

РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА
МИНИСТЕРСТВО
ЗА ОБРАЗОВАНИЕ И НАУКА

ЗАВРШЕН ИЗВЕШТАЈ
ЗА НАУЧНО-ИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ
Образец ОБ-3

НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:

Проучување на фитоплазмите како причинители на заболувања кај различни земјоделски култури

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ: Д-р Саша Митрев

ИНСТИТУЦИЈА: ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури -
Струмица,

ТРАЕЊЕ НА ПРОЕКТОТ: од: 01/01/04
до: 31/12/06

БРОЈ НА ДОГОВОР: 13 - 508 /1 од : 19. 04. 2005 година

ИЗВЕШТАЈНА ГОДИНА: 2004/06

ДАТУМ НА ПОДНЕСУВАЊЕ НА ИЗВЕШТАЈОТ: 30.03.2007 год.

Овој образец се пополнува во 3 копии и се доставува до министерството за образование и наука, како составен дел на елаборатот на завршниот извештај

1. УЧЕСНИЦИ ВО РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ**(Име и презиме, научно, наставно-научно звање, матична институција)*****а) Главен истражувач***

Име и презиме: Д-р Саша Митрев

Научно/наставно-научно звање: Научен советник

Установа: ЈНУ Институт за јужни земјоделски
култури - Струмица***б) Соработници истражувачи***

1. Илија Каров Научен советник, ЈНУ ИЈЗК - Струмица

2. Душан Спасов Научен соработник, ЈНУ ИЈЗК - Струмица

в) Соработници - млади истражувачи1. Емилија Накова помлад асистент - истражувач ЈНУ ИЈЗК -
Струмица2. Билјана Атанасова помлад асистент - истражувач ЈНУ ИЈЗК -
Струмица

2. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ - ПРОЕКТОТ:

Постојат голем број на облици на винова лоза - родови и видови од фамилијата *Vitaceae*, но современото лозарство прет сè се занимава со видови од родот *Vitis*, првенствено со племенитиот вид *Vitis vinifera* L. и некои видови со америчко потекло.

Сите видови од родот *Vitis* се повеќегодишни растенија од типот на лијани, а најмногу се распространети во суптропските и умерените климатски зони на Азија, Америка и Европа.

Освен во суптропските и умерените климатски појаси, виновата лоза е широко распространета и кај нас, зафаќајќи површина од околу 28.000 хектари (Национална Статистика на Македонија, 2004). Кај виновата лоза како проблем во одгледувањето се јавуваат голем број болести и штетници, кои секоја година нанесуваат сериозни загуби во приносот.

Фитоплазмите се прокариотски организми од класата Mollicutes (тривиано име микоплазми), кои се карактеризираат како доста ситни бактерии, со отсуство на клеточен ѕид, поседуваат само тенка мембрана, која ги прави способни да заземаат различни облици. Фитоплазмите се облигатни паразити, живеат во флоемските садови на растенијата и се причинители на повеќе од 600 болести кај стотици растителни видови. Во природни услови фитоплазмите се пренесуваат со инсекти вектори кои припаѓаат на фамилиите *Cicadelloidea* (leafhoppers) и *Fulgoroidea* (planthoppers).

Генерално, фитоплазмите не се строго специфични патогени и често се присутни кај различни растителни видови и фамилии.

Денес, поради зголемувањето на бројот и степенот на заболувања кај виновата лоза, потребна е постојана контрола на патогените кои ја напаѓаат виновата лоза. Според испитувањата на виновата лоза во светот, се смета дека виновата лоза е домаќин на повеќе од 32 фитопатогени габи, повеќе од 55 вируси и 3 бактерии.

Болестите, за кои денес со сигурност се знае дека се предизвикани од фитоплазми (потврда со употреба на најновите молекуларни методи), многу долго се сметале за вирусни (околу седумдесет години после откривањето на вирусите) (Saglio and Whitcomb, 1979).

Фитоплазмите предизвикуваат многу деструктивни заболувања кај виновата лоза и претставуваат проблем во современото лозарство, посебно во големите значајни виноградарски земји (Франција, Италија, Шпанија) (Boudon-Padieu, 2000).

Појавата на жолтило кај виновата лоза, може да биде предизвикана од фитоплазми од 7 различни рибозомални групи: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrX и 16SrXII (Gibb et al. 1999; Varga et al., 2000; Boudon-Padieu, 2003).

Појавата на жолтило кај листовите на виновата лоза е позната во многу региони на Европа. Фитоплазми кои се значајни за Европа и кои се со сигурност детерминирани се: *Flavescence dorée* (FD-16SrV subgroup) и *Bois noir* (BN-16SrXII-A subgroup).

Појавата на *Flavescence dorée* (FD) за прв пат била забележана во втората половина на 1950 година во Франција (Caudwell, 1957). Според симптоматологијата и ширењето, оваа фитоплазма била сместена во групата на карансионски болести. Патогенот бргу се шири со помош на инсекти-цикади (*Scaphoideus titanus*) (Schvester et al., 1961), кои целиот свој животен циклус го поминуваат кај *Vitis* spp.

После распространувањето во Јужна Франција и Северна Италија, *Scaphoideus titanus* интензивно се шири во Јужна Шпанија и Португалија, централните региони на Франција, во некои области на Централна и Јужна Италија, Швајцарија, Австрија, Унгарија, Хрватска и Србија. Со раширувањето на *Scaphoideus titanus* се шири и FD. Оваа болест во светот е со сигурност потврдена и постојано се превземаат мерки за заштита и спречување на нејзиното раширување. Од 2003 год., оваа болест со сигурност е потврдена и на територијата на нашиот најблизок сосед - Србија (Magud and Toševski, 2003). Според тоа, каде векторот е присутен таму наскоро и болеста пристигнува. Затоа, особено треба да се даде посебно внимание на појавата на *Scaphoideus titanus* на територијата на Република Македонија.

Спротивно на оваа фитоплазма, *Bois noir* (BN) е широко распространет во Европа и во Медитеранските области. За разлика од FD, BN обично се јавува во помал број во лозовите насади и покрај тоа што во последните неколку години во Европа е забележано зголемено присуство на BN. Вектор на оваа фитоплазма е *Hyalesthes obsoletus*. Оваа фитоплазма освен кај виновата лоза е проучена и кај други растенија: *Calystegia sepium*, *Cornus sanguinea*, *Sambucus nigra*

(Langer and Maixner, 2004; Filippin et al., 2005), како и кај *Reptalus panzeri* и *R. quinquecostatus* (Botti et al., 2005; Trivellone et al., 2005).

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

Во Македонија првите симптоми на жолтеене кај виновата лоза биле забележани во 1975 година во Неготинско, Кумановско, Струшко, Дебарска Жупа и во околината на Богданци. Погolem број на симптоматични растенија од винова лоза биле забележани кај сортата Шардоне (Пејчиновски, необјавени податоци).

Одтогаш е започнато со следење на симптоматологијата на патогените предизвикувачи на болести кај виновата лоза и во 2001 год е објавен преглед на патогените промени кај виновата лоза во регионот (Митрев и сор. 2001).

Имајќи ја во предвид симптоматологијата и биологијата на патогените, мошне е тешка идентификацијата доколку се проучуваат само симптомите кај виновата лоза.

Затоа во 2003 год за прв пат е извршена молекуларна идентификација кај симптоматични сорти Вранец и Шардоне, во околината на Велес и Скопје, во заедничка соработка со колеги од Хрватските. Притоа потврдено е присуството на *Bois noir* (BN) (*stolbur fitoplazma*), со PCR-RFLP анализи на рибозомалните и нерибозомалните гени кај симптоматичните сорти на винова лоза (Šeruga et al., 2003).

Ова испитување е од голема важност за Р. Македонија, затоа што ова е прв чекор во подетално навлегување во областа на заштитата на виновата лоза, откривање на причинителите на болести кај виновата лоза и спречување на раширување на болестите преку посадочен материјал и контрола на младите лозови насади.

3. ОЧЕКУВАНИ РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ:

Од предвиденото истражување се очекува да се потврдат и идентификуваат видовите на фитоплазми кои се присутни кај виновата лоза на територијата на Република Македонија, преку употреба на најсовремена техника на идентификација - полимеразна веризна реакција (PCR - Polymerase chain reaction)

Со точната идентификација на поважните причинители на болестите ќе се знае и примената на соодветни мерки за нивно сузбивање.

Со ова испитување ќе се потврди присуството на нови досега непроучени патовари, раси или биотипови од групата на фитоплазмите, кои досега не се регистрирани а според симптоматологијата се присутни во нашето подрачје.

Испитувањето ќе допринесе за запознавање на пошироката научна и стручна јавност со карактеристиките на фитопатогените бактерии кај виновата лоза во Македонија, едни од неиспитаните патогени кај лозата кои со поволните климатски услови на глобалното затоплување имаат се подобри можности за раширување на лозата но и на останатите култури.

4. ОСВРТ НА ОПРАВДАНОСТА НА ИСТРАЖУВАЊЕТО ВО ПОГЛЕД НА ПОСТИГНУВАЊЕТО НА ДЕФИНИРАНИТЕ ЦЕЛИ И ОЧЕКУВАНИТЕ РЕЗУЛТАТИ СОДРЖАНИ ВО ПРЕДЛОГ-ПРОЕКТОТ:

Во текот на предвиденото истражување се остварени сите очекувани резултати. Потврдени се и идентификувани фитоплазмите од групата столбур (BN фитоплазми), како причинители на болести во поголемите реони под винова лоза во Македонија.

Како основен материјал во истражувањето се користени сите сорти на винова лоза со цел да се одреди степенот на осетливост на различни сорти према различни патогени. Идентификација и детерминација на присутните фитоплазми на територијата на Република Македонија е направена со примена на современи молекуларни методи (DNA екстракција, PCR анализи и RFLP анализи).

Фитоплазмите имаат два типа на нуклеински киселини: RNA или DNA во зависност од видот на вирусот што се разгледува. Тие воопшто не се одгледуваат на неклеточна средина. Големината на нивниот геном варира во зависност од видот на фитоплазмите од 600-1200 kbp. Таа е најмала регистрирана кај органелите кои можат да се реплицираат на автономен начин. Голем напредок е постигнат благодарение на електрофоретската анализа, употребувана за фитоплазмите во САД (Neimarth and Kirkpatrick, 1993). Таа овозможува посматрање на целиот геном на агарозен гел електрофореза.

Познавањето на природата на бактериите причинители на болестите кај виновата лоза ќе допринесе за поефикасно нивно сузбивање, зголемување на приносот и допринос во заштитата на животната средина од неадекватно и непотребно третирање со хемиски средства. Ова ја оправдува причината за преземањето на ова истражување.

Во 2003 год се извршени првите подетални молекуларни анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите на територијата на Република Македонија (Шеруга и сор., 2003).

Тогаш беа земени само две територии како цели на испитување, но во текот на ова истражување се земени повеќе ареали под виновата лоза со цел да се одреди присуството на BN фитоплазмите кај виновата лоза и евентуалната појава на друга група на фитоплазми во Македонија.

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

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

5. ДЕТАЛЕН ИЗВЕШТАЈ ЗА НАУЧНО-ИСТРАЖУВАЧКИОТ ПРОЕКТ:

Во текот на летниот период (2004 год) од производни реони во околината на Велес и Скопје, се собрани поголем број на симптоматични и асимптоматични растенија. Симптомите кои се појавуваат кај инфицираните растенија се манифестираат како: пожолтување или поцрвенување на листовите зависно од сортата на виновата лоза, скратување на растот на

интернодиумите, малечки листови, стерилни цветови, некроза на флоемското ткиво, генерано престанување на растот и изумирање на растението.

Фитоплазмите се паразитни бактериски форми кои неможат да се култивираат на хранлива подлога и единствен начин на детерминација е со помош на молекуларни техники и методи на идентификација.

Колекционирање на материјал за анализа беше извршено од симптоматични и асимптоматични растенија (вкупен број 40) од девет локалитети од шест региони во Македонија: Неготино (Ило Виларов), Кавадарци (Љубаш), Струмица (Хамзали), Радовиш (Добридол), Штип (Каваклија, Ежово, Три Чешми, Врсаково) и Велес (Сопот) (Таб. 1).

Колекционираниите растенија на терен беа фотодокументирани и во лабораториски услови од 40 вкупно собрани растенија 11 веднаш беа отфрлени затоа што симптомите асоцираа на leafroll вирусот.

Останатите 29 примероци (и покрај тоа што некој покажуваа нетипични симптоми) беа анализирани со молекуларни методи.

Како позитивна контрола при PCR анализите се користеше AY1 (потврдена фитоплазма од групата 16SrXII-A).

DNA екстракција и PCR амплификација

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

После екстракциониот и пурификациониот чекор, DNA се раствора во 100 μ l TE пуфер и се припрема разредување 1:10 кое се користи за PCR анализата. Тубичките се чуваат на T од -20°C до следниот чекор на работа.

За 16SrDNA амплификацијата направен е директен PCR, проследен со вгнезден - nested (втор, следен) PCR (се применува заради зголемување на специфичноста и сензитивноста на амплификацијата), со употреба на универзална и специфична група на прајмери.

Универзална група на прајмери кои беа користени се: R16 P1/P7 (Deng и Hiruki, 1991; Schneider и сор., 1995) (директен PCR), R16 M1/B6 (nested PCR), специфична група на прајмери I F1R1, како и специфични туф прајмери ftuf1-rtuf1 (direkten PCR) (Schneider et al 1997), ftufAY-rtufAY (nested PCR) (Langer and Maixner, 2004), специфични за идентификација на BN фитоплазмата.

Директниот PCR беше направен со R16 P1/P7 парот на прајмери, и од него со разредување 1:50 во стерилна дестилирана вода беше направен вториот nested PCR со R16 M1/B6 парот на прајмери.

После добиените резултати од nested PCR-от, ре-амплифицираниот дел од 16SrDNA се подложува на уште еден nested PCR со специфична група на прајмери I F1R1. Секоја реакција се изведува во тотален волумен од 20 μ l со содржина од дестилирана вода, 10X PCR пуфер, MgCl₂, dNTP сет, парови на прајмери, Tag полимераза и DNA од примерокот. Мора да се употребуваат негативна (DH₂O) и позитивна (AY1) контрола. Сите PCR анализи се одвиваат во 35 циклуси, вклучувајќи три чекора: денатурација на 94°C (раскинување на водородните врски меѓу комплементарните вериги), анилирање (хибридизација на олигонуклеотидните прајмери со комплементарните секвенци на двете раздвоени матични DNA вериги) на 50°C и полимеризација (екстензија, синтеза) на 3' крајот на секој од анилираните олигонуклеотидни прајмери со термостабилна DNA Taq полимераза при 72°C (Schaff et al., 1992).

PCR-реакцијата овозможува детекција на извонредно мало количество на DNA. Ова е брз амплификациски метод кој се изведува во *in vitro* услови и се врши во специјални апарати означени како PCR-машини (термосајклери).

После PCR анализата, ампликоните се подложни на електрофореза во 1% агарозен гел, на 100V околу 30 мин., отстојуваат во етидиум-бромид и се отчитуваат на UV-трансилуминатор.

По агарозната електрофореза на амплифицираните PCR продукти и визуелизација на геловите, добиваме исклучително специфични DNA ленти (band-ови).

RFLP (restriction fragment length polymorphism) - рестрикциска анализа

После завршениот nested PCR, позитивните примероци се дигестираат со рестрикциски ендонуклеази (класа на ензими кои ги хидролизираат фосфодиестерските врски во двоверижната DNA), Tag I, Tru 9I (MBI Fermentas) и Hpa II за дигестија на амплифицираните фрагменти на *tuf* генот (850 bp), по посебен протокол за секој ензим. Дигестијата се одвива 2 часа на 37°C. Бандовите се раздвојуваат со електрофореза во 13% полиакриламиден гел, со

отстојување на гелот во етидиум-бромид и документирање на резултатите на UV-трансилуминатор.

Резултати

Девет локалитети од шест поголеми региони под винова лоза на територијата на Република Македонија беа предмет на испитување за појавата и дистрибуцијата на Bois Noir фитоплазмата. Резултатите од опишаните симптоми на примероците собрани од терен беа потврдени со резултатите од лабораториските анализи (Табела 1).

PCR амплификација

Првиот PCR (директен) со универзалниот прајмер пар R16 P1/P7, не даде некој јасни резултати и затоа во сите испитувања беше направен и вгнездениот (nested) PCR со R16 M1/B6 прајмер пар и потоа со специфична група на прајмери IF1R1 за I група на фитоплазми.

Од вкупно 29 анализирани примероци, 13 позитивни примероци беа потврдени во nested PCR-от со R16 M1/B6 прајмер пар, каде DNA фрагменти од 1 kbp беа амплифицирани.

Со цел да се потврди BN фитоплазмата кај сите позитивни примероци исто така го анализиравме и tuf генот (850 bp), со употреба на посебна група на прајмери за овој ген, ftuf1-rtuf1 (директен PCR) (Schneider et al 1997), ftufAY-rtufAY (nested PCR) (Langer and Maixner, 2004).

Табела 1 Резултати од Nested PCR за детекција на фитоплазмите од 16SrXII-A подгрупата кај примероци од различни локалитети под винова лоза во Македонија

Регион	Локалитет	Сорта	Симптоми	<u>Детекција со прајмерите</u> M1/B6 IF1R1 ftuf/rtuf AY		
Неготино	Ило Виларов	Италиан ризлинг	+?	-	-	-
		Смедеревка	+	+	+	++
		Вранец	+++	++	+	++
		Белан	+	+++	+	+
		Ркцатели	-	-	-	-
		Жилавка	+	+++	+++	+
Кавадарци	Љубаш	Мускат италија	-	-	-	-
		Афус али	+?	-	-	-
		Смедеревка	-?	-	-	-
		Шардоне	+	++	+	+
Струмица	Хамзали	Белан	+	+	+	+
		Вранец	+?	-	-	-
		Ркцатели	+?	-	-	-
		Смедеревка	+	-	-	-
Радовиш	Добридол	Пловдина	-	-	-	-
		Смедеревка	+	+++	+++	+
		Рајнски ризлинг	-	-	-	-
		Вранец	++	+++	+++	+
Штип	Каваклија	Рајнски ризлинг	?	-	-	-
		Бургундец	++	-	-	-
		Афус али	-	-	-	-
	Ежово	Афус али	-	-	-	-
		Вранец	++	+++	+++	+
	Три Чешми	Смедеревка	+	+++	+++	+
Рајнски ризлинг		-	-	-	-	
Бургундец		++	++	+	+	
	Врсаково	Вранец	++	++	+	+
Велес	Сопот	Шардоне	+++	++	+	+
		Афус али	-?	-	-	-

Литература

Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E., (2001): *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder phytoplasma. *Vitis* 40: 79-86.

Boudon-Padieu E. (2003): The situation of Grapevine Yellows and Current Research Directions: Distribution, Diversity, Vectors, Diffusion and Control. Extended of the 14th Meeting of ICVG, pp 47-53. Locorotondo (Bari), Italy September 12-17, 2003.

Davis R.E., Dally E.L., Tanne E., Rumbos I.C., (1997): Phytoplasma associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the stolbur phytoplasma subgroup 16SrXII-A. *J. Plant Pathol.* 79: 181-187.

Deng C and Hiruki C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14, 53-61.

Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstič, B., Dukič, N. and Bertaccini, A., (2004): Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia. *J. Phytopathology* 152, 575-579.

EPPO Reporting Service, (2006): First report of stolbur phytoplasma causing *bois noir* on grapevine in Bulgaria, 8: 2006/167.

Langer M., Maixner M., (2004): Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43: 191-199.

Gibb KS, Constable FE, Moran JR, Padovan AC (1999): Phytoplasmas in Australian grapevines-detection, differentiation and associated diseases. *Vitis* 38: 107-114.

Magub B., Toševski I. (2003): *Scaphoideus titanus* (Homoptera, Cicadellidae) Nova tetoina na teritoriji Srbije. VI savetovanje o zaštiti bilja, p. 96. Zbornik rezimea, Zlatibor, November 24-28, 2003.

Maixner, M., Ahrens, U., Seemüller, E., (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. Eur. J. Plant Pathol. 101, 241-250.

Marcone C., Ragozzino A. and Seemüller, E., (1997): Detection and identification of phytoplasmas in yellow-diseases weeds in Italy. Plant Pathology 46, 530-537.

McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowsky, L.N., Cousin, M.T., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., Seemüller, E., (1989): Plant diseases associated with mycoplasma like organisms. In: Whitcomb, R. F. and J. G. Tully (eds), The Mycoplasmas 5, pp. 545-640. Academic Press, New York, USA.

Митрев С., Пејчиновски Ф., Козина Б. и Мојсовски Т., (2001): Појава на некои нови патогени промени кај виновата лоза во регионот. Годишен зборник 2001, Охрид (107-120).

Neimark H., and Kirkpatrick B.C., (1993): Isolation and characterisation of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. Mol. Microbiol. 7: 21-28.

Schaff, D.A., Lee I-M., Davis R.E. (1992): Sensitive detection and identification of mycoplasma like organisms by polimerase chain reaction, Biochem. Biophys. Res. Comm. 186, 1503-1509.

Schneider, B., Gibb K.S., Seemüller E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. Microbiology 143, 3381-3389.

Vagra K., Kölber M, Martini M et al. (2000): Phytoplasma Identification in Hungarian Grapevines by Two Nested – PCR Systems. Extended Abstracts of the 13th Meeting of ICVG, pp 113-115. Adelaide, Australia, March 12-17, 2000.

Šeruga, M., Curkovič, P., Škoric, D., Kozina, B., Mirosevic, N., Šarič, A., Bertaccini, A., and Krajačić, M. (2000): Geographical Distribution of Bois Noir Phytoplasmas Infecting Grapevines in Croatia. J. Phytopathology 148, 239-242.

Šeruga, M., Škorič, D., Kozina, B. Mitrev, S., Krajačić, M. and Curkovič, P. (2003): Molecular identification of a phytoplasma infecting grapevine in the Republic of Macedonia. VITIS Band/Volume 42 181-185.

6. РЕЗИМЕ НА ПОСТИГНАТИТЕ РЕЗУЛТАТИ ОД ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА:

6.1. На македонски јазик

Фитоплазмите се прокариотски патогени кои се среќаваат кај растенијата и инсектите. Фитоплазмозите, болести кои тие ги причинуваат кај повеќе од 600 растителни видови, се сериозен светски проблем во земјоделието. Значаен проблем фитоплазмите претставуваат за повеќегодишните насади (овоштарници, винова лоза).

Истражувањето за фитоплазмите е значително отежнато, затоа што тие не можат да се култивираат на хранлива подлога и според оваа карактеристика се слични со вирусните патогени.

Според тоа, во идентификацијата на фитоплазмите се применуваат истражувањата на молекуларно ниво. На овој начин со користење на PCR методата, се умножува од растителните DNA екстракти фитоплазматскиот ген за 16S rDNA.

Материјалот за анализа беше колекциониран од поголемите области под винова лоза (Неготино, Кавадарци, Струмица, Велес, Радовиш и Штип) со цел да се определи географската дистрибуција на фитоплазмите низ земјата.

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

Детекцијата е специфична со употреба на специфични олигонуклеотидни прајмери кои треба да го умножат делот од фитоплазматскиот ген, доколку е присутен. Полиморфизмот на фитоплазматскиот ген се одредува со RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) и претставува основа за диференцијација, односно идентификација на фитоплазмите. Врз основа на RFLP - профилите, фитоплазмите се делат на 15 рибозомални групи и на 40 подгрупи.

Испитувањата покажаа дека како најосетливи сорти на винова лоза се Смедеревка, Вранец и Шардоне.

6.2. На англиски јазик

Phytoplasmas are prokaryote pathogens parasitizing in plants and insects. Phytoplasmoses, the phytoplasma diseases affecting more than 600 plants, are serious agricultural problem worldwide. Particularly serious problems phytoplasmas cause in perennial plants (fruit trees, grapevine).

Phytoplasma research is quite difficult, because they cannot be cultivated in axenic media and in this respect they are very similar to viral pathogens. In many plant species they are unevenly distributed and their concentration is very low. Because of these characteristics, the methods for phytoplasma research, in general, are in the realm of molecular biology. Routinely used method is PCR amplification of phytoplasmal conserved gene for 16S rRNA from plant or insect DNA extracts. The use of universal or specific oligonucleotid primer pairs to amplify phytoplasma genes or gene fragments, if they are present in the samples, is very reliable and specific. For detailed differentiation of phytoplasmas within ribosomal groups or subgroups, usually the RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) analyses are applied.

The most important and bigger vineyards in the areas of Negotino, Kavadarci, Strumica, Radovis, Veles and Stip, were chosen for these survey. Only phytoplasmas belong to the Bois Noir (subgroup 16SrXII-A or stolbur) were found in the studied vineyards in Macedonia. The aim of this study was to characterise stolbur phytoplasma isolates associated with grapevine yellows in Macedonian viticulture by molecular analyzes and to check there distribution in the most bigger vineyards.

Also from the results we can see that the most sensitive variety was Smederevka, Vranec and Chardonnay.

6.3. КЛУЧНИ ЗБОРОВИ

6.3.1. На македонски јазик:

Клучни зборови: виновата лоза, фитоплазмози, PCR (*polymerase chain reaction*), 16S rDNA, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) Bois Noir

6.3.2. На англиски јазик:

Key words: viticulture, phytoplasmoses, PCR, RFLP analyzes, 16S rDNA region, grapevine, RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), Bois Noir

7. ЗНАЧАЈНИ НАУЧНИ СОЗНАНИЈА ЗДОБИЕНИ СО РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ:

Научните сознанија добиени од овој проект се од големо значење за заштитата на виновата лоза не само во нашата земја, туку и пошироко. Вакви проучувања се опишани во литературата во голем број на европски земји како и кај нашите соседи, додека во нашето проучување паралелно и детално е потврдено само присуството на столбур фитоплазмата. Статистиките и заклучоците наведуваат дека BN фитоплазмата има широк ареал на распространување особено имајќи го во предвид фактот дека во сите земји околу Македонија (Бугарија, Србија, Албанија и Грција) BN е одамна евидентирана (Давис и сор. 1997; Дудук и сор. 2004; EPPO Reporting Service, 2006).

8. КОРИСНИЦИ НА ИСТРАЖУВАЧКИТЕ РЕЗУЛТАТИ, НАЧИН НА ПРЕНЕСУВАЊЕ И ПРИМЕНА НА ИСТИТЕ:

Корисниците на истражувачките резултати ќе бидат директно производителите на винова лоза како во поголемите производни центри така и индивидуалните производители кои имаат проблеми со лозовите насади а кои поради неинформираноста за постоењето на фитоплазмите употребуваат несоодветни сретства за третирање на лозата.

Резултатите од ова истражување ќе бидат пренесувани до производителите преку објавување на извадоци од истражувањето во различни часописи, учество на советувања за одгледување на градинарските култури и во контакти со лица кои се заинтересирани за оваа проблематика или нивните парцели се директно загрозени од појавата на фитоплазмите кај виновата лоза.

9. ТЕХНОЛОШКИ ИНОВАЦИИ И ПАТЕНТИ:

Лабораториските молекуларни испитувања на фитоплазматските заболувања, претставуваат најсовремени анализи за потврдување на присуството на фитоплазмите како во Македонија, така и во светот. Фитоплазмите на територијата на нашата земја до 2003 год., лабораториски не се испитувани и не им е посветувано доволно внимание за нивното присуство.

На основа на лабораториската работа заснована на примената на најсовремената техника - полимеразна верижна реакција, извршена е точна идентификација и детерминација на присутната група на фитоплазми, ова има големо значење за правилно поставување на дијагноза и примена на хемиските средства за заштита на растенијата.

10. МОЖНИ ЕКОНОМСКИ И КОМЕРЦИЈАЛНИ ЕФЕКТИ:

Економските и комерцијалните ефекти од ова истражување можат да се согледат како резултат на правилната дијагностика на бактериските заболувања кај виновата лоза и примена на адекватни хемиски средства за сузбивање.

Примената на адекватни и ефикасни средства за заштита ќе допринесе за намалувањето на бројот на третирањата и зголемувањето на нивниот ефект а воедно и со навременото откривање на болестите ќе се спречи раширувањето на фитоплазмите.

11. МЕЃУНАРОДНА СОРАБОТКА ОСТВАРЕНА ПРИ РЕАЛИЗАЦИЈАТА НА ПРОЕКТОТ:

Остварена е меѓународна соработка во текот на набавувањето на потребната литература претежно од земји каде оваа проблематика е исто така актуелна во нивното производство.

Набавена е литература и остварени се лични контакти со научници од Италија (Dr. Elisa Angelini, Istituto Sperimentale Per la Viticoltura, Conegliano, Italy), Хрватска (Др. Дијана Шкорич) и др.

**12. ОБЈАВЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД
ИСТРАЖУВАЊЕТО:**

**Трудови презентирани на научни собири во:
земјата:**

1. Митрев, С., Каров, И. и Ковачевич Билјана (2006): Столбур кај виновата лоза во Република Македонија. (во печат).

странство:

1. Митрев, С. и Накова Емилија: Географска дистрибуција на столбур фитоплазмата на територијата на Република Македонија (во печат).

**13. МАГИСТЕРСКИ, ДОКТОРСКИ СТУДИИ, СПЕЦИЈАЛИЗАЦИИ,
УСОВРШУВАЊА, СТУДИСКИ ПРЕСТОИ И КОРИСТЕЊЕ НА
ЕКСПЕРТИ ВО ТЕКОТ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО**

Магистерска тема под работен наслов: Детекција и идентификација на фитоплазмите - нови патогени причинители на болести кај виновата лоза во Република Македонија. (2006-2008)

Темата ја изработува: Накова Емилија помлад асистент при ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури, Струмица

I година - сезона 2006, PCR анализите на симптоматичниот материјал се направени во лабораторијата за идентификација на болести кај виновата лоза во Италија, кај Dr Elisa Angelini и Dr Michele Borgo (*Instituto Sperimentale Per la Viticoltura, Conegliano, Italy*).

**14. ИСТРАЖУВАЧКА ОПРЕМА НАБАВЕНА ВО ТЕКОТ
НА ИСТРАЖУВАЊЕТО:**

(Вид, марка, година на производство, намена, цена на чинење)

Опрема	Цена (во денари со ДДВ)
Типсови, наставци, (потрошна опрема)	87.141.00
Реагенси	29.550.00
Реагенси	31.803.30
Реагенси	28.835.00
HI 1131 pH електрода	10.385.00
Контејнер и течен азот	64.310.00
Прајмери за фитоплазми	26.987.97
Лаб опрема	18.028.77
ВКУПНО:	297.039.00

**15. РЕКАПИТУЛАЦИЈА НА ПОТРОШЕНИТЕ СРЕДСТВА ЗА
РЕАЛИЗАЦИЈА НА ПРОЕКТОТ ВО ИЗВЕШТАЈНАТА ГОДИНА:**

(по намени и извори на средства)

а) Надомест за истражувачи - пензионери:	0,00
б) Непосредни материјални трошоци:	
Потрошена енергија, материјали и сировини:	150.000,00
Патувања во земјата:	53.000,00
Патувања во странство:	115.000,00
Дневници, теренски додатоци и други надоместоци:	152.000,00
Ангажирање на експерти:	0,00
Производни и непроизводни активности: (информатички, ПТТ и сл.)	95.000,00
Одражување на научно-истражувачка опрема:	54.000,00
Набавка на научно-истражувачка литература:	91.000,00
Други трошоци:	40.000,00

В к у п н о:	750.000,00

а) Извори на средства:

Сопствено учество:	297.039,00
Учество на други институции:	0,00
Учество на меѓународни институции	0,00
Учество на Министерството за образование и наука:	750.000,00

1.047.039.00

16. ПОВАЖНИ ЗАКЛУЧУВАЊА И НАСОКИ ЗА ПОНАТАМОШНИОТ ТЕК НА ИСТРАЖУВАЊЕТО КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЧКИТЕ РЕЗУЛТАТИ

Од досегашните испитувања може да се заклучи дека кај испитуваните сорти на винова лоза има присуство само на *Bois Noir* фитоплазма од столбур групата. Испитувањата покажаа дека се работи за фитопатогени бактерии кои имаат се поширок ареал на распространување и кои предизвикуваат намалување на приносот кај виновата лоза и постепено угинување на растението.

Со понатамошните испитувања ќе се одреди начинот на нивното сузбивање и примената на најефикасни хемиски средства во нашите производни услови.

Испитувањата ќе продолжат во насока на следењето на симптомите и навременото откривање на појавата на карантинската болест предизвикана од *Flavescence dorée* (FD), посебно интересен патоген чиешто значење од ден во ден станува се поголемо, како резултат на штетите кои ги предизвикува кај виновата лоза и како резултатот на брзото ширење со помош на *Scaphoideus titanus*.

17. ВЕРИФИКАЦИЈА НА ЗАВРШНИОТ ИЗВЕШТАЈ:

- Одлука на научниот, наставно научниот, стручниот орган за прифаќање на годишниот извештај (во прилог да се достави Одлуката)

бр. 0201-266/4

од 21/03/2007 година

Потпис на главниот истражувач:

Потпис на одговорното лице на институцијата:

датум и печат:
