните групи на фитоплазми (Kostadinovska et al., 2014). При манифестирање на симптомите од инфекциите со фитоплазми, сортата Станушина, се разликуваат од општите одлики на симптомите кај црвените сорти (Kostadinovska et al., 2014). Според времето на појава на симптомите на терен, тие со сигурност се забележуваат при крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно во септември.

Во текот на теренските испитувања, кај сортата Станушина ги забележавме следниве симптоми на фитоплазматски инфекции:

Симптоми кај листовите: листовите беа мали, делумно или целосно пожолтени, со послабо или посилено изразена некроза, свиткани кон внатрешноста, со јасно изразен триаголен изглед, и наредени едни врз други како ќерамиди (Слика 20 а, б). Симптомите на лисната маса се исти како симптоми кај белите сорти (пр. исти симптоми се забележани кај осетливата сорта Шардоне). Како негативна контрола, беа земени примероци од здрава лоза (Слика 19).



Слика 19. Автохтона сорта Станушина, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – здрава лоза како негативна контрола – сезона 2013.



Слика 20 а. Автохтона сорта Станушина, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – целосно зафатена лоза-сезона 2013.



Слика 20 б. Автохтона сорта Станушина, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – целосно зафатена лоза – сезона 2013.

Ова се издвојува како еден вид на феномен и отстапување во природата дека кај црвените / црните сорти листовите добиваат црвена боја како резултат на фитоплазматска или вирусна инфекција. Слична симптоматологија била забележана и кај црвената сорта Пловдина, од страна на Кузманович и сор., а сортата била инфицирана со *Flavescence dorée* фитоплазмата (Kuzmanovic et al., 2006). Ваквиот феномен досега е познат само во виногорјата кај нашиот северен сосед – Србија. Сакаме во оваа прилика да истакнеме дека во текот на нашите истражувања идентификувавме идентичен феномен и кај нас. 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 (Vogs et al., 2005; Hren et al., 2009).

Симптоми кај ластарите: зрелите ластари беа со скратени интернодии, еластични и зелени (не лигнифицирани) на крајот на вегетацијата (Слика 21).

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 се собираа и се сушеа (Слика 21).



Слика 21. Автохтона сорта Станушина, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – зелен ластар, нерамномерно созревање на грозјето и сушење на зрната – сезона 2013.

- Фитоплазматска инфекција кај сортата Франковка (симптоми)

Франковката, како суровина, е добра сорта за производство на квалитетни црвени вина, особено за посеверните виногорја, поради добрата родност, средно созревање и отпорност на зимски ниски температури (Божиновиќ, 2005).

Кај нас, не е предвидено понатамошно нејзино ширење, но би можела да биде застапена во посвежите виногорја, на мали површини и одбрани микролокации (Божиновиќ, 2005).

Времето на појава и дијагностицирање на симптомите на терен кај оваа сорта, се забележуваат при крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно можат да се забележат во септември.

Поради малата застапеност и изолираност по локалитети каде сеуште ја има оваа сорта, симптоматологијата на терен изгледаше вака:

Симптоми кај листовите: кај листовите се јавуваше делумно или целосно поцрвенување, со светла до темно црвена боја, со отсјај на лисната маса (Слика 22 а, б). Посилно изразени симптоми на лисната маса, завршуваа со сушење и некротизирање на краевите на листовите.

Симптоми кај ластарите: зрелите ластари беа со скратени интернодии, еластичен и зелен (не лигнифициран) на крајот на вегетацијата (Слика 22а).

Симптоми кај гроздовите: зрната кај заразените лози беа мали, најчесто во почетна инфекција недоволно созреани, нерамномерно созреани, а во некои случаи собирани и исушени. Кај некои симптоматични лози, забележавме отсуство на формирање на гроздови (Слика 22 а, б).



Слика 22 а. Сорта Франковка, лозарска единица Авлаки, Гевгелија – симптоми на лисната маса од столбур фитоплазма – сезона 2012.



Слика 22 б. Сорта Франковка, лозарска единица Авлаки, Гевгелија – симптоми на лисната маса од столбур фитоплазма – сезона 2012.

- Фитоплазматска инфекција кај сортата Каберне совињон (симптоми)

Каберне совињон, како суровина за производство на високо квалитетни црвени вина, во наши услови има широк ареал на распространување и има услови за одгледување во сите наши виногорја (Божиновиќ, 2005).

Оваа сорта е слабо осетлива на фитоплазматските промени, па затоа е потребно нејзино понатамошно ширење со користење на проверени клонови (Божиновиќ, 2005).

Времето на појава и дијагностицирање на симптомите на терен кај оваа сорта, се вообичаено се при крајот на август, но најинтензивно и најјасно воочливи се во средина на септември.

Симптомите кај природно заразените лози од оваа сорта се следниве:

Симптоми кај листовите: кај листовите се развиваше делумно или целосно поцрвенување, со светла до темно црвена боја и свиткување кон внатрешноста на лисната маса. Забележавме дека кај некои клонови листовите се повеќе свиткани, за разлика од некои други клонови, кај кои воопшто нема свиткување на листовите (Слика 23).



Слика 23. Сорта Каберне совињон, локалитет с. Амзабегово – с. Пеширово, м.в. Струга – симптоми на лисната маса од столбур фитоплазма – сезона 2012.

Симптоми кај ластарите: зрелите ластари беа со скратени интернодии, еластичен и зелен (не лигнифициран) изглед на крајот од вегетацијата (Слика 24).

Симптоми кај гроздовите: зрната кај заразените лози беа мали, најчесто недоволно созреани. Исто така, се забележуваше нерамномерно созревање на гроздовите, нивно собирање и сушење. Кај некои симптоматични лози, забележавме отсуство на формирање на гроздови.



Слика 24. Сорта Каберне совинјон, локалитет с. Амзабегово - с.Пеширово, м.в. Струга – парцијални симптоми, незадрвенет ластар и кратки интернодии – сезона 2012.

- Лажни / маскирани симптоми кај виновата лоза

Во текот на теренските анализи направени во периодот од 2008 до 2013 година, забележани се и нетипични симптоми. Така, кај одредени лози на врвниот дел од ластарите можеше да се забележат карактеристични симптоми за фитоплазматски инфекции, но останатиот дел од лозата да е условно „здрав“, односно без видливи симптоми на зараза (Слика 25 б, в).

Вакви промени настануваат како резултат на активноста на *Stictoccephala bisonia* (*Membracidae /Smiliinae*), која ги полага своите јајца во младиот ластар. Поради тоа се случува блокада на спроводните садови, од делот на положените јајца (Kunz et al., 2010). Таквите листовите ја менуваат бојата (пожолтуваат / поцрвенуваат), го менуваат обликот и можеа да бидат свиткани кон внатрешноста (Слика 25 а, б, в). Како резултат на активноста на инсектите, единствено врвниот дел имаше промени

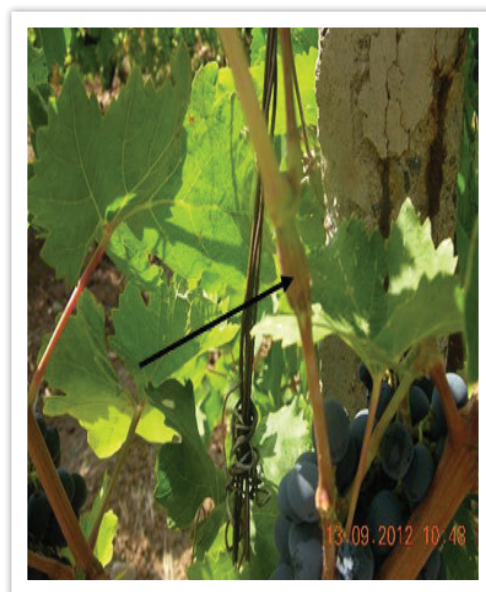
на бојата и морфологијата, останатиот дел од лозата беше „здрав“ – без видливи симптоми.

Вакви лажни симптоми на терен многу почесто беа забележувани кај многу бујни лози, со многу лисна маса, каде што како резултат на човековиот фактор при механичко оштетување (поткршување) на ластарот, делот од оштетувањето, и нагоре, покажуваше карактеристични и типични симптоми од фитоплазматска природа.

Затоа, при анализа на симптоматичните промени на терен, секогаш се правеше и преглед на целата лоза (преглед на целокупната лисна маса на лозата, изглед на интернодиите и на гроздовите), пред да се колекционира материјал за лабораториска анализа.



Слика 25 а. Сорта Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – лажни симптоми предизвикани од инсектот *Stictoccephala bisonia* - сезона 2012.



Слика 25 б, в. Сорта Вранец, лозарска единица м.в. Брловец, Кавадарци – лажни симптоми предизвикани од инсектот *Stictoccephala bisonia* - сезона 2012.

- Фитоплазматски промени кај плевелната вегетација

Плевелите се растенија што го намалуваат приносот на земјоделските култури и профитабилноста на земјоделството, при што се натпреваруваат со култивираниите растенија за влага, светлина и за хранливи материи (Шифер и Монкада, 2009). Во случајот на одгледувањето на виновата лоза, плевелната вегетација покрај конкурентските односи за опстанок имаат и друга поважна улога – претставуваат примарни домаќини на инсектите вектори (цикади) кои ги пренесуваат фитоплазмите (Bertaccini & Duduk, 2009; Kostadinovska et al., 2014).

Инсектите вектори својот животен циклус го започнуваат од почвата, па така во текот на пролетниот период (крајот на мај) формираната возрасна единка започнува да се храни со плевелната вегетација, која и е приоритетен извор за егзистенција (Kunz et al., 2010). Повремено во текот на својот животен циклус, цикадите поминуваат на виновата лоза, се хранат, ги всмукуваат фитоплазмите од симптоматичната лоза, и по исхраната преминуваат повторно на плевелната вегетација. На тој начин, преку процесот на исхраната, цикадите прават пренесување на фитоплазмите од виновата лоза на плевелната вегетација, или пак на друга здрава лоза (Weintraub & Beandland, 2006; Weintraub & Jones, 2010; Maixner, 2011; Ertunc, 2013).

Во текот на нашите теренски истражувања, утврдивме дека и покрај присуството на векторски инсекти, видливи симптоми од фитоплазматски инфекции кај плевелната флора, не беа присутни. Меѓутоа, заради целосна анализа на патогенетските процеси и потполно разјаснување на епидемиологијата на овие заболувања кај виновата лоза, беше направено собирање на различни примероци од плевели присутни во лозовите насади, покрај симптоматичниот лозов материјал, или околу самиот насад.

Во прилог се прикажани фотографии од различни плевели собрани околу лозовиот насад и под самите симптоматични лози (Слика 26 до 34).



Слика 26. *Clematis vitalba*, околу лозов насад кај лозарска единица м.в. Брловец, локација Кавадарци – сезона 2013.



Слика 27. *Ecbalium elaterium*, под симптоматична лоза, сорта Шардоне, локалитет Велес, Сопот, - сезона 2008.



Слика 28. *Ecbalium elaterium*, под симптоматична лоза, сорта Шардоне, Велес, Сопот – сезона 2008



Слика 29. *Cuscuta spp.*, под симптоматична лоза, сорта Шардоне, Велес, Сопот - сезона 2008.



Слика 30. *Cuscuta spp.*, околу симптоматична едногодишна лоза, сорта Шардоне, с. Аргулица, м.в. Тупанец - сезона 2010.



Слика 31. *Solanum nigrum*, во близина на симптоматична лоза, Вранец, с. Аргулица, м.в. Тупанец - сезона 2010.



Слика 32. *Convolvulus arvensis*, под симптоматична лоза, сорта Шардоне, Амзабегово - Пеширово, м.в. Струга - сезона 2012.



Слика 33. *Portulaca oleracea*, под симптоматична лоза, сорта Вранец, с. Пеширово - сезона 2012.



Слика 34. *Portulaca oleracea*, под симптоматична лоза, сорта Вранец, колекциониран од локалитетот Радовиш во сезона 2008.

5.2.2. Вирусна инфекција кај лозовите насади

Во текот на визуелниот преглед на лозовите насади, покрај фитоплазматските беа следени и вирусните промени. Како што е претходно истакнато, во овие испитувања беше следен вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (флоемски патоген). Како во случајот со фитоплазматските инфекции, така и во случајот со GLRaV - инфекциите, потврдата на вирусниот статус на сомнителните симптоми, беше лабораториски докажувана.

Така, врз основа на теренските испитувања и лабораториската потврда на патогенитетот, во оваа прилика 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 (Слика 35 до 40). 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 (Слика 39 а, б, в);
- нерамномерно созревање на гроздинките (Слика 37 а, б);
- намалени шеќерни единици и губење на квалитетот на грозјето;
- ненавремено и одложено созревање на грозјето.

- Вирусна инфекција кај сортата Каберне совиньон (симптоми)

Симптоми на лисната маса: 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 35 а, б, в).

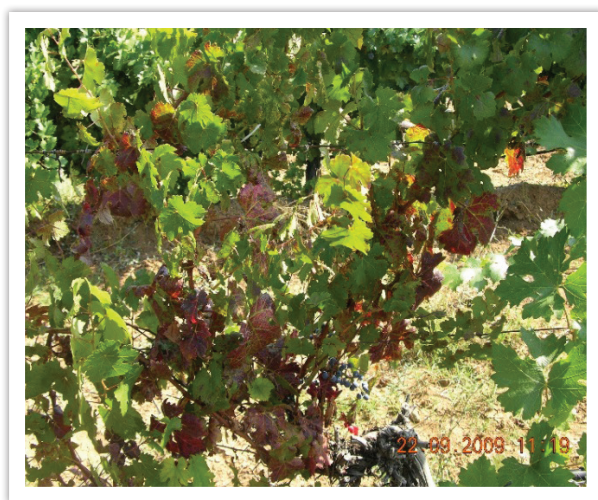
Симптоми на гроздот: гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (Слика 35 а).



Слика 35а. Сорта Каберне совиньон, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, црвенило на листовите со зелена нерватура и со големи, здрави гроздови, но со кисел вкус – сезона 2009.



Слика 35б. Сорта Каберне совиньон, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, јака инфекција на лисната маса – сезона 2009.



Слика 35в. Сорта Каберне совиньон, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, целосно поцрвенување на лисната маса, сезона 2009.

- Вирусна инфекција кај сортата Мерло (симптоми)

Симптоми на лисната маса: 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 36 а, б, в).



Слика 36 а. Сорта Мерло, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV - сезона 2010.



Слика 36 б. Сорта Мерло, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV - сезона 2010.

Симптоми на гроздот: 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 36в).



Слика 36 в. Сорта Мерло, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV - сезона 2010.

- Вирусна инфекција кај сортата Вранец (симптоми)

Симптоми на лисната маса: 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 (Слика 37 а, б, в). 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 38 а, б, в).

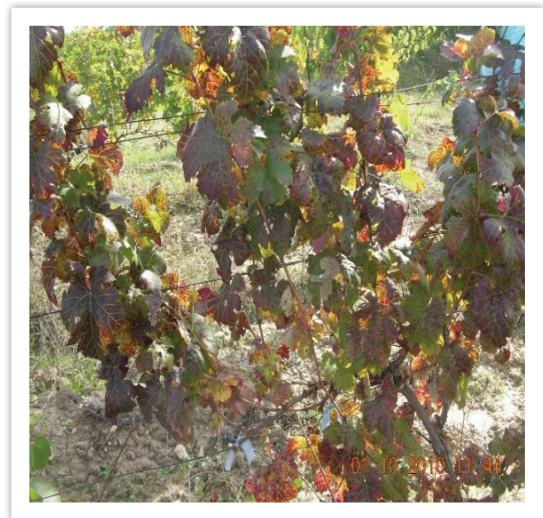
Симптоми на гроздот: гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (Слика 37 а, б).



Слика 37 а, б. Сорта Вранец, локалитет с. Карбинци, м.в. Балабаница – GLRaV, симптоми на лисна маса, со јасна зелена нерватура и нерамномерно созревање на гроздовите - сезона 2010.



Слика 37 в. Сорта Вранец, локалитет с. Карбинци, м.в. Балабаница – GLRaV, симптоми на две соседни лози - сезона 2010.



Слика 38 а, б. Сорта Вранец, локалитет с. Криви Дол – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, свиткување на листовите, промена на бојата и зелена нература - сезона 2010.



Слика 38 в. Сорта Вранец, локалитет с. Криви Дол – GLRaV, силна инфекција на лисната маса - сезона 2010.

- Вирусна инфекција кај сортата Станушина (симптоми)

Симптоми на лисната маса: беа со јасно изразено пожелтување и зелена нерватура на лисната маса, со јака морфолошка деформација (свиткување на листот кон внатрешноста и триаглен изглед), и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови (Слика 39 а, б, в). Кај некои лози, се забележуваше целосно пожелтување на лисната маса на целата лоза, и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот (Слика 39 а, б, в).

Симптоми на гроздот: 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 39 а, б).



Слика 39 а, б. Сорта Станушина, локалитет Кавадарци, м.в. Брловец – GLRaV, силна инфекција на лисната маса - сезона 2012.



Слика 39 в. Сорта Станушина, локалитет Кавадарци, м.в. Брловец – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, промена на бојата и свиткување на листовите кон внатрешноста - сезона 2012.

- Вирусна инфекција кај сортата Црн бургундец (симптоми)

Симптоми на лисната маса: 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 40 а, б). 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 40 а, б).

Симптоми на гроздот: 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 40 а, б).



Слика 40 а. Сорта Црн бургундец, локалитет Штип, м.в. Каваклија – GLRaV, инфекција на лисната маса, црвени листови со триаглест изглед – сезона 2013.



Слика 40 б. Сорта Црн бургундец, локалитет Штип, м.в. Каваклија – GLRaV, црвенило со зелена нерватура – сезона 2013.

5.3. Мапа на дистрибуција на флоемските патогени

Според климатските услови, надморската височина, како и начинот на одгледување на лозовите насади, во тиквешкото виногорје и Штипскиот регион, последователно секоја година беше забележано присуство на фитоплазматските и вирусните промени.

Во Скопскиот регион беше забележана инфекција, но во забележителни граници, но ситуацијата на терен не беше алармантна. Во Битолскиот регион, во лозарската единица на Лозар, Битола, не беше забележана инфекција на следените површини.

Табела 33. Приказ на процентот на фитоплазматска инфекција, по сортимент и години на испитување, пресметани според Mc-Kinney

Локалитет	Лозарска единица	Сорта	Година	Вкупен број симптоматични примероци од фитоплазматска инфекција на 1000 лози	Процент на инфекција според Mc-Kinney
Штип	м.в. Каваклија	Црн бургундец	2013	5	0.5
	с. Три чешми	Смедеревка	2008	10	1.0
	м.в. Ежово	Вранец	2010	35	3.5
	м.в. Врпка	Смедеревка	2008	18	1.8
	м.в. Рајкова чука	Вранец	2008	15	1.5
	с. Криви Дол	Вранец	2012	25	2.5
с.Сарчиево	с. Сарчиево	Вранец	2012	45	4.5
с.Караорман	м.в. Балабаница	Вранец	2010	75	7.5
		Шардоне		49	4.5
с.Амзибегово Пеширово	м.в. Струга	Шардоне	2013	85	8.5
		Вранец		32	3.2
Велес	м.в. Сопот	Шардоне	2012	125	12.5
		Рајнски ризлинг	2012	21	2.1

продолжеток на табела 33.

Локалитет	Лозарска единица	Сорта	Година	Вкупен број на симптоматични примероци од фитоплазматска инфекција на 1000 лози	Процент на инфекција според Mc-Kinney
Тиквешко виногорје	с. Крњево м.в. Брловец	Станушина	2013	35	3.5
		Вранец		47	4.7
		Кратошија		2	0.2
		Шардоне		15	1.5
	м.в. Прпорец с. Чемерско	Вранец	2013	45	4.5
		Црн бургундец	2013	21	2.1
	с. Раец	Станушина	2013	62	6.2
		Вранец		45	4.5
		Шардоне		82	8.2
		Кратошија		2	0.2
Амзабегово	Лозје Уни Сервис АГРО	Вранец	2013	10	1.0
Демир Капија	Попова кула	Жилавка	2012	15	1.5
Свети Николе	с. Црнилиште	Вранец	2013	35	3.5
	с. Пеширово	Вранец		41	4.1
	с. Ерџелија	Вранец		28	2.8
	Покрај пат (Бониер)	Италијански ризлинг		4	0.4
Св. Николе / Куманово	покрај пат	Вранец	2012	10	1.0
Куманово	покрај пат	Вранец	2013	15	1.5
	покрај пат II	Вранец		29	2.9
с. Долни Балван	с. Долни Балван	Кратошија	2013	5	0.5
		Вранец		89	8.9
		Смедеревка		10	1.0
с. Батање	с. Батање	Вранец	2013	35	3.5
		Кратошија		5	0.5

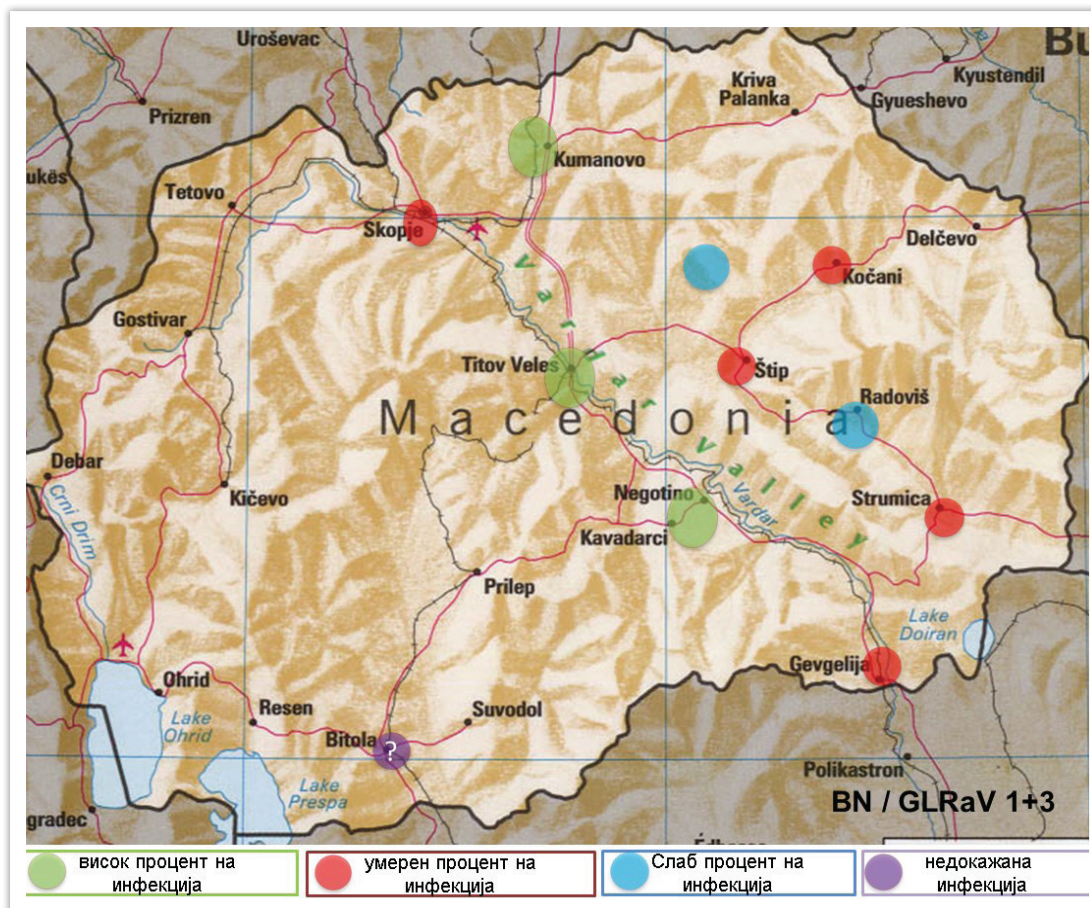
продолжеток на табела 33.

Локалитет	Лозарска единица	Сорта	Година	Вкупен број на симптоматични примероци од фитоплазматска инфекција на 1000 лози	Процент на инфекција според Mc-Kinney
Неготино	с. Ридиште	Шардоне	2011	97	9.7
	с. Лепово	Вранец	2011	89	8.9
Скопје	м.в. Четири патишта	Смедеревка	2012	21	2.1
		Шардоне		64	6.4
		Вранец		68	6.8
		Црн бургундец		45	4.5
Валандово	с.Јосифово	Вранец	2009	29	2.9
	с.Балинци	Шардоне		75	7.5
с. Аргулица	м.в. Тупанец	Вранец	2008	47	4.7
		Шардоне		65	6.5
		Мерло		7	0.7
Струмица	с. Хамзали	Вранец	2008	21	2.1
		Мерло		5	0.5
		Каберне совињон		10	1.0
Неготино	с. Долни Дисан	Хамбург	2008	9	0.9
		Вранец		47	4.7
		Шардоне		35	3.5
	Ило Виларов	Вранец	2011	64	6.4
		Шардоне		69	6.9

Табела 34. Приказ на процентот на инфекција со GLRaV, по сортимент и години на испитување, пресметани според Mc-Kinney

Локалитет	Лозарска единица	Сорта	Година	Вкупен број на симптоматични примероци за GLRaV вирусот на 1000 лози	Процент на инфекција според Mc-Kinney
Штип	с. Три чешми	Смедеревка	2008	10	1.0
	м.в. Ежово	Вранец	2010	12	1.2
	с. Криви Дол	Вранец	2012	16	1.6
	с. Ново Село	Вранец	2009	5	0.5
	м.в. Каваклија	Црн бургундец	2013	25	2.5
	с. Долни Балван	Вранец	2013	16	1.6
	с. Батање	Вранец	2013	29	2.9
Кочани	м.в. Стари лозја	Вранец	2009	12	1.2
с. Караорман	м.в. Балабанци	Вранец	2010	32	3.2
с.Аргулица	м.в. Тупанец	Вранец	2010	59	5.9
с.Сарчиево	с. Сарчиево	Вранец	2012	36	3.6
Свети Николе	с. Ерџелија	Вранец	2009	39	3.9
с. Амзабегово / с. Пеширово	м.в. Струга	Вранец	2013	72	7.2
с. Пеширово	с.Пеширово	Вранец	2013	58	5.8
с. Црнилиште	с.Црнилиште	Вранец	2013	73	7.3
Овче Поле	приватно лозје	Вранец	2013	29	2.9
Велес	м.в. Сопот	Мерло	2012	35	3.5
Тиквешко виногорје	Кавадарци,с. Чемерско	Црн бургундец	2011	42	4.2
	Кавадарци, с. Крњево, м.в. Брловец	Кратошија	2013	11	1.1
	Кавадарци, с. Раец	Вранец	2013	95	9.5
	Демир Капија	Вранец	2013	97	9.7
	Неготино, м.в. Ило Виларов	Вранец	2011	106	10.6
	Неготино, с. Лепово	Вранец	2011	97	9.7
Куманово	Кумановско	Вранец	2013	84	8.4
Валандово	с. Јосифово	Вранец	2012	64	6.4
Гевгелија	м.в. Авлаки	Франковка	2012	16	1.6
Скопје	м.в. Четири патишта	Вранец	2012	77	7.7
Битола	Битолско, Лозар	Италијански ризлинг	2011	9	0.9

Во зависност од локалитетот, ареалот на испитување, маркираните и забележани симптоми на терен, како и лабораториска потврда, направена е мапа на дистрибуција на фитоплазматските и вирусните промени кај виновата лоза (Шематски приказ 8).



Шематски приказ 8. Мапа на дистрибуција на симптомите на терен

5.4. Лабораторски анализи за докажување на присуството на фитоплазмите кај виновата лоза

5.4.1. 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 во нашите лозови насади, беше направена мултилокусна анализа, т.е. умножување на седум различни геноми со употреба на различни прајмерски комбинации (Табела 35 и 36).

Исто така, беше направен рестрикциски полиморфизам со примена на шест 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 (Табела 35 и 36).

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.

Табела 35. Изолати од 2012 година, од различен сортимент, тестирани на четири гена и дигестирање со четири ензими специфични за секој ген

Ред. бр.	Шифра на примерок	Сорта	Прајмерски комбинации за 16SrRNA		ензим	гени			ензими		
			P1P7 / M1B6 ¹	P1P7/ F1R1 ¹		MseI ¹	Tuf ²	Vmp ³	Stamp ⁴	Hpa II ²	Rsa I ³
1	019/12	Вранец	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S1
2	028/12	Шардоне	++	++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
3	029/12	Шардоне	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V2-TA	S1
4	044/12	Вранец	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type I	V3	S2
5	047/12	Вранец	+++	++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V2-TA	S1
6	048/12	Вранец	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type I	V3	S2
7	057/12	Шардоне	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
8	061/12	Вранец	++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S1
9	062/12	Вранец	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
10	066/12	Шардоне	+++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S3
11	074/12	Вранец	++	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S3
12	086/12	Станушина	+	+	?	+	+++	+++	Type II	V2-TA	S1
13	094/12	Станушина	+++	++	?	+	+++	+++	Type II	V18	S1
14	097/12	Вранец	++	++	XII-A	+	+++	+++	Type II	V3	S2
15	103/12	Вранец	+	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
16	104/12	Вранец	+	+++	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V4	S1
17	111/12	Вранец	+++	+	XII-A	+++	+++	+++	Type II	V14	S1

Легенда:

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

+ / ++ / +++ -----квалитет на добиентиот фрагмент

? ----- нејасно дигестирани продукти

Табела 36. Изолати од 2012 година, од различен сортимент, тестирани за три гени и дигестирање со три групи на ензими специфични за секој ген

Ред. бр.	Шифра на примерок	Сорта	гени			ензими		
			<i>trxA-truB</i> ¹	<i>rplS – csdB</i> ²	<i>cbiQF1-glyAR1</i> ³	<i>Bsa</i> III ¹	<i>Hpy</i> CH4V ²	<i>Hpy</i> 1881 ³
1	019/12	Вранец	+++	+++	+++	A	A	C1
2	028/12	Шардоне	+++	++	+++	A	B	C1
3	029/12	Шардоне	+++	+++	+++	A	A	C1
4	044/12	Вранец	+++	+++	+++	B	B	C1
5	047/12	Вранец	+++	+++	+++	A	A	C1
6	048/12	Вранец	+++	+++	+++	B	A	C1
7	057/12	Шардоне	+++	+++	+++	A	A	C1
8	061/12	Вранец	+++	+++	+++	A	A	C1
9	062/12	Вранец	+++	+++	+++	A	A	C1
10	066/12	Шардоне	+++	+++	+++	A	A	C1
11	074/12	Вранец	+++	+++	+	A	B	C1
12	086/12	Станушина	+++	+++	+++	A	B	C1
13	094/12	Станушина	+++	+++	+++	A	B	C1
14	097/12	Вранец	+++	+++	+++	B	A	C1
15	103/12	Вранец	+++	+++	+++	A	B	C1
16	104/12	Вранец	+++	+++	+++	A	A	C1
17	111/12	Вранец	+++	+++	+++	A	A	C1

Легенда:

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

+ / ++ / +++ -----квалитет на добиентиот фрагмент

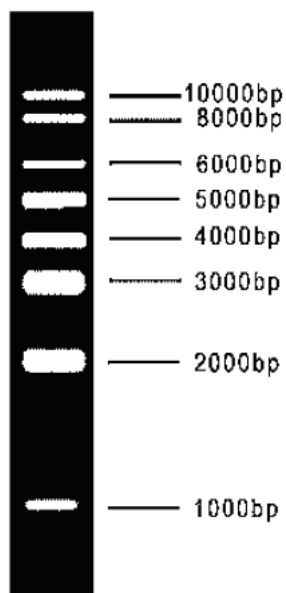
5.4.1.1. Ген за 16S rRNA

Фитоплазматскиот ген за 16S rRNA, со употреба на прајмерската комбинација P1/P7 (за директна полимеразна реакција), и F1/R1 (I) (вгнездена (nested) полимеразна реакција), го користевме на почеток на експериментот за докажување на присуството на фитоплазматски ген во испитуваниот материјал.

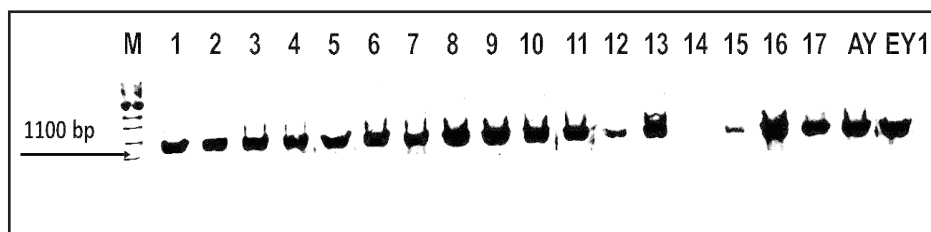
Вкупната нуклеинска киселина (TNA – total nucleic acid), беше изолирана од вкупно 766 примероци, собрани во периодот од 2008 до 2013 година. Во сите анализи беа користени наши симптоматични изолати, здрави примероци од кои беше изолирана вкупната ДНК како негативна контрола и референтни позитивни примероци (STOL C, EY1 и AY). Вкупно позитивни примероци се покажаа 415 изолати на ДНК (Табела 37).

При анализа на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, ампликони со големина од 1100 bp, успешно ги умножив кај примероците испитувани секоја година последователно (Слика 42 и 43).

Како маркер за споредување на големината на базните парови, беше користен 1 Kb DNA ladder на Sigma Aldrich и Invitrogen (Слика 41).



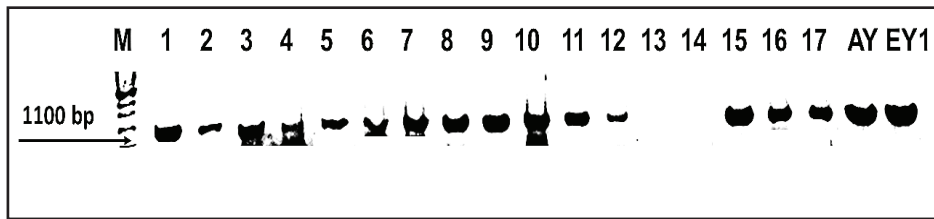
Слика 41. Маркер 1 Kb DNA ladder.



Слика 42. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, со примена на F1/R1 (I) прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од Табела 35.

M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

AY – asrer yellow, EY1- elm yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).



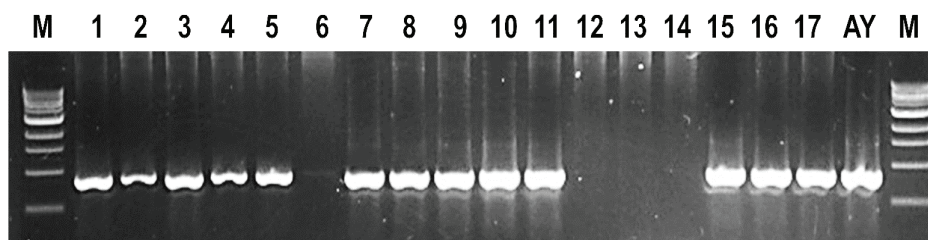
Слика 43. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, со примена на F1/R1 (I) прајмерскиот пар.

M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

AY – asrer yellow, EY1- elm yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).

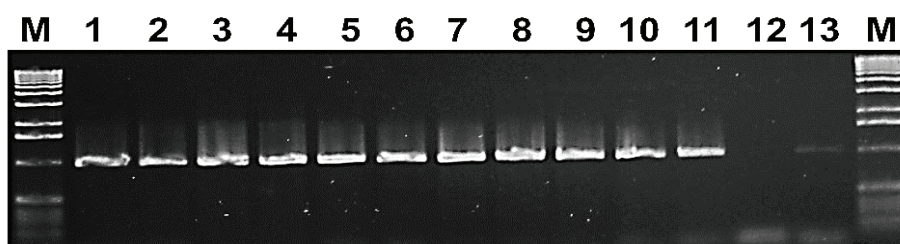
5.4.1.2. *tuf* ген

Умножувањето на фитоплазматскиот *tuf* ген, за карактеризација на видот на фитоплазмата (столбур), со примена на прајмерскиот сет ftufI-rtufI (за директна полимераза) и ftufAY-rtufAY (за вгнездена (nested) полимераза), со големина на продуктите од 1100 bp, беше направена на вкупно 415 позитивни примероци на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген. Кај автохтоната сорта Станушина, идентификацијата на *tuf* генот од вкупната изолирана нуклеинска киселина (TNA-total nucleic acid), за разлика од останатите примероци, беше потешко (со оптимизација на концентрацијата на ДНК), но сепак се докажаа позитивни примероци (Слика 44, 45). Ова е ген специфичен за столбур фитоплазмата, и кај позитивно потврдените примероци за фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, сите беа анализирани за *tuf* генот, и ни покажаа позитивни 302 примероци (Табела 37).



Слика 44. 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 35.

M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови AY – asrer yellow, EY1- elm yellow phytoplasma референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).



Слика 45. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *tuf* ген, со примена на *ftufAY-rtufAY* прајмерскиот пар.

1-11, сорта Станушина, локалитет Кавадарци, м.в. Брловец, 12 – здрави примероци од сортата Станушина, како негативна контрола, 13 – STOL C - референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).

Табела 37. Вкупен број анализирани примероци од различни сорти, со број на позитивни примероци за *tuf* ген

Локалитет	Лозарска единица	Сорта	Вкупен број анализирани примероци	Број на позитивни примероци за <i>tuf</i> ген	Ензимска дигестија <i>Hpa</i> II
Штип	м.в. Каваклија	Црн бургундец	1	0	/
	с. Три чешми	Смедеревка	10	10	Тип II
	м.в. Ежово	Вранец	25	23	Тип II
	м.в. Врпка	Смедеревка	6	4	Тип II
	м.в. Рајкова чука	Вранец	8	5	Тип II
	с. Криви Дол	Вранец	6	5	Тип II
с.Сарчиево	с. Сарчиево	Вранец	49	45	Тип II
с.Караорман	м.в. Балабаница	Вранец	9	8	Тип II
		Шардоне	7	7	Тип II
с.Амзибегово Пеширово	м.в. Струга	Шардоне	7	7	Тип II
		Вранец	8	5	Тип II
Велес	м.в. Сопот	Шардоне	30	24	Тип II
		Рајнски ризлинг	12	4	Тип II
Кавадарци	с. Крњево м.в. Брловец	Станушина	12	12	Тип II
		Вранец	8	7	Тип II
		Кратошија	2	0	/
		Шардоне	4	4	Тип II
	м.в. Прпорец	Вранец	2	2	Тип II
	с. Чемерско	Црн бургундец	1	1	Тип II
	с. Раец	Станушина	10	4	Тип II
		Вранец	3	2	Тип I
Шардоне		7	7	Тип II	
Кратошија		1	0	/	
Амзабегово	Лозје Уни Сервис АГРО	Вранец	2	1	Тип I

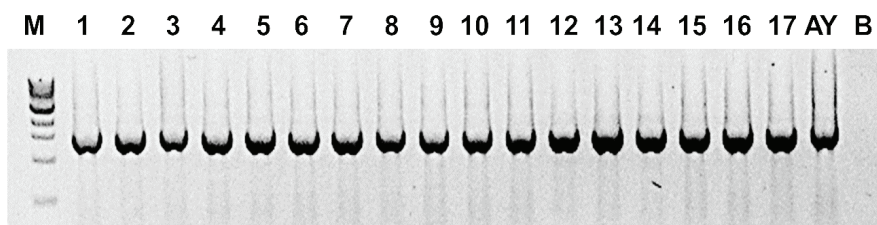
продолжување на табела 37.

Локалитет	Лозарска единица	Сорта	Вкупен број на анализирани примероци	Број на позитивни примероци <i>tuf</i> ген	Ензимска дигестија <i>Hpa</i> II
Неготино	с. Долни Дисан	Хамбург	11	2	Тип II
		Вранец	12	10	Тип II
		Шардоне	5	5	Тип II
	Ило Виларов	Вранец	8	7	Тип II
		Шардоне	5	5	Тип II
Неготино	с. Ридиште	Шардоне	5	5	Тип II
	с. Лепово	Вранец	8	7	Тип II
Скопје	м.в. Четири патишта	Смедеревка	6	3	Тип II
		Шардоне	9	5	Тип II
		Вранец	5	2	Тип II
		Црн бургундец	2	1	Тип II
Валандово	с. Јосифово	Вранец	5	5	Тип II
	с. Балинци	Шардоне	6	6	Тип II
Демир Капија	Попова кула	Жилавка	4	1	Тип II
Свети Николе	с. Црнилиште	Вранец	5	3	Тип II
	с. Пеширово	Вранец	7	4	Тип II
	с. Ерџелија	Вранец	8	6	Тип II
	Покрај пат (Бониер)	Италијански ризлинг	3	0	/
Св. Николе / Куманово	покрај пат	Вранец	7	2	Тип II
Кумановско	покрај пат	Вранец	5	5	Тип II
	покрај пат II	Вранец	6	3	Тип II
с. Долни Балван	с. Долни Балван	Кратошија	5	2	Тип II
		Вранец	4	3	Тип I
		Смедеревка	3	1	
с. Батање	с. Батање	Вранец	4	3	Тип II
		Кратошија	2	1	
с. Аргулица	м.в. Тупанец	Вранец	5	4	Тип I
		Шардоне	7	6	Тип II
		Мерло	5	1	Тип II
Струмица	с. Хамзали	Вранец	6	5	Тип II
		Мерло	3	0	/
		Каберне совињон	9	2	Тип II
ВКУПНО:			415	302	

5.4.1.3. *vmp1* ген (stol - 1H10)

Анализата на присуство на детерминанти на специфичниот *vmp1* ген (stol - 1H10) за столбур фитоплазмата, со примена на прајмерскиот сет H10F1 – H10R1 (за директна полимераза) и H10F2 – H10R2 (за вгнездена - nested полимераза), со големина на продуктите од 1570 bp, беше направена на вкупно 125 одбрани позитивни примероци на фитоплазматскиот *tuf* ген. Кај здравите примероци кои беа вклучени во полимеразната реакција како негативна контрола, не беше забележан процес на амплификација (Слика 46).

Од 125 анализирани примероци, вкупно 115 беа позитивни за *vmp1* генот (stol - 1H10), со добиени амплифицирани продукти на висина од 1570 bp.

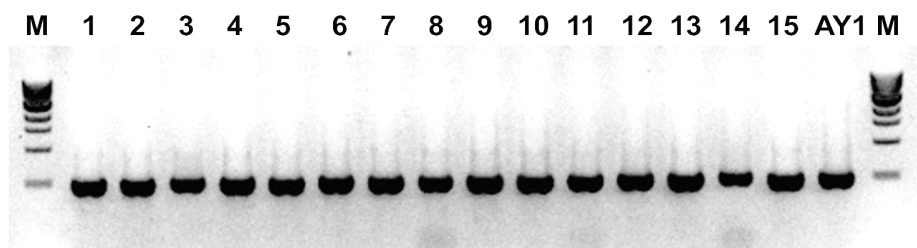


Слика 46. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *vmp1* ген, со примена на H10F2 – H10R2 прајмерскиот пар. Распоредот на продуктите одговара на шифрите на примероците од Табела 35.

M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови, AY – asrgr yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано), B – blank или негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина.

5.4.1.4. *Stamp* ген

Анализата на присуство на детерминанти на специфичниот *stamp* ген за столбур фитоплазмата, со примена на прајмерскиот сет stampF– stampR0 (за директна полимераза) и stampF1– stampR1 (за вгнездена (nested) полимераза), со големина на продуктите од 550 bp, беше направен на вкупно 125 одбрани позитивни примероци на фитоплазматскиот *tuf* ген. Од 125 анализирани примероци, вкупно 125 беа позитивни на *stamp* генот, амплифицирани на големина од 550 bp. Дел од позитивно добиените продукти се прикажани на Слика 47 и 48.

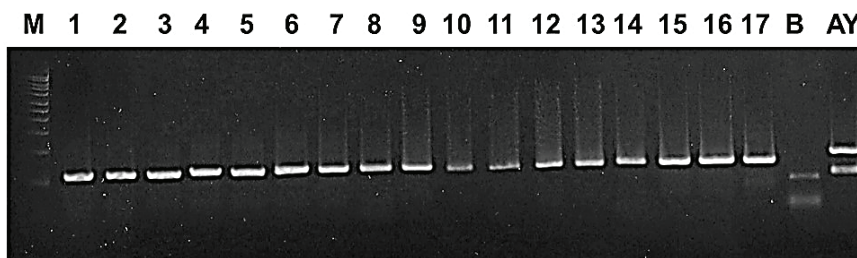


Слика 47. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *stamp* ген, со примена на *stampF1*– *stampR1* прајмерскиот пар.

Ознаките на гелот се однесуваат на: 1-5, сорта Станушина, Кавадарци, Крњево, м.в. Брловец, 6-8 Шардоне, Велес, Сопот, 9 – Вранец, Скопје, м.в. Четири патишта, 10-14 Кратошија, Долни Балван, 15 – Шардоне, Аргулица, м.в. Тупанец.

AY – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).

M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.



Слика 48. 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 35.

M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

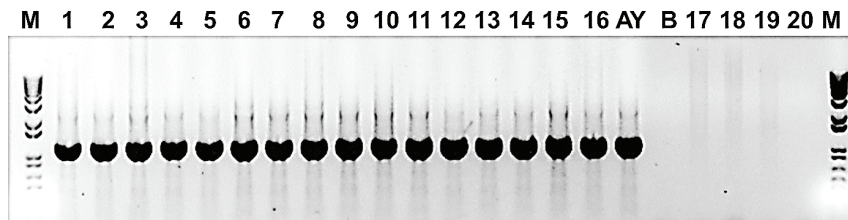
AY – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).

Генот *stamp* може лесно да се изолира и идентификува, бидејќи е лоциран во *groL-amp-nadE* генетскиот локус кој исто така се наоѓа и кај „*Candidatus P. asteris*“ и „*Candidatus P. Australiense*“ (Oshima et al. 2004, Bai et al., 2006).

5.4.1.5. *trxA*–*truB* ген

Анализата на присуство на детерминанти на специфичниот *trxA*–*truB* ген за столбур фитоплазмата, со примена на прајмерскиот сет *trxA*F1-*truB*R3 (за директна полимераза) и *trxA*F2-*truB*R4 (за вгнездена (nested) полимераза), со големина на продуктите од 1330 bp, беше направен на вкупно 125 одбрани позитивни примероци на фитоплазматскиот *tuf* ген. Сите позитивни примероци за елонгациониот - *tu* фактор (*tuf* ген), беа тестирани на останатите генски локуси карактеристични за столбур фитоплазмата, со примена на различни прајмерни секвенци. Од вкупно

125 анализирани примероци, 95 беа позитивни на *trxA-truB* генот, амплифицирани на големина од 1330 bp. Дел од позитивните продукти се прикажани на Слика 49.



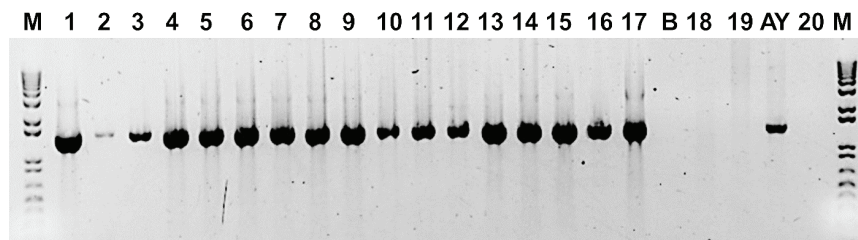
Слика 49. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *trxA-truB* ген, со примена на *trxAF2-truBR4* прајмерскиот пар во вториот или вгнездениот PCR.

Распоредот на продуктите: одговара на шифрите на примероците од Табела 36. 18 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина, Крњево, м.в. Брловец, 19 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Шардоне, Велес, Сопот 20 – негативна контрола, вода.

М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови AY – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано).

5.4.1.6. *rpIS – csdB* ген

Анализата на присуство на детерминанти на специфичниот *rpIS – csdB* ген за столбур фитоплазмата, со примена на прајмерскиот сет *rpISF1-csdBR1* (за директна полимераза) и *rpISF2-csdBR2* (за вгнездена (nested) полимераза), со големина на добиените продукти од 1550 bp, беше направен на вкупно 125 одбрани позитивни примероци. Од вкупно 125 анализирани примероци, 105 беа позитивни на *rpIS – csdB* генот, амплифицирани на големина од 1330 bp. Дел од позитивните продукти се прикажани на Слика 50.



Слика 50. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *rpIS – csdB* ген, со примена на *rpISF2-csdBR2* прајмерскиот пар во вториот или вгнездениот PCR.

Распоред на продуктите: одговара на шифрите на примероците од Табела 36. B – бланк, вода како негативна контрола 18 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина, Крњево, м.в. Брловец, 19 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Шардоне, Велес, Сопот, AY – asrer yellow phytoplasma, референтен примерок на фитоплазма (од колекцијата на Универзитетот во Милано), 20 – негативна контрола, вода (само од вториот PCR).

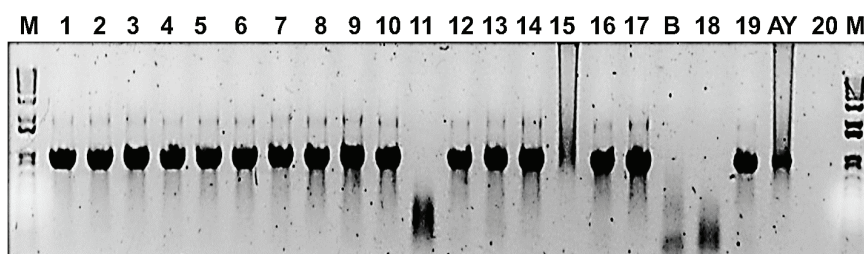
М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

5.4.1.7. *cbiQ* – *glyA* ген

Анализата на присуство на детерминанти на специфичниот *cbiQ* – *glyA* ген за столбур фитоплазмата, со примена на прајмерскиот сет *cbiQF1-glyAR1* (за директна полимераза) и *cbiQF1-glyAR2* (за вгнездена (*nested*) полимераза), со големина на добиените продукти од 1060 bp, беше направен на вкупно 125 одбрани позитивни примероци. Дизајнираниот прајмерски пар *cbiQF1*, беше користен и за директната и за втората или вгнездената полимеразна реакција.

Од вкупно 125 анализирани примероци, 105 беа позитивни на *cbiQ* – *glyA* генот, амплифицирани на големина од 1060 bp.

Дел од позитивните продукти се прикажани на Слика 51.



Слика 51. Резултат во 1% агарозна електрофореза, продукти на фитоплазматскиот *cbiQ* – *glyA* ген, со примена на *gpISF2-csdBR2* прајмерскиот пар во вториот или вгнездениот PCR.

Распоред на продуктите: одговара на шифрите на примероците од Табела 36.

B – бланк, вода како негативна контрола 18 – негативна контрола, здрав примерок од сортата Станушина, Крњево, м.в. Брловец, 19 – симптоматичен примерок од сортата Шардоне, Велес, Сопот AY – *asrer yellow phytoplasma*, референтен примерок на фитопlasма (од колекцијата на Универзитетот во Милано), 20 – негативна контрола, вода (само од вториот PCR).

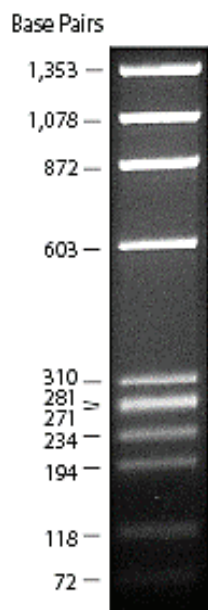
M – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

5.4.2. Полиморфизам на должината на рестрикциските фрагменти (RFLP)

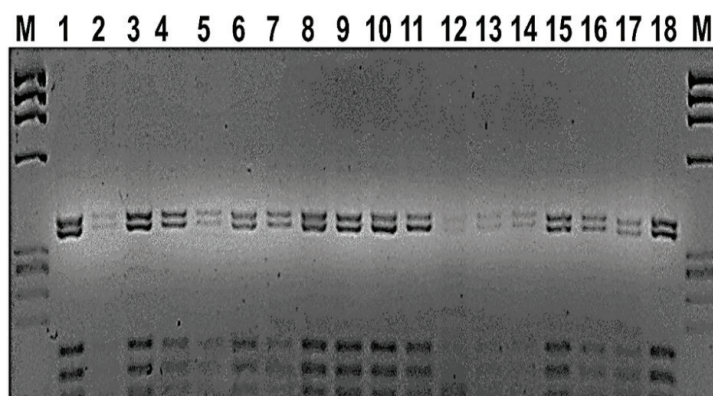
5.4.2.1. Ген за 16S rRNA

Полиморфизмот на должината на рестрикциските фрагменти за 16S rRNA генот, беше направен на сите позитивни примероци, со поединечно делење со примена на ензимот *MseI*, и споредено со позитивната контрола се покажа дека сите испитувани примероци имаат еднакви рестрикциски профили (Слика 53).

Во прилог се прикажани сите 17 позитивни примероци од Табелата 35 земена за пример, т.е. оние примероци на кои се горе прикажани полимеразните продукти. Во овие анализи, кои имаа за цел споредување на големината на молекулската маса на дигестираните продукти, беше употребен Φ x174 маркер (Слика 52).



Слика 52. Маркер Фх174 со големина на базните парови

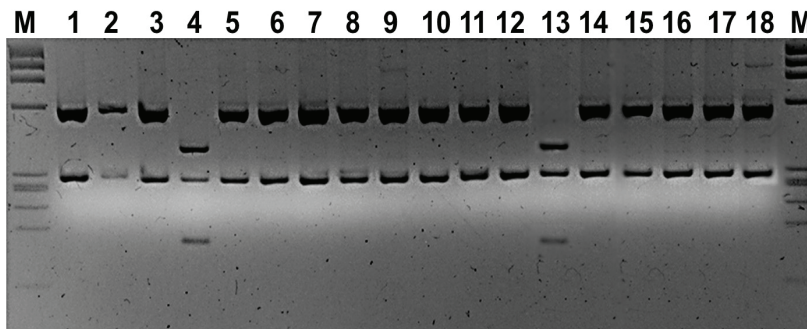


Слика 53. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот ген за *16S rRNA* добиени со промена на R16F1/R16R0 и *MseI* ензимот за дигестирање. Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asperg yellow phytoplasma M - маркер, Фх174 стандард за одредување на молекуларната маса

5.4.2.2. *tuf* ген

По рестрикциската анализа за *tuf* генот, направена на сите позитивни примероци, со поединечно делење со примена на ензимот *HpaII*, и споредено со позитивната контрола (шифра 18 на слика 56), се покажа дека кај најголем број од испитувани примероци имаат рестрикциски профили карактеристични за столбур фитоплазмата тип II, а кај многу мал процент од испитуваните примероци, го докажавме присуството на столбур фитоплазма тип I (Слика 54, профили на шифри на примероци 4 и 13).

Во прилог се прикажани сите 17 позитивни примероци од Табела 35 земена за пример, прикажана во Поглавјето 5.3.1. И во овој случај, за споредување на големината на молекулската маса на дигестираните продукти, беше употребен маркерот Фх174.



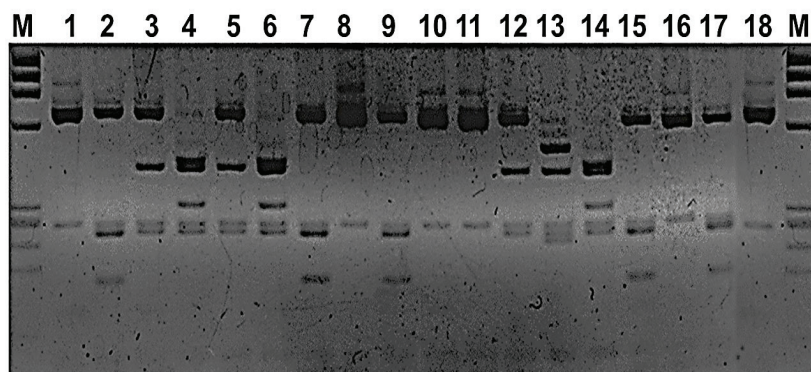
Слика 54. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *tuf* ген, добиени со примена на *Hpa*II ензимот за дигестирање.

Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asrer yellow phytoplasma.

M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса.

5.4.2.3. *vmp1* ген (stol - 1H10)

После рестрикциската анализа за *vmp1* генот, направена на сите позитивни примероци, со поединечно делење со примена на ензимот *Rsa*I, и споредено со позитивната контрола (шифра 18 на Слика 57), се покажаа неколку различни профили кај испитуваните примероци, кои во споредба со Табелата 35 од Поглавјето 5.3.1., обележани се како V14, V4, V2-TA, V3 и V18 профил (ознаките на профилите се веќе објавени според Foissac et al., 2013). На слика 55, се прикажани сите 17 позитивни примероци (Табела 35), односно големината на молекулската маса на дигестираните продукти, споредбено со Фx174 маркерот.



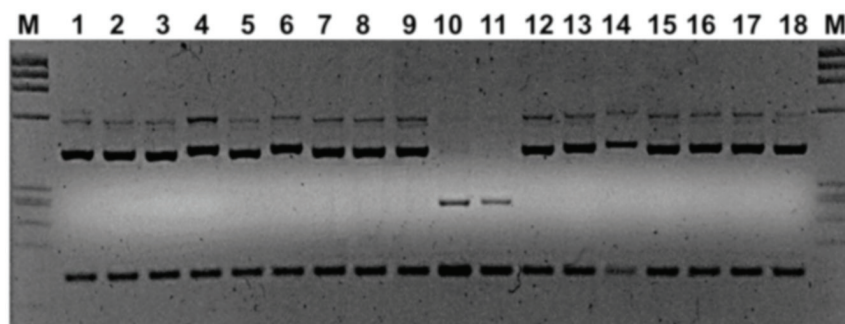
Слика 55. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *vmp1* ген, добиени со примена на *Rsa*I ензимот за дигестирање.

Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asrer yellow phytoplasma.

M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса.

5.4.2.4. *stamp* ген

Рестрикциските профили направени при дигестирање на позитивните продукти за испитување на *stamp* генот, со примена на ензимот *Hpy188I*, и споредено со позитивната контрола (шифра 18 на Слика 58), покажаа три различни профили кај испитуваните примероци, кои во споредба со табелата 32 од поглавјето 5.3.1., обележани се како S1, S2 и S3 профили (Foissac et al., 2013). На слика 56, се прикажани сите 17 позитивни примероци (Табела 35), односно големината на молекулската маса на дигестираните продукти, споредбено со Фх174 маркерот.



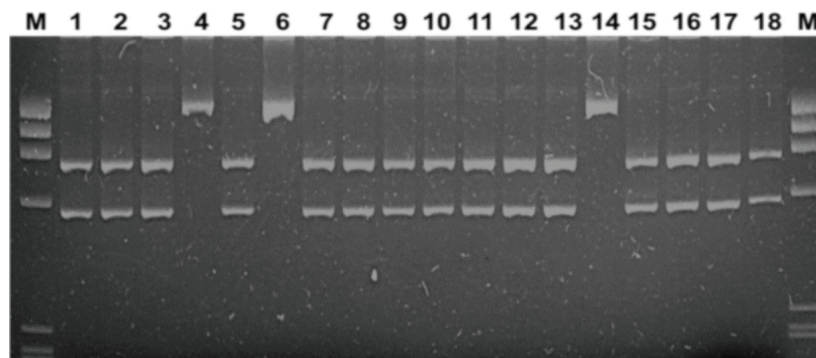
Слика 56. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *stamp* генот, добиени со примена на *Hpy188I* ензимот за дигестирање.

Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 35, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asreg yellow phytoplasma.

M - маркер, Фх174 стандард за одредување на молекуларната маса.

5.4.2.5. *trxA-truB* ген

Рестрикциските профили направени при дигестирање на позитивните продукти за испитување на *trxA-truB* генот, со примена на ензимот *BsaI*, и споредено со позитивната контрола (шифра 18 на Слика 57), покажаа два различни профили кај испитуваните примероци, кои во споредба со табелата 19 од Поглавјето 5.3.1., обележани се како А и В профили. На Слика 57, се прикажани сите 17 позитивни примероци (Табела 36), односно големината на молекулската маса на дигестираните продукти, споредбено со Фх174 маркерот.



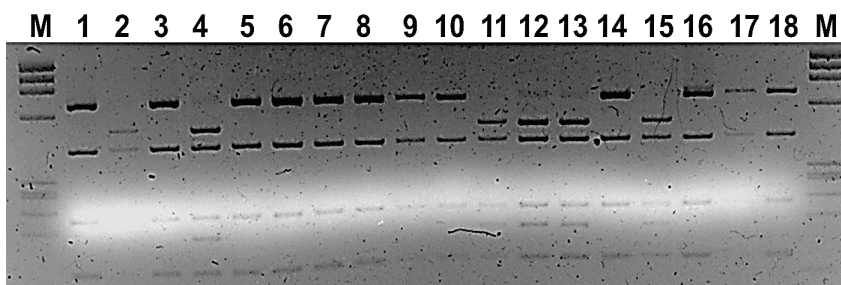
Слика 57. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *trxA-truB* генот, добиени со примена на *Bsa*II ензимот за дигестирање.

Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 36, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asrer yellow phytoplasma.

M - маркер, Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса

5.4.2.6. *rpIS – csdB* ген

Рестрикциските профили направени при дигестирање на позитивните продукти за испитување на *rpIS – csdB* генот, со примена на ензимот *Hpy*CH4V, и споредено со позитивната контрола (шифра 18 на Слика 58), покажаа два различни профили кај испитуваните примероци, кои во споредба со Табелата 36 од Поглавјето 5.3.1., обележани се како А и В профили.



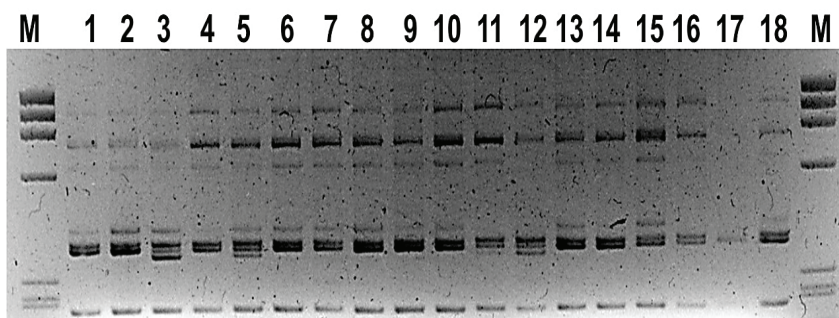
Слика 58. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *rpIS – csdB* генот, добиени со примена на *Hpy*CH4V ензимот за дигестирање.

Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 36, од Поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asrer yellow phytoplasma.

M - маркер Фx174 стандард за одредување на молекуларната маса.

5.4.2.7. *cbiQ* – *glyA* ген

Рестрикциските профили направени при дигестирање на позитивните продукти за испитување на *cbiQ* – *glyA* генот, со примена на ензимот *Hpy188I*, и споредено со позитивната контрола (шифра 18 на слика 59), не се покажаа различни профили кај испитуваните примероци, на кои за шифрите исто така се повикуваме на Табелата 36 од поглавјето 5.3.1., и сите обележани се како А профил.



Слика 59. Репрезентативно прикажување на рестрикциски профили во 3% агарозен гел. Фрагментите од фитоплазматскиот *cbiQ* – *glyA* генот, добиени со промена на *Hpy188I* ензимот за дигестирање.

Ознаките на примероците се по истиот редослед од Табелата 36, од поглавјето 5.3.1. 18 – позитивна контрола AY – asrer yellow phytoplasma.

M - маркер Phx174 стандард за одредување на молекуларната маса.

5.5. Лабораториско докажување на присуство на фитоплазмите кај плевелната вегетација

5.5.1. PCR-RFLP анализа

Имајќи ги предвид податоците за начинот на движење на BN (столбур) фитоплазмата во природата (Накова, 2008; Mitrev et al., 2008, 2011), со цел подетално проучување на патогенезата во наши производни услови, дополнителен материјал за анализа беше собиран од плевелната вегетација чиј развој се одвиваше во лозовите насади, во непосредна близина на симптоматичните лози.

Во Табела 35, е прикажана разновидноста на плевелната вегетација која беше вклучена во овие испитувања, како и вкупниот број на собрани примероци за анализа.

Знаејќи кој вид на фитопlasма е присутна кај симптоматичните сорти на лоза, лабораториската анализа на сите примероци беше направена за елонгацискиот *tuf* фактор (*tuf* ген), за да се утврди дали плевелната вегетација е примарен, или еден

од домаќините на столбур фитоплазмата, а со тоа да се направи една корелација помеѓу видот на фитоплазмата присутен кај виновата лоза и кај плевелната вегетација.

Според литературни податоци, најчесто застапена плевелна вегетација во лозовите насади каде што е потврдено присуството на одреден вид на фитоплазма, *Convolvulus arvensis* (bindweed) и *Urtica dioica* (nettle) (Maixner, 1994; Sforza et al., 1999; Alma et al., 2002; Bressan et al., 2007; Mori et al., 2012). Во нашите испитувани локалитети, најмногу забележано беше присуството на *Convolvulus arvensis* (Табела 38), и докажано лабораториски лоциравме присуство на столбур фитоплазма, тип II (Слика 60 и 61), истиот вид на фитоплазма која ја забележавме во најдогем дел од позитвините примероци од винова лоза. Плевелот *Urtica dioica*, многу често сретнуван во литература како домаќин на столбур фитоплазмата и на нејзиниот вектор, *Hyalestes obsoletus*, не беше забележан во ниту еден од испитуваните локалитети. Фитоплазмите како и некои групи на вируси, може да се пренесуваат преку инфицирано растение – паразитен цветник (*Cuscuta* sp.) (Bertaccini & Duduk, 2009), истото докажано и кај наши испитувани примероци (Слика 60 и 61).

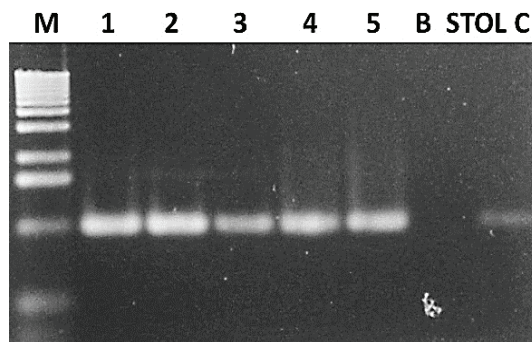
Во Табела 38, е прикажана плевелната вегетација која се наоѓаше непосредно под симптоматичната лоза, од која беше собран материјал за анализа, и која исто така беше земена за анализа, и покрај тоа што кај собраните примероци за анализа, не беа забележани симптоми на лисната маса.

Табела 38. Примероци од плевелна вегетација во сезона 2008-2013 година, со број на позитивни примероци

Локалитет	Лозарска единица	Плевел	Вкупен број на примероци за анализа	Број на позитивни примероци за <i>tuf</i> ген
Велес	м.в. Сопот	<i>Sorghum sp.</i>	1	0
		<i>Ecbalium elaterium</i>	1	0
		<i>Colutea arborescens</i>	1	0
		<i>Portulaca oleracea</i>	1	0
		<i>Malva sylvestris</i>	1	0
		<i>Chenopodium album</i>	1	1
		<i>Cuscuta sp.</i>	1	1
Кавадарци	П.Е.Љубаш	<i>Chenopodium album</i>	1	0
		<i>Convolvulus arvensis</i>	1	1
		<i>Portulaca oleracea</i>	1	0
		<i>Sorghum halepense</i>	1	0
		<i>Polygonum convolvulus</i>	1	0
		<i>Clematis vitalba</i>	1	0
		<i>Setaria viridis</i>	1	0
с.Сарчиево	с.Сарчиево	<i>Solanum nigrum</i>	1	1
		<i>Convolvulus arvensis</i>	1	1
с.Сарчиево	с.Сарчиево	<i>Convolvulus arvensis</i>	1	1
		<i>Portulaca oleracea</i>	1	0
Кочани	м.в. Стари лозја	<i>Amarantus retroflexus</i>	1	0
Штип	с.Криви Дол	<i>Sorghum sp.</i>	1	0
с.Аргулица	с.Тупанец	<i>Cuscuta sp.</i>	1	1
		<i>Solanum nigrum</i>	2	0
		<i>Convolvulus arvensis</i>	1	0
Куманово	Кумановско (покрај пат)	<i>Amarantus retroflexus</i>	3	0
		<i>Solanum nigrum</i>	1	0
		<i>Convolvulus arvensis</i>	4	2

5.5.1.1. *tuf* ген – PCR анализа

Со примена на пражмерскиот сет *ftufI-rtufI* (за директна полимераза) и *ftufAY-rtufAY* (за вгнездена (nested) полимераза), за умножувањето на фитоплазматскиот *tuf* ген за карактеризација на видот на фитоплазмата (столбур), со големина на добиените продукти од 1100 bp, направена беше полимеразна реакција на вкупно 40 примероци од плевелната вегетација, за потврда на присуство или пак отсуство на столбур - фитоплазмата. Од вкупно 40 анализирани примероци, само 8 се покажаа позитивни за *tuf* генот, а дел од нив се прикажани на Слика 60.



Слика 60. Продукти од полимеразната реакција, со примена на ftufAY-rtufAY прајмерскиот пар, за потврда на *tuf* генот кај плевелната вегетација.

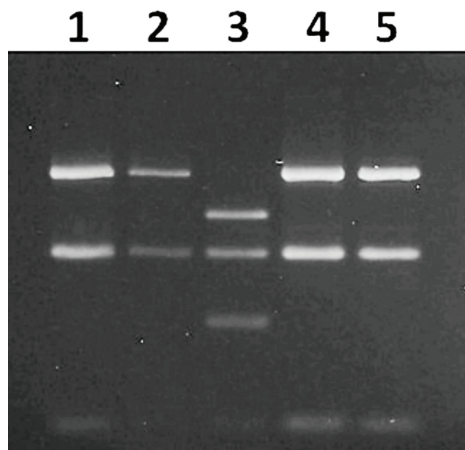
М – маркер 1Kb DNA ladder, за споредба на големината на базните парови.

1 - *Cuscuta* sp. – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Велес, Сопот, 2 - *Cuscuta* sp. – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Аргулица, Тупанец, 3 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кавадарци, П.Е. Љубаш, 4 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Сарчиево, 5 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кумановско, В – бланк, негативна контрола, вода. STOL C – позитивен референтен примерок.

5.5.1.2. *tuf* ген – RFLP анализа

По рестрикциската анализа за *tuf* генот, од добиените позитивни примероци, со примена на ензимот *HpaII*, и споредено со позитивната контрола, се покажа дека кај испитуваните примероци рестрикциските профили се карактеристични за столбур фитоплазмата тип II, а само кај еден позитивен примерок профилот одговара на тип I.

Во прилог се прикажани профилите на позитивни примероци (Слика 61).



Слика 61. Рестрикциски профили во 3% агарозен гел со примена на *HpaII* ензимот за дигестирање.

1 – *Cuscuta* sp., плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Велес, Сопот, 2 - *Cuscuta* sp. – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Шардоне, Аргулица, Тупанец, 3 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кавадарци, П.Е. Љубаш, 4 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Сарчиево, 5 - *Convolvulus arvensis* – плевелна вегетација од кај симптоматична лоза Вранец, Кумановско.

5.6. Лабораториски анализи за докажување на присуството на вирусите

5.6.1. 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.

Детално прикажување на вкупниот број на анализирани примероци, вкупниот број на позитивни примероци и процентот на инфекција, дадени се во Табела 39.

Периодот на собирање на материјал за анализа беше во исто време кога се собираа примероци за анализа на присуство на столбур - фитоплазмата (крајот на јули до крајот на септември - период на најинтензивно појава на симптоми).

Детален преглед за утврденото присуство и дистрибуцијата на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза е даден во Табела 40.

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 39. Преглед на податоците за вкупниот број на анализирани и број на позитивни примероци за вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - GLRaV

Локалитет	Лозарска единица	Година на испитување	Вкупен број анализирани примероци	Број на позитивни примероци	Процент на инфекција (%)
Штип	с. Три чешми	2008	1	0	0
	м.в. Ежово	2008-2010	16	10	62.5
	с. Криви Дол	2008-2012	14	12	85.7
	с.Ново Село	2009	1	0	0
	м.в. Каваклија	2008-2013	25	12	48
	с. Долни Балван	2013	3	1	33.3
	с. Батање	2013	4	2	50
Кочани	м.в. Стари лозја	2008-2009	21	17	80.9
с. Караорман	м.в. Балабанци	2008-2010	6	3	50
с.Аргулица	м.в. Тупанец	2010	20	16	80
с.Сарчиево	с. Сарчиево	2008-2010, 2012	49	26	53
Свети Николе	с. Ерцелија	2009	18	8	44.4
с.Амзабегово / с. Пеширово	м.в. Струга	2012-2013	23	20	86.9
с. Пеширово	с. Пеширово	2012-2013	23	12	52.1
с. Црнилиште	с. Црнилиште	2012-2013	5	2	40
Овче поле	приватно лозје	2012-2013	1	0	0
Велес	м.в. Сопот	2008, 2010, 2012	16	4	25
Тиквешко виногорје	Кавадарци, с. Чемерско	2011	19	15	78.9
	Кавадарци, с. Крњево, м.в. Брловец	2011-2013	26	12	46.1
	Кавадарци, с. Раец	2013	8	3	33.3
	Демир Капија	2011-2013	8	2	22.2
	Неготино, м.в. Ило Виларов	2011	9	5	55.5
	Неготино, с. Лепово	2011	5	4	80
Куманово	Кумановско	2010-2013	9	1	11.1
Валандово	с.Јосифово	2009-2012	18	12	66.9
Гевгелија	м.в.Авлаки	2011-2012	7	2	28.5
Скопје	м.в. Четири патишта	2011-2012	20	14	70
Битола	Битолско, Лозар	2011	7	0	0

Табела 40. Резултати од DAS ELISA методот за присуство на групите на leafroll вирусот

Регион	Локалитет	Сорта	Лабораториски DAS ELISA резултати					
			GLRaV 1+3	GLRaV 1	GLRaV 2	GLRaV 3	GLRaV 7	RT-PCR
Штип	с.Три чешми	Вранец	+	+	-	+	-	+
	м.в.Ежово	Вранец	+	-	-	+	-	+
	с.Криви Дол	Вранец	/	-	-	-	-	-
	с.Ново Село	Вранец	+	+	-	+	-	+
	м.в.Каваклија	Црн бургундец	+	+	-	+	-	+
	с.Долни Балван	Вранец	+	+	-	+	-	+
	с.Батање	Вранец	/	-	-	-	-	НТ
Кочани	м.в.Стари лозја	Црн бургундец	/	+	-	-	-	+
Караорман	м.в. Балабанци	Вранец	/	-	-	+	-	+
Аргулица	м.в. Тупанец	Вранец	/	-	-	-	-	НТ
с.Сарчиево	с.Сарчиево	Вранец	+	+	-	+	-	НТ
Свети Николе	с.Ерџелија	Италијански ризлинг	-	+	-	+	-	НТ
с.Амзабегово с.Пеширово	м.в. Струга	Вранец	/	+	-	-	-	НТ
с.Пеширово	с.Пеширово	Вранец	+	+	-	+	-	НТ
с.Црнилиште	с.Црнилиште	Вранец	+	-	-	+	-	НТ
Овче поле	приватно лозје	Црн бургундец	+	+	-	+	-	НТ
Велес	м.в. Сопот	Каберне совинјон	+	-	-	+	-	НТ
Тиквешко виногорје	Кавадарци, с. Чемерско	Црн бургундец	+	+	-	-	-	НТ
	Кавадарци, с. Крњево, м.в. Брловец	Кратошија	+	+	-	-	-	НТ
		Вранец	+	-	-	+	-	+
	Кавадарци, Раец	Вранец	+	+	-	-	-	НТ
	Демир Капија	Вранец	+	+	-	-	-	НТ
	Неготино, м.в. Ило Виларов	Вранец	+	-	-	+	-	НТ
Неготино, с. Лепово	Вранец	+	+	-	+	-	НТ	
Куманово	Кумановско	Вранец	+	-	-	+	-	НТ
Валандово	с.Јосифово	Вранец	+	+	-	+	-	+

продолжување на табела 40.

Гевгелија	м.в.Авлаки	Франковка	+	-	-	+	-	+
Скопје	м.в. Четири патишта	Вранец	+	+	-	+	-	нт
Битола	Битолско, Лозар	Италијански ризлинг	-	-	-	-	-	нт

+ - позитивни, - негативни; нт – не тестирани.

5.6.2. 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 62).

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 62). 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 62).

Во Табела 41 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.

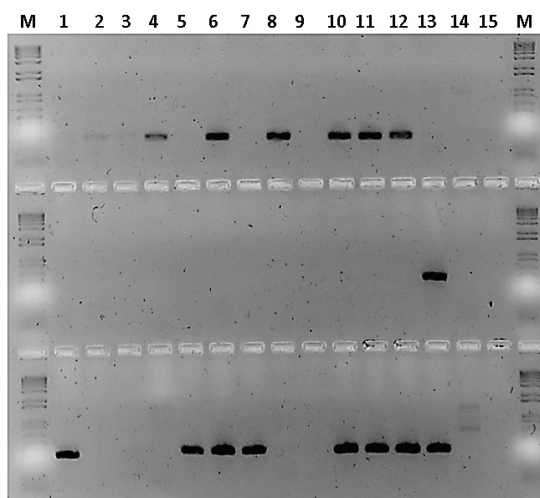
Табела 41. Примероци прикажани со комплетна анализа ELISA / RT-PCR

Ред. бр.	Шифра на примерок	Локалитет / Лозарска единица	Сорта	DAS-ELISA	Екстракција на RNA (Qiagen кит) концентрација	RT-PCR (GLRaV 1) (прајмерски пар M3 and M4) 232 bp	RT-PCR (GLRaV 2) (прајмерски пар CP1-CP2 (543 bp) 543 bp	RT-PCR (GLRaV 3) (прајмерски пар M3 and N2) 336 bp
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 62. 1% Агарозен гел на кој се прикажани резултатите од RT-PCR детекцијата со примена на прајмерски комбинации за GLRaV -1, -2 и -3.

Вкупната РНК е прикажана од десет репрезентативни примероци обележани од 1-10, со карактеристики за примероците во Табела 41.

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.

5.6.3. 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, резултираше 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 (Слика 63 до 64б).

Првите поинтензивни промени во изгледот на тест растенијата (промени на бојата на лисната маса), беа забележани 20 дена после инокулацијата (Слика 65,66,67).

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 GLRaV-3. Материјалот за лабораториската анализа беше собран после 45 дена од инокулацијата.

По 45 дена беше направена серолошка реакција ELISA со користење на готови китови BIOREBA, според чекорите на протоколот опишан во Поглавјето 4.2.1.3.1., за докажување на пренесување на вирусот на тест растенијата.



Слика 63. Тест растенија *N. benthamiana*, по инокулација, поставени во комора на 25°C/светло, 20°C/темно (BINDER, KBW 720).



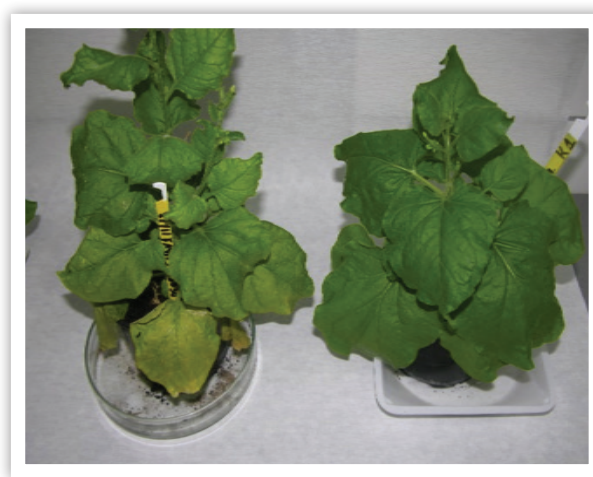
Слика 64а. Изглед на тест растение веднаш по инокулација.



Слика 64б. Изглед на тест растение по инокулација со вода – контрола.



Слика 65. Симптоми предизвикани од GLRaV-1, по 20 дена од инокулација



Слика 66. Симптоми предизвикани од GLRaV-1, лево инокулација со вирусот, десно негативна контрола, инокулација со вода



Слика 67. Симптоми предизвикани од GLRaV-3, по 20 дена од инокулација



Слика 68. Симптоми предизвикани од GLRaV-3, по 45 дена од инокулацијата, десно инокулација со вирусот, лево негативна контрола, инокулација со вода



Слика 69. Симптоми предизвикани од GLRaV-1 (десно) и GLRaV-3 (лево), по 45 дена од инокулацијата, споредени со негативна контрола – дестилирана вода (во средина)

6. ДИСКУСИЈА

Во изминатите неколку децении, интересот за производство и употреба на убави, квалитетни и вкусни вина се повеќе се зголемува, а со тоа го зголемува и интересот на производителите на вино да го бираат квалитетот на грозјето за да го зголемат квалитетот на производот.

За да се добијат што поквалитетни вина, потребно е квалитетот на грозјето да биде на високо ниво. Појавата на болести и штетници кај виновата лоза, значително го намалуваат квалитетот и квантитетот во производството на грозје (Nakaune et al. 2008, Martelli & Boudon-Padieu, 2006, Sforza, 2003, Kube et al., 2012, Santi et al. 2013).

Едни од најпроучуваните групи на патогени се габните причинители на болести кај виновата лоза, за кои постојат и превентивни и хемиски методи за заштита (Schnee et al., 2013).

За разлика од нив, фитоплазматските и вирусните промени кај виновата лоза се многу малку познати во наши услови, т.е. поради неинформираност не им се дава големо значење од страна на лозарите, агрономите за нивната појава и присутност/ застапеност на терен. Поради големото економско значење, фитоплазматските и вирусните промени кај виновата лоза многу често се предмет на проучување на светско ниво (Kunkel, 1926, 1931, 1955; McCoy et al., 1989; Maramorosch, 2008, Santi et al. 2013).

Со ова наше детално истражување, добивме една реална слика за состојбата со флоемските патогени присутни во лозовите насади во нашата држава, со посебен акцент на фитоплазматските и вирусните промени, преку мултилокусна анализа на седум фитоплазматски генски локуси и анализа на четири групи на вирусот на свиткување на листовите кај лозата. Оваа перспективна студија вклучува шестгодишен период на теренска и лабораториска анализа, со вклучена методологија веќе практикувана на светско ниво, со примена на модификација и оптимизација на протоколот на работа, онаму каде што имаше потреба од тоа.

Според анализата на достапната литература за појавата на овие патогени на виновата лоза кај нас, сметаме дека овој труд претставува прво, комплексно истражување од ваков вид. Во него се вклучени, помеѓу останатото, детална анализа на симптоматологијата, појавата на патогените и нивната процентуална застапеност, и дијагностиката базирана на најмодерни и најосетливите молекуларни техники.

6.1. Распространетост на флоемските патогени во Македонија

Кога ќе се спомене поимот фитоплазматски или вирусни промени на виновата лоза, кај нас на терен, сеуште агрономите, лозарите, одгледувачите на винова лоза, ги прифаќаат овие поими со резерва и став дека кај нас сеуште нема таква опасност. Меѓутоа, реалноста на терен е сосема поинаква. Анализите и доказите добиени во текот на изработката на дисертацијата, покажаа дека во некои региони состојбата е дури и алармантна. Утврдено е, како, присуството на двата флоемски патогени, така и нивно брзо ширење.

Првичните информации за можно присуството на фитоплазмите кај нас, датираат уште од крајот на седумдесетите години на 20-от век (усна комуникација со Проф Пејчиновски). Меѓутоа, во недостаток на соодветни лабораториски методи и техники во тоа време, нивното докажување било невозможно. Многу подоцна, Митрев и сор. (2000), ги извршиле првите подетални теренски истражувања, кога бил направен и првиот молекуларен доказ за присуството на фитоплазмите во Македонија. Во рамките на овие првични подетални проучувања, биле земени само два региона (Скопје и Велес), со истражувања сконцентрирани кај двете најосетливи сорти Шардоне и Вранец (Seruga et al., 2003). Во периодот од 2006 па до денес, во Лабораторијата за заштита на растенијата и животната средина, при Земјоделскиот факултет, УГД - Штип, изведени се бројни, најсовремени молекуларни испитувања за дијагностика на видот на фитоплазмате и разликите во геномската структура на фитоплазмите присутни во Република Македонија (Mitrev et al., 2011, 2009, 2008, 2007).

Инаку, првите поопширни податоци за појавата и присуството на вирусните промени кај виновата лоза во Македонија, публикувани се во седумдесети години на минатиот век. Пејчиновски (1975) ја истражувал патогената природа на симптомите кај различни природно и вештачки заразени лози, Авторот дава објаснување на различните групи на вируси кои се познати патогени на виновата лоза (Пејчиновски, 1975 г.). Меѓутоа, фокусот на тие истражувања даден е на вирусот на инфективна дегенерација на виновата лоза – Grapevine fanleaf virus. Анализите кои биле направени за идентификација на заразната дегенерација се однесувале на симптоматолошка идентификација, како и механичка инокулација на тест растенија и примена на серолошки тестови. Сите понатамошни истражувања на истиот автор, спроведени за дијагностика на вирусните промени кај виновата лоза, се базираат главно на симптоматологијата и механичко пренесување на

вирусот (Пејчиновски, 1975, 1979). Многу години подоцна, за ново жариште на GFLV-от, пишуваат и Русевски сор., (2008).

Во поновите истражувања и публикувани податоци на други автори, се поголем акцент се дава на фитоплазматските заболувања на виновата лоза. Многу истражувачи нив ги сместуваат во групата на патогени кои прилично лесно и брзо се шират, а за заштита од нив потребно е многу енергија, труд, знаење и долготраен временски период (Pavan et al., 2012, Ertunk, 2013). “Flavescence doree“ (FD) и “Bois noir“ (BN), се две групи на фитоплазми кои предизвикуваат сериозни загуби кај голем број на европски лозови насади (Kube et al., 2012, Santi et al., 2013, Schnee et al., 2013).

Во нашата земја, досега е докажано присуство само на столбур (BN) фитоплазмата, која спаѓа во групата на економски штетни патогени. Меѓутоа, но поради раширеноста, тоа не значи дека треба да се занемари нејзиното присуство (Kostadinovska et al., 2014, Mitrev et al., 2013, Накова, 2008). Според нашите добиени резултати, фитоплазматските промени од видот на столбур фитоплазмата ги забележавме во сите испитувани лозарски единици (табела 33), со најголем процент на инфекција кај винските сорти Шардоне, Вранец и Црн бургундец.

6.2. Симптоматологија

Во изминатиот шестгодишниот период, секоја сезона последователно, беше следена симптоматологијата кај природно зарзените лози, од кои истовремено беше собиран и материјал за лабораториска анализа. Направените истражувања вклучуваат подолг временски период, поради теренските анализи, различноста на теренот (локалитети, лозарски единици), различната надморска височина, како и старосната структура на лозовите насади.

Теренските анализи покажаа различна експресија на симптомите кај различни сорти. Генерално земено, појавата на симптомите и нивната експресија, зависат многу од осетливоста на сортата, видот на фитоплазмата / вирусот, компатибилноста на подлогата со калемот, како и варијабилноста на надворешните услови. Покрај собирање на материјал за лабораториска анализа од јасно заразени индивидуи (пожолтувања / поцрвенувања на лисната маса), беше правена анализа и на целокупниот изглед на симптоматичните лози.

Интересен и нов податок за појавата на флоемските патогени, во рамките на овие истражувања, забележавме кај сортата Станушина (суровина за производство

на црвени вина). Тоа е домашна автохтона сорта од Тиквешкото виногорје. По однос на симптомите, оваа сорта, се разликува од општите одлики за црвените сорти. Времето на појава и дијагностицирање на симптомите на терен кај оваа сорта, се забележуваат кон крајот на јули и почетокот на август, но најинтензивно можат да се забележат во месец септември. Симптомите кај листовите се карактеризираат како мали, делумно или целосно пожелтени, со послабо или посилено изразена некроза, совиени кон внатрешноста, со јасно изразен триаголен изглед и наредени една врз друга како ќерамиди. Симптомите на лисната маса се исти како симптоми кај белите сорти (пр. исти симптоми се забележуваат кај осетливата сорта Шардоне). Ова е еден феномен и отстапување од клишето дека кај црвените / црните сорти листовите добиваат црвена боја како резултат на фитоплазматска или вирусна инфекција.

Ваков феномен на пожелтување на листовите кај црвена сорта на винова лоза, бил забележан и кај друга црвената сорта - Пловдина, од страна на Кузманович и сор., а сортата била инфицирана со *Flavescence dorée* фитоплазмата (Kuzmanovic et al., 2006). Ваквиот феномен досега е познат само во Србија, така што со нашите истражувања тој доби уште една потврда. Појавата на пожелтување кај црвените сорти поврзано со фитоплазматските промени е објаснета како акумулација на флавоноидите (флавоноиди, антоцијани и проантоцијаниди), кои се различни кај црвените и белите сорти (Vogs et al., 2005; Hren et al., 2009).

Во нашите истражувања, исто така, го утврдувавме присуството на флоемските патогени и во непосредната плевелната вегетација. Познато е дека плевелите играат важна улога во епидемиологијата на овие заболувања (Weintraub & Beandland, 2006, Weintraub & Jones, 2010, Maixner, 2011, Ertunc, 2013). Според литературни податоци, најчесто застапени плевели во лозовите насади каде е потврдено присуството на одреден вид на фитоплазма, се *Convolvulus arvensis* (bindweed) и *Urtica dioica* (nettle) (Maixner, 1994, Sforza et al., 1999, Alma et al., 2002, Bressan et al., 2007, Mori et al., 2012).

Во нашите испитувани локалитети, најчесто застапен плевел беше *Convolvulus arvensis* (Табела 38). Истовремено, кај овој растителен вид, лабораториски беше докажано присуството на столбур фитоплазма, тип II (Слика 60 и 61), што е истиот вид на фитоплазма која ја утврдивме во најголем дел од позитивните примероци од винова лоза.

Плевелот *Urtica dioica*, кој е многу често сретнуван во литература како домаќин на столбур фитоплазмата и на нејзиниот вектор, *Hyalestes obsoletus*, не беше

забележан во ниту еден од испитуваните локалитети (Табела 19). Фитоплазмите како и некои вируси на виновата лоза, може да се пренесуваат со *Cuscuta* sp. (Bertaccini & Duduk, 2009). Природни инфекции кај овој паразитски цветник докажавме и кај некои наши испитувани примероци (Табела 38, Слика 60 и 61).

Од групите на вирусни заболувања кои ја напаѓаат виновата лоза, еден од најширокораспространетите и економски многу штетени вируси е вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза – *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (Rayapati et al., 2008).

Од симптоматолошка гледна точка, вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза беше забележан во сите лозарски единици кои беа предмет на нашите испитувања. Овој вирус најчесто предизвикува промена во бојата на листовите и нееднакво созревање на гроздовите. Исто така, симптомите може да вклучат и совивање на листовите кон внатрешната страна, промена на бојата (поцрвенување кај црвените/црните сорти, пожолтување (хлорозност) кај белите сорти) и некротизирање на одредени делови од листот, како и разрушување на флоемот.

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 (Martelli et al., 2002; Peake et al., 2004). Теренските анализи на симптомите кај виновата лоза предизвикани од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, многу често може да наликуваат на симптоми настанати како резултат на механичко оштетување на стеблото кај виновата лоза, други болести на флоемското ткиво, оштетувања од инсекти и сл. (Слика 25 а, б, в). Martelli et al., (2002), Peake et al., (2004), даваат речиси идентичен опис на инфекциите на виновата лоза со GLRaV.

6.3. Осетливост на различни сорти винова лоза кон проучуваните флоемски патогени

Како што е погоре детално образложено, колекционирање на материјал за анализа е вршено од: лисна маса, едногодишни лозови калеми и од плевелна вегетација. За одредување на процентот на инфекција, од секоја испитувана парцела беа следени по 10 реда (со 100 лози во ред), и на секоја симптоматична лоза беше забележуван интензитетот на експресија на симптомите (+? до +++), при што на крај ја анализиравме осетливоста на сортите на испитуваниот регион и компаративно по региони (Табела 33 и 34).

Според нашите анализи, најосетливи сорти на флоемските групи на испитувани патогени, се покажаа: сортата за производство на бели вина, Шардоне и сортата за производство на црвени вина, Вранец (Табела 33 и 34). Овие резултати се во директна корелација со достапните литературни податоци, во кои се истакнува дека овие две сорти се едни од најосетливите и најпроучувани за детекција на фитоплазматските флоемски патогени (Carraro et al., 1994; Pavan et al., 1997; Refatti et al., 1998; Mutton et al., 2002; Milkus et al., 2004; Vered & Tirza, 2011; Pavan et al., 2012).

6.4. Методолошки пристап кон детекција на флоемските патогени кај виновата лоза

Лабораториска анализа: За потврда на појавените симптоми на терен со лабораториска детерминација, беа користени како класични, така и најосетливите методи и техники за докажување на фитоплазматските и вирусните видови (тест на механичко пренесување на вирусите, изолација на ДНК / РНК, PCR / RFLP анализи, како и серолошка DAS ELISA анализа).

Лабораториска анализа на фитоплазматскиот геном: За комплетна детерминација на фитоплазматскиот геном и за утврдување на компатибилноста и различноста на изолатите, беше направена мултилокусна анализа, т.е. умножување на седум различни геноми со употреба на различни прајмерски комбинации и рестрикциски полиморфизам со примена на шест ензими

Првата лабораториска анализа беше направена со универзална група на прајмери за фитоплазматскиот ген за *16S rRNA*, за да направиме класификација и селекција на примероци со позитивна ДНК, кои понатаму ги анализиравме за други специфични генски локуси. Од вкупно 766 примероци, 415 се покажаа како позитивни за генот *16S rRNA*. Понатамошните анализи беа направени на позитивните примероци за универзалниот ген, но со специфични прајмерски комбинации за генски локуси на столбур фитоплазмата, за определување на идентичноста и разликите во различните изолати. Анализите на фитоплазматскиот *tuf* ген, за карактеризација на видот на фитоплазмата (столбур), кај вкупно 415 испитувани позитивни примероци на фитоплазматскиот *16S rRNA* ген, ни покажаа позитивни 302 примероци, кај кои рестрикциските профили покажаа присуство на тип I (*tuf*-type a). Овој генетски тип во досегашните испитувања и публикации за видот на столбур фитоплазмата во Македонија не бил забележан (Seruga et al., 2003; Mitrev et al., 2007).

Од испитуваните примероци, 80% од позитивните анализирани за фитоплазматскиот *tuf* ген (елонгационен фактор Tu), се столбур фитоплазма тип II (*tuf*-type b), а 20 % се тип I (*tuf*-type a). Анализа на специфичниот фитоплазматски *tuf* ген, беше направена и на позитивните примероци од плевелната вегетација, и беше забележано присуство на столбур групата кај *Cuscuta* sp. и *Convolvulus arvensis* (тип II и тип I). До сега, во литература не е споменато дека широкораспространетиот паразитен цветник *Cuscuta* sp. учествува во пренесувањето на фитоплазмите кај виновата лоза. Ова представува уште еден прилично нов податок за движењето на фитоплазмите во природата.

Анализите направени со рестрикцискиот ензим *RsaI* со RFLP дигестијата на *vmp1* генскиот регион, покажаа пет различни профили. Овие различни профили споредени со типот на столбур фитоплазмата анализирани за *tuf* генот, одговараат на тип II (*tuf*-type b).

Со ова истражување, преку квантитативна анализа на добиените генетски профили, направивме еден чекор напред во однос на класификација на фитоплазмите присутни кај нас. Па така според *vmp1* генскиот локус, добиени се пет профили, од кои најчесто застапени кај нас се V4 (кој одговара на профили застапени во Еуро-Медитеранските региони), и V14 профил застапен во Западна Европа (Foissac et al., 2013). V3 профилот беше пронајден во помал процент кај испитуваните примероци, но во комбинација со столбур *tuf* type a и b (тип I и II). 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 (Foissac et al., 2013). Добиениот V2-TA профил, претходно бил објавен само како профил присутен кај инсектите вектори *Reptalus panzeri* и *R. quinquecostatus* во Србија (Cvrkovic et al., 2014). Со ова се отвара 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 на автохтоната македонска сорта Станушина, поради нетипичните симптоми за црна сорта кои ги забележавме на терен. Сепак, идентификацијата на видот на фитоплазмата не покажа некој поразличен генетски профил од другите докажани, а кој би можело да биде евентуална причина за жолтеењето, наместо црвенењето на листовите.

Во однос на анализите спроведени врз плевелната вегетација, најзастапен плевел во испитуваните лозови насади беше *Convolvulus arvensis* (Табела 38). Кај овој плевел, беше докажано присуството на столбур фитоплазма, тип II (слика 60 и 61), што претставува ист вид на фитоплазма која е докажана и кај најдогемиот број од позитивните примероци од винова лоза.

Плевелот *Urtica dioica*, многу често сретнуван во литература како домаќин на столбур фитоплазмата и на нејзиниот вектор, *Hyalestes obsoletus*, не беше забележан во ниту еден од испитуваните локалитети. Фитоплазмите како и некои групи на вируси, може да се пренесуваат и со *Cuscuta* sp. (Bertaccini & Duduk, 2009). Во нашите истражувања, овој паразитен цветник беше во докажан и како природен домаќин на столбур фитоплазма (тип II) (слика 60 и 61).

Лабораториска анализа на вирусните промени кај виновата лоза:

За флоемските вирусни патогени, меѓу кои спаѓа и групата на GLRaV вирусот, кај нас досега не постојат пишани податоци. Со ова истражувања, се обидовме да направиме една мапа за присуството и степенот на застапеност на овој вирус кај нас (табела 38, шематски приказ 8).

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 (Borgo & Angelini, 2002, Cabaleiro & Seruga, 1996), со посебен акцент на GLRaV-1 и GLRaV-3 група на leafroll вирусот (Voncina, 2011).

При анализите на групите на вирусот, беше направено и механичко пренесување на GLRaV-1 и GLRaV-3 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 (Слика 64). Дополнително, присуството на GLRaV-2, беше утврдувано кај десет одбрани серолошки негативни примероци, со помош на RT-PCR методот со примена на GLRaV2-CP1 / GLRaV2-CP2 прајмерските парови (Слика 64). 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 (Слика 64). 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 научно истражувачки центри и досега постојат бројни публикации за групите на вирусот и нивните карактеристични профили (Borgo & Angelini, 2002, Martelli & Boudon-Padieu, 2006, Voncina, 2011).

6.5. Можности за контрола на флоемски ограничените патогени

Од моментот на откривање на „микоплазмите слични на организмите“ („*Mycoplasmas like organism*“ MLOs) од 1967 г., фитоплазмите многу бргу се класифицираат во посебна група на растителни патогени (Doi et al. 1967).

Фитоплазмите се прокариотски патогени со редуциран геном, кои паразитираат во флоемските спроводни садови кај растенијата и во плунковите жлезди кај инсектите вектори. Поради отсуството на клеточен ѕид имаат непостојан (плеоморфен) облик, и неможе да се изолираат на хранлива подлога (Bertaccini et al., 1995; Boudon-Padieu, 2000; Lee et al., 2000; Angelini et al., 2001; Botti & Bertaccini, 2007).

Најновите истражувања даваат до сознание дека науката во проучувањето на фитоплазмите оди напред, и направена е првата изолација на вештачки (хранлив) медиум (Contaldo et al., 2012). Покрај тоа што сеуште не е разработен методот на прифаќање на фитоплазмите на медиум (*in vitro*), најчеста идентификација на оваа група на бактерии се врши со анализа на умножениот фитоплазматски геном, особено *16S rRNA* генот (Santi et al., 2013; Schnee et al., 2013; Kostadinovska et al., 2014).

Фитоплазмите заедно со вирусите кои се пренесуваат на перзистентен пропегативен начин, спаѓаат во ретка група на микроорганизми кои се способни да паразитираат во растителните и животинските микроорганизми (Hull, 2009).

Најчесто предизвикуваат жолтила, заостанување во растот, абнормална пролиферација на делови од растението, како што се листовите, стеблата, гранките, деловите од цветот (phyllody), за на крај да доведат до постепено пропаѓање на растенијата (Bertaccini & Duduk, 2009).

Фитоплазмите се регистрирани како нестроги специфични патогени, затоа што често може да се сретнат и кај други растителни видови и фамилии, но врзани за виновата лоза како култура предизвикуваат значителни економски штети и загуби во приносот и квалитетот на грозјето (Bertaccini, 2007; Bertaccini & Duduk, 2009; Maejima et al., 2014).

Така, според голем број на литературни податоци објавени на територијата на најголемите центри за производство на квалитетни вина, како што се Франција, Италија и Шпанија, фитоплазмите предизвикуваат многу деструктивни заболувања кај виновата лоза и претставуваат проблем при современото одгледување на виновата лоза (Boudon-Padieu, 2000, 2003).

Генерално земено, многу важно при конципирањето на мерките за заштита од овие флоемски патогени, е правилниот избор и навремениот начин на примена на таквите кој воглавном треба да опфаќаат употреба на тестиран саден материјал, т.е. производство на саден материјал преку строга сертификациона програма со примена на напредни серолошки и молекуларни дијагностички методи (Cabaleiro, 2009; Службен весник бр. 116, август 2011; Димовска и Белески, 2014).

Расадниците морат да бидат изложени на строги контроли на кој начин ќе се спречи инфекцијата на сертифицираните матични растенија, особено на подлогата која многу често не покажува симптоми на инфекција (Cabaleiro, 2009). Кога се работи за контрола на вирусните појави кај виновата лоза, отстранувањето на вирусите од растителниот материјал може да се постигне со примена на конвенционални (Goheen & Luhn, 1973) или модифицирани термотерапевтски методи (Stellmach, 1980), или примена на метод на култура на апикалниот меристем во *in vitro* услови (Barlass et al., 1982).

Според применетите мерки за заштита, во случај на спроведување на терапија против вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, оздравување на растителниот материјал може да се постигне со продолжена терапија (60 до 120 дена на 38°C), термотерапија *in vitro* по Галзиев метод (Valat & Mur, 1976) и култура на меристемот *in vitro* (Barlass et al., 1982).

Интересен, но сеуште недоволно проучен феномен, претставува процесот на опоравување „recovery“ кој претставува губење на симптомите кај претходно маркирани симптоматични растенија. Оправените растенија развиваат механизам на отпорност кој се однесува на ултраструктурната и биохемиска промена во спроводните садови (Santi et al., 2013). Овој синдром на опоравување останува како поле за понатамошна работа и дискусија, затоа што симптомите на надворешен преглед на лозата не се забележуваат, но тоа не значи дека флоемските патогени не се присутни во спроводните садови.

7. ЗАКЛУЧОК

Врз основа на направените и објавените истражувања во рамките на дисертацијата, може да се изведат следниве заклучоци:

1. Во истражувањата беа вклучени едни од економски многу значајните патогени кај виновата лоза – флоемски ограничени патогени. Тие беа, испитувани на територијата на Македонија, на вкупно 17 локалитети и 27 лозарски единици. Истражувањето опфати вкупно 766 изолати со симптоми на фитоплазматски промени кај виновата лоза, 40 изолати од фитоплазматски промени кај околната вегетација и 382 изолати од вирусна симптоматологија кај виновата лоза;

2. Во Тиквешкото и Штипското виногорје, последователно, секоја година беше докажано присуството на проучуваните флоемски патогени. Во Скопското виногорје беше забележана инфекција но помал обем. Проучуваните патогени не беа утврдени во Битолскиот регион, на лозовите насади на Лозар;

3. Анализите покажаа дека најголем процент на инфекција беше утврден кај винските сорти Шардоне, Вранец и Црн бургундец;

4. Кај природно заболените лози со столбур фитоплазмата и/или GLRaV вирусот, предизвикуваат промена во бојата и морфолошката структура, како и промена на распоредот на листовите во ластарите. Морфолошки промени се забележливи и на целата лоза. Листовите постепено пожелтуваат / поцрвенуваат, и добиваат боја позната како „златно жолтеене“ („grapevine yellowing“). Кај заразените растенија се развива окрутнување и свиткување на листовите со рабовите кон внатрешноста, како и распоред на листовите во вид на поставеност како ќерамиди. Кај некои сорти, симптоматичните листови на изглед се помали од нормалните здрави листови.

5. Ластарот кај заболените лози од фитоплазматска или вирусна природа, е незадрвенет т.е. нелигнифициран, со голем број на мали листови, свиткани на внатре и со дисколорација. Таквите ластари лежат на површината на почвата, и лесно можат да бидат забележани.

6. Интернодиите кај заболените ластари се пократки од нормалните, што е генерална карактеристика кај сите фитоплазматски и флоемски вирусни заразени лози;

7. Кај автохтоната сорта Станушина (црна сорта), како резултат на паразитизмот на испитуваните патогени, утврдено е пожолтување на лисната маса, симптом - карактеристичен за белите сорти (пр. Сорта Шардоне), како и окрутнување и свиткување на листовите, ќерамидест изглед и поставеност на лисната маса;

8. Мултилокусна анализа на геномската сенвенца на столбур фитоплазмата потврди мали варијабилности кај некои геноми:

- универзалниот *16S rRNA* ген, докажа присуство на столбур фитоплазмата, со комплетна идентичност во геномската структура на овој ген, т.е. без варијабилност во геномот кај испитуваните примероци;
- специфичниот *tuf* ген - докажано присуството на столбур фитоплазма кај виновата лоза (Bois noir, 16SrXII – A subgroup - stolbur) – тип I и II (type a и type b) (VKI & VKII), со поголема застапеност на тип II;
- *vmp1* генскиот регион, покажаа пет различни профили кај проучуваните примероци во дисертацијата, од кои најчесто застапени кај нас се V4 (кој одговара на профили застапени во Еуро-Медитеранските региони), и V14 профил застапен во Западна Европа;
- анализите на специфичниот *stamp* ген докажаа варијабилност со присуство на три профила, (S1, S2 и S3 профили);
- со анализите на *trxA–truB* генот, докажано е присуство на два профила (A и B профили);
- со анализите на *rplS – csdB* генот, докажано е присуство на два профила (A и B профили);
- со анализите на *cbiQ – glyA* генот, докажано е присуство на само еден профил, кои го обележавме како профил A за испитуваниот ген.

9. Лабораториските анализи на собраниот материјал, потврдија присуство на столбур фитоплазмата, тестирани за специфичниот *tuf* ген, *tuf* type b (II), кај плевелната вегетација, т.е. кај *Convolvulus arvensis* и *Cuscuta* sp.;

10. Кај виновата лоза во неколку виногорја, беше следено и потврдено присуството на економски значајниот вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза (*Grapevine leafroll associated virus*) со групите -1 и -3 од овој вирус (GLRaV-1, GLRaV-3).

8. ЛИТЕРАТУРА

- Abdulkareem A.K., Pakhshan M.M. (2011). The allelopathic effect of different species of grapevine berries aqueous extracts on some germination parameters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *International Journal of Biosciences 9IJB*, Vol. 1., No. 6, 70-80.
- Agrios G. N. (1997). *Plant Pathology* ISBN-10: 0120445646 ISBN-13: 9780120445646
- Ahrens U., Lorenz K.H., Seemueller E. (1993). Genetic diversity among mycoplasma like organisms associated with stone fruit diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6: 686-691.
- Al-Saady N.A., Khan A.J., Calari A., Al-Subhi A.M., Bertaccini A. (2008). 'Candidatus *Phytoplasma omanense*', a phytoplasma associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 461-466.
- Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Arzone A. (1997). Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology*, 6: 115-121.
- Alma A., Soldi G., Tedeschi R., Marzachi C. (2002). Ruolo di *Hyalestes obsoletus* Signoret (Homoptera, Cixidae) nella transmission del Legno nero della vite in Italia, *Petria* 12: 411-412.
- Alvarez E., Mejía J.F., Llano G.A., Loke J.B., Calari A., Duduk B., Bertaccini A. (2009). Characterization of a Phytoplasma Associated with Frogskin Disease in Cassava. *Plant disease*. Vol. 93 No. 11 pp. 1139-1145.
- Andersen M.T., Beever R.E., Gilman A.C., Liefting L.W., Balmori E., Beck D.L., Sutherland P.W., Bryan G.T., Gardner R.C., Forster R.L.S. (1998). Detection of phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. *Plant Pathology*, 47: 188-196.
- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. (2004). Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86 (3), 183-195.

- 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.
- Arocha Y., Lopez M., Pinol B., Fernandez M., Picornell B., Almeida R., Palenzuela I., Wilson M.R., Jones P. (2005). 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6): 2451-2463.
- Avramov Z., Gillet J., Laginova M., (2008). First detection of stolbur phytoplasma in Grapevines (*Vitis vinifera* cv. Merlot) Affected with grapevine Yellows in Bulgaria. *J. Phytopathology* 156, 112-114.
- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller S.A., Radek A.J., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., and Hogenhout S.A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Baric S., Dalla Via J. (2004). A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 57: 135-145.
- Barlass M., Skene K. G. M., Woodham R. C., Krake R. C. (1982). Regeneration of virus free grapevines using in vitro apical culture. *Annals of Applied Biology* 101, 291-295.
- Barros T.S.L., Davis R.E., Resende R.O., Dally E.L. (2002). Erigeron witches'-broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-b in 16S rna gene group vVII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease*, 86(10): 1142-1148.
- Белевски, К. (2013). Лозарството во Република Македонија.
<http://www.marili.com.mk/web/Cont.asp?ID=1848>
- Bertaccini A., Vibio M., Stefani E. (1995). Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopatol. mediterr.*, 34, 137-141.
- Bertaccini A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology, *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689.
- Bertaccini A., Duduk B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Mediterr.* (2009) 48, 355–378.

- Bertamini M., Nedunchezian N., Tomasi F., Grando M.S. (2002). Phytoplasma [Stolbur-subgroup (BoisNoir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv.Chardonnay) leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61, 357–366. doi: 10.1006/pmpp.2003.0449
- 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.
- Borgo M., Angelini E. (2002). Influence de l'enroulement foliare GLRaV-3 sur les parameters de la production du Merlot. *Bullerin de l'O.I.V.*, 859-860.
- Borgo M. (1990). Determinazione serologica dei virus dell' arricciamento e dell' accartocciamento fogliare mediante test ELISA su organi legnosi della vite. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 43, 3-13.
- Botti S., Bertaccini A. (2007): Grapevine yellows in Northern Italy: molecular identification of Flavescence dore'e phytoplasma strains and of Bois Noir phytoplasmas. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. 2325-2330.
- 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.
- 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).
- Bovey R., Gartel W., Hewitt W. B., Martelli G.P., Vuittenez A. (1990). Soil-borne viruses transmitted by nemathodes. U: Bovey R., Gartel W., Hewitt W. B., Martelli G.P., Vuittenez A. *Virus and virus-like diseases of grapevines*, Editions Payot, Lausanne, Switzerland, 46-50.
- Божиновиќ З. (2005). Ампелографија, второ издание. Агенција „Академик“ Скопје.
- Bressan A., Turata r., Maixner M., Spiazzi S., Boudon-Padieu E., Girolami V. (2007): Vector activity of *Hyalestes obsoletus* living on nettle and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Ann. Appl. Biol.* 150: 331-339.

- Cabaleiro C., Seruga A. (1996). Efecto del enrollado de la vid (GLRaV-3) en un viñedo en plena producción del cultivar “Albarino”. *Investigation Agraria, Produccion y Proteccion Vegetal* 11, 451-463.
- Cabaleiro C. (2009). Current advances in the epidemiology of grapevine leafroll disease. Highlights of the 16th Meeting of ICVG Dijon, France.
- 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.
- Carraro L., N. Loi, C. Kuszala, D. Clair, E. Boudon-Padieu, E. Refatti (1994). On the ability-inability of *Scaphoideus titanus* Ball to transmit different grapevine yellow agents. *Vitis* 33, 231–234.
- 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.
- 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.
- Chen J., Pu X., Deng X, Liu S., Li H., Civerolo E. (2008). A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16SrIX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São paulo, Brazil. *Phytopathology*, 98(9): 977-984.
- 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.
- Daire X., Boudon-Padieu E., Berville A., Schneider B., Caudwell A. (1992). Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence doree mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, 121: 95-103.
- Daire, X., Clair, D., Larrue, J., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A. (1993). Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis*, 32, 159-163.
- Danielli A., Bertaccini A., Alma A., Bosco D., Vibio M., Arzone A. (1996). May evidence of 16SrI-group-related phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball suggest their transovarial transmission? *IOM Letters*, 4: 190-191.

- Davis R.E., Sinclair W.A. (1998). Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88: 1372-1376
- Davis R.E., Jomantiene R., Dally E.L., Wolf T.K. (1998). Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16Srl, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. *Vitis*, 37: 131-137.
- Davis R.E., Dally E.L. (2001). Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroup. *Plant Disease* 85, 790-797.
- Deng S., Hiruki C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14:53-61.
- Димовска В., Белески К. (2014). Производство на лозов саден материјал. Универзитет „Гоце Делчев“ Штип, Земјоделски факултет.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H., (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellows or paulownia witches'-broom. *Ann Phytopathol Soc Jap* 33: 259-266.
- Endeshaw S.T., Murolo S., Romanazzi G., Neri D. (2012). Effects of Bois Noir on carbon assimilation, transpiration, stomatal conductance of leaves and yield of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay. *Physiol. Plant.* 145, 286–295.
doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01576.x
- Errampalli D., Fletcher J., Claypool P.L. (1991). Incidence of yellows in carrot and lettuce and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Disease*, 75: 579-584.
- Ertunk F. (2013). A new threat for Turkish horticulture: phytoplasma diseases and their vectors. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 60, 221-224.
- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq MJ., Candresse T. (2000). Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PRO RT-PCR). 16th International Symposium of Virus and Virus-Like diseases on fruit trees. Canterbury p.48. *Acta Agricultura*, Vol 550, 37-43.

- 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.
- Fortusini A., Scattini G., Prati S., Cinquanta S., Belli G. (1997). Transmission of Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and Grapevine virus A (GVA) by scale insects. U: Sequeira de O.A., Sequeira J.C., Santod M.T. Extended abstracts 12th Meeting of ICVG, Lisabon, Portugal, 121-122.
- Gibb K.S., Padovan A.C., Mogen B.D. (1995). Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology*, 85: 169-174.
- Golino D.A., Sim S.T., Rowhani A. (1995). Transmission studies of grapevine leafroll associated virus and grapevine corky bark associated virus by the obscure mealybug. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 408.
- Golino D. A., Sim S., Gill R., Rowhani A. (1998). Transmission studies of grapevine closteroviruses by four species of mealybugs. *Phytopathology* 88, S32.
- Golino D. A., Sim S., Gill R., Rowhani A. (2002). California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture* 56, 196-201.
- Goheen A. C., Luhn C. F. (1973). Heat inactivation of viruses of grapevines. *Rivista di Patologia Vegetale Ser. IV*, 9, 287-289.
- Griffiths H.M., Sinclair W.A., Smart C.D., Davis R.E. (1999). The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches' broom: 'Candidatus Phytoplasma fraxini'. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1605-1614.
- Gugerli P. (2009). 25 years of serological identification of grapevine leafroll-associated viruses: antiserum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9. Extended abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France, 24-28.
- Gundersen D.E., Lee I-M., Rehner S.A., Davis R.E., Kingsbury D.T. (1994). Phylogeny of mycoplasma like organisms (phytoplasmas): a basic for their clasification. *J. Bacteriol.* 176, 5244-5254.
- Gundersen DE, Lee I-M, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ (1996). Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA group I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* 46: 64-75.

- Harmon F.N., Snyder E. (1946). Investigation of the occurrence, transmission, spread and effect of “white” fruit color in the Emperor grape. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 47, 190-194.
- Hanboonsong Y, Choosai C, Panyim S, Damak S. (2002). Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*, 11: 97-103.
- Harrison N.A., Richardson P.A., Kramer J.B., Tsai J.H. (1994). Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 43: 998-1008.
- Heinrich M., Botti S., Caprara L., Arthofer W., Strommer S., Hanzer V., Katinger H., Laimer da Câmara Machado M., Bertaccini A. (2001). Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 169-179.
- Hewit W.B. (1970). Virus and Virus diseases of the Grapevine. *Review of Applied Mycology* 47, 433-455.
- Hiruki C., Wang K. (2004). Clover proliferation phytoplasma: ‘Candidatus *Phytoplasma trifolii*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4): 1349-1353.
- Ho K., Tsai C., Chung T. (2001). Organization of ribosomal RNA genes from a loofah witches’ broom phytoplasma. *DNA and Cell Biology*, 20: 115-122.
- 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.
- Hull R. (2009). *Comparative plant virology* (second edition). Elsevier Academic Press. ISBN 13: 978-0-12-374154-7.
- Христов П. (2002). Лозарство, општо. 161-166.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). Virus taxonomy. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>
- 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.

- Jacobs K.A., Lee I.-M., Griffiths H.M., Miller F.D.Jr., Bottner K.D. (2003). A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Disease*, 87(3): 241-246.
- Jarausch W., Schwind N., Jarausch B., Krczal G. (2004). Analysis of the distribution of apple proliferation phytoplasma subtypes in a local fruit growing region in Southwest Germany. *Acta Horticulturae*, 657: 421–424.
- Jomantiene R., Davis R.E., Maas J., Dally E.L. (1998b). Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269-277.
- Jomantiene R., Maas J.L., Takeda F., Davis R.E.. (2002a). Molecular identification and classification of strawberry phylloid fruit phytoplasma in group 16Srl, new subgroup. *Plant Disease*, 86(8): 920.
- Jomantiene R., Davis R.E., Valiunas D., Alminaitė A. (2002b). New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 507-517.
- Jones P. (2002). Phytoplasma plant pathogens. *Plant Pathologist's Pocketbook* 3th edition. Waler J.M., Lenne J.M., Waller S.J. CABI Publishing UK.
- Jung H., Sawayanagi T., Kakizawa S., Nishigawa H., Wei W., Oshima K., Miyata S., Ugaki, M., Hibi T., Namba S., (2003a). 'Candidatus Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1037-1041.
- Jung H.Y., Sawayanagi T., Wongkaew P., Miyata S., Ugaki M., Hibi T., Namba S. (2003b). 'Candidatus Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1925-1929.
- Kawakita H., Saiki T., Wei W., Mitsuhasi W., Watanabe K., Sato M. (2000). Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in genital organs and eggs of the leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90: 909-914.
- Kostadinovska E., Quaglino F., Mitrev S., Casati P., Bulgari D., Bianco P. A. (2014). Multiple gene analyses identified distinct 'bois noir' phytoplasma genotypes in the Republic of Macedonia, *Phytopathologia Mediterranea* DOI number 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14517 (in press).

- Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E. (2012). Current View on Phytoplasma Genomes and Encoded Metabolism. *The ScientificWorld Journal* Volume 2012, Article ID 185942, doi:10.1100/2012/185942, 1-25.
- Kunkel L.O. (1926). Studies on aster yellows. *American Journal of Botany*, 13: 646-705.
- Kunkel L.O. (1931). Celery yellows of California not identical with the aster yellows of New York. *Boyce Thompson Institute*, 4: 405-414.
- Kunkel L.O. (1955). Cross protection between strains of aster yellow-type viruses. *Advances in Virus Research*, 3: 251-273.
- Kunz G., Roschatt C., Schweigkofler W. (2010). Biodiversity of planthoppers (Auchenorrhyncha) in vineyards infected by Bois noir phytoplasma. *Gredleriana* Vol 10. (89-108)
- 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.
- Lacirignola C., Digiario M. (1999). Grapevine industry in the world: state of the art and future trends. *Options Mediterraneennes, Serie B, Proceedings of the Mediterranean Network on Grapevine Closteroviruses*, 33-46.
- Lee I.M., Davis R.E. (1992). Mycoplasmas which infect plants and insects. U: Maniloff J, McElhansey RN, Finch LR, Baseman JB (eds) *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC, Am Soc Microbiol, 379-390
- 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.
- Lee I.-M., Pastore M., Vibio M., Danielli A., Attathom S., Davis R.E, Bertaccini A. (1997b). Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poa annua*) white leaf disease in southern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 251-254.
- Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A., (1998). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.
- Lee I.M, Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54:221-255.

- Lee I.M., Martini M., Bottner K.D., Dane R.A., Black M.C., Troxclair N. (2003). Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, 93: 1368-1377.
- Lee I.M., Gundersen-Rindal D., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C., Seemueller E. (2004a). 'Candidatus *Phytoplasma asteris*', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54: 1037-1048.
- Lee I.M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. (2004b). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus *Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2): 337-347.
- Lee I.M., Bottner K.D., Munyaneza J.E., Davis R.E., Crosslin J.M., du Toit L.J., Crosby Z. (2006a). Carrot purple leaf: A new spiroplasmal disease associated with carrots in Washington State. *Plant Disease*, 90: 989-993.
- Liefting L.W., Kirkpatrick B.C. (2003). Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 221: 203–211.
- 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.
- Maejima K., Oshima K., Namba S. (2014). Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *J Gen Plant Pathol* (2014) 80:210–221.
- Maixner M. (1994). Transmission of german grapevine yellows (vergilbungskrankheit) by planthopper *Hyalestes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* 33. 103-104.
- Maixner M. (2011). Recent Advances in Bois Noir Research. 17-32. In: Book of Abstract, 2nd European Bois Noir Workshop, 27 Feb-1st March, Castelbrando, Venice. DOI 10.1007/s10327-014-0512-8
- Mannini F., Credi R. (2000). Appraisal of agronomic and enological modification in the performances of grapevine clones after virus eradication. Extended Abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 151-154.
- Maramorosch K. (2008). The discovery of phytoplasmas: a historical reminiscence of success and failure. *Egyptian Journal of virology*, 5 (1): 1-19.

- Marcone C., Neimark A., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E., (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.
- Marcone C., Lee I.-M., Davis R.E., Ragozzino A., Seemüller E. (2000). Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(5): 1703-1713.
- Marcone C., Gibb K.S., Streten C., Schneider B. (2004a). 'Candidatus Phytoplasma spartii', 'Candidatus Phytoplasma rhamni' and 'Candidatus Phytoplasma allocasuarinae', respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1025-1029.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- Martelli G.P., Savino V. (1990). Fanleaf degeneration. U. Pearson R.C. Goheen A. *Compendium of grape diseases*, APS Press, St. Paul, MN, USA, 48-49.
- Martini M., Lee I.M. Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan J., Osler R. (2007). Ribosomal protein gene-based filogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.
- 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.

- Mc Coy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen T.A., Chiykowskyi L.N., Cousin M.T., Dale de Leeuw G.T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Shina R.H., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemüller E. (1989). Plant Diseases Associated with Mycoplasma-like Organisms. In: *The Mycoplasmas*, vol. 5. (eds. Whitcomb R.F. e Tully J.G.). Academic Press, New York: 545-640.
- McFarlane S.A., Neilson R., Brown D.J.F. (2002). Nematodes. U: Plumb R.T. *Advances in botanical research*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 169-198.
- Milkus B., Clair D., Idir S., Habili N., Boudon-Padieu E. (2004). First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera*, cv Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. *New Disease Reports* (2004) 10, 12.
- Montano H.G., Davis R.E., Dally E.L., Pimentel J.P., Brioso P.S.T. (2000). Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Disease*, 84: 429-436.
- Montano H.G., Davis R.E., Dally E.L., Hogenhout S., Pimentel J.P., Brioso P.S.T. (2001). 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1109-1118.
- Mori N., Pavan F., Reggiani N., Bacchiavini M., Mazzon L., Paltrinieri S., Bertaccini A. (2012): Correlation of bois noir disease with nettle and vector abundance in northern Italy vineyards. *J. Pest Sci* (2012) 85: 23-28.
- Mitrev S., Kostadinovska E. (2013). Presence of stolbur phytoplasma in grapevine and other natural hosts in the Republic of Macedonia. In: *Abstracts, 3rd European Bois Noir Workshop*, March 22-23, 2013, Barcelona, Spain, 44–45.
- Mitrev S., Karov I., Kostadinovska E. (2011). Grapevine yellows in the Republic of Macedonia: molecular identification of stolbur phytoplasma strains in grapevine and weeds. *2nd European Bois noir Workshop 2011* (37-38).
- Mitrev S., Kostadinovska E., Pejcinovski, F., Spasenoski, M. (2009). Dispersion of the disease Bois noir in some vineyards in Macedonia. *Plant Protection*, Vol. XX: 49-54, Skopje.
- Mitrev S., Spasenoski, M., Kostadinovska E. (2008). Molecular detection and characterization in Macedonia. *Yearbook of Goce Delcev University - Stip, Faculty of Agriculture*. Vol. 8: 7-17.

- Mitrev S., Nakova E., Pejcinovski F. and Angelini E. (2007). Geographical distribution of Bois noir phytoplasmas infecting grapevines in the Republic of Macedonia. *Bulletin of Insectology*, Vol. 60 (2) ISSN 1721-8661.
- Митрев С., Пејчиновски Ф., Козина Б., Мојсовски Т. (2001). Појава на некои нови патогени промени кај виновата лоза во регионот, Годишен зборник 2001, Институт за јужни земјоделски култури, Струмица, 107-120.
- Murphy, F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. (1995). *Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag Wien, New York. 586 p.
- Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanitàdi Toppi L., Borselli S. (2007). On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pros- ecco) from Flavescence dorée disease. *Funct.PlantBiol.* 34, 750–758. doi: 10.1071/FP06308.
- Mutton P., W. Boccalon, S. Bressan, C. Coassin, M. Colautti, D. Del Cont Bernard, A. Floreani, D. Zucchiatti, F. Pavan, D. Mucignat, C. Frausin, P. Antoniazzi, G. Stefanelli, A. Villani (2002). Legno nero della vite in vigneti di Chardonnay del Friuli-Venezia Giulia. *Informatore Fitopatologico* 52 (1), 52–59.
- Нацрт стратегија за лозарство и винарство 2010-2015.
- Накова Е. (2008). Фитоплазмите како причинители на жолтило кај виновата лоза (*Vitis vinifera* L.) во Република Македонија, магистерски труд, 2008, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје, Природно-математички факултет, Институт за Биологија.
- Naima M., Dhouibi Chabbouh N. (2002). Etude de la biologie de la cochenille farineuse de la vigne *Planococcus citri*, essais de transmission des virus (LR et GVA) et essais de lutte biologique. Travail DEA, INAT, Tunisie.
- Nakaune R., Toda S., Mochizuki M., Nakano M. (2008). Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Archives of Virology* 153, 1827-1832.
- Namba S., Kato S., Iwanami S., Oyaizu H., Shiozawa H., Tsuchizaki T. (1993). Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83: 786-791.
- 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.

OIV, International organization of Vine and Wine (2014). The wine Market: development and trends.

http://www.oiv.int/oiv/info/en_press_conference_may_2014

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.

Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H-Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36: 27-29.

Pavan F., L. Carraro, G. Vettorello, E. Pavanetto, V. Girolami, R. Osler, (1997). Flavescenza dorata nei vigneti delle colline trevigiane. *L'Informatore Agrario* 53 (10), 73–78.

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.

Pearson, R.C., Goheen, A.C. (1988). *Compendium of Grape Diseases*. APS Press. USA.

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.

Petersen C.L., Charles J.G. (1997). Transmission of grapevine leafroll associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology* 46, 509-515.

Pejcinovski F. (1975). Jamcavost drveta vinove loze u Makedoniji. *Zastita bilja*, XXVI, No 132, 171-175.

Pejcinovski F. (1979). Mozaik nervature vinove loze kod sorte prokupac. *Zastita bilja*, XXX, No. 148, 141-147.

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.

- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P.A., Wei W., Davis R.E. (2013). 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur and Bois noir related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2879-2894.
- Rayapati A.N., O'Neil S., Walsh D. (2008). Grapevine leafroll disease. WSU Extension Bulletin. (<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf>).
- Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., Meredith C.P. (1983). Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease* 67, 335-339.
- Refatti E., L. Carraro, R. Osler, N. Loi, F. Pavan (1998). Presenza di differenti tipi di giallumi della vite nell'Italia nord-orientale. *Petria* 8, 85-97.
- Roggia C., Caciagli P., Galetto L., Pacifico D., Veratti F., Bosco D., Marzachi C. (2014). Flavescence doree phytoplasma titre in field-infected Barbera and Nebbiolo grapevines, *Plant Pathology* 63, 31-41.
- Routh G., Zhang Y.P., Saldarelli P., Rowhani A. (1998). Use of degenerative primers for partial sequencing and RT-PCR-based assays of grapevine leafroll-associated viruses. *Phytopathology* 88, 1238-1243.
- Rowhani A., Uyemoto J.K. (1997): A comparison between serological and biological assay in detecting grapevine leafroll associated viruses. *Plant Disease* 81, 799-801.
- Русевски Р., Христов П., Чамовски В., Банџо К. (2008). Grapevine fanleaf nepovirus: вирус на инфективна дегенерација на виновата лоза, ново жариште во Македонија, потекло и штетност Заштита на растенијата, Год. XIX, Vol XIX, Скопје.
- Saldarelli P., Rowhani A., Minafra A., Digiario M. (1998). Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to closterovirus and vitivirus of the grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 104, 945-950.
- 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.
- Scheu G. (1935). Die Rollkrankheit des Rebstockes. *Der Deutsche Weinbau* 14, 222-223, 345-346, 356-358.

- 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.
- 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.
- Seemüller E., Schneider B., Maurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K., Firrao G., Avinent L., Sears B.B., Stackebrandt E. (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 440-446.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A, Göschl, M. (1998a). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80: 3-26.
- Seemüller E., Schneider B. (2004). 'Candidatus *Phytoplasma mali*', 'Candidatus *Phytoplasma pyri*' and 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1217-1226.
- 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.
- Sforza R., Clair D., Daire X., Laurrue J., Boudon-Padieu E. (1999). The role of *Hyalestes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of grapevines in France. *J Phytopathology* 146: 549-556.
- Sforza R., Komar V., Greif C. (2000). New scale insect vectors of grapevine closteroviruses. Extended abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 14.
- Службен весник 116 (2011). Правилник за трговија со материјал за вегетативно размножување на виновата лоза, 3-24.
- Smart C.D, Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K-H., Seemüller E., Kirkpatrick B.C. (1996). *Phytoplasma*-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* 62: 2988-2993.

- Sosnowski M., Wicks T. (2007). A global perspective on grapevine diseases. www.winebiz.com.au AUSTRALIAN VITICULTURE, pp 77-81.
- Stevanovič M., Arsič T., (1997). Reakcija lančanog umnozavanja DNA-PCR (Polymerase chain reaction). Stevanovic M. Osnovi genetskog inzinjerstva: Izolovanje, obrada i elektroforetska analiza DNA. Institut za molekularnu genetiku i genetsko inzinjerstvo
- Šeruga M., Škorić D., Kozina B, Mitrev S, Krajačić M, Ćurković Perica M (2003). Molecular identification of a phytoplasma infecting grapevine in the Republic of Macedonia. *Vitis* 42: 181-184.
- Šeruga M., Škorić D., Botti S., Paltrinieri S., Juretić N., Bertaccini A. (2003). Molecular characterization of a phytoplasma from the Aster Yellows (16SrI) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. *Forest Pathology*, 33: 113-125.
- Stellmach G. (1980). Moderate heat propagation of grapevines for eliminating graft transmissible disorders. Proceedings 7th Meeting of ICVG, Niagara Falls, USA, 325-328.
- Taylor C.E., Raski D.J. (1964). On the transmission of grapevine fanleaf by *Xiphilema* index. *Nemathologica* 10, 489-495.
- Tanne E., Ben Dov Y., Raccach B. (1989). Transmission of the corky-bark disease by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica* 17, 55.
- Tanne E., Ben-Dov Y., Raccach B. (1989). Transmission of closterolike particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (Pseudococcidae) in Israel. Proceedings 9 th Meeting of ICVG, Kiryat Anavim, Israel, 71-73.
- Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J., Alma A. (2006). Possible Phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology*, 55: 18–24.
- Teixeira D.C., Wulff N.A., Martins E.C., Kitajima E.W., Bassanezi R., Ayres A.J., Eveillard S., Saillard C., Bové J.M. (2009). A phytoplasma related to 'Candidatus Phytoplasma asteri' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology*, 99(3): 236-242.
- 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.

- Torres E., Botti S., Rahola J., Martin M.P., Bertaccini A. (2005). Grapevine yellows diseases in Spain: eight years survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasmas involved. *Anales del Jardín botánico de Madrid*, 62(2): 127-133.
- Trudgill, L.D., Brown D.J.F., McNamara D.G. (1983). Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematode's. *Revue Némalol.* 6 (1) : 133-141.
- Tsai C.W., Rowhani A., Golino D.A., Daane K.M., Almeida R.P.P. (2010). Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology* 100, 830-834.
- 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.
- Valat C., Mur T. G. (1976). *Thermotherapie du Cardinal Rouge*. *Progres Agricole et Viticole* 93, 200-204.
- Valiunas D., Jomantiene R., Davis R.E. (2005). A 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related phytoplasma associated with cherry little leaf disease represents a new subgroup, 16SrIQ. *Phytopathology*, 95: S106.
- Valiunas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Abraitis R., Staniene G., Zhao Y, Davis R.E. (2009). First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania. *Plant Disease*, 93(5): 550.
- Вајн Р.П., Хркнес Е.М., Линтон С.Џ. (2007). Производство на вино.
- Verdin E., Salar P., Danet J.-L., Choueiri E., Jreijiri F., El Zammar S., Gélie B., Bové J. Garnier M. (2002). 'Candidatus Phytoplasma phoeniceum', a new phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 833-838.
- Vered N., Tirza Z. (2011). Long maintenance of phytoplasmas in grapevines Chardonnay and cabernet-sauvignon in vitro. *Phytopathogenic Mollicutes Volume:1, Issue:1 (15-20)*. Print ISSN : 2249-4669. Online ISSN : 2249-4677. Article DOI : [10.5958/j.2249-4669.1.1.002](https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.1.002)
- 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).

- Walter B., Martelli G.P. (1996). Selection clone de la vigne: selection sanitaire et selection pomologique. Influence des virus et qualite. 1 ere partie: Effects des viroses sur la culture des vignes et ses produits. Bulletin del' OIV 69, 945-971.
- Weintraub P.G., Beanland L.A. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. Annual Revue of Entomology 51, 91–111.
- Weintraub PG, Jones P (2010). Phytoplasmas, Genomes, Plant Hosts and Vectors. Cab International, United Kingdom.
- Zreik L., Carle P., Bové J.M., Garnier M. (1995). Characterization of the mycoplasma like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 449-453.
- Шифер, К.С., Монкада К.М. (2009). Вовед во агрономијата: храна, земјоделски култури и животна средина. Издадено на македонски јазик од Арс Ламина ДОО, 2011. Оригинал: Sheaffer C.C., Moncada K.M. (2009). Introduction to Agronomy: Food, Crops and Environment, Delmar Cengage learning.

ПРИЛОГ

Приказ на сите испитувани примероци со ELISA тест за докажување на присуство на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза во сезоните од 2008 до 2013

Реден бр.	Локалитет	Сорта	Шифра на примерок	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-7
1	с. Сарчиево	Вранец	01/08	-	-	-	-
2			02/08	+	-	-	-
3			03/08	-	-	-	-
4			04/08	-	-	-	-
5			05/08	+	-	+	-
6			06/08	+	-	-	-
7			07/08	-	-	+	-
8			08/08	-	-	+	-
9			09/08	-	-	+	-
10			10/08	-	-	-	-
11			11/08	-	-	-	-
12			12/08	+	-	-	-
13			13/08	-	-	+	-
14			14/08	-	-	-	-
15			15/08	-	-	+	-
16	Велес, м.в. Сопот	Каберне совињон	16/08	-	-	-	-
17			17/08	-	-	+	-
18			18/08	+	-	-	-
19			19/08	-	-	-	-
20			20/08	-	-	-	-
21			21/08	-	-	-	-
22			22/08	-	-	-	-
23			23/08	-	-	-	-
24			24/08	-	-	-	-
25			25/08	-	-	-	-
26	Штип, с. Ежово	Вранец	26/08	-	-	-	-
27	с. Три чешми	Вранец	27/08	-	-	-	-
28			28/08	-	-	-	-

29	Кочани, Стари лозја	Вранец	29/08	+	-	+	-
30			30/08	-	-	-	-
31			31/08	-	-	+	-
32			32/08	-	-	+	-
33			33/08	+	-	-	-
34			34/08	-	-	+	-
35			35/08	-	-	-	-
36			36/08	+	-	-	-
37			37/08	-	-	-	-
38			38/08	-	-	+	-
39			39/08	-	-	+	-
40			40/08	+	-	+	-
41			41/08	-	-	+	-
42			42/08	-	-	+	-
43			43/08	-	-	-	-
44	Штип, с. Криви дол	Вранец	44/08	+	-	+	-
45			45/08	-	-	+	-
46	Штип, м.в. Каваклија	Вранец	46/08	-	-	+	-
47	с. Сарчиево	Вранец	1/09	-	-	-	-
48			2/09	+	-	-	-
49			3/09	-	-	+	-
50			4/09	-	-	+	-
51			5/09	-	-	-	-
52			6/09	-	-	-	-
53	Кочани, Стари лозја	Вранец	7/09	-	-	+	-
54			8/09	-	-	+	-
55			9/09	-	-	+	-
56			10/09	+	-	-	-
57			11/09	-	-	+	-
58			12/09	-	-	+	-

59	Свети Николе, с. Ерџелија	Вранец	13/09	-	-	+	-
60			14/09	+	-	-	-
61			15/09	-	-	-	-
62			16/09	-	-	+	-
63			17/09	-	-	-	-
64			18/09	+	-	+	-
65			19/09	-	-	-	-
66			20/09	-	-	-	-
67			21/09	-	-	+	-
68			22/09	+	-	-	-
69			23/09	-	-	-	-
70			24/09	-	-	-	-
71			25/09	-	-	+	-
72			26/09	-	-	-	-
73			27/09	+	-	-	-
74			28/09	-	-	-	-
75			29/09	-	-	-	-
76			30/09	-	-	-	-
77	Валандово, с. Јосифово	Молдавија	31/09	-	-	-	-
78			32/09	-	-	-	-
79			33/09	-	-	+	-
80			34/09	-	-	+	-
81			35/09	+	-	-	-
82			36/09	-	-	-	-
83		Страшинска	37/09	+	-	-	-
84			38/09	-	-	+	-
85			39/09	-	-	-	-
86			40/09	-	-	+	-
87	Штип, с. Криви Дол	Вранец	41/09	+	-	+	-
88			42/09	-	-	+	-
89			43/09	-	-	+	-
90	Штип, м.в. Каваклија	Вранец	44/09	+	-	-	-
91			45/09	-	-	+	-
92			46/09	-	-	+	-
93			47/09	-	-	+	-
94	Штип, с. Ново Село	Вранец	48/09	-	-	-	-
95	Штип, м.в. Ежово	Вранец	1/10	+	-	-	-
96			2/10	-	-	+	-
97			3/10	-	-	+	-

98	Штип, м.в. Каваклија	Вранец	1/10	-	-	+	-
99			2/10	+	-	-	-
100			3/10	-	-	-	-
101			4/10	+	-	+	-
102	с. Сарчиево	Вранец	5/10	+	-	-	-
103			6/10	-	-	+	-
104			7/10	+	-	+	-
105			8/10	-	-	-	-
106			9/10	+	-	-	-
107			10/10	-	-	+	-
108			11/10	-	-	+	-
109			12/10	-	-	+	-
110			13/10	-	-	+	-
111			14/10	-	-	-	-
112			15/10	-	-	-	-
113			16/10	+	-	+	-
114			17/10	-	-	-	-
115			18/10	-	-	-	-
116			19/10	+	-	+	-
117			20/10	-	-	-	-
118			21/10	-	-	-	-
119			22/10	-	-	-	-
120			23/10	-	-	+	-
121			24/10	-	-	-	-
122	25/10	-	-	-	-		
123	Штип, м.в. Ежово	Црн бургундец	26/10	+	-	+	-
124			27/10	-	-	+	-
125			28/10	-	-	+	-
126			29/10	+	-	-	-
127			30/10	-	-	+	-
128			31/10	-	-	+	-
129			32/10	-	-	+	-
130			33/10	-	-	-	-
131	с. Караорман м.в. Балабаница	Вранец	34/10	-	-	-	-
132			35/10	-	-	+	-
133			36/10	-	-	-	-
134			37/10	+	-	+	-
135			38/10	-	-	-	-
136			39/10	-	-	+	-

137	Велес, м.в. Сопот	Каберне совињон	40/10	-	-	-	-
138			41/10	-	-	-	-
139			42/10	-	-	-	-
140			43/10	-	-	+	-
141			44/10	-	-	-	-
142	Велес, м.в. Сопот	Рајнски ризлинг	45/10	-	-	-	-
143	с. Аргулица, м.в. Тупанец	Мерло	46/10	-	-	+	-
144			47/10	-	-	-	-
145			48/10	-	-	-	-
146			49/10	-	-	-	-
147			50/10	+	-	-	-
148			51/10	+	-	-	-
149		Вранец	52/10	-	-	+	-
150			53/10	-	-	-	-
151			54/10	-	-	+	-
152			55/10	-	-	+	-
153			56/10	-	-	+	-
154			57/10	-	-	+	-
155			58/10	+	-	+	-
156			59/10	-	-	+	-
157			60/10	+	-	+	-
158			61/10	-	-	+	-
159			62/10	+	-	+	-
160			63/10	-	-	+	-
161			64/10	-	-	+	-
162			65/10	-	-	+	-
163	Штип, с. Криви Дол	Вранец	66/10	-	-	+	-
164			67/10	+	-	+	-
165			68/10	-	-	+	-
166			69/10	+	-	-	-
167			70/10	-	-	-	-
168			71/10	-	-	-	-
169			72/10	-	-	-	-
170			73/10	-	-	-	-
171			74/10	+	-	+	-
172	Кумановско	Вранец	75/10	-	-	-	-
173			76/10	-	-	-	-
174			77/10	-	-	-	-
175			78/10	-	-	-	-
176			79/10	-	-	-	-
177			80/10	-	-	-	-

178	Демир Капија, Попова кула	Жилавка	01/11	-	-	-	-
179			02/11	-	-	-	-
180			03/11	-	-	-	-
181			04/11	-	-	-	-
182			05/11	-	-	-	-
183			06/11	-	-	-	-
184			07/11	-	-	-	-
185		Вранец	08/11	-	-	+	-
186			09/11	+	-	+	-
187	Валандово с. Јосифово	Молдавија	10/11	-	-	-	-
188	Овче поле	Вранец	11/11	-	-	-	-
189			12/11	-	-	-	-
190	с. Пеширово	Вранец	13/11	-	-	-	-
191			14/11	-	-	-	-
192			15/11	-	-	-	-
193	с. Пеширово	Вранец	16/11	+	-	-	-
194			17/11	-	-	+	-
195			18/11	-	-	-	-
196			19/11	-	-	+	-
197			20/11	-	-	-	-
198			21/11	-	-	-	-
199			22/11	-	-	+	-
200			23/11	-	-	-	-
201			24/11	-	-	-	-
202			25/11	+	-	+	-
203			26/11	-	-	-	-
204			27/11	-	-	-	-
205			28/11	-	-	-	-
206			29/11	-	-	+	-
207			30/11	-	-	-	-
208			31/11	-	-	-	-
209			32/11	-	-	-	-
210			33/11	-	-	+	-
211			34/11	-	-	-	-
212			35/11	-	-	-	-
213	с. Црнилиште	Вранец	36/11	-	-	-	-
214			37/11	-	-	-	-
215			38/11	-	-	-	-
216			39/11	-	-	+	-

217	Неготино, Ило Виларов	Вранец	40/11	+	-	-	-		
218			41/11	-	-	+	-		
219			42/11	-	-	-	-		
220			43/11	+	-	+	-		
221			44/11	-	-	-	-		
222			45/11	+	-	+	-		
223			46/11	-	-	-	-		
224			47/11	-	-	-	-		
225			48/11	-	-	+	-		
226			Неготино с. Лепово	Вранец	49/11	-	-	-	-
227					50/11	-	-	+	-
228	51/11	-			-	+	-		
229	52/11	-			-	+	-		
230	53/11	+			-	-	-		
231	54/11	-			-	-	-		
232	Кавадарци, с. Крњево	Вранец	55/11	-	-	-	-		
233			56/11	-	-	-	-		
234			57/11	-	-	-	-		
235			58/11	-	-	+	-		
236			59/11	+	-	-	-		
237			60/11	-	-	+	-		
238			61/11	-	-	-	-		
239			62/11	-	-	-	-		
240			63/11	-	-	+	-		
241			64/11	-	-	+	-		
242			65/11	-	-	-	-		
243			66/11	-	-	-	-		
244			67/11	-	-	+	-		
245	Кавадарци, с. Крњево	Вранец	68/11	-	-	-	-		
246			69/11	+	-	-	-		
247			70/11	-	-	-	-		

248	Штип, м.в. Каваклија	Црн бургундец	71/11	-	-	-	-
249			72/11	-	-	-	-
250			73/11	-	-	-	-
251			74/11	-	-	-	-
252			75/11	-	-	-	-
253			76/11	-	-	+	-
254			77/11	-	-	-	-
255			78/11	-	-	-	-
256			79/11	+	-	+	-
257			80/11	-	-	-	-
258			81/11	-	-	-	-
259			Кавадарци, с. Чемерско, м.в. Селиште	Црн бургундец	82/11	-	-
260	83/11	-			-	+	-
261	84/11	-			-	+	-
262	85/11	-			-	+	-
263	86/11	-			-	+	-
264	87/11	+			-	+	-
265	88/11	-			-	+	-
266	89/11	-			-	+	-
267	90/11	-			-	+	-
268	91/11	-			-	+	-
269	92/11	-			-	+	-
270	93/11	+			-	-	-
271	94/11	+			-	-	-
272	95/11	-			-	+	-
273	96/11	-			-	+	-
274	97/11	+			-	+	-
275	98/11	-			-	-	-
276	99/11	-			-	-	-
277	100/11	-	-	-	-		
278	Битолско, „Лозар“	Италијански ризлинг	101/11	-	-	-	-
279			102/11	-	-	-	-
280			103/11	-	-	-	-
281			104/11	-	-	-	-
282		Мерло	105/11	-	-	-	-
283	Свети Николе Дудин дол	Црн бургундец	106/11	-	-	-	-
284			107/11	-	-	-	-

285	Скопје М.в. Четири патишта Маркова Сушица	Шардоне	108/11	-	-	-	-
286			109/11	+	-	-	-
287			110/11	-	-	+	-
288			111/11	-	-	+	-
289			112/11	+	-	+	-
290		Црн бургундец	113/11	-	-	-	-
291			114/11	-	-	+	-
292			115/11	+	-	+	-
293			116/11	-	-	+	-
294			117/11	-	-	-	-
295			118/11	-	-	-	-
296			Скопје М.в. Четири патишта Маркова Сушица	Црн бургундец	118/11	-	-
297	119/11	+			-	-	-
298	120/11	+			-	+	-
299	121/11	-			-	-	-
300	122/11	-			-	+	-
301	123/11	-			-	+	-
302	124/11	+			-	+	-
303	125/11	-			-	+	-
304	126/11	-			-	-	-
305	127/11	-			-	-	-
306	Гевгелија м.в. Авлаки	Вранец	1/12	-	-	+	-
307			2/12	-	-	-	-
308			3/12	-	-	-	-
309			4/12	-	-	-	-
310		Франковка	5/12	+	-	-	-
311			6/12	-	-	-	-
312			7/12	-	-	-	-
313	Валандово с. Јосифово	Вранец	8/12	-	-	+	-
314			9/12	+	-	+	-
315			10/12	-	-	+	-
316			11/12	-	-	+	-
317			12/12	-	-	-	-
318			13/12	+	-	+	-
319			14/12	-	-	+	-
320		Кратошија	15/12	-	-	-	-

321	с. Сарчиево	Вранец	16/12	-	-	-	-
322			17/12	+	-	+	-
323			18/12	-	-	-	-
324			19/12	-	-	+	-
325			20/12	-	-	-	-
326			21/12	-	-	-	-
327			22/12	-	-	+	-
328	Кавадарци Крњево, м.в. Брловец	Вранец	23/12	-	-	-	-
329			24/12	-	-	-	-
330			25/12	-	-	-	-
331			26/12	-	-	+	-
332			27/12	+	-	-	-
333			28/12	-	-	-	-
334		Станушина	29/12	-	-	+	-
335	30/12		-	-	-	-	
336	Штип, м.в. Ежово	Вранец	31/12	-	-	-	-
337			32/12	-	-	+	-
338			33/12	+	-	-	-
339			34/12	-	-	+	-
340	Штип м.в. Каваклија	Црн бургундец	1/13	-	-	-	-
341			2/13	-	-	+	-
342			3/13	-	-	-	-
343			4/13	-	-	-	-
344			5/13	+	-	+	-
345	Кавадарци с. Крњево м.в. Брловец	Станушина	6/13	-	-	-	-
346			7/13	-	-	-	-
347			8/13	-	-	-	-
348			9/13	-	-	-	-
349			10/13	-	-	-	-
350			11/13	-	-	-	-
351			12/13	-	-	+	-
352			13/13	-	-	-	-
353			14/13	-	-	-	-
354			15/13	+	-	-	-
355			16/13	-	-	-	-
356			17/13	-	-	-	-
357	с. Црнилиште	Вранец	18/13	-	-	-	-
358			19/13	-	-	+	-
359			20/13	-	-	-	-
360			21/13	-	-	+	-

361	с. Долни Балван	Црн бургундец	22/13	-	-	-	-
362			23/13	-	-	-	-
363			24/13	-	-	-	-
364			25/13	-	-	-	-
365		Вранец	26/13	-	-	+	-
366			27/13	-	-	-	-
367	с. Батање	Вранец	28/13	-	-	+	-
368			29/13	-	-	-	-
369			30/13	+	-	-	-
370			31/13	-	-	-	-
371	Кавадарци с. Раец	Станушина	32/13	-	-	-	-
372			33/13	-	-	-	-
373			34/13	-	-	-	-
374			35/13	-	-	+	-
375			36/13	-	-	-	-
376			37/13	-	-	-	-
377		Вранец	38/13	-	-	+	-
378			40/13	-	-	+	-
379			41/13	-	-	-	-
380			Свети Николе /Куманово	Вранец	42/13	-	-
381	43/13	-			-	-	-
382	44/13	-			-	-	-

