

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ - СКОПЈЕ

ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ

М-Р МИХАЈЛО РИСТЕСКИ

**„ДИСТРИБУЦИЈА И ДИВЕРЗИТЕТ НА ПАТОГЕНИ
ВИДОВИ *RHIZOCTHORA* ВО РЕПУБЛИКА
МАКЕДОНИЈА“**

- Докторска дисертација -

Скопје, 2018 година

Ментор: Проф. д-р Кирил Сотировски
редовен професор на Шумарски факултет - Скопје

Членови на комисија за оценка и одбрана:

Проф. д-р Кирил Сотировски - редовен професор на Шумарски факултет - Скопје

Проф. д-р Ирена Папазова-Анакиева - редовен професор на Шумарски факултет - Скопје

Проф. д-р Никола Николов - редовен професор на Шумарски факултет - Скопје

Проф. д-р Раде Русевски - редовен професор на Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје

Проф. д-р Билјана Кузмановска - вонреден професор на Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје

Датум на одбрана:

Датум на промоција:

Наука со која се стекнува докторандот: Шумарска

ПРЕДГОВОР

Со некои од видовите во родот *Phytophthora* се запознав уште за време на додипломските студии, и уште тогаш стана јасно дека тој „свет“ е во голема мера сè уште неистражен, а е многу битен не само земјоделството, туку и за шумарството. Сепак, најинтригантен момент, а во исто време и мотивирачки беше мојот неуспех при првиот обид да изолирам и култивирам еден ваков организам од колектирани примероци од симптоматски стебла костен, и тоа уште во времето на изработка на мојата магистерска теза чие поле на интерес беше сосема друг патоген. Сугестијата на мојот ментор, проф. д-р Кирил Сотировски, да се занимавам со истражување на видовите кои припаѓаат на овој род ја прифатив со многу ентузијазам, но и со колебање заради специфичноста, односно тежината при нивната изолација и култивација, но и заради тоа што има многу малку релевантни податоци за овие типови патогени на територијата на Република Македонија, а тие што постојат се од 80-тите години на претходниот век и се практично недостапни. Таинственоста на ваквите организми кои имаат животен стил сличен на габи а сепак се различни од нив и се класифицирани во сосема нова таксономска категорија, како габолики организми, беше дополнителен аспект кој го зголеми мојот интерес и придонесе да безрезервно се посветам на ова истражување.

Најраните податоци за предизвикани епидемии поврзани со родот *Phytophthora* датираат од периодот 1843-1845 кои предизвикале загуби на бербата од компир на територијата на источниот брег на Северна Америка (Bourke, 1991), но главниот акцент на родот *Phytophthora* бил ставен во периодот на 1845-1846 година кога пламеницата на компирот предизвикала масовна глад во Ирска што довело до губење на повеќе од една четвртина од 8 - милионското население од глад и иселување. И покрај контраверзните хипотези за предизвикувачот на губење на бербата од компир, *Phytophthora infestans* како предизвикувач на пламеница по компирот за прв пат формално бил опишан од страна на Anton de Bary во 1876 (Lamour, 2013).

Девастирачкото сушење и изумирање на шумите од *Eucalyptus marginata* (глобално познато како „jarrah-dieback“) во Западна Австралија, кое било предизвикано од инвазивниот почвен патоген *P. cinnamomi*, покажало какви

драматични импликации може да предизвика заболување од видот *Phytophthora* врз целиот екосистем (Hardy et al., 2001).

Во Европа, видовите *P. citricola*, *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. quercina*, *P. alni* и *P. pseudosyringae* предизвикуваат гниење на коренот и базалниот дел, рак рани со сокоточение на стеблата и гранките на многу дрвни видови како што се европската бука (*Fagus sylvatica*), јаворите (*Acer platanoides* и *A. pseudoplatanus*), див костен (*Aesculus hippocastanum*), питом костен (*Castanea sativa*), липи (*Tilia* spp.), бела ела (*Abies alba*), смрча (*Picea abies*), бел бор (*Pinus silvestris*), дабови (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. cerris*, *Q. ilex*, *Q. fraineto*, *Q. pubescens*) и евли (*Alnus glutinosa*, *A. incana*, *A. cordata*, *A. viridis*). Откако овие *Phytophthora* видови биле интродуцирани во Европа, домашните дрвни видови кои не се адаптирани често се подложни на заболувања предизвикани од овие организми. Помеѓу 1993-та и 2004-та година на повеќе од 150 месторастења на даб во 12 европски земји, се покажало дека на широк дијапазон на климатски услови, *P. quercina* како и девет други почвени патогени од родот *Phytophthora* се цврсто поврзани со етиологијата на сушење на европскиот даб, преку предизвикување прогресивни деструкции на кореновиот систем (Jung, unpublished).

Спротивно на патогените видови од родот *Phytophthora*, воздушните видови од овој род се разнесуваат со помош на ветер, дожд, распрскување на дождовни капки, како и со распрскување на спорангии. Овие патогени со воздушно потекло, предизвикуваат воздушни рак рани на кора и гранчиња и се причинители на некрози на листови. Со исклучок на Јужна Англија, каде инвазивните патогени *P. ramorum* и *P. kernoviae* предизвикуваат штети на бројни дрвни видови, видовите *Phytophthora* со воздушно потекло сеуште се со минорно значење за шумарството во Европа. Сепак во Калифорнија и Орегон патогенот со воздушно потекло *P. ramorum* е одговорен за девастирање и изумирање на дабови дрва, попознато како „Sudden Oak Death (SOD)“ (Grünwald et al., 2012).

Етаблирањето и развојот на *Phytophthora* видовите зависи од неколку фактори. Пред се холистичкиот пристап на истражување базиран на популациони истражувања ја зголемил свеста за суптилноста и сложеноста на овие видови, вклучувајќи го постоењето на уникатни адаптирани видови низ

еволуцијата а складни на постоечката таксономска поделба како и отворените можности за идентификација и опис на нови таксони. Брзиот развој и примената на молекуларни техники овозможува брза и прецизна детекција на нови видови. Зголемувањето и засилувањето на интернационалната трговија со садници го зголемува ефектот на дистрибуција на патогени надвор од нивните природни екосистеми што било заклучено од зголемените теренски инспекции и истражувања за присуство на патогени од овој род (Brasier, 2008).

Долготрајни обилни летни врнежи најчесто водат до влажна почва која фаворизира услови за мултицикличен развој и разнесување на *Phytophthora* видови при што подложните видови растенија домаќини биваат уништени. Развиените механизми за резистентност на растенијата се редуцираат заради перманентна сатурација на почвата, па подложната кора или базален дел на стеблото стануваат инвадирани што резултира со рак рани на кората. Следната пролет и лето, физиолошки ослабените стебла доколку се соочат со суша, губењето на ситните корени од претходната сезона не може да бидат надоместени. Како резултат на ова афектираните стебла дополнително се предиспонирани на секундарни паразити од видовите *Armillaria* и *Nectria*, како и бројни деструктори на кора, за да на крај најчест резултат е смрт на растението (Erwin and Ribeiro, 1996). Бројот на опишани *Phytophthora* видови до 2000 година се зголемил за повеќе од 50 видови (прецизен број не бил познат) од причина што некои видови како на пример *P. alni* има повеќе подвидови, кои може да бидат вброени како засебен вид или како група од видови (таксон). Сепак до 2007 година забележаниот пораст на формално опишани видови бил значително зголемен во споредба со оној од 1996 година, кога била поставена хипотезата дека во следните 10 години доколку се продолжи со исто темпо на истражување бројот на опишани видови ќе надмине 200 (Brasier, 2009). Kroon et al. (2012) дале осврт на сите нови видови кои после 1996 година биле откриени со нивно сведување во 10 групи кои може да се издвојат во родот *Phytophthora*, при што вкупниот број на опишани видови го надминува бројот 200.

Глобалните климатски промени се предвидува дека ќе ја засилат дистрибуцијата и активноста на повеќе патогени организми. Климатските промени може да го афектираат етаблирањето на патогените, прогресот во развојот на болести како и времетраењето на епидемиите, секоја во

потенцијално различен правец. Во некои случаи климатските промени може да фаворизираат етаблирање и развој на болест и потенцијално да го забрзаат поместувањето на одреден дрвен или друг растителен вид во делови надвор од моменталниот географски опсег (Boland et al., 2004; Venette and Cohen, 2006). Од друга страна, климатските промени може штетно да се манифестираат врз развојот на одредена болест чиј предизвикувач може да биде *Phytophthora* spp. Погоре споменатиот инвазивен патоген *P. ramorum*, предизвикувач на SOD како и други заболувања (по *Lithocarpus* spp. и *Quercus* spp.) во 14 западни окрузи во Калифорнија и еден округ во Орегон, најверојатно бил присутен во САД од средината на 1990-тите, но истражувањата покажале дека дистрибуцијата на патогенот зависела од регионалните климатски граници (Venette, 2009).

Бројот на познати видови од родот *Phytophthora* е во континуиран пораст. Главна причина за тоа се евидентните штети ширум светот кои се предизвикани од овие организми, како и сериозниот прогрес во изнаоѓањето на нови и подобрувањето на класичните методи на детекција.

Штетните последици предизвикани од *Phytophthora* видовите се познати и проучени во многу земји ширум светот. Лабораторијата за фитопатологија при Шумарскиот факултет во Скопје е во склад со трендовите во науката на шумарската растителната патологија во светот, па така ова истражување пополнува една од празнините, особено поради фактот дека е речиси невозможно да се најде пишан податок за било какво истражување на ова поле во Република Македонија.

Михајло С. Ристески

„ДИСТРИБУЦИЈА И ДИВЕРЗИТЕТ НА ПАТОГЕНИ ВИДОВИ
PHYTOPHTHORA ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА“

И з в а д о к

Класата Oomycetes се состои од повеќе од 800 видови, паразити или сапрофити на почвени или акватски растенија или животни. Претставниците на родот *Phytophthora* се многу специфична група габолики микроорганизми и долго време не можеле да бидат соодветно систематизирани во т.н. „дрвото на животот“ а заради бројните сличности со габите во минатото биле класифицирани како габи. Според најновите истражувања, родот *Phytophthora* припаѓа во царството Chromista, група Stramenopiles, супер-група во рамките на „SAR“ (Stramenopiles, Alveolata и Rhizaria).

Сознанијата за девастирачкиот потенцијал на видовите од родот *Phytophthora* како и недостатокот на релевантни истражувања и податоци за територијата на Република Македонија ги поттикнаа следните главни цели на истражување: опсервација на здравствена состојба на шумите, шумските насади и расадници, како и земјоделските (овошни) насади во однос на видовите *Phytophthora*; колектирање на теренски примероци со симптоми и изолација на чисти култури кои припаѓаат на родот *Phytophthora*; идентификација на културите со морфолошки и молекуларни методи; оценка на патогеност и изработка на карта на распространетост на детерминирани видови *Phytophthora* на територијата на Република Македонија.

Во овој труд презентирано е темелно истражување во кое е извршена оценка на здравствената состојба на шумските и земјоделските екосистеми во однос на фитопатогените организми од родот *Phytophthora*. Користени се

класични и модерни, морфолошки и молекуларни методи, во повеќе лаборатории во Република Македонија и во странство. Презентирани се добиените резултати со соодветна дискусија и предлог мерки за заштита.

Во периодот од 2010 до 2017 година беше извршена теренска опсервација за присуство на симптоми карактеристични за видовите од родот *Phytophthora*. Опсервирани беа 36 локалитети во шумски екосистеми, од кои 21 природен или вештачки подигнат насад, 9 расадници во сопственост на ЈП „Македонски шуми“ и 6 приватни расадници, додека во земјоделски екосистеми опсервирани беа 17 насади во приватна сопственост. Вкупно беа опфатени 44 видови растенија домаќини.

Колектирани беа вкупно 298 примероци почва, корења и некротирано растително ткиво, од кои 205 примероци од шумски екосистеми и 93 примероци од земјоделски екосистеми. Од вкупниот број колектираните примероци од шумски екосистеми 79% беа со симптоматско потекло, додека од земјоделски екосистеми 80% беа со симптоматско потекло. Без разлика на бројот на колектирани примероци, процентот на колектирани симптоматски примероци беше со ист тренд.

За секој колектиран примерок почва или растителен материјал беа регистрирани податоци за име на локалитет, ГПС координати, вид на растение домаќин со латински назив, проценета старост на растение, присуство или отсуство на симптоми, како и информација за педолошки профил.

Користени беа неколку методи за изолација на чисти култури, притоа најкористен беше метод на мамка со живи листови, селективни хранливи подлоги PARPNH и CARP+, и хранливи подлоги за одгледување ПДА, MEA и V8 агар. Од вкупниот број колектирани теренски примероци за анализа, 17% од шумски екосистеми и 33% од земјоделски екосистеми резултирале со изолација на најмалку една култура за понатамошна анализа. Анализирани и документирано беше присуството на следните морфолошки карактеристики: морфологија на култура, вредности за дневен пораст, присуство или отсуство на плодни тела од полово (ооспори, антеридии и оогонии) и вегетативно потекло (хламидоспори, хифални задебелувања (swellings) и украси на хифите).

За 240 култури изолирани беа примероци ДНК, истите беа подложени на полимеражна верижна реакција со универзални молекуларни прајмери за видовите од родот *Phytophthora* (ITS4 и ITS6) за да на крај бидат секвенционирани. Добиените ДНА секвенци, беа софтверски и мануелно едитирани и споредени со оние во официјалната онлајн датабаза на *Phytophthora* видовите. Беа детектирани 49 секвенци кои припаѓаа на 10 видови *Phytophthora* и тоа: *P. cinnamomi* (1), *P. cambivora* (1), *P. cactorum* (18), *P. plurivora* (12), *P. gonapodyides* (1), *P. colocasiae* (7), *P. megasperma* (2), *P. rosacearum* (1), *P. inundata* (2), *P. taxon Walnut* (4). За сите детектирани видови *Phytophthora* ова е прв наод за Република Македонија.

Беа направени филогенетски анализи со помош на алатката ClustalW multiple alignment на BioEdit Sequence Alignment Editor софтверот, сите 49 секвенци беа порамнети и тоа во должина од 896 базни парови, а ги содржеа ITS1 регионот, 5.8S генот и ITS2 регионот. Најголемо варирање беше регистрирано помеѓу секвениците во регионите ITS1 и ITS2, што и беше очекувано а заради различноста помеѓу видовите. Според изработениот матрикс за процена на еволуционите разлики помеѓу видовите, забележани беа очекувани еволуциони разлики помеѓу различните видови *Phytophthora*, но забележани беа еволуциони разлики и помеѓу изолати на исти видови *Phytophthora* а кои се изолирани од различни екосистеми или растенија домаќини.

За претставници изолати за 7 од вкупниот број детектирани видови *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. plurivora*, *P. colocasiae*, *P. inundata* и *P. taxon Walnut*) тестирана беше патогеноста кон дормантни питом костенови стапчиња (како потенцијален домаќин за секој од тестираните видови). Притоа за два различни дијаметри на костеновите стапчиња од 5-10 mm и 10-15 mm, беа добиени лезии со должина од 1,6 cm до 5,9 cm. Според вредностите за должината на предизвиканите лезии, најпатоген вид кон костеновите стапчиња беше видот *P. cactorum* додека најмалку патоген беше видот *P. inundata*.

Според резултатите и согледувањата беа предложени превентивни мерки како и мерки за заштита од овие организми, при што акцентот беше ставен на потребата од постојани слични истражувања заради откривање на нови потенцијално патогени видови *Phytophthora* во Република Македонија, почести

и поригорозни фитосанитарни прегледи а инспекциските служби а особено при увоз на растителен материјал, и спроведување на тестови за патогеност на видовите *Phytophthora* кон економски најзначајните (земјоделски и шумарски) растителни видови за Република Македонија.

Клучни зборови: габолики организми, *Phytophthora* spp., морфолошки и молекуларни карактеристики, изолација, идентификација, ДНК, ITS секвенционирање, патогеност.

Mihajlo S. Risteski

“DISTRIBUTION AND DIVERSITY OF PATHOGENIC SPECIES OF THE GENUS
PHYTOPHTHORA IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA”

Abstract

The class Oomycetes consists of more than 800 species, parasites or saprophytes on soil or aquatic plants or animals. The representatives within the genus *Phytophthora* are very specific group of a fungus-like organisms which couldn't be properly systematized in the so-called “tree of life”, and because of the many similarities with the fungi, in the past, they were classified as fungi. According to the latest research the genus *Phytophthora* belongs to the Chromista kingdom, Stramenopiles group and within the “SAR” (Stramenopiles, Alveolata and Rhizaria) super group.

The knowledge about devastating potential of the species of the *Phytophthora* genus, as well as the lack of the relevant research and data for the Republic of Macedonia's territory, stimulated the following main research goals: observation of the health state of the forest, forest plantations and nurseries, as well as agricultural (fruit) plantations in relation to the *Phytophthora* species; collecting field samples with symptoms and pure culture isolation of the species belonging to *Phytophthora* genus; culture identification using morphological and molecular methods; assessment of the pathogenicity and compiling a map of determined *Phytophthora* species on the Republic of Macedonia's territory.

This paper presents a thorough research of the health state assessment of forest and agricultural ecosystems related to the phytopathogenic organisms of the genus *Phytophthora*. Classical and modern, morphological and molecular methods

were used in several laboratories in the Republic of Macedonia and abroad. The results and the analogue discussion with draft protection measures are presented.

During the period from 2010 to 2017 a field observation for presence of the *Phytophthora* specific symptoms was carried out. Total of 36 sites in forest ecosystems, out of which 21 natural or artificial plantations, 9 nurseries owned by PE “Makedonski sumi” and 6 private nurseries; and 17 plantations in agricultural ecosystem in private ownership were observed. A total of 44 species of host plants were included. A total of 298 samples of soil, roots and necrotic plant tissue were collected, out of which 205 samples from forest ecosystems and 93 samples from agricultural ecosystems. A percentage of 79 out of the collected samples from forest ecosystems were from symptomatic origin, and a percentage of 80 out of the samples collected from agricultural ecosystems were from symptomatic origin. No matter the number of the collected samples the percentage of symptomatic samples was at same trend.

For each of the collected soil samples or plant material it was recorded the data for name of the site, GPS coordinates, host plant species with latin name, estimated age, presence or absence of symptoms and the information about the pedological profile.

Several methods for pure culture isolation were used, and the most used was the bait method with live leaves, selective nutritious media PARPNH and CARP+, and culturing nutritious media PDA, MEA and V8 agar. Out of the total number of collected field samples for analysis, 17% out of forest ecosystems and 33 % out of agricultural ecosystems resulted with isolation of at least one culture for further analysis. It was analysed and documented the presence of the followed morphological characteristics: culture morphology, growth rate, presence or absence of fruiting structures from sexual (oospores, antheridia and oogonia) and vegetative origin (chlamidospores, hyphal swellings and hyphal ornaments).

For total of 240 cultures DNA samples were isolated and subjected to polymerase chain reaction with universal molecular primers for *Phytophthora* species (ITS4 and ITS6) and they were sequenced. The DNA sequences were manually and softwarewise edited and compared with the ones present at the online *Phytophthora* database. A total of 49 sequences were determined belonging to 10 *Phytophthora* species as follows: *P. cinnamomi* (1), *P. cambivora* (1), *P. cactorum* (18), *P. plurivora*

(12), *P. gonapodyides* (1), *P. colocasiae* (7), *P. megasperma* (2), *P. rosacearum* (1), *P. inundata* (2), *P. taxon Walnut* (4). For all detected *Phytophthora* species this is a first report for the territory of the Republic of Macedonia. Phylogenetical analysis were carried out using the tool ClustalW multiple alignment of the BioEdit Sequence Alignment Editor, all 49 sequences were aligned in length of 896 base pairs, containing ITS1 region, 5.8S gene and ITS2 region. The major variation between the sequences was registered in the ITS1 and ITS2 regions, which was expected because of the differences between the species. According to the developed matrix for the evaluation for the evolutionary differences between the species, the expected differences between the species were observed, but also evolutionary differences between same *Phytophthora* species isolated from different ecosystems or host plant were observed.

Representative isolate for 7 out of detected *Phytophthora* species (*P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamomi*, *P. plurivora*, *P. colocasiae*, *P. inundata* and *P. taxon Walnut*) were tested for pathogenicity towards dormant sweet chestnut sticks (as a potential host plant for each of the tested species). For the two different diameters of the chestnut sticks used, 5-10 mm and 10-15 mm, the length of the caused lesions was 1,6 to 5,9 cm. According to the length of the caused lesions, the most pathogenic species towards chestnut sticks was *P. cactorum* and the least pathogenic species was *P. inundata*.

According to the results and the perceptions preventive and protection measures were drafted with emphasis on the need of permanent similar research for detection of new potentially pathogenic *Phytophthora* species in the Republic of Macedonia, more frequent and more rigorous phytosanitary examinations and in particular when importing plant material, and conducting pathogenicity tests of the *Phytophthora* species towards the economically most important (agriculture and forestry) plant species for the Republic of Macedonia.

Key words: fungus-like organisms, *Phytophthora* spp., morphological and molecular characteristics, isolation, identification, DNA, ITS sequencing, pathogenicity.

Благодарност

Идејата за запишување на докторски студии, како и идејата за насловот на докторската дисертација беше на предлог на мојот ментор, проф. д-р Кирил Сотировски од Шумарскиот факултет во Скопје (ШФС). Најголема благодарност за придонесот во изработката на овој труд ја изразувам на мојот ментор. Искрено му се заблагодарувам за неизмерната долгогодишна поддршка, неизмерното трпение и мотивирање во секој момент од нашето запознавање до сега. Уште од почетоците на изработка на мојата дипломска работа стана и остана главен мотиватор, несебично и сестрано помагајќи ми во секој аспект и секој момент. Моите лабораториски и теренски вештини ги стекнав за време на многуте часови тренинг под надзор на мојот ментор, поминати во дискусија во неколку лаборатории: фитопатолошка лабораторија при Шумарскиот факултет во Скопје, фитопатолошката лабораторија при Универзитетот Корнел (Итака, Њујорк), како фитопатолошката лабораторија при Институтот WSL (Цирих, Швајцарија); но и бројните денови поминати на теренски патувања, ширум Македонија и во странство.

Им се заблагодарувам и на останатите членови на комисијата. Проф. д-р Ирена Папазова-Анакиева (ШФС) беше достапна за дискусија и сугестии за цело времетраење на изработката на мојата теза, како за научниот дел така и за бројните издржани сугестии и совети во техничкиот дел од изработката на тезата. Проф. д-р Раде Русевски од Факултетот за земјоделски науки и храна (ФЗНХ), беше неуморен мотиватор и извор на идеи, како тпелив водич за дел од теренските колекции на примероци, така и со искусвени сугестии за лабораторискиот дел. Заедно и низ дискусија ги избиравме местата за колекција на теренски примероци, а во лабораторија водевме дискусии околу причините за успешноста на изолација на целните организми. Вонреден проф. д-р Билјана Кузмановска (ФЗНХ) беше искрен мотиватор и безрезервно ја поддржувше изработката на овој труд, искрено и пријателски ме советуваше, сугерираше и бодреше. Првата изолација на ДНК беше направена под будно око и директна помош на Проф. Кузмановска во нејзината лабораторија за што сум искрено благодарен, како и за бројните сугестии во техничкиот дел на изработката на оваа дисертација. Му се заблагодарувам на проф. д-р Никола Николов (ШФС) за сите сугестии и совети за време на изработката на оваа теза, како и за помошта

при колекција на теренски примероци од неколку шумски расадници, како и за ангажманот во Противпожарниот Сојуз на Македонија. Му се заблагодарувам на Проф. д-р Љупчо Јанкуловски (ФЗНХ) за широко отворените врати на неговата молекуларна лабораторија и посветеното време и советите за користење на методологија за лиофилизација и микродисембрирање на мицелија. Ѓ се заблагодарувам на проф. д-р Мирјана Јанкуловска (ФЗНХ) за дадените совети и поддршката, но и за отворените врати за користење на лабораторијата за генетика.

Се заблагодарувам на гостопримството на проф. д-р Стивен Вудворд на Универзитетот Абердин во Абердин, Шкотска, кој без резерва ме прими во неговата лабораторија за да работам на моите изолати. Тука се заблагодарувам и на неговата асистентка д-р Елени Сиасоу која ми помагаше при изолацијата на ДНК од моите изолати.

Д-р Даниел Риглинг, беше отворен за моите прашања и ми овозможи научноистражувачка работа во неколку наврати во лабораториите од институтот WSL во Бирменсдорф, Швајцарија кои се едни од најсовремените и најопремените во Европа, за што сум многу благодарен. Му благодарам на д-р Симоне Просперо (WSL) за поддршката и соработката во однос на многу технички прашања поврзани со моите истражувања, како и на лаборантката Хелен Блумстен за размената на искуства во користени методологии за изолација и хранливи подлоги, како и за помош при набавка на хемикалии и лабораториски потрошни материјали, недостапни на нашиот пазар.

Им благодарам на проф д-р Мирна Чурковиќ Перица и доц. д-р Марин Језиќ од Факултетот за биолошки науки во Загреб за безрезервната поддршка низ сите години на моето созревање, особено од аспект на молекуларните технологии. Комплетно опремената лабораторијата на д-р Мирна Чурковиќ Перица ми беше достапна во целост, како за изолација на ДНК, така и за реагенси. Д-р Језиќ беше секогаш достапен да одговора на мои прашања, како и за размена на лабораториски протоколи, и несебично помогна при подготовка на првиот сет примероци ДНК за секвенционирање.

Му благодарам на м-р Александар Михајловски кој беше достапен и ми помогна во теренската колекција на примероци, како и за поддршката за време на почетоците на моето истражување.

Им благодарам на дипл. шум. инж. Благоја Размоски, дипл. шум. инж. Маџунаров Дарко, дипл. шум. инж. Катерина Среброва, дипл. зем. инж. Евтим Петковски за помошта при теренска колекција на примероци.

Целокупната изработка на тезата ниту за момент не беше поткрепена од ниту еден национален проект ниту било каква помош од Министерството за образование и наука на Република Македонија. Изработката на докторската дисертација немаше да биде можна доколку не постоеја два последователни мултилатерални проекти финансирани од Swiss National Foundation (SNF, SCOPES):

1. IZ73Zo_127922. Chestnut blight research in the Balkans and Georgia: population studies and biological control methods. Четирилатерален проект (Швајцарија, Хрватска, Грузија и Македонија) со времетраење 2009-2012 година.

2. IZ73Zo_152525. Invasive chestnut diseases in the Balkans and Georgia - epidemiological research and management options. Четирилатерален проект (Швајцарија, Хрватска, Грузија и Македонија) со времетраење 2014-2017 година.

Придонес за ова истражување беа стекнатите искуства за време на SEEEERANETPLUS проектот: ERA 138/01. Diversity of invading *Phytophthora* spp. plant pathogens in agro and forest ecosystems in Southeast Europe, Петлатерален проект (Бугарија, Грција, Македонија, Србија и Романија) Времетраење на проектот 2010-2012 година.

Благодарен сум на организацијата COST (Cooperation in Science and Technology) преку чиј систем учествував на повеќе тренинг школи и обуки ширум Европа (Србија, Бугарија, Грција, Хрватска, Турција, Унгарија, Полска, Белгија, Шкотска, Шпанија, Португалија и Шведска) поврзани со современи техники и методи директно поврзани со темата на мојата докторска дисертација, но и битни за моето генерално усовршување како фитопатолог. Преку овие професионални патувања не совладував само методологија и практични аспекти, туку бев експониран и на поширокиот контекст и на принципи на

научно истражувачката работа и остварив контакти со многу истражувачи и научници ширум светот.

На моите родители Славе Ристески и Кица Ристеска, на мојата сестра Елизабета Ристеска, на мојата сопруга Кети Илова-Ристеска и мојата ќерка Дарија Ристеска, неизмерно им се заблагодарувам за апсолутната поддршка и изнаоѓање начини за да се одржи мојата мотивација и издржливост.

Овој труд со цело срце го посветувам на мојот ментор, Проф. д-р Кирил Сотировски.

С о д р ж и н а

1. ВОВЕД	1
1.1. Таксономија	5
1.2. Историјат на проучување на видовите <i>Phytophthora</i>	10
1.3. Досегашни истражувања во Република Македонија	12
1.4. Цели на истражувањето	13
2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА	16
2.1. КОЛЕКЦИЈА НА ПРИМЕРОЦИ, ИЗОЛАЦИЈА И МОРФОЛОШКА ИДЕНТИФИКАЦИЈА	16
2.1.1. Избор на локалитети за истражување	16
2.1.2. Избор на локалитети во шумски екосистеми	16
2.1.3. Избор на локалитети во земјоделски екосистеми	17
2.1.4. Колектирање примероци почва	19
2.1.5. Изолација на чисти култури од почвени примероци	23
2.1.6. Изолација на чисти култури од некротирано ткиво и корења	28
2.1.7. Користени хранливи подлоги за изолација и одгледување на изолатите	29
2.1.8. Морфолошка анализа на културите	31
2.2. МОЛЕКУЛАРНА ИДЕНТИФИКАЦИЈА	33
2.2.1. Метод со SEVAG	35
2.2.2. Метод со Guanidine thiocyanate	36
2.2.3. Метод според PureLink™ Plant, Total DNA Purification Kit	36
2.2.4. Полимеразна верижна реакција	38
2.2.5. Секвенционирање	42
2.3. ФИЛОГЕНЕТСКИ АНАЛИЗИ	46
2.4. ПАТОГЕНОСТ	48
2.4.1. Тест на патогеност со користење дормантни стапчиња	48
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	51
3.1. Избор на локалитети за истражување	51
3.2. Изолација на чисти култури	85
3.3. Морфолошка идентификација на изолираните култури	87
3.4. Молекуларна идентификација	87
3.5. Филогенетски анализи	89

3.6. Опис на детектираните видови <i>Phytophthora</i>	98
3.6.1. Група изолати од <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	98
3.6.2. Група изолати од <i>Phytophthora colocasiae</i> Racibirski	100
3.6.3. Група изолати од <i>Phytophthora megasperma</i> Drechsler	102
3.6.4. Група изолати од <i>Phytophthora rosacearum</i> E.M. Hansen & Wilcox	104
3.6.5. Група изолати од <i>Phytophthora cactorum</i> (Lebert and Cohn) Schröeter	106
3.6.6. Група изолати од <i>Phytophthora plurivora</i> Jung and Burgess	109
3.6.7. Група изолати од <i>Phytophthora gonapodyides</i> (H.E. Petersen) Buisman	112
3.6.8. Група изолати од <i>Phytophthora inundata</i> Brasier, Sanchez-Hernandez & S. A. Kirk	112
3.6.9. Група изолати од <i>Phytophthora cambivora</i> (Petri) Buisman	113
3.6.10. Група изолати од <i>Phytophthora</i> Taxon Walnut	116
3.7. Патогеност	121
3.8. Предлог мерки кои треба да се преземат	129
4. ЗАКЛУЧОЦИ	130
5. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	132

1. ВОВЕД

Видовите од родот *Phytophthora* се многу специфична група микроорганизми кои долго време, токму заради својата специфичност, не можеле да го „најдат“ вистинското место во т.н. „дрво на животот“, односно да бидат соодветно лоцирани во систематиката на живите организми. Според најновите научни податоци, родот *Phytophthora* припаѓа на царството Chromista, група Stramenopiles (од англ. straminopiles) (Adl et al., 2012; Beakes et al., 2012; Beakes et al., 2015; Kirk et al., 2008), систематизирана како супер-група (Adl et al., 2012; Burki et al., 2007; Burki et al., 2008) во рамките на „SAR“ (Stramenopiles, Alveolata и Rhizaria). Според Cavalier-Smith (1999) претставниците на царството *Chromista* се развиле од пластид на црвените алги преку секундарни симбиогенетски процеси со различни двоклеточни домаќини, а можно е дури и со два или три различни домаќини. Заради големите сличности во животниот циклус, во патогеноста и во морфолошко-физиолошките каарактеристики, во минатото во микологијата не е правена разлика на *Phytophthora* spp. во однос на останатите „вистински“ габи.

Класата Oomycetes се состои од повеќе од 800 видови кои може да бидат паразити или сапрофити на почвени или акватски растенија и животни. Сепак, претставниците на класата Oomycetes долго време биле класифицирани како габи заради бројните сличности. Пред сè претставниците на оваа класа ги обезбедуваат потребните хранливи материи со апсорпција на истите од околната почвена или акватска средина, или со инвадирање на телото на организам од кој се хранат (Lahr, 2011). Исто, играат значајна улога во декомпозиција и разградување при процесот на гниење (Lahr, 2011). Повеќето од нив формираат влакнести формации, познати како мицелија, особина која е карактеристична за габите (Dick, 1997), а една од суштинските сличности со „вистинските“ габи е во развивањето на стратегија за колонизација и напад на растението домаќин (Latijnhouwers et al., 2003). Од друга страна пак, одамна е познато дека од вистинските габи (царството Fungi) претставниците на класата Oomycetes се разликуваат во неколку суштински особини. Најпрвин започнувајќи од половата (сексуалната) репродукција, претставниците на класата Oomycetes содржат или формираат специјализирани полови структури т.н. гаметангии, при што женските полови клетки - ооспори биваат оплодени од машките полови клетки

- антеридии. Ваквата особина отсуствува кај „вистинските“ габи, кои не формираат ооспори, додека сексуалната репродукција резултира со зигоспори, аскоспори и базидиоспори. Втора битна разлика е јадрената состојба на вегетативната мицелија, при што претставниците на *Oomycetes* се диплоидни и формираат несептирани, едноклеточни хифи, додека „вистинските“ габи се хаплоидни или дикариотски и формираат септирани хифи (Latijnhouwers et al., 2003). Трета битна карактеристика е градбата на клеточниот ѕид, при што претставниците на *Oomycota* содржат β глукани и целулоза а отсуствува хитинот, додека кај „вистинските“ габи хитинот е присутен а целулозата многу ретко во изградбата на клеточниот ѕид. Четврта битна карактеристика е типот на флагели кои ги формираат на зооспорите. Притоа претставниците на *Oomycetes* формираат подвижни зооспори со 2 типа флагели, мазни или влакнести, додека „вистинските“ габи ретко формираат зооспори а доколку формираат истите се со еден тип, односно мазни флагели. Петтата битна разлика е градбата на структурите кристи (*cristae*) во митохондриите, при што кај *Oomycota* истите се тубуларни (цевчести), додека кај „вистинските“ габи се ламеларни (во вид на листови). Овие разлики се потврдени со помош на молекуларни и филогенетски истражувања со што дефинитивно овие организми се издвоени од царството Fungi (Adl et al., 2005; Adl et al., 2012; Baldauf et al., 2000; Erwin and Ribeiro, 1996; Kirk et al., 2008; Sleight, 1989; Sogin et al., 1996).

Заради трајните спори со дебел ѕид кои ги формираат (половите ооспори и бесполовите хламидоспори), видовите од родот *Phytophthora* имаат способност за преживување во неповолни услови како што се високи и ниски температури, суша и недостаток на приемчив домаќин и тоа на долг период (Erwin and Ribeiro, 1996). Освен со помош на наведените спори, преживувањето често се одвива и со додатоци и задебелувања на хифите, константно самообновување во водена средина и на различни други начини (Erwin and Ribeiro, 1996). На пример кај *P. cinnamomi* Rands, докажано е дека главни пропагули за долгорочно преживување во текот на екстремно суви лета во Западна Австралија се самообразуваните ооспори во внатршноста на мртвото растително ткиво и образувањето агрегации на хифи кои наликуваат на строми и задебелени интрацелуларни хифи во внатрешноста на инфицираното кореново ткиво (Jung et al., 2013a).

При настапување на поволни услови, вклучувајќи температури над 10 °C и зголемена влажност во земјата, органите за преживување `ртат и на краевите формираат карактеристични спороносни органи во различен облик, наречени зооспорангии, кои ослободуваат зооспори во влажна земја. Овие спори се со димензии од околу 10 µm и имаат 2 флагели кои им овозможуваат активна подвижност. Спорите се упатуваат кон ситните коренчиња, привлечени со хемотаксија¹, и по пристигнувањето, на нив се прилепуваат како прва фаза во процесот на инфекција. Потоа преминуваат во стадиум на циста (метаморфоза на зооспорите после отпаѓање на флагелите при контактот со ткивото на домаќинот) и инфицираат како примарни патогени (Erwin and Ribeiro, 1996). Само неколку часови после инфекцијата доаѓа до формирање на голем број спорангии на површината на инфицираниот корен, кои пак ослободуваат нови зооспори во земјата (Erwin and Ribeiro, 1996). Оваа нивна мултициклична природа, перзистентноста на трајните спори, високата агресивност и широката дистрибуција (Erwin and Ribeiro, 1996; Jung et al., 2013b; Ribeiro, 2013; Scott et al., 2013), *Phytophthora* видовите ги прават едни од најопасните растителни патогени воопшто. Некои видови се тесно специјализирани за одреден вид домаќин и остваруваат инфекција исклучиво на истиот, додека кон други видови се инфериорни. Такви се видовите: *P. quercina* Jung, паразит кој е поврзан со видови од родот на дабовите (*Quercus* spp.) (Jung et al., 1999a), видот *P. alni* Brasier & S.A. Kirk е паразит на видовите евла (*Alnus* spp.) (Brasier et al., 2004a), видот *P. austrocedri* Gresl. & E.M. Hansen е паразит на видот *Austrocedrus chilensis* (Greslebin et al., 2005), видот *P. pinifolia* A Durán, Gryzenh & M.J. Wingf., пак е паразит исклучиво на зелени гранчиња и иглички на видовите бор (*Pinus* spp.) (Durán et al., 2008), видот *P. rubi* Man in `t Veld е паразит на видот *Rubus idaeus* var. *idaeus* (Erwin and Ribeiro, 1996; Kroon et al., 2004; Man in't Veld, 2007), додека пак видот *P. trifolii* E.M. Hansen & D.P. Maxwell е паразит по видовите *Trifolium* spp. ((Erwin and Ribeiro, 1996; Hansen and Maxwell, 1991; Kroon et al., 2004)) и други видови. Други видови се пак полифагни² и се појавуваат на голем број растенија-домаќини кои припаѓаат на различен број родови и фамилии, како што се *P. citricola* Sawda (домаќини се растенија од 38 фамилии и 75

¹ Хемотаксија (хемотакса) е феномен во кој телесните клетки, бактерии како и други едноклеточни или повеќеклеточни организми го насочуваат своето движење врз основа на некоја хемиска супстанца која се наоѓа во нивната средина.

² Полифаг - организам што се храни со различни растителни видови.

родови), *P. plurivora* Jung and Burgess (домаќини се видовите: *Abies alba*, *Lnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Acer platanoides*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer saccharum*, *Aesculus hippocastanum*, *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus rubra*, *Rhododendron* spp., *Syringa vulgaris*, *Tilia* spp., *Tsuga canadensis*, *Castanea sativa*), *P.cactorum* (Lebert and Cohn) Schröter (домаќини се растенијата претставници на најмалку 54 фамилии и 154 родови), *P. cinnamomi* Rands (домаќини се растенијата претставници на 90 фамилии и 266 родови, најчесто дрвни видови), *P. ramorum* Werres, de Cock and Man in `t Veld (домаќини се растенијата на 17 фамилии и 26 родови) (Erwin and Ribeiro, 1996; Jung and Burgess, 2009b; Waterhouse and Waterston, 1966).

Според видот на паразитизам овие патогени организми припаѓаат на групата хемибиотрофи (Latijnhouwers et al., 2003; Thines, 2013), што значи дека во почетната фаза на инфекција колонизираат живи растителни ткива, а подоцна, после изумирањето на овие ткива продолжуваат да се развиваат и во мртвото ткиво, во кое спорутираат или/и формираат трајни структури за преживување (Agrios, 2005; Webster and Weber, 2007). Ова е една од битните разлики во однос на морфолошки сличните видови од родот *Pythium* spp., кои претежно колонизираат веќе изумрено растително ткиво, иако одреден број нивни претставници имаат способност да колонизираат живи растителни ткива (Latijnhouwers et al., 2003). Таков е примерот со видот *Pythium anandrum* Drechler кој е регистриран на даб китњак (*Quercus petraea*) во Турција (Akilli et al., 2013b), додека инфекции од видот *Pu. aphanidermatum* Edson освен по растенија, се забележани и кај луѓе, и тоа после повреди (Calvano et al., 2011).

Во текот на својот животен циклус видовите од родот *Phytophthora* се појавуваат како во полова така и во бесполова фаза, додека еден мал број видови е стерилен или тежнее кон стерилитет. Кај одреден број претставници половата фаза (присуство на ооспори) ретко се појавува, како на пример кај *P. citrophthora* (R.E. Smith and E.H. Smith) Leonian (Erwin and Ribeiro, 1996). Овие видови, исто така, во однос на своето вегетативно тело, т.н. талус, може да се појават како хомоталусни или како хетероталусни. Кај првите, половите елементи (антеридии и оогонии) се образуваат на ист талус (мицелија), додека кај вторите се потребни два различни талуса кои се од компатибилни хифи A1 и A2 размножувачки типови (mating types A1 и A2) (Erwin and Ribeiro, 1996).

Хетероталусните видови може да се одржуваат и да остваруваат инфекција и без спарување со компатибилниот од другиот размножувачки тип (A1 или A2) при што преживуваат во облик на трајни бесполови спори (хламидоспори), или пак како орнаменти или задебелувања на хифите (hyphal swellings), или преку самообновување, односно со често формирање нови зооспорангии со зооспори, при што последниов начин е поврзан со влажни или акватски екосистеми (Erwin and Ribeiro, 1996). Иако во овие случаи можноста за рекомбинација³ на гените (кога продуктот генетски се разликува од родителите), како и хибридизацијата (кога продуктот од генетски различни родители ги носи гените и од двата родители, односно носи по два различни алела во секој ген), се ретки појави, природно индуцираната хибридизација (секундарен контакт помеѓу две популации кои се развиле индивидуално во текот на подолг временски период и е одговорна за зголемување или зачувување на диверзитетот помеѓу таксони) кај овие организми е одамна забележана (Brasier et al., 2004b; Érsek and Man in 't Veld, 2013; Érsek and Nagy, 2008; Ioos et al., 2007; Man in 't Veld et al., 2007; Man in't Veld et al., 2012; Nagel et al., 2013; Yang et al., 2014c). Исто така, кај одредени хетероталусни видови под дејство на различни влијанија од надворешната средина доаѓа до самообразување ооспори, иако е присутен само еден компатибилен пар (A1 или A2). Таков е случајот кога некои видови габи од родот *Trichoderma*, се стимулатори за образување полови структури кај видовите од родот *Phytophthora* (Brasier, 1975). Самообразувањето ооспори на видот *P. cinnamomi* во инфицирано ткиво на домаќинот го докажале (Jung et al., 2013a).

1.1. Таксономија

После издвојувањето од царството габи, видовите од родот *Phytophthora* заедно со други габолики организми се воведени во новоформирано царство „*Chromista*“ (*regnum novum*) со веќе познатите две подцарства Cryptophyta и Chromophyta (Cavalier-Smith, 1981). Овој термин од тогаш е прифатен и нормално се користи во литературата кога се зборува за класификација на *Phytophthora* видовите (Kirk et al., 2008). Суперцарството Chromalveolate ги вбројува претставниците на царството Chromista, сестринското подцарство

³ Генетска рекомбинација претставува производство на потомци со комбинација на особини кои се разликуваат од оние кои се наоѓаат кај било кој од родителите.

Alveolata, како и различни еукариоти со присуство на пластид црвени алги и фотосинтетски апарат (Cavalier-Smith, 1999). Молекуларното секвенционирање ја докажало блиската поврзаност на видовите *Phytophthora* од класата Oomycetes со другите габолики организми како што се еноклеточните и кафените алги и протистите од кои се состои кладот на суперцарството Chromelvelate (Beakes et al., 2012). Според Beakes et al. (2012) се смета дека претставниците на целиот клад се развил од предци способни за фотосинтеза, но еволутивниот тек бил проследен со три независни губења на пластид. Според најновите наоди докажано е дека претставниците на Oomycetes еволуирале од едноставни холокарпни морски паразити и дека хифалниот модел на раст и стекнувањето на оогамната сексуална репродукција највероватно се развила долго после миграцијата на овие организми од море на копно (Beakes et al., 2012).

Овде е потребно да се истакне дека во литературата се сретнуваат термини кои се сметаат за синоними на видовите кои припаѓаат на царството Chromista и тоа „Heterokonta“ (Cavalier-Smith, 1986) и „Stramenopiles“ Patterson (1989, 1994), цитирано во Patterson (1999), и истите внесуваат дополнителна забуна при сведувањето видови од родот *Phytophthora* и на другите габолики организми во повисоките систематски категории. Всушност, Heterokonta е подцарство во царството Chromista (Cavalier-Smith 1995 a, b; цитирано во Cavalier-Smith and Chao (2006)), додека како негов најран синоним се појавил називот „Stramenopiles“. Многу автори овој термин го прифатиле како синоним за целото царство Chromista што според Cavalier-Smith and Chao (2006) било погрешно, бидејќи може да биде поврзан само со припадниците на подцарството Heterokonta а не со целото царство Chromista. Според Patterson (1999), терминот „Stramenopiles“ е воведен заради полесно групирање како и пробен пример за да се опфатат видовите од Protista кои делат слични или исти карактеристики со своите најблиски заеднички предци. Нивните припадници се претходно сместени во „Heterokont algae“, „Chromophyta“, „Chrisophyta“ или „Chromista“ (Patterson (1989), цитирано во Patterson (1999)). Според истиот автор (Patterson, 1999) терминот „Stramenopiles“ првобитно не е воведен како таксономска категорија и претставувал неформален термин но набрзо е прифатен и користен од страна на многу автори, често и во погрешен контекст, а некои дури и го окарактеризирале како таксономска категорија и како посебно кралство. Исто

така, сличен назив „Stramenipila“ (Dick (2001), цитирано во Cavalier-Smith and Chao (2006)) е непотребно воведен и станува дополнително збунувачки синоним за царството Chromista (Cavalier-Smith and Chao, 2006). Овој термин е задржан и во новата научна литература, со помалку или повеќе промени, и означува голема група хетероконтни организми, на пример „Stramenopiles“ (Adl et al., 2012).

Според истражувањето на Burki et al. (2007), со детални молекуларни анализи на голем број ДНК секвенци и филогенетски истражувања од 49 еукариотски видови, претставници на сите еукариотски групи, утврдено е дека претставниците од подцарството Rhizaria (Cavalier-Smith, 2002) делат исто потекло со претставниците од претходно дефинираното суперцарство Chromalveolate (Cavalier-Smith, 1999). Истите автори предложиле прелиминарно сведување на овие организми во една супергрупа која ја нарекле „SAR“ (кратенка составена од првите букви Stramenopiles (Chromista, Heterokonta), Alveolata и Rhizaria)(Burki et al., 2007). Со помош на пошироки молекуларни истражувања и вклучување поголем број видови, репрезентативни гени и аминокиселини, групирањето „SAR“ дефинитивно е докажано и потврдено (Burki et al., 2008). Исто така „SAR“ групата е и формално препозната и вклучена во последната ревизија на класификацијата на еукариотите (Adl et al., 2012).

Кога се зборува за пониските систематски категории, и тука дошло до одредени промени, пред сè благодарение на деталните молекуларни истражувања. Повеќето автори во текот на минатиот век и без молекуларни истражувања укажувале на тоа дека класифицирањето на *Phytophthora* видовите во фамилијата Pythiaceae, ред Pythiales, заедно со морфолошки делумно сличните *Pythium* видови, не е природна класификација на овие организми (Thines, 2013). Со истражувањата на Cook et al., (2000), Hudspeth et al.,(2000, 2003), Riethmuller et al., (2002), цитирано во Thines (2013), докажано е дека *Phytophthora* видовите се многу поблиски до пламениците (фамилија: Peronosporaceae, родови: *Peronospora* и *Plasmopara*) отколку до видовите *Pythium*, иако пламениците се вистински биотрофи⁴. Друга важна промена која се извршила во редот Peronosporales е издвојувањето на фамилијата Albuginaceae од овој ред и прераснување на истата во посебен ред Albuginales, заради големите

⁴ Биотроф е организам кој хранливите материи ги снабдува од живо ткиво на домаќинот, често со формирање на специјализирани клетки, наречени хаустории.

разлики од родот *Albugo* во однос на останатите пламеници (Riethmuller *et al.* (2002), Thines and Spring (2005), цитирано во Thines (2013)). Овие наоди и поврзаноста на *Phytophthora* видовите со пламениците се докажани во повеќе филогенетски студии од страна на Thines (2013).

Фамилијата Peronosporaceae ги опфаќа пламениците, родот *Phytophthora* како и родовите *Halophytophthora* и *Phytopythium* (Hulvey *et al.*, 2010b; Thines, 2013). Блиски на оваа фамилија се фамилијата Pythiaceae со родот *Pythium* и новата фамилија *Salisapiliaceae* со родот *Salisapilia* (Hulvey *et al.*, 2010b; Thines, 2013), сите во склоп на редот Peronosporales.

Според базата на податоци на САВІ на сајтот „speciesfungorum“ (<http://www.speciesfungorum.org/>) со додаток на горе наведената група „SAR“ (Adl *et al.*, 2012; Burki *et al.*, 2008) и според таксономијата на Straminipila (Beakes *et al.*, 2015), систематиката е претставена на овој начин:

- супергрупа: „SAR“
- царство: Chromista (Stramenopiles)
- phylum: Oomycetes
- класа: Peronosporomycetes (претходно Oomycetes)
- подкласа: Peronosporidae
- ред: Peronosporales
- фамилија: Peronosporaceae
- род: *Phytophthora*

Самиот род *Phytophthora* исто така претрпувал одредени промени во својот назив додека конечно да биде опишан под името *Phytophthora* (De Bary (1876), цитирано во Ribeiro (2013)). Така *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary е прв опишан вид од овој род, а бил првобитно опишан како *Botrytis* (Montagne 1845), потоа како *Peronospora* (Unger 1847), сè додека прочуениот германски миколог Heinrich Anton de Bary не ја сместил во родот *Phytophthora* (De Bary (1876), цитирано во Ribeiro (2013)). Неговиот клуч за *Phytophthora* видовите во наредните години претрпувал ревизии во однос на порастот на бројот на видови и на опишаните карактеристики (Erwin and Ribeiro, 1996; Newhook *et al.*, 1978;

Stamps et al., 1990; Waterhouse, 1970, цитирано во Ribeiro (2013)), но и понатаму е задржан како основа од која се поаѓа при идентификација на изолати.

Првите молекуларни анализи укажувале на одредени разлики меѓу видовите кои припаѓаат на секоја од групите, а посебно укажувале на постоење комплекс видови кои се морфолошки слични, а молекуларно, еколошки и според агресивноста многу различни (Cooke et al., 2000c; Cooke and Duncan, 1997; Kroon et al., 2004; Ribeiro, 2013). Деталните молекуларни и филогенетски анализи покажале дека претходната поделба на морфолошките групи воведени од страна на Waterhouse (1963b) не е природна и не претставува вистинска поделба помеѓу видовите од овој род (Blair et al., 2008; Cooke et al., 2000c; Kroon et al., 2004; Kroon et al., 2012; Martin et al., 2014). Преку истражување на секвенците од ITS (internal transcribed spacer) регионот од голем број изолати од дотогаш познати видови со цел одредување на филогенетскиот однос меѓу нив, родот *Phytophthora* е поделен на 8 различни примарни групи – кладови (clades) со уште две додатни групи (Cooke et al., 2000c). Следното посеопфатно истражување кое било спроведено од страна на Kroon et al. (2004), вклучило и два јадрени и два митохондријални гени, а резултатите со помали или поголеми измени во распределбата во одредени кладови биле потврдени и од Cooke et al. (2000a) со постоење на 10 индивидуални групи во склоп на родот *Phytophthora*. Исто така осврт на истите истражувања и постоењето на овие 10 различни групи во склоп на родот *Phytophthora* е потврдено и во многу обемното истражување на Blair et al. (2008) кои анализирале седум јадрени гени (28S rDNA, 60S rProtein L10, Beta-tubulin, Elongation factor 1 alpha, Enolase, Heat shock protein 90, TigA gene fusion protein) кај 82 вида. Од друга страна Kroon (2010) и Kroon et al. (2012), направиле одличен осврт на повеќето до тогаш познати видови и разграничиле нови видови во постоечките кладови. Исто така, имало обид за карактеризација на припадниците од поединечните групи според нивните главни еколошки карактеристики и предложен е модел на сведување, во кој покрај филогенетски би се вклучиле и еколошки особини на видовите *Phytophthora* (Kroon, 2010).

Најсеопфатно филогенетско истражување со 11 користени гени спровеле Martin et al. (2014). Оваа обемна студија вклучила вкупно 166 изолати од 92 различни видови и 17 неформално опишани таксони и во ова истражување се користеле седум јадрени гени, опишани кај Blair et al. (2008) и дополнителни

четири митохондријални гени (*cox2*, *nad9*, *gpc10*, *secY*) опишани од Martin et al. (2014). Според добиените резултати, присуството на 10-те претходно издвоени групи (кладови) е генерално потврдено, иако била одделена дополнителна група која била блиска на група 1, или пак значајно различна од постоечките групи и која за сега содржи два вида, и тоа *P. quercina* и *P. sp. ohioensis* (Martin et al., 2014). Исто така Yang et al. (2014a) опишуваат два нови вида од кои видот *P. strict sp. nov.* Yang, Copes and Hong образувал нов клад на база на кладовите 1-8, додека *P. macilentosa sp. nov.* Yang, Copes and Hong образувал кластер на видови отпорни на високи температури во склоп на кладот 9. Со добиените резултати дефинитивно е докажано дека филогенетските односи помеѓу наведените групи во родот *Phytophthora* немаат никакво поклопување со претходно дефинираните морфолошки групи, на што укажувале и претходните истражувања (Martin et al., 2014).

1.2. Историјат на проучување на видовите *Phytophthora*

Родот *Phytophthora* е познат од 1845 година (формално опишан во 1876 година) кога е опишан првиот вид, *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary, предизвикувач на пламеница на компирот која предизвикала глад од 1844-1846 година и масовно раселување на населението во Ирска (Irish famine). Според Ribeiro (2013), први опишани видови во склоп на родот, после *P. infestans* (Mont.) de Bary, биле: *P. cactorum* (Levert and Cohn) J. Schröt, опишана во 1870 година, *P. phaseoli* Taxter која е опишана во Америка во 1889 година, *P. nicotianae* Breda de Haarn (= *P. parasitica* Dastur) која е опишана во 1896 година, и на крај *P. colocasiae* Raciborski, опишана во 1900 година, и ова биле сите званично опишани видови во XIX век. Освен тоа, биле познати уште неколку неформално опишани видови, подвидови, вариетети и форми кои подоцна биле званично опишани или споени со други видови (Ribeiro, 2013). Според (Ribeiro, 2013) до 2000 година, биле познати околу 60 видови од родот *Phytophthora*, вклучувајќи 58 видови опишани во Erwin and Ribeiro (1996) како уште и *P. multivesiculata* Ilieva, Man in `t Veld, Veenbaas-Rijks and Pieters и *P. quercina* Jung опишани во (Ilieva et al., 1998; Jung et al., 1999b; Schubert et al., 1999). Највисок скок во бројот на новооткриени видови се случил во последните 15 години, кога бројот на сите познати видови, вклучувајќи ги и неформално опишаните таксони, практично е

повеќе од дуплиран и изнесува преку 130 (ABAD G. Z., 2008; Brasier, 2009; Jung et al., 2011b; Kroon, 2010; Kroon et al., 2012; Martin, 2013; Martin et al., 2014; Nelson et al., 2010; Nelson and Hudler, 2007; Yang et al., 2014a; Yang and Hong, 2014b). Според Abad (2014), родот *Phytophthora* содржи 141 вид. Земејќи го предвид големиот раст на бројот на новоопишани видови во последните години (60 видови до 2000 година, и преку 80 видови и таксони после 2000 година) се претпоставува дека вкупниот број на видови во рамките на овој род може да биде меѓу 500 и 600 (Brasier, 2009). Според поголем број истражувања (Brasier, 2009; Brasier et al., 2003b; Jung et al., 2011b; Milenkovic et al., 2011; Nechwatal et al., 2012), најголем број потенцијално нови видови лежи во ITS кладот 6 (Cooke et al., 2000c; Kroon et al., 2004), во кој се наоѓаат голем број сеуште неформално опишани таксони, вклучувајќи ги: *Phytophthora* taxon "Pg chlamido" (*P. chlamidospora* Hansen et al.), taxon "oaksoil" (*P. obrutafolium* Hansen et al.), taxon (sp.) "hungarica" и taxon "sulawesiensis", "riversoil", "forestsoil", "walnut", "paludosa", "cranberry", како и неодамна опишаниот *P. lacustris* Brasier, Cacciola, Nechwatal, Jung and Bakonyi sp. nov., претходно позната како *Phytophthora* taxon "Salixsoil", како и други (Bakonyi et al., 2012; Brasier et al., 2003a; Hansen et al., 2014; Jung et al., 2011a; Kroon et al., 2012; Nechwatal et al., 2012). Според достапните извори на литература, еден од неодамна опишаните видови од овој род е *Phytophthora pachyplura* sp. nov. Henricot, Pérez-Sierra and Jung (2013), додека неколку нови видови и таксони се во процес на опишување.

Постојат неколку причини кои до некаде може да го објаснат овој вистински „бум“ во растот на бројот на новоопишани видови. Прво, достапноста на нови молекуларни техники кои значително ја олеснија детекцијата и идентификацијата на нови видови, потоа зголемениот број на истражувања кои се занимаваат со оваа проблематика, и на крај големиот број на обемни истражувања ширум неистражените природни и вештачки екосистеми (Yang et al., 2013). Главна причина за широката дистрибуција на *Phytophthora* видови низ светот е порастот на меѓународните трговски и глобални размени (Brasier, 2008; Evans and Oszako, 2007; Scott et al., 2013) како и нивното внесување преку заразен саден материјал од расадници во природни и вештачки екосистеми (Brasier and Jung, 2006; Pérez-Sierra and Jung, 2013).

Напредокот и развојот на техниките за детекција и идентификација на *Phytophthora* видовите, започнува од првите морфолошки анализи на само 10 изолати од видот *Phytophthora* (*P. infestans*, *P. cactorum*, *P. phaseoli*, *P. nicotianae*, *P. syringae*, *P. arecae*, *P. parasitica*, *P. faberi*, *P. jatrophae*, *P. fagi*) (Rosenbaum, 1917), преку комбинирање на првите морфолошко-физиолошки ДНК и филогенетски анализи па се до најсовремени молекуларни техники и следна генерација на секвенционирање (NGS) кои денес се користат во работата со овие организми (Martin, 2013; Ribeiro, 2013; Thines, 2013).

1.3. Досегашни истражувања во Република Македонија

Присуство на симптоми на сушење предизвикани од габи или габолики организми никогаш не било забележано во поголеми размери. Исклучок од ова е холандската болест по брестот која предизвикала сушење и деструкција на скоро сите стебла од брест, што довело скоро до негово исчезнување (лична комуникација Папазов и Сотировски).

Единствен официјален достапен податок за постоење на некој од *Phytophthora* видовите на територијата на Република Македонија е на веб-страницата на ЕППО (EPPO - European Plant Protection Organization), според која постоењето на симптоми на сушење предизвикани од *P. cryptogea* било регистрирано од страна на д-р Танас Трајчевски, во 1985 година. Присуство на мастилеста болест, сокотечение (симптом најчесто предизвикан од еден или повеќе видови *Phytophthora*) на стебла на питомиот костен (*Castanea sativa* Mill) на локалитетот Скудриње било забележано уште во 80-тите години од минатиот век од Папазов и Сотировски (лична комуникација). Присуство на венење, редуциран развој и редуцирана лисна маса, проследено со лезии и гниење во базалниот дел на јаболкови (*Malus domestica*) и оревови (*Juglans regia*) насади во преспанскиот регион било регистрирано од страна на Русевски и Кузмановска (лична комуникација). Редуцирана крошна и сушење на делови од крошна како и на цели стебла од врби (од видот *Salix alba* L.) било регистрирано од страна на Сотировски (лична комуникација). Но сепак, никогаш не било лабораториски (морфолошки на изолирана култура или молекуларно) докажано дека

симптомите на ваквите наоди се предизвикани од некој од видовите кои припаѓаат на родот *Phytophthora*.

Во Република Македонија во земјоделските екосистеми (насади од јаболко, круша, праска, црешна, вишна и слива) од секогаш постоеле помали или поголеми оштетувања на подлогата за калемење, и тоа најчесто на јаболковите насади. Во јаболковите насади најчестите симптоми на гниење се забележани таму каде како основа за калемење бил користен така наречениот вариетет ММ106 кој се покажал како подложен на *Phytophthora* видовите (Ivanović, 1992). Во текот на неколку децении биле регистрирани лезии и гниење на базалниот дел на стеблата, додека во крошните на истите стебла забележано било проретчување и рудиментирање на лисната маса и намален вигор на растенијата. Но, иако било укажувано за постоење на симптоми предизвикани од *Phytophthora* видовите, сепак никогаш не било лабораториски докажано (Русевски, лична комуникација).

Во Република Македонија постојат регистрирани расадници за производство на шумски саден материјал, кои според законот за здравје на растенија подлежат на задолжителна здравствена контрола од страна на стручни лица, односно од извештајно дијагностичко прогнозната служба од страна на катедрата за Заштита на шумите при Шумарскиот факултет во Скопје. Претходно никогаш не биле забележани симптоми кои насочуваат на присуство на патоген од родот *Phytophthora*.

Генерално, може да се каже дека на територијата на Република Македонија недостасуваат истражувања и податоци за присуство на патогени видови од родот *Phytophthora*.

1.4. Цели на истражувањето

Имајќи предвид дека сознанијата за присуството на патогени болести предизвикани од видовите во родот *Phytophthora* се особено значајни, како заради локализирање на евентуално присуство на одредена локација, така и заради превентивно преземање мерки за да не дојде до внесување на патогенот или фаворизирање на услови за развој на истиот, но и заради докажување на

причинителот на веќе сомнителни локалитети во земјоделски и шумски екосистеми, беа поставени јасни цели на истражување на овој труд:

- **Опсервација на здравствената состојба на шумите, шумските насади и расадници, како и земјоделските (овошни) насади во однос на овие организми на територијата на Република Македонија**, со цел детектирање симптоми специфични за *Phytophthora* видовите.
- **Колектирање примероци почва и растителен материјал со симптоми** кои насочуваат кон патогени организми од родот *Phytophthora*.
- **Изолација на чисти култури од видовите кои припаѓаат на родот *Phytophthora***, со користење на неколку селективни антибиотици и фунгициди во хранливите медиуми во кои се изолираат и култивираат овие организми со специфичен животен стил и намалена конкурентност во однос на други „вистински“ габи кои во лабораториски услови растат побрзо од целните организми.
- **Идентификација на културите со користење на морфолошки и на молекуларни методи**. Изолацијата на чисти култури не би била доволна доколку истите не се идентификуваат до ниво на вид со помош на верификувани методи. Користењето на морфолошка идентификација треба да биде проследено со изолација на ДНК и на нејзино секвенционирање со помош на молекуларни маркери, за да биде точно одреден видот, но и за да може да се споредува сродноста на изолатите кои припаѓаат на ист вид а се колектирани на различни видови растенија-домаќини.
- **Сторнирање на колекција живи култури од родот *Phytophthora***, кои би послужиле за натамошни истражувања.
- **Оценка на патогеноста на детерминираниите култури**. Детектираните култури треба да бидат тестирани за патогеност кон домаќинот од кој биле изолирани. Главна причина за тоа е одговор на прашањето дали овој детектиран организам е причинител на симптомите на болеста кои ги манифестира домаќинот, или симптомите се манифестација на друг причинител на болест.

- **Изработка на карта на распространетост и диверзитет на видовите *Phytophthora* на територијата на Република Македонија.** Информацијата за распространетост на видовите е битна од аспект на преземање на мерки за заштита и локализирање на причинителите на заболување, но и можност да се открие евентуален начин на интродукција и дисеминација, доколку се работи за *Phytophthora* видови кои се сметаат екзотични за Европа или за регионот, односно за досега непознати во овој дел на светот.

- **Да се предложат превентивни мерки, како и мерки за заштита од организмите од родот *Phytophthora*.** Познавањето на моменталната здравствена состојба на истражуваните видови растенија домаќини, било индивидуално или од аспект на популации, во однос на видовите од родот *Phytophthora* како предизвикувачи на болест, не значи многу од практичен аспект, доколку не се дадат предлог превентивни и заштитни мерки и совети.

Горенаведените аспекти беа формулирани како со научна така и со практична цел според моменталната состојба на ова поле во Република Македонија.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД НА РАБОТА

2.1. КОЛЕКЦИЈА НА ПРИМЕРОЦИ, ИЗОЛАЦИЈА И МОРФОЛОШКА ИДЕНТИФИКАЦИЈА

2.1.1. Избор на локалитети за истражување

Теренските работи се одвиваа во периодот од 2010 до 2017 година. Целни локалитети за инспекција, процена и колекција на примероци заради изолација, беа оние за кои имавме информации дека биле забележани симптоми, било од наши прелиминарни истражувања, било преку комуникација со колеги истражувачи или од пракса. Истражувањето беше спроведено како во локалитети во шумски така и во локалитети во земјоделски екосистеми, во повеќе региони низ Македонија.

2.1.2. Избор на локалитети во шумски екосистеми

За време на ова истражување беа опсервирани и колектирани примероци од вкупно 36 локалитети, и тоа 21 природен или вештачки подигнат насад во шумски екосистеми, 9 расадници на Шумскостопански единици во сопственост на ЈП „Македонски шуми“ и 6 расадници на приватни сопственици (табела 1). Притоа за време на колектирањето примероци почва, корења и некротирано ткиво опфатени беа 41 растителен вид како домаќини. Од вкупно 205 колектирани примероци (почва, корења и некротирано ткиво), 162 (79%) примероци беа од растенија-домаќини кои имаа манифестиран било каков симптом на сушење, редуциран раст, редуцирана крошна или намалена виталност, додека 43 (21%) примероци беа од растенија-домаќини без манифестиран било каков симптом на болест.

Табела 1. Опсервирани локалитети во шумски екосистеми

Table 1. Observed sites in forest ecosystems

Шумски екосистеми			
Forest ecosystems			
Број на локалитети	Број на растенија	Симптоматски	Асимптоматски
Number of sites	домаќини	примероци	примероци
	Number of host	Symptomatic	Asymptomatic
	plants	samples	samples
36	41	162 (79%)	43 (21%)

2.1.3. Избор на локалитети во земјоделски екосистеми

Опсервирани беа вкупно 17 насади на 17 локалитети во земјоделски екосистеми (табела 2), притоа сите насади беа во приватна сопственост. Вкупно беа опфатени 3 видови растенија-домаќини, но со опфатени повеќе сорти по вид. Од вкупно 93 колектирани примероци (почва, корења и некротирани ткиво), 74 (80%) примероци беа од симптоматски растенија-домаќини, додека 19 (20%) примероци беа од асимптоматски растенија-домаќини.

Табела 2. Избор на локалитети за опсервација во земјоделски екосистеми

Table 2. Observed sites in agricultural ecosystems

Земјоделски екосистеми			
Agricultural ecosystems			
Број на	Број на растенија	Симптоматски	Асимптоматски
локалитети	домаќини	примероци	примероци
Number of sites	Number of host	Symptomatic	Asymptomatic
	plants	samples	samples
17	3	74 (80%)	19 (20%)

Обсервираните локалитети се прикажани на карта 1, подолу, додека точките каде се колектирани примероци од секој локалитет се прикажани на карта 2.



Карта 1. Карта на Република Македонија со дистрибуција на локалитети од каде се колектирани примероци за анализа

Map 1. Sites distribution map of the Republic of Macedonia for collected samples for analysis



Карта 2. Карта на дистрибуција на колектирани примероци за анализа

Map 2. Distribution map of collected samples for analysis

2.1.4. Колектирање примероци почва

Стебла односно садници на кои беа забележани симптоми на заболување, слични на оние предизвикани од *Phytophthora* видовите беа детално опсервирани и од нив беа колектирани почвени примероци од деловите на ризосферата, фрагменти од корења како и кора од местата каде имаше видливи лезии или сокотечение (фотографија 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7). Во популациите од питом костен *Castanea sativa* на локалитетите Калишта (Струга), Осој (Кичево), Требеништа (Охрид), Кале (Тетово), Вратница (Тетово) и Смолари (Струга), каде постоеја субпопулации со приближно еднаква возраст, извршено беше колектирање на примероци како од субпопулации со присуство на симптоми, така и од популации без присуство на симптоми. Целта на ваквиот начин на колектирање беше да се да се оцени присуство на целниот организам во асимптоматски примероци. Самата техника на колектирање се одвиваше на следниот начин:

- 1) Почвените примероци беа колектирани од 3 различни страни на стеблото- домаќин откако беше претходно отстранет површинскиот органски слој. Трите индивидуални колектирани примероци (секој со зафатнина сса 25 cm x 25 cm x 25 cm) од еден домаќин, беа заедно споени и измешани во иста стерилна пластична ќеса и транспортирани во лабораторија.
- 2) Примероци од лезии или некротирано ткиво (најчесто од базалниот дел на стеблото) или фрагменти од корења беа колектирани со помош на нож или секира, стерилизирани со 70% алкохол.

Примероците од секаков вид беа пакувани во стерилни пластични кеси. Овој метод е опишан од страна на (Jung and Blaschke (1996); Jung et al., 2000; Jung and Burgess, 2009a). До моментот на изолација, колектираните почвени примероци беа чувани на собна температура, додека примероците кора беа чувани на температура од 4°C.



Фотографија 1. Симптоми на сушење во леи на *Cupressus arizonica*, чемпрес
(Расадник Лопушник, ШСЕ Кичево)

Figure 1. Dyeback symptoms in *Cupressus arizonica* beds, cypress (Nursery
Lopusnik, PE Kicevo)



Фотографија 2. Симптоми на сушење на фиданки *Robinia pseudoacacia*,
багрем (близина на с. Теново, Тетово)

Figure 2. Dyeback symptoms on *Robinia pseudoacacia* shoots, black locust (near v.
Tetovo, Tetovo)



Фотографија 3. Проретчена крошна на *Juglans regia*, орев (с. Теново, Тетово)
Figure 3. Transparent crown of Juglans regia, walnut (v. Tenovo, Tetovo)



Фотографија 4. Симптоми на сушење на *Alnus glutinosa*, евла (с. Теново,
Тетово)
Figure 4. Dieback symptoms on Alnus glutinosa, black alder (v. Tenovo, Tetovo)



Фотографија 5. Проретчена круна на стебла *Morus nigra*, црница (с. Ново Село, Струмица)

Figure 5. Transparent crown on *Morus nigra* trees, black mulberry (v. Novo Selo, Strumica)



Фотографија 6. Симптоматски стебла *Castanea sativa*, питом костен (с. Калиште, Струга)

Figure 6. Symptomatoс trees *Castanea sativa*, sweet chestnut (v. Kaliste, Struga)



Фотографија 7. Симптоматски стебла *Malus domestica*, јаболко (с. Мислешево, Струга)

Figure 7. Symptomatic trees *Malus domestica*, apple (v. Mislesevo, Struga)

2.1.5. Изолација на чисти култури од почвени примероци

Во прелиминарните истражувања беа применети неколку методи за изолација на култури од *Phytophthora* видовите. Така, најпрвин беше користена една од класичните методи на изолација, со директно поставување инокулум од колектираниот почвен материјал на плодови од јаболко (Грени Смит) и на круша (Tsao, (1983), цитирано во Erwin and Ribeiro (1996)) . Избирани беа нецелосно зрели и здрави плодови, без површински оштетувања, истите беа површински исчистени со минимални количини течен детергент и добро измиени и исушени со стерилна филтер хартија. Со стерилен скалпел, на плодовите беше направен отвор со приближна големина сса 1 x 1 cm. Отворот беше инокулиран со почва, навлажнета со стерилна дестилирана вода. Отворот беше покриен со парафилм и вазелин со цел да се избегне губење на влажноста во инокулумот почва. Инкубирањето беше на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно. После евентуално инвадирање на ткивото од плодот со *Phytophthora* spp. се појавуваше некроза, од чии маргини мали инокулуми (сса 3 x 3 mm) беа поставувани на селективна хранлива подлога (PARPNH или CARP+), со забивање под површина на подлогата. При пораст на мицелија истата беше пресадена на хранлива подлога (V8 agar, MEA или PDA) со цел добивање чиста култура.

Друг користен метод за изолација на *Phytophthora* spp. беше со користење на плодови од јаболко (Грени Смит) и на круша како мамка (Tsao, (1983) цитирано во (Erwin and Ribeiro, 1996)). За оваа цел почвениот примерок беше потопен (1-2 cm над површината од почвениот слој) со стерилна дестилирана вода и оставен да отстои 48 часа во пластичен сад, пред да бидат додадени плодовите од јаболко или круша како мамки. За оваа цел користените плодови беа избрани со цел што помалку созреани и што помалку физички повредени. Плодовите беа површински исчистени со минимални количини течен детергент и добро измиени и исушени на стерилна филтер хартија. После поставувањето на плодовите во почвениот примерок, пластичните контејнери беа поставени во темно на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$) и беа набљудувани после 2-3 дена. Плодовите каде беа регистрирани лезии, беа внимателно измиени со стерилна дестилирана вода. Мали инокулуми сса 3 x 3 mm од маргините на лезија на плодот беа отсечени со стерилен скалпел и поставени селективна хранлива подлога (PARPNH или CARP+), со забивање на инокулумот под површина на хранливата подлога. Инспекцијата за појава на пораст на мицелија од инокулумот се одвиваше секој ден. При евентуален пораст на мицелија, културата беше пресадена во друг петри сад со една од хранливаите подлоги за култивирање (V8 agar, MEA или PDA).

Следна користена метода беше со директна изолација од почва и растителен материјал на селективна хранлива подлога PARPNH или CARP+ (Erwin and Ribeiro, 1996). За целта директна изолација од почвен примерок, измерени беа 5 g почва и истата суспендирана во 20 ml стерилна дестилирана вода. Суспензијата беше излевана во петри садови со селективна хранлива подлога (PARPNH или CARP+). Инспекција за пораст на мицелија се вршеше секој ден, и во случај на појава на пораст на мицелија истата беше пресадувана во петри сад со хранлива подлога за култивирање (V8 agar, MEA или PDA). За целта на директна изолација од растителен материјал (промероци кора и дрвно ткиво, колектирани од маргини на лезија) истиот беше потопуван во сад со стерилна дестилирана вода, со неколкукратна промена на водата сè до измивање на присутните шеќери и танини кои би фаворизирале развој на конкурентски организми на селективната хранлива подлога за изолација. Алтернативно, примероците растителен материјал беа оставани под млаз вода преку ноќ. Мали фрагменти сса 3 x 3 mm беа поставувани на селективна хранлива подлога за

изолација (PARPNH или CARP+) со забивање под површина на подлогата. Инспекција за пораст на мицелија се вршеше секој ден и при евентуален пораст истата беше пресадувана на хранлива подлога за одгледување (V8 agar, MEA или PDA).

Последен метод кој беше користен за изолација на *Phytophthora* spp., е методот со листови како мамка, и започнуваше со издвојување 250-300 грама почва, заедно со коренови фрагменти и се поставуваше во стерилни пластични контејнери со димензии 25 cm x 12 cm x 7 cm. Во садовите се ставаше стерилна дестилирана вода, внимавајќи површината на водата да биде најмногу 2 cm над површината на почвата (фотографија 11). Со помош на стерилна филтер хартија, механички се прочистуваше површината на водата, односно се отстрануваа најразновидни органски остатоци од почвениот материјал. Овие остатоци се потенцијални носители на други сапробни организми, но и би можеле да ја спречат инфекцијата на листовите од страна на целниот организам.

По прочистувањето на површината на водата, и откако почвата и кореновите фрагменти ќе се наталожеа на дното од почвената суспензија, на површина на водата беа поставувани млади листови од различни видови растенија. Тие служат како мамки за ослободените зооспори од спорангиите настанати при `ртење на половите или на бесполови структури доколку се присутни во почвата. Различни автори во зависност од домаќинот од каде е колектиран примерокот и во зависност од достапност на листови, користеле различни видови листови како мамка. На пример, за изолација на *P. ramorum* најчесто користени листови како мамка се листови од рододендрон (Hwang et al., 2008; Vercauteren et al., 2013), рододендрон и tanoak (Hansen et al., 2008); за изолација на *P. cinnamomi* биле користени листови од авокадо (Pegg, 1977), камелија и рододендрон (Ghimire et al., 2009) како и други листови; за изолација на *P. nicotianae* користени биле листови тутун (Jenkins, 1962), листови од соја (Mohammadi, 2012), листови од рододендрон (Bush, 2002); или, за изолација на *P. palmivora* користени биле листови од црн бибер (HOLLIDAY, 1963). Бидејќи во нашето истражување имавме широк дијапазон на домаќини, а според тоа и потенцијално голем број видови *Phytophthora*, во зависност од достапноста на млади листови, односно од сезоната, користевме листови од различни видови, и во одредени случаи по повеќе во иста почвена проба, односно во групи проби.

Користевме азалеа (*Rhododendron* sp.), ловорвишна (*Prunus lourocerasus*), даб благун (*Quercus pubescens*), даб горун (*Q. petraea*), македонски даб (*Q. macedonica*), бука (*Fagus toesiaca*) и махонија (*Mahonia aquifolium*) (фотографија 11) и тоа во различни комбинации за различни почвени примероци (Tsao, (1983), цитирано во (Erwin and Ribeiro, 1996)).

Пластичните контејнери се покриваа со капак заради заштита од испарување на водата и од контаминација, но се оставаше простор за пристап на воздух, и можност за вентилирање (фотографија 8). Пластичните контејнери се чуваа на темно, на собна температура, која се движеше во рангот од $24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$.

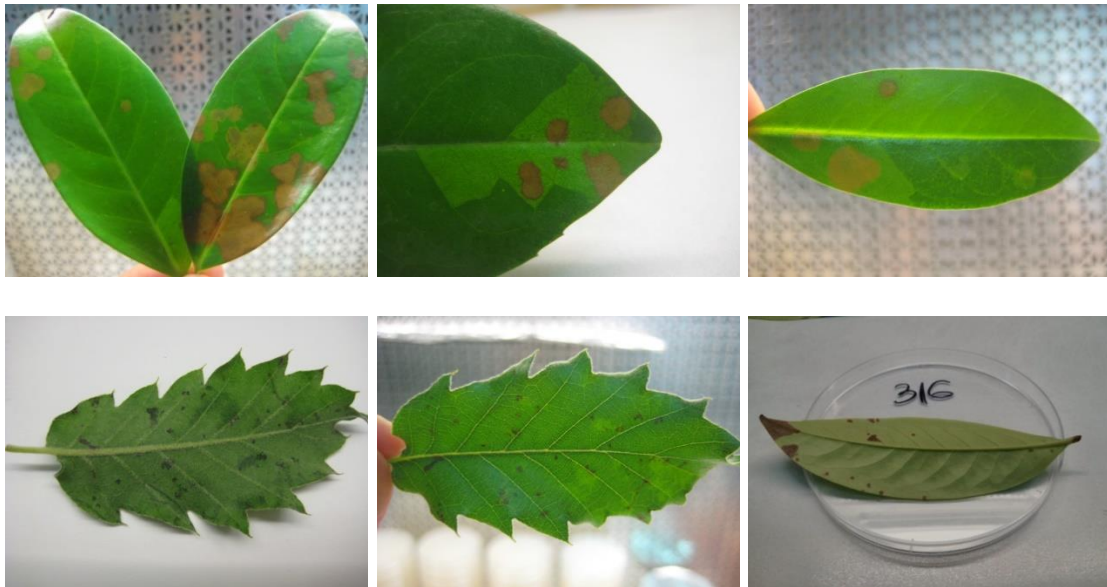


Фотографија 8. Поставување на метод на мамка

Figure 8. Setting the bait method

После поставувањето како мамка, листовите беа секојдневно опсервирани за појава на некротирани дамки. По регистрирањето некротирани дамки (меѓу 1 mm и 3mm) како дополнителен симптом дека некротираниите дамки се предизвикани од некој од *Phytophthora* видовите, листовите на кои беа

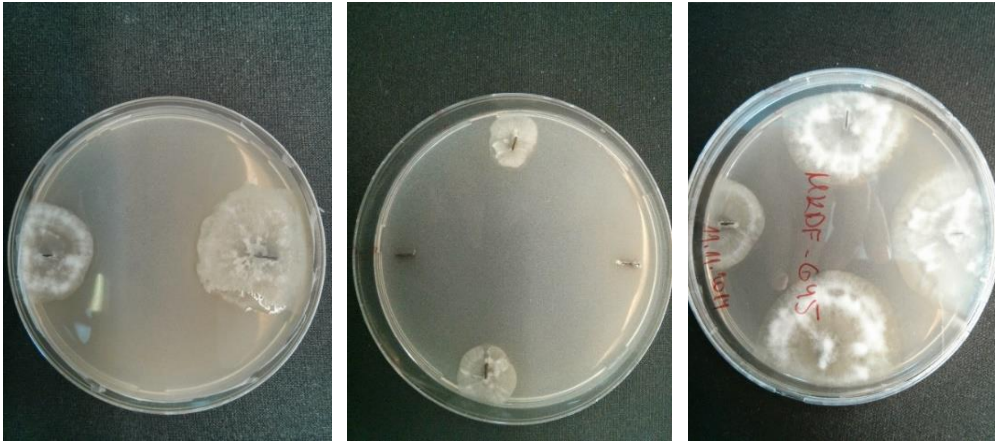
регистрирани некротирани дамки (фотографија 9) беа набљудувани со помош на бинокулар заради евентуално утврдување присуство на спорангии на некротирано ткиво. Присуството на спорангии укажуваше на присуство на патогенот во почвениот примерок. Во случај кога листовите на чии дамки беа регистрирани спорангии не резултирале со изолација на култура од *Phytophthora* spp., постапката се повторуваше со поставување нови мамки.



Фотографија 9. Користени листови како мамки со регистрирани некротирани дамки

Figure 9. Used bait leaves with necrotic spots registered

Помали фрагменти (ска 2 x 2mm) од дамките некротирано ткиво беа сечени со скалпел и поставувани на селективна хранлива подлога (PARPNH или CARP+) и инкубирани на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно. Изборот на фрагменти од маргини на некротирано ткиво на листот мамка беше правен на „периферната“ половина од листот (спротивно од дршката) бидејќи дршката се смета како точка од каде листот побрзо би го инвадирале видовите *Pythium* пред да го инвадираат видовите *Phytophthora* (Erwin and Ribeiro, 1996). Петри садовите со инокулуми беа секојдневно опсервирани на бинокулар за појава на хифи (Фотографија 13). Регистрираните хифи беа пресадувани на свежа V8 Agar хранлива подлога заради натамошни анализи и сторнирање на чисти култури.



Фотографија 10. Инокулирани фрагменти од листови мамки на селективна хранлива подлога, после 7 дена инкубација на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно

Figure 10. Inoculated bait leaves fragments on selective nutritios media, after 7 days incubation on room temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), on dark

2.1.6. Изолација на чисти култури од некротирано ткиво и корења

Колектираните примероци од некротирано ткиво и корења, најпрво беа испирани во стерилна дестилирана вода. После испирањето примероците беа сушени на стерилна филтер хартија и истите беа сецкани на помали фрагменти со димензии од неколку квадратни милиметри и беа стерилизирани со потопување во 70% алкохол и пламен за да на крај бидат поставени на селективна хранлива подлога (PARPNH или CARP+) (Jung, 2009).

После неколкудневно инкубирање, чистите култури беа пресадени на 3 типови на хранливи подлоги, компир декстроза агар (PDA), V8 агар и малт екстракт агар (MEA) за понатамошни анализи. После неколку дена инкубација беа набљудувани заради утврдување на нивниот развој и беа реизолирани на секои 6-8 недели на свежа хранлива подлога (PDA), заради задржување на нивната виталност. Културите се сторнирани односно се чуваат на температура $8-12^{\circ}\text{C}$ со пресадување на секои 6-8 недели, во колекцијата на Шумарскиот факултет во Скопје.

2.1.7. Користени хранливи подлоги за изолација и одгледување на изолатите

Имајќи ги предвид сложениот развоен циклус на организмите од родот *Phytophthora*, потребното време за изолација и цената на селективната хранлива подлога која се користи за изолација, усовршувањето на метод на изолација, идентификација и чување на овие организми беше наметнато како многу важен елемент во истражувањето.

За изолација на организмите од родот *Phytophthora* беа користени 2 вида селективни хранливи подлоги, и тоа:

- V8 Agar PARPNH (1L)(Jung et al., 1996):

- 200 ml V8 сок (Campbell Foods, Belgium)
- 800 ml дестилирана H₂O
- 20 g Agar (Biolife, technical use)
- 3 g CaCO₃ (Sigma-Aldrich)

Смесата од горенаведените состојки беше автоклавирана 15 минути на 120°C, при што откако истата беше изладена на температура од околу 55°C, беа додадени:

- 10 mg Pimaricin
- 200 mg Ampicillin
- 10 mg Rifampicin
- 25 mg PCNB (Pentachloronitrobenzene)
- 50 mg Nystatin,
- 50 mg Hymexazol (Tachigaren)

- CARP + (Saavedra et al., 2007)

- 15 ml Corn meal Agar (BBL, Becton, Dickinson and Company Sparks, France)
- 1 L дестилирана H₂O
- 3 g CaCO₃ (Sigma-Aldrich)

Смесата од горенаведените состојки беше автоклавирана 15 минути на 120 °C, при што откако истата беше изладена на температура од околу 55 °C, беа додадени:

- 10 mg Pimaricin
- 200mg Ampicillin
- 10 mg Rifampicin
- 25 mg PCNB (Pentachlornitrobenzene)
- 50 mg Nystatin,
- 50 mg Нумехазол (Tachigaren)

Улогата на селективната хранлива подлога кон видовите од родот *Phytophthora* е да дозволи раст на колониите од овој род, а да го оневозможи или забави растот на останатите микроорганизми присутни во пробата, вклучувајќи габи, псевдо-габи и бактерии. Користењето на една од горенаведените селективни подлоги не може потполно да го инхибира растот на конкурентските габи или псевдо-габи (на пример оние од родот *Pythium*), но може привремено да го забави растот на останатите организми со помош на дејството на Tachigaren/Нумехазол, со што се овозможува доволно време и простор за пресадување на врвовите на хифите на свежа подлога во друг Петри сад.

За добивање чисти култури, како и заради нивна идентификација, обсервации, мерења и сторнирање, изолатите беа одгледувани на 3 типа хранливи подлоги, и тоа:

- Малт екстракт агар (МЕА):

- 20 g/L малт екстракт (Difco),
- 15 g/L Агар (Biolife, technical use),
- 1 L дестилирана вода.

Смесата беше автоклавирана 15 минути на 120 °C, и после изладување на околу 55 °C беше излевана во Петри садови.

- Компир декстрога агар (PDA):

- 39 g/L компир декстроза агар (DIFCO),
- 1 L дестилирана вода.

Смесата беше автоклавирана 15 минути на 120 °C, и после изладување на околу 55 °C беше излевана во Петри садови.

- V8 Agar:

- 20 g/L Агар (Biolife, technical use)
- 150 ml V8 сок (Campbell Foods, Belgium)
- 3 g/L CaCO₃ (Sigma-Aldrich),
- 850 ml дестилирана вода.

2.1.8. Морфолошка анализа на културите

Сите добиени изолати беа култивирани на собна температура (24 °C ± 4 °C) во темно. За целта на морфолошките анализи беа користени петри садови со редуцирана количина хранлива подлога (V8 agar, PDA или MEA), и тоа 10-12 ml (во споредба со вообичаената количина од 20-25 ml). Редуцираната количина хранлива подлога во Петри садот има предност заради подобрата транспарентност на подлогата, а со тоа и подобра видливост на структурите при опсервација на културите како и заради документирање на истите. Со цел оценка на просечниот дневен пораст, културите беа следени на собна температура (24 °C ± 4 °C), во темно, до исполнување на петри садот. Вредноста на просечен дневен пораст беше пресметана како збир од вредностите за дневен пораст за секој мерен ден, поделена со бројот на мерни денови. После 3-4 неделен развој на културите со помош на бинокулар (Carl Zeiss Stemi 305 со зголемување до x 4, опремен со специјализирана камера AxioCam 105, и софтвер ZEN 1 и ZEN 2) и светлосен микроскоп (NIKON ECLIPSE e400, со зголемување до x100, опремен со дигитален фотоапарат Nikon D90+ и софтвер NKRemote) истите беа опсервирани со цел утврдување присуство на плодни тела од полово (ооспори, антеридии и оогонии) и вегетативно потекло (хламидоспори, задебелувања (swellings) и орнаментти на хифите). Заради иницирање и стимулација за образување плодни тела од типот спорангии, по неколку инокулуми свежа

мицелија (од периферен дел на порастот во Петри садот) со големина приближно 1 x 1 cm беа поставувани во Петри сад и прелиени со нестерилен почвен екстракт (Non sterile soil extract solution - NSSSES) подготвен според рецептот на (Erwin and Ribeiro, 1996). Нестерилниот почвен екстракт беше испиран од инокулумите со помош на стерилна дестилирана вода, по што се пристапуваше кон микроскопирање (Jung and Burgess, 2009b).

Забележаните карактеристики и структури беа документирани и споредени со клучот на Erwin and Ribeiro (1996), еден од неколкуте најпознати за идентификација на *Phytophthora* видовите. Измерени беа големините на забележаните плодни структури а просечна големина беше пресметана како аритметичка средина од 20 вредности за секоја од структурите. Освен тоа, како референтни изолати беа користени дел изолати од колекцијата на Др. Даниел Риглинг од WSL институтот, Бирменсдорф, Швајцарија. Освен преку користење клуч и референтни изолати, дефинитивната идентификација се базираше на молекуларни методи кои се опишани подолу.

2.2. МОЛЕКУЛАРНА ИДЕНТИФИКАЦИЈА

Имајќи предвид дека во последните 15 години се објавуваат голем број на новоопишани видови и таксони (Brasier 2009; Jung et al., 2011; Nechwatal et al., 2012; Kroon et al., 2012; Martin et al., 2014) чии карактеристики не се наведени во претходно споменатиот користен клуч за морфолошка идентификација (Erwin and Ribeiro, 1996), како и фактот дека постојат морфолошки клучеви кои не ја следат природната поделба на овој род на видови комплекси на *sensu stricto* видови (Kroon et al., 2004), неопходно е да се изврши молекуларна идентификација на добиените репрезентативни изолати и да се потврдат наодите од морфолошките анализи.

За потребите на молекуларните анализи беа одбрани изолати кои според морфолошките карактеристики беа потврдени дека припаѓаат на родот *Phytophthora*. За таа цел репрезентативните изолати беа одгледани на хранлива подлога (PDA) на собна температура, во темно, се додека не беше исполнет петри садот. Потоа се пристапуваше кон површинско колектирање мицелија со помош на спатула. Колектираната мицелија беше поставувана во епендорф тубички со големина 2 ml.

Тубичките со површински колектирана мицелија беа чувани на -20°C во темно сè до процесот на лиофилизација (сушење на температура од -20°C и при вакуум). Процесот на лиофилизација се одвиваше во лабораторијата за генетика при Факултетот за земјоделски науки и храна во Скопје со помош на изведен лиофилизатор (Labconco, Edwards 5). Леофилизацијата се вршеше со помош на ладен вакуум за времетраење од 24 часа (фотографија 11). Леофилизираните примероци мицелија беа понатаму гмечени до приближна големина на партикулите до 10^{-9}mm , со помош на стерилна метална куглица со големина од 2mm поставувана во епендорф тубичките со лиофилизирана мицелија, а со помош на машина за дисмембрација, гмечење (Qiagen TissueLyser II, фотографија 12).



Фотографија 11. Користена опрема за лиофилизирање на примероци мицелија

Figure 11. Equipment used for lyophilization of mycelial samples



Фотографија 12. Користена опрема за гмечење на примероци лиофилизирана мицелија

Figure 12. Equipment used for grinding lyophilized mycelial samples

Користени беа 3 методи за изолација на ДНК:

2.2.1. Метод со SEVAG (Lee, 1990)

Потребни реагенси:

- Lysis buffer
 - 50 mM Tris - HCl (pH 7.2)
 - 50 mM EDTA
 - 3% SDS
 - 1% 2-mercaptoethanol (се додава пред употреба)
- Chloroform : TE saturated phenol (1:1, v:v)
- SEVAG (chloroform:isoamyl alcohol, 24:1)
- 3 M NaOAc (pH 8.0)

Во епендорф тубички со зафатнина од 1,5 ml се става претходно лиофилизирана мицелија во течен азот до 1/3 од вкупната зафатнина. Се додава 500 µl lysis buffer и се вортексира додека не се добие хомогена смеса. Потоа се инкубира на температура од 65 °C за време од 1 час. После инкубацијата се додава 500 µl chloroform:phenol и кратко се вортексира. Се центрифугира при 12000 вртежи за време од 15 минути. После центрифугирањето, од бистрата течна фаза се одзема 350-400 µl (без да се земат клеточни остатоци) и се става во нова епендорф тубичка и се додава 500 µl Sevag и кратко се вортексира. Потоа се микроцентрифутира при 12000 вртежи за време од 15 минути. После центрифугирањето, од течната бистра фаза повторно се одземаат 350-400 µl и се ставаат во нова епендорф тубичка и се додава 20 µl 3M NaOAc, а потоа тубичките се дополнуваат со изопропанол. Тубичките се превртуваат внимателно неколку пати, при што би требало да се забележи преципитат со конци од ДНК. Потоа тубичките се центрифугираат при 12000 вртежи за време од 10 минути, за да се исталожи преципитатот од ДНК. Супернатантот внимателно се истура и следи измивање со 1 ml 70% етанол. Доколку при измивањето талогот се одлепи од сидот на епендорфот, содржината повторно се центрифугира при 12000 вртежи за време од 10 минути. Откако етанолот ќе се истури, тубичките се поставуваат превртени на сува мека хартија за време од 1 минута. Исушените тубички се

ставаат во инкубатор на температура од 50 °C за време од 10-15 минути за да се исушат. После инкубацијата, наталожената ДНК се ресуспендира со 100 µl TE Buffer и се чува на температура од -20 °C.

2.2.2. Метод со Guanidine thiocyanate (Chomczynski & Sacchi, 1987):

Потрбни реагенси:

- 5M guanidine thiocyanate
- 0.5M EDTA
- 10% w/v Sarcosyl (Na N-lauroylsarcosinate).

Овој метод беше користен во лабораторијата на Д-р Стивен Вудворд, Универзитет Абердин, Шкотска за време на краткорочна научноистражувачка посета (STSM, финансирана од COST Action FP0801 Established and Emerging Phytophthora: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe). За целта на методот, со помош на стерилна метална или пластична спатула површински се отстрануваше („гребаше“) мала количина мицелија (0.1g) од одгледаната културата и беше веднаш поставувана во пластични епендорф тубички со зафатнина од 2 ml во кои претходно беше додадено 100 µl гуанидин тиоцијанат пуфер [5M guanidine thiocyanate, 0.5M EDTA, 10% w/v Sarcosyl (Na N-lauroylsarcosinate)]. Тубичките беа инкубирани на 65 °C во времетраење од 20 минути, потоа беше додадено 100 µl isopropanol и беа инкубирани на 4 °C во времетраење од 1 час. Потоа тубичките беа центрифугирани на 13.000 rpm во времетраење од 20 минути, супернатантот беше отстранет и тубичките беа измивани со 250 µl 100% ethanol, проследено со 70 % ethanol (со 5 минутно центрифугирање на 13000 rpm). Пелетките наталожена ДНК беа на крај исушени и растворени во 100 µl вода за молекуларни анализи (Sigma-Aldrich DNase, RNase free) и сторнирани на -20 °C.

2.2.3. Метод според PureLink™ Plant, Total DNA Purification Kit (кит за изолација на ДНК) :

Сетот реагенси за овој кит се состои од следниве ставки:

- Elution buffer
- Binding buffer
- Precipitation buffer
- Resuspension buffer
- Wash buffer W4
- Wash buffer W5
- 20% SDS
- RNase A

Подготовката на реагенсите беше со додавање на 11,5 ml 96-100% етанол во тубичката со 7,5 ml Binding Buffer, и со додавање на 40 ml 96-100% етанол во тубичката со 10 ml Wash Buffer, после што следеше процесот на изолација на ДНК.

Користено беше максимум 100 mg лиофилизирана згмечена мицелија од секоја култура во епендорф тубичка. Додадено беше 250 µl Resuspension Buffer и секоја тубичка беше вортексирана додека суспензијата убаво не се измеша. Додадено беше 15 µl 20% SDS и 15 µl RNase A и тубичките беа инкубирани на 55 °C за времетраење од 15 минути. Тубичките беа центрифугирани на висока брзина за времетраење од 5 минути со цел да се отстранат нерастворливите материи. Бистриот супернатант беше пренесен во стерилна 1,5 ml епендорф тубичка без да се вознемирува наталожениот пелет. Додадено беше 100 µl Precipitation Buffer со цел да се исчисти лизатот. Тубичките беа вортексирани за да се измеша содржината и потоа беа инкубирани на мраз за времетраење од 5 минути. Тубичките беа центрифугирани на максимална брзина за времетраење од 5 минути со цел да се формира бистар лизат. Пренесено беше 250 µl од бистриот лизат од секоја тубичка во нова стерилна тубичка и во секоја додадено беше 375 µl Binding Buffer и секоја тубичка убаво беше промешана. Содржината од секоја тубичка беше пренесена во Спин кертриџ од китот кои претходно беа поставени во колекциона тубичка, а потоа центрифугирани на 10000 x g во времетраење од 30 секунди. Содржината од колекционите тубички беше отстранета и во кертриџите додадено беше по 500 µl Wash Buffer A и потоа кертриџите беа

центрифугирани на 10000 x g во времетраење од 30 секунди. Содржината од колекционите тубички беше отстранета и во контејнерите со филтер за селективна пропустливост на супстанции (кертрици), додадено беше по 500 µl Wash Buffer В и потоа кертриците беа центрифугирани на 10000 x g во времетраење од 30 секунди. Содржината од колекционите тубички беше отстранета и празните кертрици беа центрифугирани на максимална брзина за времетраење од 2 минути со цел да се отстранат сите резидуи и потоа колекционата тубичка беше отстранета. Кертриците беа поставувани во стерилни DNase-free 1,5 ml епендорф тубички и додадено беше 100 µl Elution Buffer во секој кертриц. После 1 минута инкубирање на собна температура, кертриците беа центрифугирани на максимална брзина во времетраење од 1 минута. После оваа постапка секоја епендорф тубичка во која беше ставен кертриц ја содржеше изолираната ДНК.

2.2.4. Полимеразна верижна реакција

Користењето на процесот на последователна полимеразна верижна реакција или PCR (Polymerase chain reaction) или рестрикција на делови од геномот на рибозомалната ДНК (rDNA) овозможуваат брза идентификација на *Phytophthora* видовите (Cooke et al., 2000b; Cooke et al., 2000c). Регионите ITS1, 5.8S и ITS2 можат да бидат амплифицирани од чисти култури. За таа цел користени беа универзалните прајмери за видовите од родот *Phytophthora*, и тоа ITS4 (White et al., 1990) и ITS6 (Cooke et al., 2000), табела бр.:4 .

Табела 3. Користени прајмери за процесот на полимеразна верижна реакција

Table 3. Used primers for the polymerase chain reaction process

Код на прајмер (ITS)	Секвенца Sequence	Извор Source
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC (T 49,7° C)	White et al., 1990
ITS 6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG (T 52,4° C)	Cooke et al., 2000

За целта на полимеразна верижна реакција запремината на тубичката беше 22,5 µl и содржеше состојките прикажани во табела 5. Процесот на

полимеразна верижна реакција беше извршен во фитопатолошката молекуларна лабораторија на Др. Кирил Сотировски при Шумарскиот факултет во Скопје. Користена беше Termal cycler Techne TC-412, а редоследот на циклусите на реакции е прикажан во табела 6.

Табела 4. Состојки на мастер микс за полимеразна верижна реакција

Table 4. Ingredientis for the polymerase chain reaction master mix

Состојка Ingredient	Почетна концентрација Initial concentration	Волумен за 1 PCR смеса (μl) Volume per PCR sample	Конечна концентрација Final concentration
Стерилна вода Sterile water	*	16.4	*
Таq реакциски пуфер Taq reaction buffer	10 x	2.5	1 x
MgCl₂ раствор MgCl₂ solution	25mM	1.5	1,5 mM
dNTP микс dNTP mix	40mM вкупно	0.5	200 μ M sekoj
ITS-4 (10μM)	10 μ M	0.5	0,4 nM
ITS-6 (10μM)	10 μ M	0.5	0,4 nM
Таq DNA полимераза Taq DNA polymerase	5U / μ l	0.1	0,5 U/реакција
Калап Well	*	0.5	*

Табела 5. Редослед на циклуси за процесот на полимеразна верижна реакција

Table 5. Order of cycles for the process of polymerase chain reaction

Циклуси на PCR Cycles of the PCR	Температура во °C Temperature in °C	Времетраење Duration	Број на циклуси Number of cycles
Initial denaturation Почетна денатурација ⁵	95	3 секунди	1
Denaturation Денатурација	95	30 секунди	
Annealing Закачување на прајмери ⁶	55	30 секунди	35
Extension Издолжување ⁷	72	50 секунди	
Final extension Конечно издолжување ⁸	72	10 минути	1

После завршувањето на процесот на полимеразна верижна реакција, направена беше проверка со ставање на продуктот помешан со 5x обојувач (Loading Dye Blue; производител Sigma Aldrich) на 1% агарозен гел. За обојување на ДНА во примероците, со цел да може да биде видлива на UV светло се користеше SyberSave (Sigma Aldrich). После 60 минути електрофореза (120 Ма/Н) во ТВА пуфер гелот се опсервираше под UV светло (High performance UV

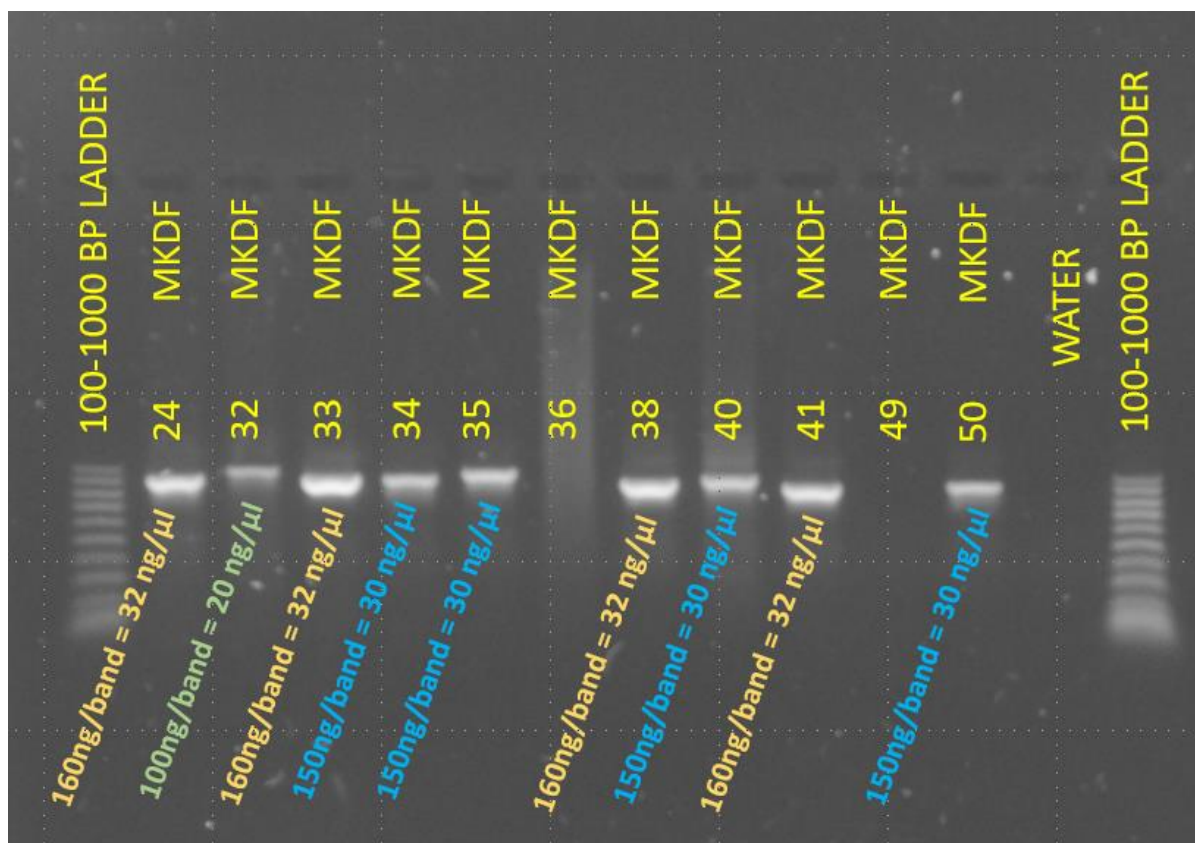
⁵ Изменување на молекуларната структура со кршење на водородни и други врски, при што ДНК од двојно спирална станува едно спирална.

⁶ Процес кога прајмерите се закачуваат за секоја од претходно одделените спирали на ДНК (под дејство на температура).

⁷ Процес кога Таq DNA полимеразата додава нуклеотиди на секоја од спиралите од процесот „annealing“

⁸ Процес кога Таq DNA полимеразата додава нуклеотиди на секоја од спиралите од процесот „annealing“ до должина на ДНК спиралите од пред почетната денатурација.

Transilluminator, UVP). Набљудуваните примероци кои покажуваа сигнал (band) од 800 - 900 bp (базни парови) ги оценувавме како успешни и беа користени за натамошно процесирање. Квалитетот на дел од примероците ДНА, односно нивната концентрација после процесот на PCR беше проверуван со помош на спектрофотометар (Thermoscientific, NANODROP 2000c) во лабораторијата за генетика при Факултетот за земјоделски науки и храна, Скопје, додека за останатиот дел беше користена искуствена метода при што окуларно се пресметуваше концентрацијата на ДНК според јачината на сигналот на агарозниот гел (лична комуникација со Др. Марин Језиќ, и група истражувачи на сајтот на Research Gate), во споредба со користената скала (PCR LOW LEADDER 100-1000bp) за која имавме податоци за концентрација (фотографија 16). Притоа, според спецификација на користената скала - маркер во агарозниот гел, секој од 10-те сигнали „свети“ како да има 50 ng, па според тоа секој сигнал за примероците ДНА во гелот беше споредуван со нив. Со тоа што вредноста беше поделена со 5, затоа што во агарозниот гел аплицирано беше 5 µl скала - маркер, додека секој ДНА примерок беше плициран со количина од 1 µl. Од друга страна користениот обојувач на гелот (SYBER SAFE) според спецификација може да обои минимум 3 ng (сигналот е едвај видлив), а максимум 100 ng (сигналот е силен и јасен а притоа да не биде размачкан). Ова беа 2 ограничувања со помош на кои се интерполираше во пресметката а на концентрација на ДНА во примерокот. Ваквиот метод се покажа како брз и многу практичен, но и точен, при пополнување на потребните информативни формулари за примероците ДНК кои беа пратени на секвенционирање (фотографија 13).



Фотографија 13. Проценка на концентрација на ДНК во споредба со користената скала-маркер на агарозен гел

Figure 13. Estimation of the DNA concentration according to the loading dye used on agarose gel

2.2.5. Секвенционирање

Продуктите од 96 ДНК примероци добиени од процесот на PCR беа секвенционирани во Source Bioscience Lifesciences (Sanger sequencing service), Шкотска, Велика Британија за време на посетата. Останатите 144 PCR продукти беа секвенционирани од страна на компанијата Macrogen, во Холандија (96 примероци) и Јужна Кореја (48 примероци). И во двата случаи беше испраќан PCR продукт на ДНК примероците чие „чистење“ од преостанатите протеински супстанции (purification) беше изведено од компанијата што го вршеше секвенционирањето.

Пополнетиот информативен формулар за примероци ДНК пратени на секвенционирање изгледаше како на фотографија 14.

1. Submission of primer name is **MANDATORY**. Put in the primer names that will be used on the plate.

2. Input the designated "number of sample" (given next to each well position in the chart) for the well position that the application of each primer will begin and end.

3-1. "X" will appear when primer is **NOT ENTERED**.

3-2. "X" will appear when there is/are any column with primer name but has no 'Start Position' or '&' and 'End Position' entered.

Primer Information		Primer #1	Primer #2	Primer #3	Primer #4	Primer #5	Primer #6
1. Name	ITS 4 (Forward)	ITS 6 (Reverse)					
2. Start Position	1	1					
End Position	96	96					
Sequence	TCCTCCGCTTATTGAT	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG					
Concentration	5uM	5uM					
Type	Enclosed	Enclosed					

Plate Name: MKD PHYTOPHTHORA

Well Type: Horizontal

Well Position	Sample Name	Conc	Primer #1	Primer #2	Primer #3	Primer #4	Primer #5	Primer #6	Product Size (bp)	Name of vector	Antibiotics
A1	1	10	ITS 4 (Forward)	ITS 6 (Reverse)					1000		
A2	2	16	ITS 4 (Forward)	ITS 6 (Reverse)					1000		
A3	3	20	ITS 4 (Forward)	ITS 6 (Reverse)					1000		
A4	4	18	ITS 4 (Forward)	ITS 6 (Reverse)					1000		

Фотографија 14. Пополнет информативен формулар за ДНК примероци пратени за секвенционирање

Figure 14. Filled informative form for DNA samples sent for sequencing

Анализата на добиените ДНК секвенци беше извршена со помош на BioEdit Sequence Alignment Editor (Open source) и DNADynamo. Добиевите секвенци после процесот на секвенционирање, не се подготвени за анализа. Со цел нивна проверка, потребно беше да се споредат податоците на хроматограмите за секоја секвенца со порамнување по должина на две секвенци за секој примерок ДНК и тоа за „forward“ и „reverse“ правец (фотографија 15). Секвенците после секвенционирање најчесто на почеток и на крај од секоја секвенца содржат податоци со отчитани базни парови со непрецизен или лош квалитет, најчесто во регионот на прајмерите за секвенционирање, и тоа на почеток, пред прајмерите прецизно да го започнат процесот на секвенционирање, како и на крај на секвенцата каде прајмерите постепено престануваат да ја функционираат. На овие два споменати региони најчесто на почетокот и на крајот на секоја од секвенците за „forward“ и „reverse“ правец потребно е овие региони со непрецизно отчитување да се отстранат, со цел да не ја насочат анализата на секвенцата во погрешен правец. Вклопувањето на секвенците за „forward“ и „reverse“ правец како и повеќе секвенци одеднаш се изведува автоматски од страна на софтверот, но дозволено е поставување на параметри за оваа цел со цел најдобра можно поклопување без разлика на правецот „forward“ и „reverse“ за секоја од секвенците. Откако ќе се постигне

поклопување секвенците за „forward“ и „reverse“ правец, и ќе бидат отстранети непрецизните и нејасни отчитувања за базни парови, се пристапува кон оценка на правилното софтверско отчитување базните парови аналогно на хроматограмот на секоја од секвенците, како и паралелна споредба за базните парови со хроматограмите за двата правци на секвенцата. Евентуалните грешки, беа мануелно поправени и тоа: со додавање на базен пар, онаму каде што според хроматограмот постои а според софтверското отчитување истиот е испуштен; со бришење на празни места (gaps) или дупки, каде според хроматограмот не постои базен пар а според софтверското отчитување треба да постои базен пар но не е наведен кој, тоа се такнаречени гапови; и со поместување на делови од секвенца во еден од двата правци заради неправилно софтверско отчитување кое може да се потврди и спореди со хроматограмите за двете секвенци. На крај од ова анализирање и едитирање се добива т.н. consensus секвенца која го содржи истиот редослед и број на базни парови за двете секвенци за „forward“ и „reverse“ правец. Оваа секвенца се запомнува во т.н. FASTA формат кој е подобен за понатамошни анализи и споредба со сродни или исти видови во дадена датабаза на секвенци (пр. BLAST во датабаза на нуклеотиди). Таквата консензус секвенца за ДНК примероците беше споредена со онлајн датабазата специјализирана за видовите *Phytophthora* (<http://www.phytophthoradb.org/>) (Zhang *et al.*, 2000).

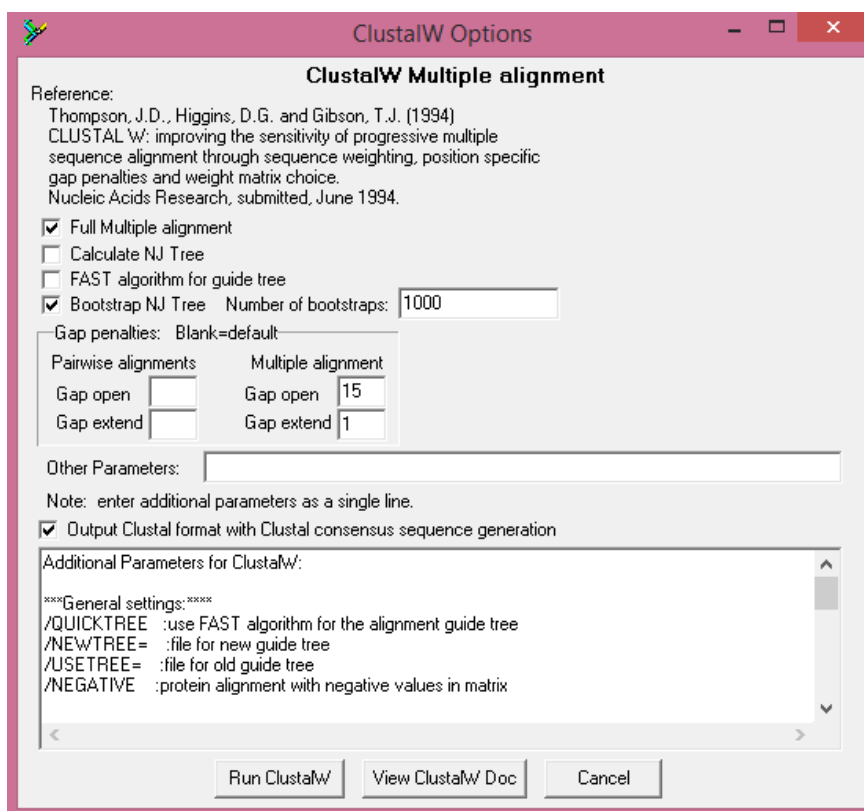


Фотографија 15. Хроматограми на ДНК секвенци во софтвер BioEdit Sequence Alignment Editor (горе), и DNADynamo (долу)

Figure 15. DNA sequences chromatograms using software BioEdit Sequence Alignment Editor (above), and DNADynamo (below)

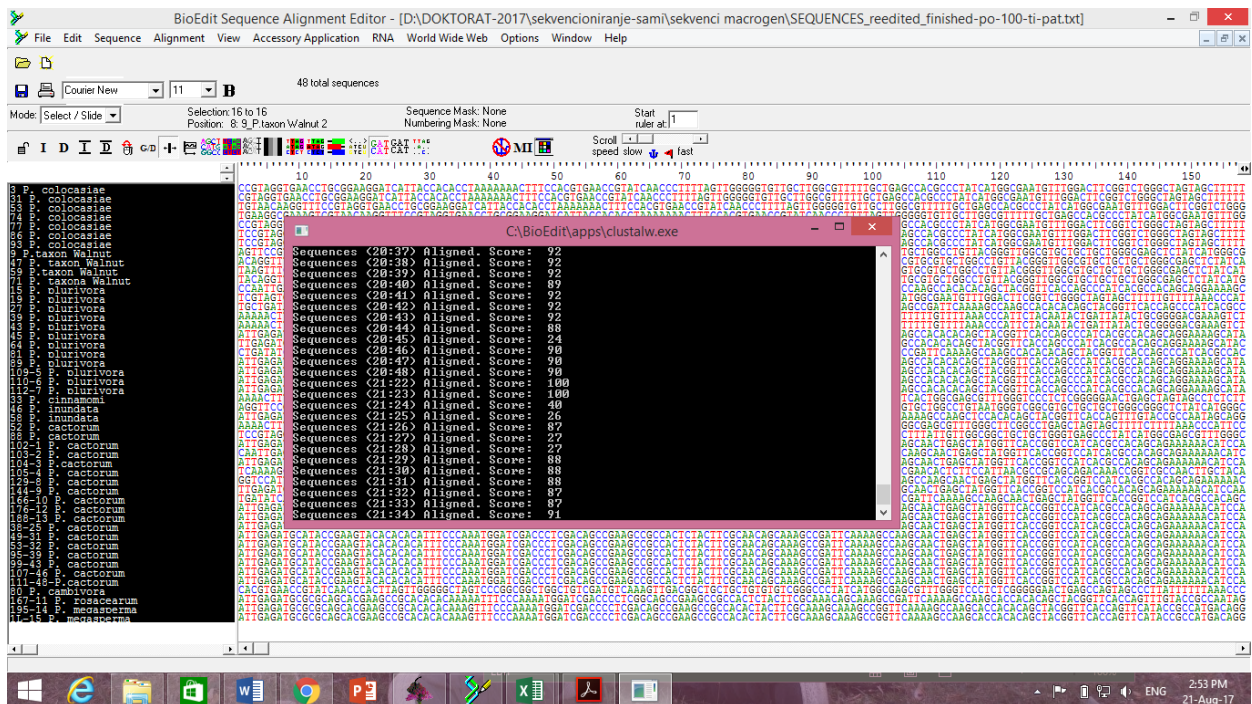
2.3. ФИЛОГЕНЕТСКИ АНАЛИЗИ

За целта на филогенетските анализи, добиените секвенци беа порамнети во Bioedit Sequence Alignment Editor софтверот, со користење на алатката ClustalW Multiple alignment (Thompson et al., 1994) со вредности за „bootstrap“ од 1000 единици, за „Gap extend“ 1 единица и „Gap open“ 15 единици (фотографија 19 и 20). Со помош на истиот програм изработен беше прегледен матрикс на сите порамнети секвенци, график со индексот Entropy (Hx) како мерка за непостојаност на одредена варијабилна, во дадениов случај имињата на базните парови на одредена положба во секвенцата, и матрикс со вредности за еволуциони разлики помеѓу видовите *Phytophthora*.



Фотографија 16. Нагодени параметри за порамнување секвенци во алатка ClustalW multiple alignment

Figure 16. Parameter settings for sequence alignment using tool ClustalW multiple alignment



Фотографија 17. Порамнување на секвенците со користење на алатка ClustalW Multiple alignment на софтвер BioEdit Sequence Alignment Editor

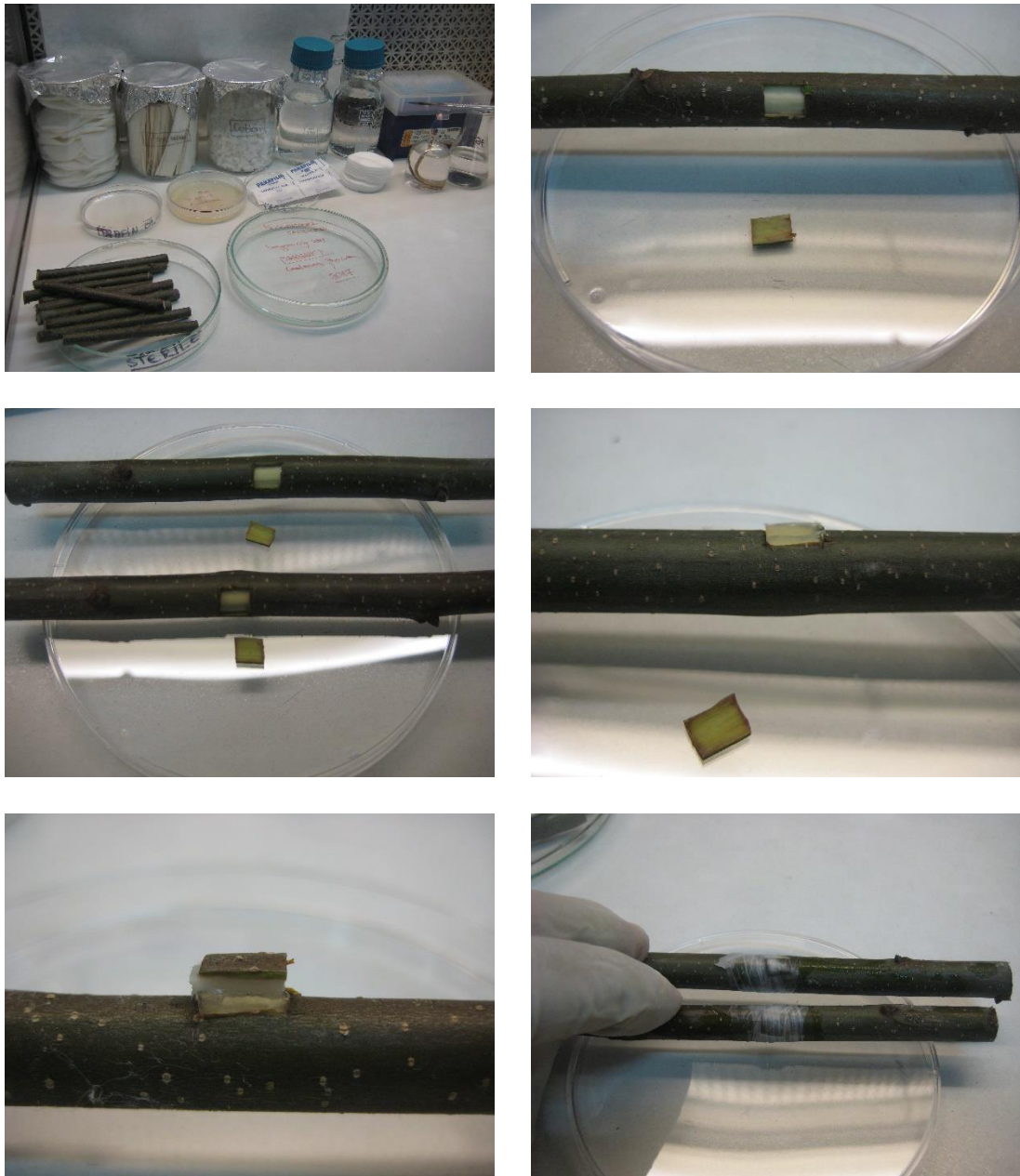
Figure 17. Sequence alignment using the tool ClustalW Multiple alignment from BioEdit Sequence Alignment Editor software

Со користење порамнетите секвенци, и кратаење на секвенците до иста должина, со користење онлајн софтвер беше изработено филогенетско дрво и претставена беше сродноста на детектираните *Phytophthora* видови. Како референца за сроден но различн вид за вкоренување на филогенетското дрво користена беше секвенца на *Pythium vexans* (Пристапен код GU133564.1, од онлајн датабаза на NCBI).

2.4. ПАТОГЕНОСТ

2.4.1. Тест на патогеност со користење дормантни стапчиња (Jung and Nechwatal, 2008)

Како потенцијален домаќин на сите изолирани *Phytophthora* видови, за овој тест за патогеност беше користен материјал од питом костен *Castanea sativa*. Притоа користени беа стапчиња од едногодишни леторасти (дијаметар 5-15 mm) колектирани од исто дрво или кластер (огниште), веднаш после развивањето на пупките, околу месец мај. Со помош на стерилна калемарска ножица (70 % етанол), листовите беа отстранети и гранчињата беа отсечени на стапчиња со должина од 10 - 15 cm и инокулирани со инокулум со големина сса 5 x 5 mm од активна култура на еден од одбраните *Phytophthora* видови одгледана на V8 Агар. Користен беше по еден изолат претставник по случаен избор, за секој од детектираните видови *Phytophthora*, односно за секој тестиран изолат се поставуваа по 40 репликати (инокулации) на гранчиња, и тоа 20 репликати за гранчиња со дијаметар 5-10 mm и 20 репликати за гранчиња со дијаметар 10-15 mm. Користени беа изолати претставници за следните видови *Phytophthora*: *P. colocasiae*, *P. cambivora*, *P. taxon Walnut*, *P. cinnamomi*, *P. inundata*, *P. gonapodyides* и *P. cactorum*. Инокулацијата беше извршена на површина со иста големина на инокулумот и тоа под отстранета кора до површина на камбиум (фотографија 18). После инокулацијата отстранетата кора беше повторно наместена и фиксирана со парче стерилен влажен памук (стерилна дестилирана вода) и парафилм. Во стаклени петри садови поставувани беа по 10 инокулирани стапчиња и тоа на 2 слоја влажна филтер хартија (фотографија 19). За контрола инокулирани беа стапчиња со стерилна хранлива подлога PDA. Петри садовите беа фиксирани со парафилм и инкубирани на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, за времетраење од 7 денови. Должината од евентуалните некрози беше прецизно измерена, и беше извршена реизолација на селективна хранлива подлога (PARPNH или CARP+) од некротираното ткиво според случаен избор заради проверка на причинителот на некрози.



Фотографија 18. Инокулирање на костенови стапчиња

Figure 18. Inoculation of chestnut stics



Фотографија 19. Инкубација на инокулирани костенови стапчиња во стаклени петри садови

Figure 19. Incubation of inoculated chestnut stics in glass petri dishes

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1. Избор на локалитети за истражување

Теренската опсервација за присуство на симптоми карактеристични за *Phytophthora* видовите беше извршена на 36 локалитети во шумски екосистеми, од кои на 21 природен или вештачки подигнат насад, 9 расадници во сопственост на ЈП „Македонски шуми“ и 6 приватни расадници, додека во земјоделски екосистеми опсервирани беа 17 насади во приватна сопственост (табела 6). Вкупно беа опфатени 44 видови на растенија домаќини.

Табела 6. Вкупен број на обсервирани локалитети во шумски и земјоделски екосистеми

Table 6. Number of sites observed in forest ecosystems

	Број на локалитети Number of sites	Број на растенија домаќини Number of host plants
Шумски екосистеми	36	41
Земјоделски екосистеми	17	3
Вкупно	53	44

Беа колектирани примероци почва, корења и некротирано ткиво. Вкупно од шумарски екосистеми колектирани беа 205 примероци додека 93 примероци од земјоделски екосистеми. На табела број 7 прикажан е процентот на асимтоматски и симптоматски колектирани примероци.

Табела 7. Број на колектирани симптоматски и асимптоматски примероци

Table 7. Number of collected asymptomatic and symptomatic samples

	Број на симптоматски примероци Number of symptomatic samples	Број на асимптоматски примероци Number of asymptomatic samples	Вкупно Total
Шумски екосистеми	162 (79%)	43 (21%)	205
Земјоделски екосистеми	74 (80%)	19 (20%)	93
Вкупно	236 (79 %)	62 (21%)	298

Од табела број 7 може да се забележи дека од вкупно колектирани 298 примероци од шумски и од земјоделски екосистеми 79 % од примероците се симптоматски, додека 21 % од примероците се асимптоматски. Исто, може да се забележи дека, иако вкупниот број на колектирани примероци од шумски екосистеми е драстично поголем од вкупниот број на колектирани примероци од земјоделски екосистеми, процентот на симптоматски примероци е со ист тренд, исто како и во вкупниот број на колектирани примероци во двата екосистеми. Ваквите аналогни бројки алудираат на правилно извршена опсервација и правилна покриеност на локалитети кои беа инспектирани за оценка на здравствена состојба и присуство на симптоми во однос на *Phytophthora* видовите како на шумски така и на земјоделски системи на територијата на Република Македонија.

За секој колектиран примерок почва или растителен материјал, беа регистрирани следните податоци: име на локалитет, ГПС координати, вид на растение домаќин со латински назив, проценета старост на растение, присуство или отсуство на симптоми, како и информација за педолошки профил (според педолошка карта на Филиповски et al. (2015)) за точката на секој колектиран примерок почва (табела 8).

Table 8 Список на колектирани примероци за анализа со опис

Table 8. List of collected samples for analysis with description

Р.бр. No	Датум на колектирање Collection date	Локалитет Site	ГПС координати GPS coordinates	Домаќин / ~ години (старост)	Колектиран материјал	Симтоматски	Почвен тип Type of soil (Филиповски et al., 2015)
1	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
2	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
3	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
4	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
5	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
6	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва

7	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
8	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
9	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва
10	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва
11	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва
12	01.07.2011	„Агроплод“ Ресен Јаболков насад	Lat: 41.090597 Lon: 21.019831	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
13	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon: 20.990369	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Мочурливо-глејна почва
14	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon: 20.990369	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Мочурливо-глејна почва
15	19.07.2011	с. Перово	Lat: 41.016807 Lon: 20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Мочурливо-глејна почва

		Ресен Јаболков насад		~15			
16	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Мочурливо-глејна почва
17	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Мочурливо-глејна почва
18	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	А	Мочурливо-глејна почва
19	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Мочурливо-глејна почва
20	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Мочурливо-глејна почва
21	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	А	Мочурливо-глејна почва
22	19.07.2011	с. Перово Ресен Јаболков насад	Lat: 41.016807 Lon:20.990369	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	А	Мочурливо-глејна почва
23	19.07.2011	с. Горна Бела Црква Ресен	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва

Јаболков насад							
24	19.07.2011	с. Горна Бела Црква	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
		Ресен		~10			
Јаболков насад							
25	19.07.2011	с. Горна Бела Црква	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
		Ресен		~10			
Јаболков насад							
26	19.07.2011	с. Горна Бела Црква	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва
		Ресен		~10			
Јаболков насад							
27	19.07.2011	с. Горна Бела Црква	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
		Ресен		~10			
Јаболков насад							
28	19.07.2011	с. Горна Бела Црква	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
		Ресен		~10			
Јаболков насад							
29	19.07.2011	с. Горна Бела Црква	Lat: 41.051997 Lon: 21.021626	<i>Malus domestica</i>	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва
		Ресен		~10			
Јаболков насад							

30	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
31	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
32	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
33	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Колувијална почва
34	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
35	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
36	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
37	02.05.2012	с. Грнчари Ресен Јаболков насад	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
38	02.05.2012	с. Грнчари	Lat: 41.010382 Lon: 21.052023	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва

		Ресен Јаболков насад					
39	02.05.2012	с. Брајчино Ресен Јаболков насад	Lat: 40.898478 Lon: 21.152175	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Колувијална почва
40	02.05.2012	с. Брајчино Ресен Јаболков насад	Lat: 40.898478 Lon: 21.152175	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
41	02.05.2012	с. Брајчино Ресен Јаболков насад	Lat: 40.898478 Lon: 21.152175	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
42	02.05.2012	с. Брајчино Ресен Јаболков насад	Lat: 40.898478 Lon: 21.152175	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
43	02.05.2012	с. Брајчино Ресен Јаболков насад	Lat: 40.898478 Lon: 21.152175	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Колувијална почва
44	02.05.2012	с. Царев Двор Ресен Јаболков насад	Lat: 41.036188 Lon: 21.004805	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
45	02.05.2012	с. Царев Двор Ресен Јаболков насад	Lat: 41.036188 Lon: 21.004805	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
46	02.05.2012	с. Царев Двор Ресен Јаболков насад	Lat: 41.036188 Lon: 21.004805	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва

47	02.05.2012	с. Царев Двор Ресен Јаболков насад	Lat: 41.036188 Lon: 21.004805	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
48	03.05.2012	с. Езерани Ресен Јаболков насад	Lat: 41.024585 Lon: 21.025962	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
49	03.05.2012	с. Езерани Ресен Јаболков насад	Lat: 41.024585 Lon: 21.025962	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Флувијатилна почва
50	03.05.2012	с. Езерани Ресен Јаболков насад	Lat: 41.024585 Lon: 21.025962	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
51	03.05.2012	с. Езерани Ресен Јаболков насад	Lat: 41.024585 Lon: 21.025962	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
52	03.05.2012	с. Езерани Ресен Јаболков насад	Lat: 41.024585 Lon: 21.025962	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Флувијатилна почва
53	03.05.2012	с. Претор Ресен Јаболков насад	Lat: 40.988544 Lon: 21.055793	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Колувијална почва
54	03.05.2012	с. Претор Ресен Јаболков насад	Lat: 40.988544 Lon: 21.055793	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
55	03.05.2012	с. Претор	Lat: 40.988544 Lon: 21.055793	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва

		Ресен Јаболков насад					
56	03.05.2012	с. Претор Ресен Јаболков насад	Lat: 40.988544 Lon: 21.055793	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
57	03.05.2012	с. Претор Ресен Јаболков насад	Lat: 40.988544 Lon: 21.055793	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Колувијална почва
58	03.05.2012	с. Претор Ресен Јаболков насад	Lat: 40.988544 Lon: 21.055793	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Колувијална почва
59	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Дистричен камбисол
60	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Дистричен камбисол
61	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	Дистричен камбисол
62	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	А	Дистричен камбисол

63	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	A	Дистричен камбисол
64	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	C	Дистричен камбисол
65	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	C	Дистричен камбисол
66	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	C	Дистричен камбисол
67	07.05.2012	с. Стенковец Преспа јаболков насад	Lat: 41.55523 Lon: 20.613661	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	A	Дистричен камбисол
68	09.05.2012	(Летиште) с. Градско Црешов насад	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~5	Почва, корења и кора	C	Рендзина и регосол
69	09.05.2012	(Летиште) с. Градско Црешов насад	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~5	Почва, корења и кора	C	Рендзина и регосол
70	09.05.2012	(Летиште) с. Градско	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~5	Почва, корења и кора	C	Рендзина и регосол

		Црешов насад					
71	09.05.2012	(Летиште) с. Градско	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~5	Почва, корѐња и кора	С	Рендзина и регосол
		Црешов насад					
72	09.05.2012	(Летиште) с. Градско	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~5	Почва, корѐња и кора	С	Рендзина и регосол
		Црешов насад					
73	18.05.2012	с. Сопотско Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корѐња и кора	С	/
74	18.05.2012	с. Сопотско Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корѐња и кора	С	/
75	18.05.2012	с. Јанковец Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корѐња и кора	С	/
76	18.05.2012	с. Јанковец Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корѐња и кора	С	/
77	18.05.2012	с. Јанковец Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корѐња и кора	С	/
78	18.05.2012	с. Болно Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> /	Почва, корѐња и кора	С	/

79	18.05.2012	с. Болно Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> /	Почва, корења и кора	С	/
80	18.05.2012	с. Горно Дупени Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	/
81	18.05.2012	с. Горно Дупени Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> /	Почва, корења и кора	С	/
82	18.05.2012	с. Горно Дупени Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	/
83	18.05.2012	С. Долна Бела Црква Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	/
84	18.05.2012	С. Долна Бела Црква Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	/
85	18.05.2012	С. Долна Бела Црква	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	/

		Ресен Јаболков насад					
86	18.05.2012	С. Долна Бела Црква Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> ~15	Почва, корења и кора	С	/
87	18.05.2012	с. Езерани Ресен Јаболков насад	/	<i>Malus domestica</i> /	Почва, корења и кора	С	/
88	14.04.2013	с. Марена Шумски расадник	Lat: 41.468271 Lon: 22.028385	<i>Thuja orientalis</i> ~2	Почва и корења	С	/
89	14.04.2013	с. Марена Шумски расадник	Lat: 41.468271 Lon: 22.028385	<i>Picea abies</i> ~2	Почва	С	/
90	14.04.2013	с. Марена Шумски расадник	Lat: 41.468271 Lon: 22.028385	Канал за вода /	Почва	/	/
91	14.04.2013	с. Марена Шумски расадник	Lat: 41.468271 Lon: 22.028385	<i>Thuja orientalis</i> ~2	Почва и корења	С	/
92	14.04.2013	с. Марена Шумски расадник	Lat: 41.468271 Lon: 22.028385	<i>Thuja orientalis</i> ~2	Почва и корења	С	/
93	14.04.2013	Свети Николе Боров насад	Lat: 41.840983, Lon: 21.928158	<i>Pinus nigra</i> ~30	Почва и корења	С	Чернозем, рендзина и смолица
94	15.04.2013	Свети Николе Шумски расадник	Lon: 41.853170 Lat: 21.954823	<i>Pinus sylvestris</i> (1+0)	Почва и корења	С	/

95	15.04.2013	Свети Николе Шумски расадник	Lon: 41.853170 Lat: 21.954823	<i>Pinus sylvestris</i> (1+0)	Почва и корења	С	/
96	15.04.2013	Свети Николе Шумски расадник	Lon: 41.853170 Lat: 21.954823	<i>Pinus sylvestris</i> (1+0)	Почва и корења	С	/
97	15.04.2013	Свети Николе Шумски расадник	Lon: 41.853170 Lat: 21.954823	<i>Cupressus arizonica</i> (1+0)	Почва и корења	С	/
98	15.04.2013	Берово Шумски расадник	Lon: 41.719360 Lat: 22.848760	<i>Thuja orientalis</i> (1+0)	Почва и корења	С	/
99	15.04.2013	Берово Шумски расадник	Lon: 41.719360 Lat: 22.848760	<i>Picea abies</i> (1+0)	Почва и корења	С	/
100	17.05.2013	Скопје Расадник Хорти Експерт	Lon: 42.010580 Lat: 21.407685	<i>Camelia japonica</i> ~3	Почва и корења	С	/
101	17.05.2013	Скопје Расадник Хорти Експерт	Lon: 42.010580 Lat: 21.407685	<i>Azalea japonica</i> ~3	Почва и корења	С	/
102	17.05.2013	Скопје Расадник Хорти Експерт	Lon: 42.010580 Lat: 21.407685	<i>Azalea japonica</i> ~3	Почва и корења	С	/
103	17.05.2013	Скопје Расадник Хорти Експерт	Lon: 42.010580 Lat: 21.407685	<i>Photinia fraseri</i> ~3	Почва и корења	С	/
104	17.05.2013	Скопје Расадник Хорти Експерт	Lon: 42.010580 Lat: 21.407685	<i>Photinia fraseri</i> ~3	Почва и корења	С	/
105	17.05.2013	Скопје Расадник Хорти Експерт	Lon: 42.010580 Lat: 21.407685	<i>Nandina domestica</i>	Почва и корења	С	/

~3							
106	17.05.2013	Охрид Шумски расадник	Lon: 41.100793 Lat: 20.811884	<i>Cupressus arizonica</i>	Почва и корења	С	/
~3							
107	29.05.2013	Куманово Боров насад Св.Илија	Lon: 42.092213 Lat: 21.745250	<i>Pseudotsuga menziesi</i>	Почва и корења	С	Регосол и лептосол
~15							
108	29.05.2013	Куманово Боров насад Св.Илија	Lon: 42.092213 Lat: 21.745250	<i>Pinus nigra</i>	Почва и корења	С	Регосол и лептосол
~15							
109	29.05.2013	Куманово Боров насад Св.Илија	Lon: 42.092213 Lat: 21.745250	<i>Pinus nigra</i>	Почва и корења	С	Регосол и лептосол
~15							
110	29.05.2013	Куманово Боров насад Св.Илија	Lon: 42.092213 Lat: 21.745250	<i>Pinus nigra</i>	Почва и корења	С	Регосол и лептосол
~15							
111	30.05.2013	Кавадарци Расадник Пинус	Lon: 41.452896 Lat: 22.023193	<i>Thuja orientalis</i>	Почва и корења	С	/
~3							
112	30.05.2013	Кавадарци Расадник Пинус	Lon: 41.452896 Lat: 22.023193	<i>Thuja orientalis</i>	Почва и корења	С	/
~3							
113	04.06.2013	НП Маврово	Lon: 41.703269 Lat: 20.663686	Корито од поток со траги од диви свињи	Почва	/	Кафеава шумска почва
/							
114	04.06.2013	НП Маврово	Lon: 41.703269 Lat: 20.663686	<i>Picea abies</i>	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва
~30							
115	04.06.2013	с. Скудриње Дебар	Lon: 41.565043 Lat: 20.600424	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
~50							

116	12.06.2013	Струмица Расадник Флора Гарден	Lon: 41.442209 Lat: 22.647649	<i>Juniperus</i> sp. ~3	Почва и корења	С	/
117	12.06.2013	Струмица Расадник Флора Гарден	Lon: 41.442209 Lat: 22.647649	<i>Tilia</i> sp. ~3	Почва и корења	С	/
118	12.06.2013	Струмица Расадник Флора Гарден	Lon: 41.442209 Lat: 22.647649	<i>Tilia</i> sp. ~3	Почва и корења	С	/
119	12.06.2013	Струмица Расадник Флора Гарден	Lon: 41.442209 Lat: 22.647649	<i>Juniperus</i> sp. ~3	Почва и корења	С	/
120	12.06.2013	Струмица Расадник Флора Гарден	Lon: 41.442209 Lat: 22.647649	<i>Cupressus</i> <i>sempervirens</i> ~3	Почва и корења	С	/
121	12.06.2013	Струмица Расадник Флора Гарден	Lon: 41.442209 Lat: 22.647649	<i>Juniperus</i> sp. ~3	Почва и корења	С	/
122	29.07.2013	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Juniperus</i> <i>communis</i> <i>stricta</i> (1+1)	Почва и корења	С	/
123	29.07.2013	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Juniperus</i> <i>communis</i> <i>stricta</i> (1+1)	Почва и корења	С	/
124	29.07.2013	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Pinus mugo</i> ~3	Почва и корења	С	/
125	29.07.2013	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Pinus mugo</i> ~3	Почва и корења	С	/

126	10.10.2013	Кичево Шумски расадник	Lon: 41.514211 Lat: 20.937796	<i>Pinus nigra</i> ~3	Почва и корења	С	/
127	10.10.2013	Охрид Шумски расадник Радомирово	Lon: 41.350838 Lat: 20.747031	<i>Picea abies</i> ~3	Почва и корења	С	/
128	10.10.2013	Охрид Расадник Комуналец	Lon: 41.100793 Lat: 20.811884	<i>Juniperus</i> sp. ~3	Почва и корења	С	/
129	21.03.2014	Охрид Црешов насад	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~2	Почва и корења	С	/
130	21.03.2014	Охрид Црешов насад	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~2	Почва и корења	С	/
131	21.03.2014	Охрид Црешов насад	/	<i>Prunus mahaleb</i> ~2	Почва и корења	С	/
132	29.05.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
133	29.05.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> ~45	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
134	29.05.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Prunus avium</i> ~20	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
135	29.05.2014	Кичево с. Крушино Шумски расадник	Lon: 41.514211 Lat: 20.937796	<i>Cupressus arizonica</i> (1+0)	Почва и корења	С	/

136	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
137	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
138	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
139	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
140	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
141	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
142	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
143	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
144	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
145	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница

146	29.05.2014	Дебар с. Скудриње	Lon: 41.559646 Lat: 20.602625	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
147	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
148	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
149	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
150	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
151	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
152	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
153	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
154	16.07.2014	Кичево с. Осој	Lon: 41.530615 Lat: 20.934237	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
155	16.07.2014	Струга Семенска состоина	Lon: 41.214106 Lat: 20.564476	<i>Pseudotsuga menziesi</i> (1+0)	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница

156	16.07.2014	Струга Семенска состоина	Lon: 41.214106 Lat: 20.564476	<i>Pseudotsuga menziesi</i> (1+0)	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
157	16.07.2014	Струга Семенска состоина	Lon: 41.214106 Lat: 20.564476	<i>Pseudotsuga menziesi</i> (1+0)	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
158	16.07.2014	Струга Семенска состоина	Lon: 41.214106 Lat: 20.564476	<i>Pinus peuce</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
159	16.07.2014	Струга Семенска состоина	Lon: 41.214106 Lat: 20.564476	<i>Pinus peuce</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
160	16.07.2014	Струга Семенска состоина	Lon: 41.214106 Lat: 20.564476	<i>Pinus peuce</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
161	22.07.2014	Гевгелија Шумски расадник Кожуф	/	<i>Fraxinus ornus</i> (2+0)	Почва и корења	С	/
162	22.07.2014	Гевгелија Шумски расадник Кожуф	/	<i>Robinia pseudoacaci a</i> (2+0)	Почва и корења	С	/
163	22.07.2014	Гевгелија Шумски расадник Кожуф	/	<i>Cupressus semperviren s</i> ~2	Почва и корења	С	/
164	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
165	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница

166	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
167	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
168	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
169	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
170	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
171	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
172	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
173	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
174	07.08.2014	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница
175	03.10.2014	Гостивар с. Речане	Lon: 41.745676 Lat: 20.825748	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
176	03.10.2014	Гостивар с. Речане	Lon: 41.745676 Lat: 20.825748	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва

/							
177	03.10.2014	Гостивар с. Речане	Lon: 41.745676 Lat: 20.825748	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
/							
178	17.10.2014	Тетово с. Кале	Lon: 42.019510 Lat: 20.958687	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
179	17.10.2014	Тетово с. Кале	Lon: 42.019510 Lat: 20.958687	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
180	17.10.2014	Тетово с. Кале	Lon: 42.019510 Lat: 20.958687	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
181	17.10.2014	Тетово с. Кале	Lon: 42.019510 Lat: 20.958687	<i>Castanea sativa</i> ~10	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
182	17.10.2014	Тетово с. Кале	Lon: 42.019510 Lat: 20.958687	<i>Castanea sativa</i> ~10	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
183	17.10.2014	Тетово с. Кале	Lon: 42.019510 Lat: 20.958687	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
184	17.10.2014	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja ivone stardust</i> ~3	Почва и корења	С	/
185	17.10.2014	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja ivone stardust</i> ~3	Почва и корења	С	/
186	17.10.2014	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Chamaecyparis lawsoniana stardust</i>	Почва и корења	С	/

~3							
187	17.10.2014	Тетово Расадник Еуроплант	Lon:42.033588 Lat: 21.102428	<i>Chamaecypa ris lawsoniana columnaris</i>	Почва и корења	С	/
~3							
188	30.10.2014	Гостивар с. Вруток	Lon: 41.763703 Lat: 20.825986	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
189	30.10.2014	Гостивар с. Вруток	Lon: 41.763703 Lat: 20.825986	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
190	30.10.2014	Гостивар с. Вруток	Lon: 41.763703 Lat: 20.825986	<i>Quercus petraea</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
191	30.10.2014	Гостивар с. Вруток	Lon: 41.763703 Lat: 20.825986	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
192	30.10.2014	Гостивар с. Вруток	Lon: 41.763703 Lat: 20.825986	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
193	06.11.2014	Охрид с. Требеништа	Lon: 41.196587 Lat: 20.772027	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница и Кафеава почва врз варовници и доломити
194	06.11.2014	Охрид с. Требеништа	Lon: 41.196587 Lat: 20.772027	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница и Кафеава почва врз варовници и доломити

195	06.11.2014	Охрид с. Требеништа	Lon: 41.196587 Lat: 20.772027	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница и Кафеава почва врз варовници и доломити
196	06.11.2014	Охрид с. Требеништа	Lon: 41.196587 Lat: 20.772027	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница и Кафеава почва врз варовници и доломити
197	06.11.2014	Охрид с. Требеништа	Lon: 41.196587 Lat: 20.772027	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Варовничко- доломитна црница и Кафеава почва врз варовници и доломити
198	15.05.2015	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
199	15.05.2015	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
200	15.05.2015	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
201	15.05.2015	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
202	15.05.2015	Струга с. Калиште	Lon: 41.166303 Lat: 20.650994	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
203	15.05.2015	Струга с. Мислешево	Lon: 41.178572 Lat: 20.705224	<i>Malus sp.</i> ~10	Почва и корења	С	Флувијатилна почва
204	15.05.2015	Струга с. Мислешево	Lon: 41.178572 Lat: 20.705224	<i>Malus sp.</i> ~10	Почва и корења	С	Флувијатилна почва

205	15.05.2015	Струга с. Мислешево	Lon: 41.178572 Lat: 20.705224	<i>Malus</i> sp. ~10	Почва и корења	С	Флувијатилна почва
206	15.05.2015	Струга с. Мислешево	Lon: 41.178572 Lat: 20.705224	<i>Malus</i> sp. ~10	Почва и корења	С	Флувијатилна почва
207	16.05.2015	Струмица с. Ново Село	Lon: 41.399472 Lat: 22.889566	<i>Morus nigra</i> ~15	Почва и корења	С	Колувијална почва
208	16.05.2015	Струмица с. Ново Село	Lon: 41.399472 Lat: 22.889566	<i>Morus nigra</i> ~15	Почва и корења	С	Колувијална почва
209	23.06.2015	Тетово с. Тетово	Lon: 41.882191 Lat: 20.980147	<i>Juglans regia</i> ~30	Почва и корења	С	Колувијална почва
210	23.06.2015	Тетово с. Тетово	Lon: 41.882191 Lat: 20.980147	<i>Alnus glutinosa</i> ~40	Почва и корења	С	Колувијална почва
211	23.06.2015	Тетово с. Тетово	Lon: 41.882191 Lat: 20.980147	<i>Prunus avium</i> ~30	Почва и корења	С	Колувијална почва
212	23.06.2015	Тетово с. Тетово	Lon: 41.882191 Lat: 20.980147	<i>Robinia pseudoacacia</i> ~40	Почва и корења	С	Колувијална почва
213	23.06.2015	Гостивар с. Речане	Lon: 41.756521 Lat: 20.821393	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
214	23.06.2015	Гостивар с. Речане	Lon: 41.756521 Lat: 20.821393	<i>Castanea sativa</i> ~10	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
215	23.06.2015	Гостивар с. Речане	Lon: 41.756521 Lat: 20.821393	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва

216	23.06.2015	Гостивар с. Речане	Lon: 41.756521 Lat: 20.821393	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
217	23.06.2015	Гостивар с. Речане	Lon: 41.756521 Lat: 20.821393	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
218	23.06.2015	Гостивар с. Речане	Lon: 41.756521 Lat: 20.821393	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва
219	26.06.2015	Превалец Стража	Lon: 41.695773 Lat: 20.844772	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	А	Кафеава почва врз варовници и доломити
220	26.06.2015	Превалец Стража	Lon: 41.695773 Lat: 20.844772	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	А	Кафеава почва врз варовници и доломити
221	26.06.2015	Превалец Стража	Lon: 41.695773 Lat: 20.844772	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	А	Кафеава почва врз варовници и доломити
222	26.06.2015	Превалец Стража	Lon: 41.695773 Lat: 20.844772	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	А	Кафеава почва врз варовници и доломити
223	26.06.2015	Превалец Стража	Lon: 41.695773 Lat: 20.844772	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	А	Кафеава почва врз варовници и доломити
224	30.06.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Juniperus communis columnaris</i> ~4	Почва и корења	С	/
225	30.06.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Juniperus sabinae</i> ~4	Почва и корења	С	/

226	30.06.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon:42.033588 Lat: 21.102428	<i>Juniperus communis blue chip</i>	Почва и корења	С	/
				~3			
227	30.06.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon:42.033588 Lat: 21.102428	<i>Berberis thunbergii Orange rocket</i>	Почва и корења	С	/
				~3			
228	30.06.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon:42.033588 Lat: 21.102428	<i>Berberis thunbergii Golden rocket</i>	Почва и корења	С	/
				~3			
229	02.07.2015	Кичево с. Кнежино	Lon: 41.517146 Lat: 20.919102	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
				~50			
230	02.07.2015	Кичево с. Кнежино	Lon: 41.517146 Lat: 20.919102	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
				~50			
231	02.07.2015	Кичево с. Кнежино	Lon: 41.517146 Lat: 20.919102	<i>Quercus pubescens</i>	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
				~30			
232	02.07.2015	Кичево с. Кнежино	Lon: 41.517146 Lat: 20.919102	<i>Quercus pubescens</i>	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
				~30			
233	02.07.2015	Маврово с. Бунец	Lon: 41.717272 Lat: 20.770676	<i>Salix alba</i>	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
				~50			
234	08.07.2015	Демир Капија шумски расадник Дошница	Lon: 41.382010 Lat: 22.221911	<i>Robinia pseudoacacia</i> (1+0)	Почва и корења	А	/

235	08.07.2015	Демир Капија шумски расадник Дошница	Lon: 41.382010 Lat: 22.221911	<i>Robinia pseudoacacia</i> (1+0)	Почва и корења	A	/
236	08.07.2015	Демир Капија Расадник Мак Грин	/	<i>Picea</i> sp. (1+0)	Почва и корења	A	/
237	08.07.2015	Демир Капија Расадник Мак Грин	/	<i>Erica carnea</i> ~2	Почва и корења	A	/
238	08.07.2015	Демир Капија Расадник Мак Грин	/	<i>Picea</i> sp. ~2	Почва и корења	A	/
239	08.07.2015	Демир Капија Расадник Мак Грин	/	<i>Picea</i> sp. ~2	Почва и корења	A	/
240	8.07.2015	Кавадарци Расадник Пинус	Lon: 41.452863 Lat: 22.023249	<i>Thuja orientalis</i> ~4	Почва и корења	A	/
241	08.07.2015	Кавадарци Расадник Пинус	Lon: 41.452863 Lat: 22.023249	<i>Thuja orientalis</i> ~4	Почва и корења	C	/
242	21.07.2015	Крива Паланка Кркљанска река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~60	Почва и корења	C	Кафеава шумска почва
243	21.07.2015	Крива Паланка Кркљанска река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~60	Почва и корења	A	Кафеава шумска почва
244	21.07.2015	Крива Паланка Кркљанска река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~50	Почва и корења	A	Кафеава шумска почва
245	21.07.2015	Крива Паланка Кркљанска река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~50	Почва и корења	C	Кафеава шумска почва

246	21.07.2015	Крива Паланка Тораничка река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
247	21.07.2015	Крива Паланка Тораничка река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
248	21.07.2015	Крива Паланка Тораничка река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
249	21.07.2015	Крива Паланка Тораничка река	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Salix alba</i> ~50	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
250	21.07.2015	Криваа Паланка	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Juglans regia</i> ~40	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
251	21.07.2015	Криваа Паланка	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Populus nigra</i> ~40	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
252	21.07.2015	Криваа Паланка	Lon: 42.222947 Lat: 22.397370	<i>Juglans regia</i> ~30	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
253	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Acer negundo</i> ~30	Почва и корења	С	Колувијална почва
254	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Juglans regia</i> ~30	Почва и корења	С	Колувијална почва
255	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Acer negundo</i> ~15	Почва и корења	С	Колувијална почва

256	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Anus glutinosa</i> ~20	Почва и корења	С	Колувијална почва
257	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Salix alba</i> ~40	Почва и корења	С	Колувијална почва
258	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Salix alba</i> ~40	Почва и корења	С	Колувијална почва
259	17.09.2015	Штип Река Брегалница	Lon: 41.731960 Lat: 22.170475	<i>Alnus glutinosa</i> ~30	Почва и корења	С	Колувијална почва
260	15.10.2015	Струга с. Калиште	Lon: 41.129217 Lat: 20.637087	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва
261	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja ivone</i> ~2	Почва и корења	С	/
262	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja danica</i> ~2	Почва и корења	С	/
263	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja danica</i> ~2	Почва и корења	С	/
264	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja smaragd</i> ~3	Почва и корења	А	/
265	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja smaragd</i> ~3	Почва и корења	С	/
266	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja danica</i> ~2	Почва и корења	С	/

267	15.10.2015	Тетово Расадник Еуроплант	Lon: 42.033588 Lat: 21.102428	<i>Thuja danica</i> ~2	Почва и корења	С	/
268	15.10.2015	Охрид Расадник Комуналец	Lon: 41.100793 Lat: 20.811884	<i>Trachicarpus fortunei</i> /	Почва и корења	А	/
269	15.10.2015	Охрид Расадник Комуналец	Lon: 41.100793 Lat: 20.811884	<i>Trachicarpus fortunei</i> /	Почва и корења	А	/
270	16.10.2015	Радовиш с. Подареш	/	<i>Prunus avium</i> ~3	Почва и корења	С	/
271	16.10.2015	Радовиш с. Подареш	/	<i>Prunus avium</i> ~3	Почва и корења	С	/
272	18.12.2015	Богданци Расадник Хорти експерт	/	<i>Juniperus macrocarpa</i> ~5	Почва и корења	С	/
273	18.12.2015	Богданци Расадник Хорти експерт	/	<i>Juniperus macrocarpa</i> ~5	Почва и корења	С	/
274	18.12.2015	Богданци Расадник Хорти експерт	/	<i>Juniperus macrocarpa</i> ~5	Почва и корења	С	/
275	18.12.2015	Богданци Расадник Хорти експерт	/	<i>Juniperus macrocarpa</i> ~5	Почва и корења	С	/
276	18.12.2015	Струмица с.Смолари	Lon: 41.370692 Lat: 22.902385	<i>Castanea sativa</i> ~40	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва
277	18.12.2015	Струмица с.Смолари	Lon: 41.370692 Lat: 22.902385	<i>Castanea sativa</i>	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва

~40							
278	19.12.2015	Делчево шумски расадник	/	<i>Pinus nigra</i> (1+0)	Почва и корења	A	/
279	19.12.2015	Делчево шумски расадник	/	<i>Pinus nigra</i> (1+0)	Почва и корења	A	/
280	19.12.2015	Делчево шумски расадник	/	<i>Pseudotsuga menziesi</i> (1+0)	Почва и корења	A	/
281	19.12.2015	Делчево шумски расадник	/	<i>Pseudotsuga menziesi</i> (1+0)	Почва и корења	A	/
282	19.12.2015	Делчево шумски расадник	/	<i>Pinus sylvestris</i> (1+0)	Почва и корења	A	/
283	19.12.2015	Виница шумски расадник	/	<i>Pinus nigra</i> ~2	Почва и корења	A	/
284	19.12.2015	Виница шумски расадник	/	<i>Pinus nigra</i> ~2	Почва и корења	A	/
285	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Quercus petraea</i> ~20	Почва и корења	A	Циметна шумска почва
286	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	A	Циметна шумска почва
287	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	A	Циметна шумска почва
288	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	C	Циметна шумска почва

289	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
290	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	С	Циметна шумска почва
291	21.06.2016	Кичево с.Осој	Lon: 41.530826 Lat: 20.638148	<i>Castanea sativa</i> /	Почва и корења	А	Циметна шумска почва
292	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва и Ранкер
293	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва и Ранкер
294	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва и Ранкер
295	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~50	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва и Ранкер
296	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	А	Кафеава шумска почва и Ранкер
297	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~60	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва и Ранкер
298	21.06.2016	Тетово с.Вратница	Lon: 42.145672 Lat: 21.113922	<i>Castanea sativa</i> ~15	Почва и корења	С	Кафеава шумска почва и Ранкер

3.2. Изолација на чисти култури

Од претходно опишаните користени методи за изолација, и тоа: со директно поставување инокулум од колектиран почвен примерок, со користење на плодови (јаболко и круша) како мамка во примероци навлажнета почва и коренови фрагменти, со директна изолација од примероци почва и растителен материјал и со користење на листови како мамка на потопени примероци почва и коренови фрагменти, сепак за време на прелиминарните обиди како најуспешен се покажа последниот, односно со користење на листови како мамка на потопени примероци почва и коренови фрагменти, и истиот беше најмногу користен.

Како најкористени листови - мамки беа оние на *Prunus lourocerasus* (ловорвишна), потоа оние на *Fagus moesiaca* (бука). Прва причина за нивно користење беше достапноста. Оценката дека најчесто користење на овие листови е правилна одлука беше донесена за време на долгогодишно користење на методот на мамка со листови и тоа со користење на 3 - 4 различни видови листови мамки за ловење во еден почвен примерок, притоа овие листови дадоа најголем успех.

Од двете користени селективни хранливи подлоги PARPNH и CARP+ не беше забележана значителна разлика во успехот на изолација на видовите *Phytophthora*, од причина што и во двете подлоги користени беа исти инхибитори на останати габи и бактерии, односно антибиотици (Pimaricin, Ampicilin, Rifampicin и Nystatin) и фунгициди (Pentachloronitrobenzene и Нумехазол) и тоа во исти количини. Единствена разлика беше хранливиот елемент во двете подлоги и тоа V8 сок за V8 agar PARPNH и Corn meal agar за CARP+, кој во ова истражување не покажаа значајна разлика во резултатот при процесот на изолација.

Од вкупно 205 колектирани примероци од шумски екосистеми, 35 примероци (17%) резултирале со изолација на најмалку една култура за понатамошна анализа. Од друга страна, од вкупно 93 колектирани примероци од земјоделски екосистеми, 31 (33%) дале изолати на култури за понатамошна анализа (табела 9). Притоа, добиените култури како од земјоделски така од шумски екосистеми, секогаш потекнуваа од колектирани симптоматски

примероци освен во еден случај каде од асимптоматски примерок беше изолирана култура.

Табела 9. Процентуален приказ на колектирани примероци кои резултирале со изолати

Table 9. Percentage of collected samples which resulted with isolats

Потекло на колектирани примероци Origin of collected samples	Број на колектирани примероци Number of collected samples	Број на примероци кои резултирале со успешна изолација Number of samples which resulted with successful isolation
Шумски екосистеми	205	35 (17%)
Земјоделски екосистеми	93	31 (33%)

Од претходната табела може да се забележи дека и покрај споменатиот тренд на процентот на симптоматски колектирани примероци од терен, процентот на примероци кои резултирале со успешна изолација на култури е поголем кај шумските екосистеми од оној на земјоделските екосистеми. Притоа 17%, односно 35 од вкупно 205 колектирани теренски примероци од шумски екосистеми резултирале со изолација, додека 33 %, односно 31 од вкупно 93 теренски примероци колектирани од земјоделски екосистеми резултирале со изолација.

Од табела број 8 и 9 (погоре) може да се забележи дека иако се колектирани различен број на примероци од шумски и од земјоделски екосистеми, процентуалната застапеност на симптоматски и асимптоматски колектирани примероци е скоро идентична, но процентот на примероци кои резултирале со успешна изолација на култури е поголем кај примероците колектирани од земјоделски екосистеми.

3.3. Морфолошка идентификација на изолираните култури

За време на истражувањето, од различни причини (технички и финансиски), приближно 65 изолати беа изгубени, без можност за натамошни анализи на истите. Сепак, на морфолошки анализи со цел нивна идентификација беа подложени близу 400 изолати. Според сличностите во морфолошките карактеристики и тоа: морфологија на култура, вредности за дневен пораст, присуство или отсуство на плодни тела полово (ооспори, антеридии и оогонии) и вегетативно потекло (хламодоспори, задебелувања (swellings) и украси на хифите) издвоени беа 10 групи на изолати. Од нив, 4 групи беа составени од само по еден изолат, додека најголемата група беше составена од 18 изолати. Овие групи на изолати ќе бидат опишани подолу. Дел од изолатите имаа морфологија слична на *Pythium* видовите.

3.4. Молекуларна идентификација

Иако морфолошките анализи ја потврдија или исклучија припадноста на анализираните изолати кон родот *Phytophthora*, сепак на молекуларни анализи беа подложени 240 култури. За таа цел од секоја од селектираните 240 култури беше изолиран ДНК примерок. Сите ДНК примероци беа подложени на полимеражна верижна реакција со универзалните прајмери за *Phytophthora* видовите (ITS4 и ITS6). Добиените примероци ДНК после разредување до потребната работна концентрација беа пратени на секвенционирање.

Добиените секвенци беа софтверски и мануелно едитирани. После едитирањето и споредбата со секвенците во онлајн датабазата *Phytophthora* видови (www.phytophthoradb.org) беа добиени 49 секвенци кои припаѓаа на одреден вид *Phytophthora* (табела број 10), но детектирани беа и близу 30 изолати кои припаѓаа на неколку видови *Pythium*, како што се: *P. vexans*, *P. litorale*, *P. nigrum*, но и *Mortiera* spp. и *Phytophythium* spp., кои не беа од интерес на ова истражување.

Табела 10. Листа на примероци DNA кои припаѓаат на *Phytophthora* spp.
според онлајн база

Table 11. List of DNA samples belonging to *Phytophthora* spp. according to the
online database

Р. бр. №	Код на изолат Isolate code	Вид Species	База на податоци Database	Користена секвенца за споредба Used sequence for comparison	Поклопув ање Ident %	Разлика (број на базни парови) Difference (number of base pairs)
1	MKDF-102-1	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
2	MKDF-103-2	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
3	MKDF-104-3	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00935 ITS	100%	0
4	MKDF-105-4	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01486 ITS	100%	0
5	MKDF-109-5	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01211 ITS	99,87	1
6	MKDF-110-6	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01211 ITS	99,87	1
7	MKDF-112-7	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01211 ITS	99,87	1
8	MKDF-129-8	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
9	MKDF-144-9	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01477 ITS	100%	0
10	MKDF-166-10	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01477 ITS	100%	0
11	MKDF-167-11	<i>P. rosacearum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_02743 ITS	99,5	4
12	MKDF-176-12	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01477 ITS	100%	0
13	MKDF-188-13	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01477 ITS	100%	0
14	MKDF-195-14	<i>P. megasperma</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01534 ITS	100%	0
15	MKDF-1L-15	<i>P. megasperma</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01534 ITS	100%	0
16	MKDF-38-25	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
17	MKDF-49-31	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
18	MKDF-53-32	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
19	MKDF-95-39	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
20	MKDF-99-43	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
21	MKDF-107-46	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
22	MKDF-111-48	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	100%	0
23	MKDF-3	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01573 ITS	100%	0
24	MKDF-9	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_02830 ITS	100%	0
25	MKDF-15	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01556 ITS	100%	0
26	MKDF-19	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01132 ITS	100%	0
27	MKDF-27	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00265 ITS	100%	0
28	MKDF-31	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01573 ITS	100%	0
29	MKDF-33	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01976 ITS	100%	0
30	MKDF-39	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01132 ITS	100%	0
31	MKDF-43	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01556 ITS	100%	0
32	MKDF-45	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00265 ITS	100%	0
33	MKDF-46	<i>P. inundata</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_02731 ITS	100%	0
34	MKDF-47	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_02830 ITS	100%	0
35	MKDF-52	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_00278 ITS	99,63%	3
36	MKDF-53	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> adb.org	PD_01573 ITS	100%	0

37	MKDF-58	<i>P. inundata</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_02731_ITS	100%	0
38	MKDF-59	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_02830_ITS	100%	0
39	MKDF-64	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_02828_ITS	100%	0
40	MKDF-71	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_02830_ITS	100%	0
41	MKDF-74	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01573_ITS	100%	0
42	MKDF-77	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01573_ITS	100%	0
43	MKDF-80	<i>P. cambivora</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01869_ITS	100%	0
44	MKDF-81	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01556_ITS	100%	0
45	MKDF-86	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01573_ITS	100%	0
46	MKDF-88	<i>P. cactorum</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01471_ITS	100%	0
47	MKDF-89	<i>P. plurivora</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_00265_ITS	100%	0
48	MKDF-93	<i>P. colocasiae</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_01573_ITS	100%	0
49	MKDF-08	<i>P. gonpodyides</i>	<i>Phytophthora</i> db.org	PD_02725_ITS	100%	0

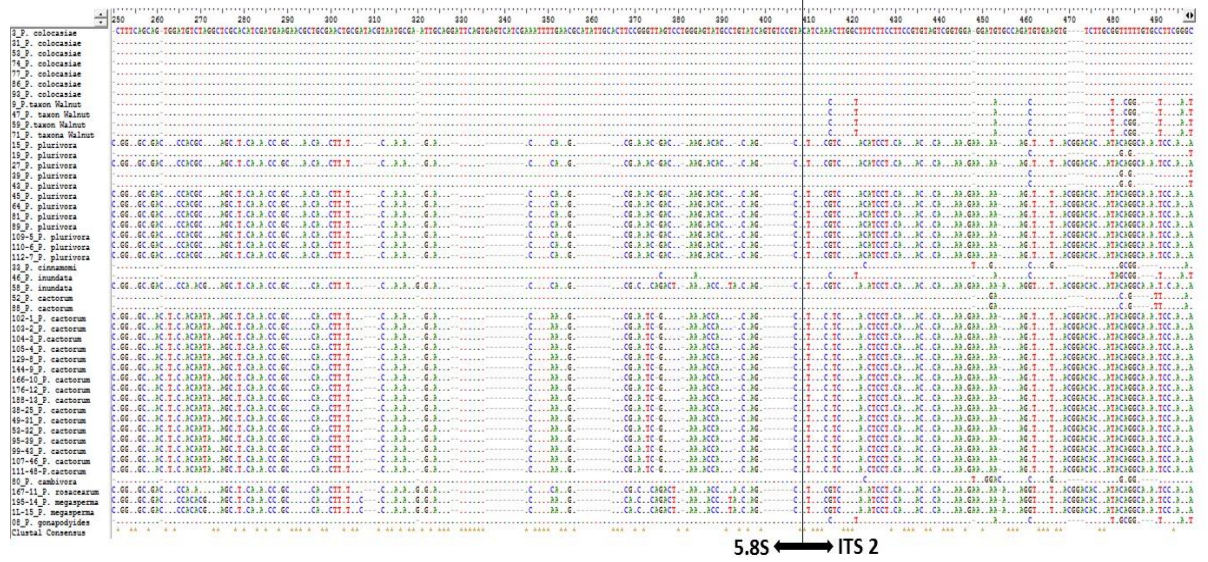
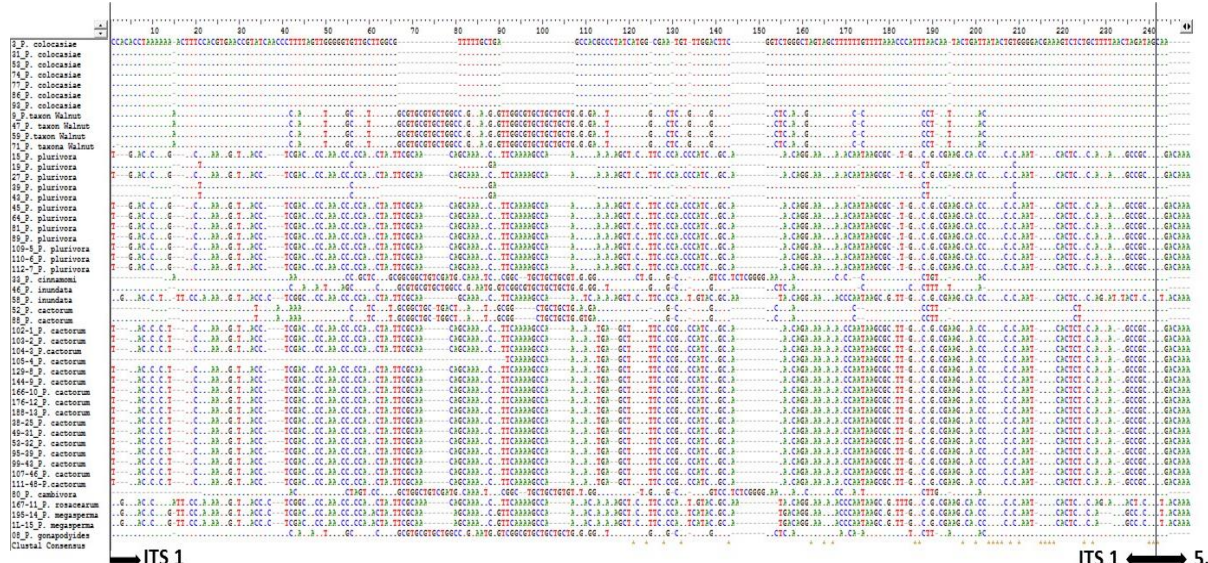
Во табела број 10, за секоја секвенца, прикажани се: лабораторискиот код, *Phytophthora* вид според користена датабаза, користена секвенца за споредба од дадената датабаза, процент на поклопување со користената секвенца од датабазата, како и бројот на базни парови според кои се разликува од користената секвенца за споредба.

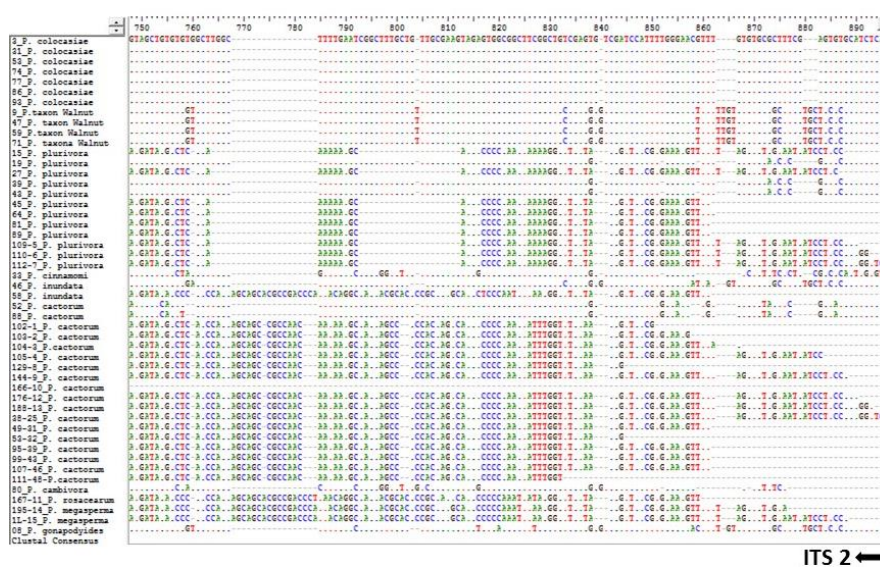
3.5. Филогенетски анализи

Добиените секвенци во FASTA формат беа порамнети во BioEdit Sequence Alignment Editor софтверот, со користење на алатката ClastalW multiple alignment. Во својата должина секвенците ги содржеа регионот ITS1, генот 5.8S и регионот ITS2, а вкупната должина на порамнетите секвенци изнесуваше 896 базни парови. На фотографија 20 претставен е матрикс со порамнети секвенци, каде е забележана положбата на ITS1 и ITS2 регионите и 5.8S генот по должината на секвенците. На матриксот, базните парови кои се повторуваат и се еднакви за сите секвенци се означени со „.“, оние кои недостасуваат со „-“, останатите се променливи.

„ДИСТРИБУЦИЈА И ДИВЕРЗИТЕТ НА ПАТОГЕНИ ВИДОВИ РИТОРНТОРА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА“

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА





Фотографија 20. Матрикс со порамнети секвенци според алатка ClastalW Multiple alignment, каде базните парови кои недостигаат се означени со „-“, додека базните парови кои се еднакви и се повторуваат се означени со „.“

Figure 20. Matrix with aligned sequences according to the tool ClastalW Multiple alignment, where missing base pair are marked with „-“, and the base pairs which are equal and repeating are marked with „.“

Од матриксот на фотографија 20 може да се забележи дека постои големо варирање помеѓу секвенците, и тоа во најголем случај заради различноста помеѓу видовите. Од друга страна најголемо варирање е забележано во двата „варијабилни“ региони ITS1 со 144 варијабилни положби на базните парови од вкупно 242 положби, и ITS2 со 328 варијабилни положби од вкупно 487. Во регионот на 5.8S генот, забележано е значително помало варирање, и тоа забележани се 62 варијабилни региони од вкупно 167.

На графикот со број 1, подолу, претставен е индексот Entropy (Hx) како мерка за непостојаност на одредена варијабилна, а во моментот веријабилноста на имињата на одредена положба во секвенцата, што укажува на претходно забележаното. Така што, доколку се земе дека во должина на анализираните секвенци најнапред е позициониран ITS1 регионот, па 5.8S регионот и на крај ITS2 регионот, од графикот може да се забележи на вредностите на ентропија (големината на пиковите) најголемите пикови се наоѓаат во прва и трета третина по должина на секвенцата, тоа укажува дека варијабилноста на секвенците е

најголема во овие региони ITS1 (лево) и ITS2 (десно), односно дека варијабилноста е најмала во средина во областа на регионот 5.8S.

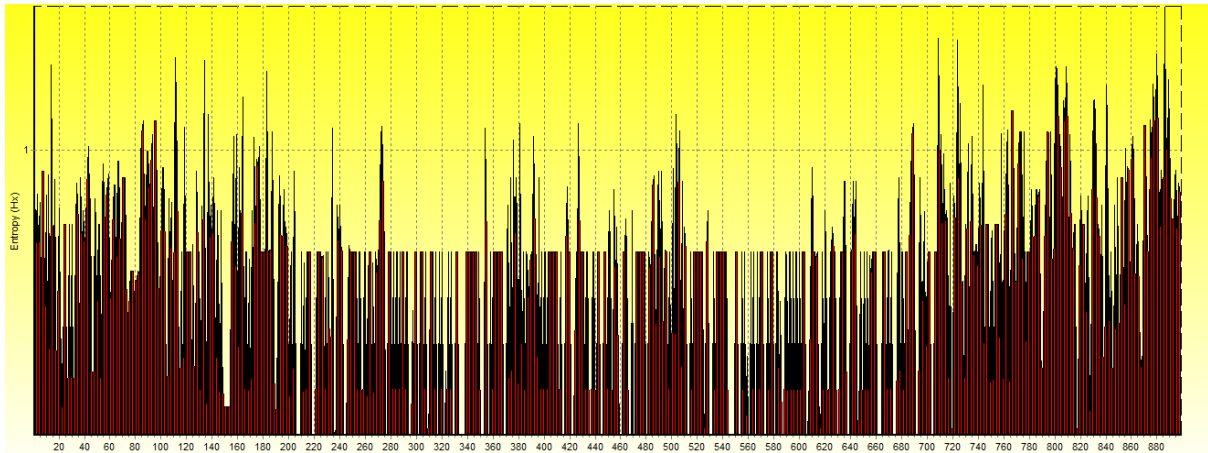


График 1. Графички приказ за варијабилност на положбата на базните парови долж порамнетите секвенци (индексот Entropy (Hx))

Chart 1. Graphic display of the variability of the base pair position along the aligned sequences (index Entropy (Hx))

Со помош на алатката ClastalW multiple alignment изработен беше матрикс кој ги претставува еволуционите разлики помеѓу секој од изолатите (табела 11). Проценка на еволуциони разлики помеѓу два исти изолати има вредност 1, односно нема еволуциони разлики, но колку таа вредност е помала тие два вида еволуционо се подалечни и поразлични.

ТАБЕЛА 11 ВО МОМЕНТОВ НЕ Е ЦЕЛОСНА, СКРАТЕНА Е И

КЕ БИДЕ НА ЦЕЛА СТРАНА СО БРОЈ 92 ВО А3 ФОРМАТ!!!!!!! не знам

како ќе го изведам тоа, ама нема како поинаку да се види целосно

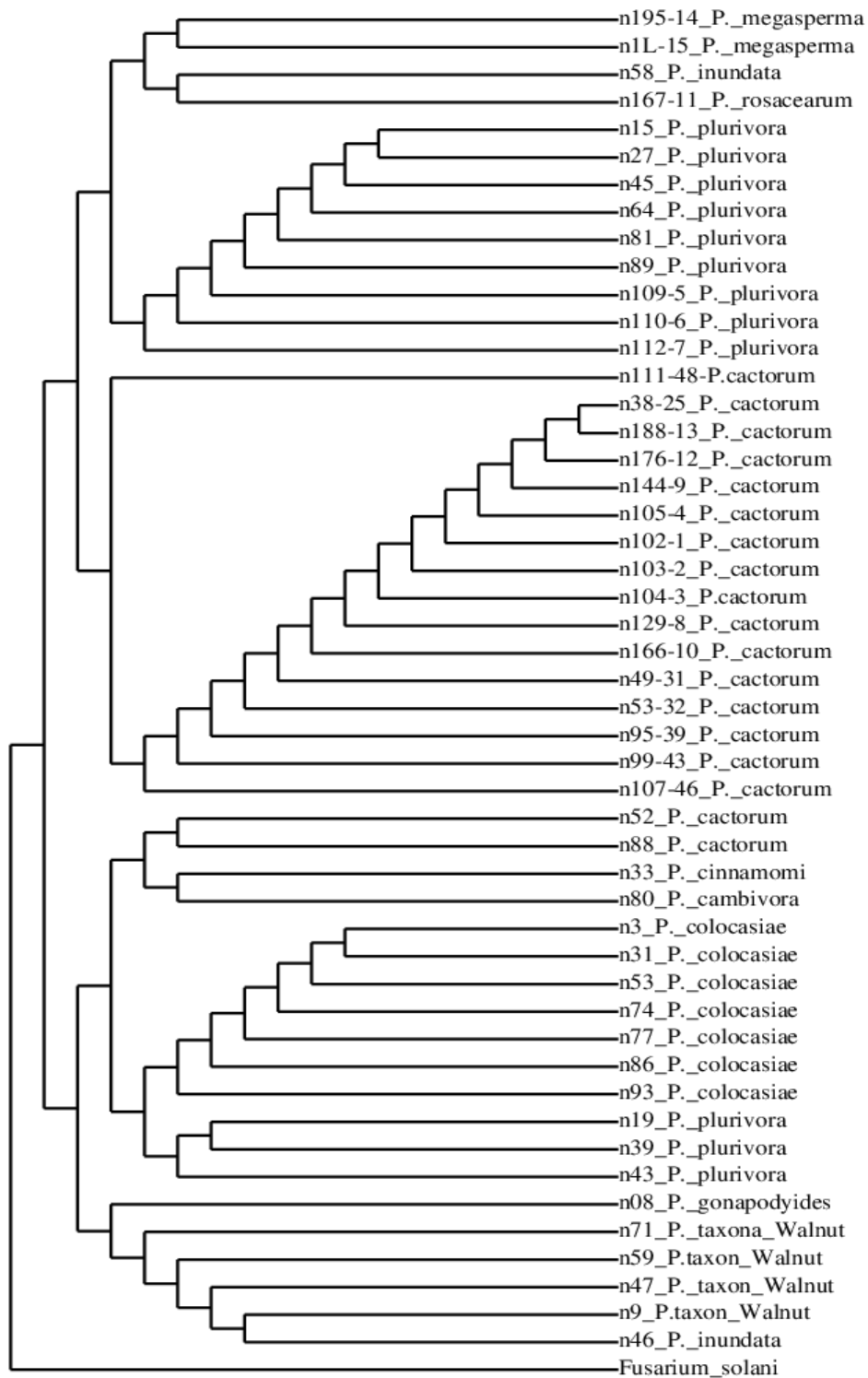
Табела 11 Проценка на еволуционите разлики помеѓу видовите *Phytophthora* видови (1 - потполно еднакви, 0 - потполно различни видови)

Табле 11. Estimation of the evolution distances between *Phytophthora* species (1 - completely equal, 0 - completely different species)

N	Sequence name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	3_P. colocasiae		1	1	1	1	1	1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
2	31_P. colocasiae	1		1	1	1	1	1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
3	53_P. colocasiae	1	1		1	1	1	1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
4	74_P. colocasiae	1	1	1		1	1	1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
5	77_P. colocasiae	1	1	1	1		1	1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
6	86_P. colocasiae	1	1	1	1	1		1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
7	93_P. colocasiae	1	1	1	1	1	1		0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.37 1	0.94 8	0.37 1	0.93 7
8	9_P. taxon Walnut	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1				0.99 8	0.37 3	0.83 4	0.37 1	0.82 3
9	47_P. taxon Walnut	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1				0.99 8	0.37 3	0.83 4	0.37 1	0.82 3
10	59_P. taxon Walnut	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1				0.99 8	0.37 3	0.83 4	0.37 1	0.82 3
11	71_P. taxon Walnut	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.84 1	0.99 8	0.99 8	0.99 8		0.37 3	0.83 3	0.37 2	0.82 4
12	15_P. plurivora	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 3	0.37 3	0.37 3	0.37 3		0.35 7	0.99 8	0.35 6
13	19_P. plurivora	0.94 8	0.94 8	0.94 8	0.94 8	0.94 8	0.94 8	0.94 8	0.83 4	0.83 4	0.83 4	0.83 3	0.35 7		0.35 6	0.98 8
14	27_P. plurivora	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 1	0.37 2	0.99 8	0.35 6		0.35 5
15	39_P. plurivora	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.82 3	0.82 3	0.82 3	0.82 4	0.35 6	0.98 8	0.35 5	
16	43_P. plurivora	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.93 7	0.82 3	0.82 3	0.82 3	0.82 4	0.35 6	0.98 8	0.35 5	1
17	45_P. plurivora	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 1	0.36 1	0.36 1	0.36 2	0.96 9	0.35 3	0.97	0.35 1
18	64_P. plurivora	0.36 4	0.36 4	0.36 4	0.36 4	0.36 4	0.36 4	0.36 4	0.36 2	0.36 2	0.36 2	0.36 3	0.97	0.35 4	0.97	0.35 3
19	81_P. plurivora	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 1	0.36 1	0.36 1	0.36 2	0.96 9	0.35 3	0.97	0.35 1
20	89_P. plurivora	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 3	0.36 1	0.36 1	0.36 1	0.36 2	0.96 9	0.35 3	0.97	0.35 1
21	109-5_P. plurivora	0.37 4	0.37 4	0.37 4	0.37 4	0.37 4	0.37 4	0.37 4	0.37 6	0.37 6	0.37 6	0.37 7	0.99 6	0.36 1	0.99	0.36 4

Од приложениот матрикс со проценка на еволуционите разлики помеѓу видовите, може да се забележи дека видот *P. cactorum* има најголема забележана разлика во табелата (односно најмал индекс на еднаквост) со другите видови, а најмалку сродна е со *P. plurivora*.

Погоре споменатите анализи може да се забележат и од положбите на видовите *Phytophthora* на филогенетското дрво (дендрограм), а заради поголема прегледност истото е претставено на три начина (дендрограм 1, дендрограм 2 и дендрограм 3).

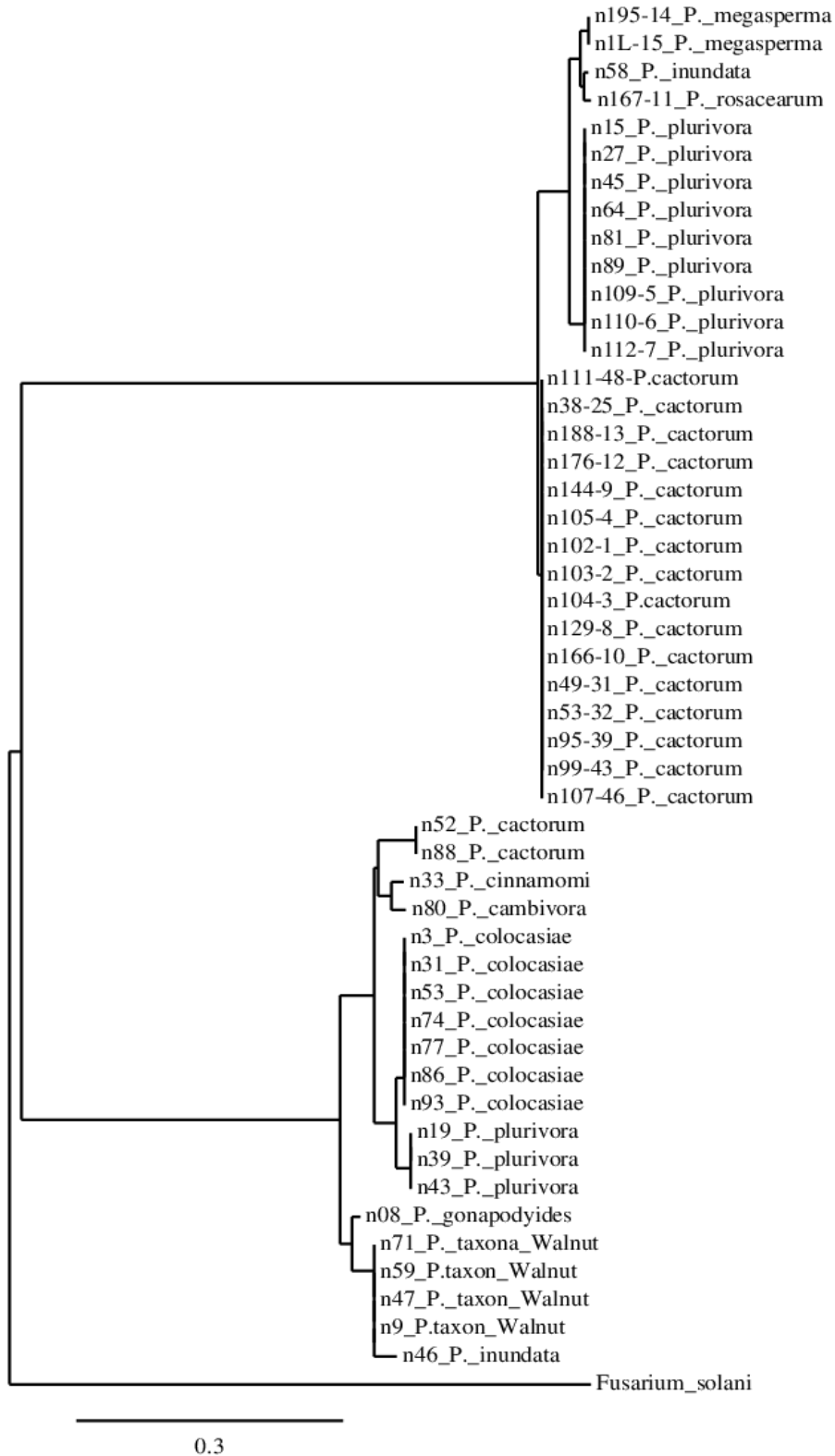


Дендрограм 1. Филогенетско дрво, изготвено според веб страницата:

<http://www.phylogeny.fr/>

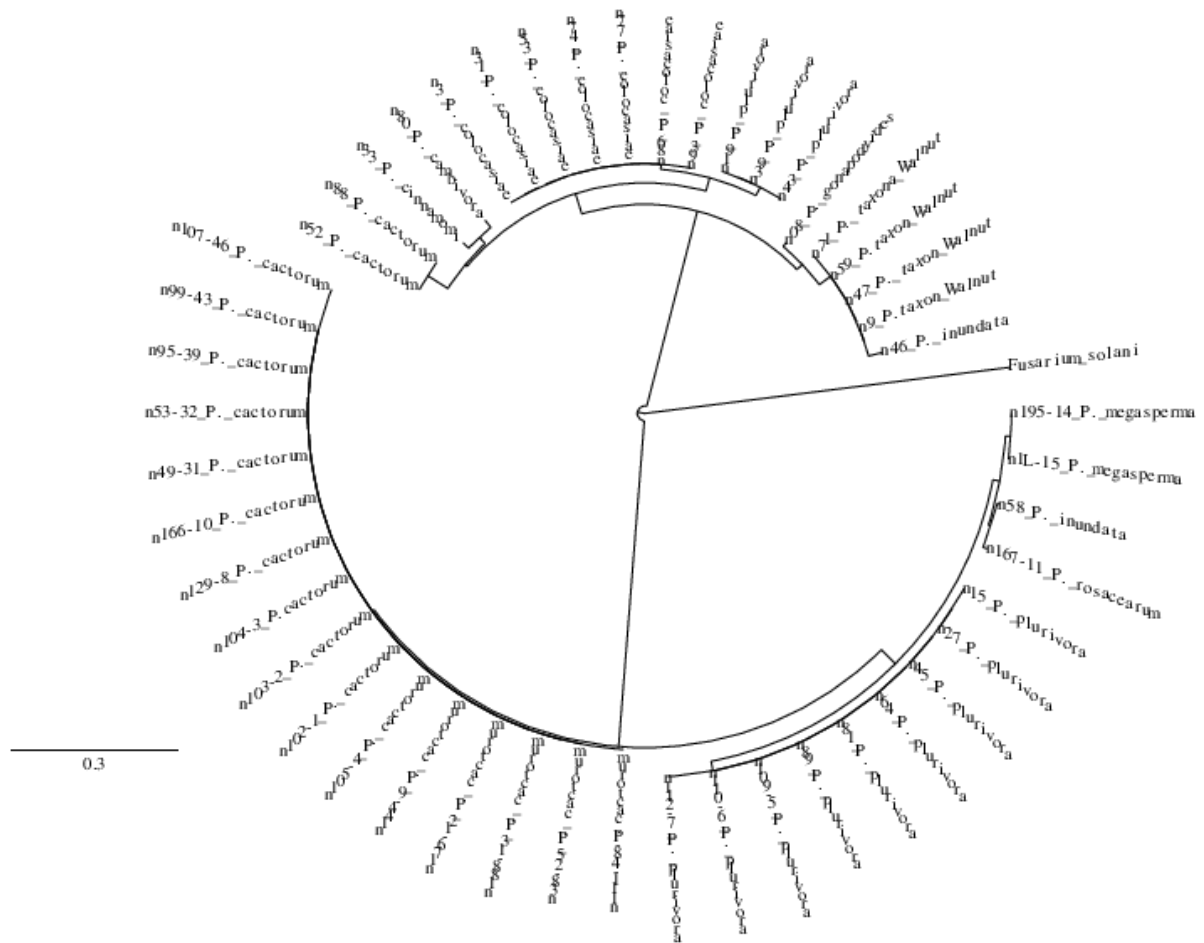
Dendrogram 1. Filogentic tree, prepared according to the web page:

<http://www.phylogeny.fr/>



Дендрограм 2. Филогенетско дрво, изготвено според веб страницата:
<http://www.phylogeny.fr/>

Dendrogram 2. Filigentic tree, prepared according to the web page:
<http://www.phylogeny.fr/>



Дендрограм 3. Филогенетско дрво, изготвено според веб страницата:

<http://www.phylogeny.fr/>

Dendrogram 3. Filogentic tree, prepared according to the web page:

<http://www.phylogeny.fr/>

Од погоре прикажаните дендрограми јасно може да се забележи дека постојат филогенетски разлики помеѓу изолатите од ист вид *Phytophthora* кои се изолирани од различен домаќин. Тоа е случај кај изолатите кои припаѓаат на видовите *P. cactorum*, при што може да се забележи дека постојат разлики помеѓу изолатите добиени од шумски екосистеми (домаќин - *Castanea sativa*) и земјоделски екосистеми (домаќин - *Malus domestica*). Друг е примерот со изолатите на видот *P. plurivora* меѓу кои постојат филогенетски разлики помеѓу оние добиени од шумски екосистем (домаќин - *Salix alba*) (домаќин -

Chamaecyparis stricta). Од друга страна пак, видот *P. inundata* резултирал со 2 изолата кои се изолирани од ист почвен примерок (домаќин - *Trachicarpus fortunei*) а сепак постои филогенетска разлика меѓу нив.

3.6. Опис на детектираните видови *Phytophthora*

Морфолошките анализи спроведени според користениот клуч за идентификација (Erwin and Ribeiro, 1996), а поткрепени со молекуларните анализи дадоа јасна слика за бројот на детектирани изолати кои припаѓаат на родот *Phytophthora*, како и бројот на изолати кои припаѓаат на одреден *Phytophthora* вид. Описот на детектираните *Phytophthora* видови, а според претходно извршеното морфолошко групирање е следен:

3.6.1. Група изолати на *Phytophthora cinnamomi* Rands

Оваа група се состоеше од 1 изолат, изолиран од примерок почва, колектирани во расадник (Европеан плантс, Тетово). Примерокот почва беше колектиран од микродепресија со растенија од видот туја ивоне (*Thuja ivone*), каде беа регистрирани симптоми на сушење (фотографија 21). Изолатите од овој вид имаа типична коралоидна форма на хранлива подлога ПДА, V8 агар и МЕА (фотографија 22). Просечниот дневен пораст на собна температура (24°C ±4°C) во темно, на хранлива подлога ПДА изнесуваше приближно 7,5 mm. Овој вид е хетероталичен, и затоа во чисти култури не формираше ооспори. Формирните спорангии беа со овоидна форма или елипсовидни до издолжено елипсовидни, без папила (пупка). Формирањето на спорангии беше со симподијален развој на спорангиофор веднаш до празна спорангија (фотографија 23). Просечната големина на формираните спорангии беше 70 x 35 µm. Во културите беа забележани хламидоспори со просечна големина од околу 45 µm, со исклучително тенки сидови, често се појавуваа во вид на карактеристично разграничување од неколку хламидоспори во гроздови (фотографија 23). Изолатите од овој вид беа едни од оние кои често формираа хифални задебелувања.



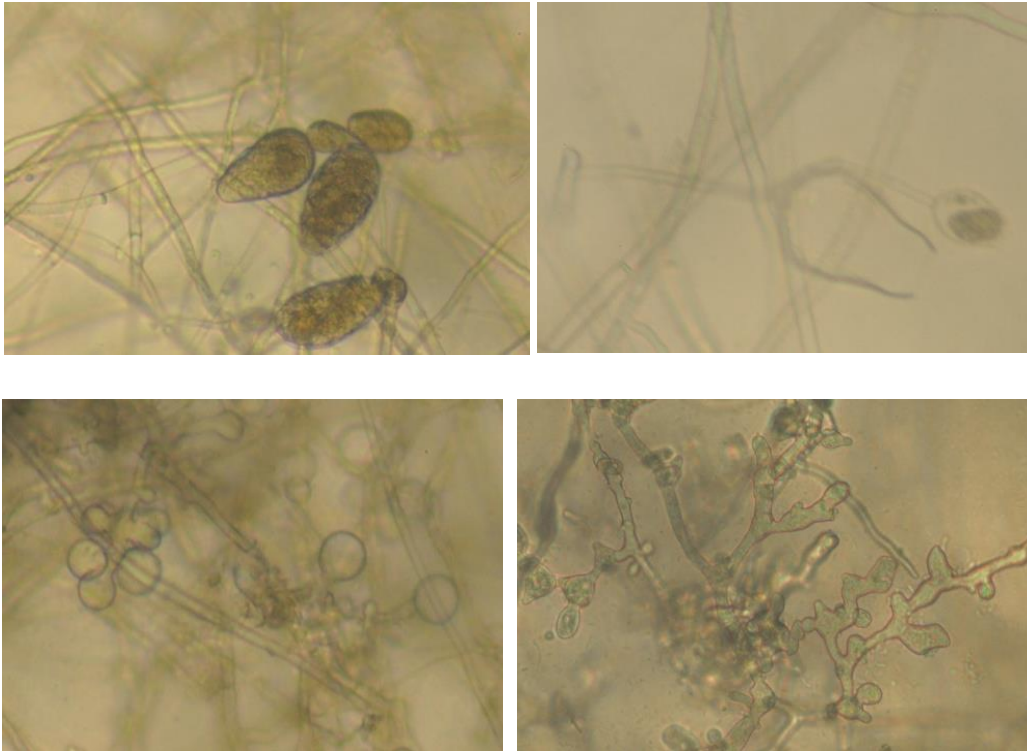
Фотографија 21. Микродепресија со *Thuja ivone* (туја), во расадник Еуропеан плантс, Тетово, место на колекција почвен примерок

Figure 21. Microdepression of *Thuja ivone*, thuja, nursery European plants, Tetovo, site of soil sample collection.



Фотографија 22. Морфологија на култура *P. cinnamomi* на хранлива подлога PDA, V8 и MEA (од лево кон десно)

Figure 22. Culture morphology of *P. cinnamomi* on PDA, V8 and MEA nutritious medias (from left towards right)



Фотографија 23. Плодни тела формирани од *P. cinnamomi*: спорангии (горе лево), развој на спорангиофор веднаш до празна спорангија (горе десно), карактеристично појавување на хламидоспори во гроздови (долу лево) и обилна појава на хифални задебелувања (долу десно)

Figure 23. Fruiting bodies produced by *P. cinnamomi*: sporangia (upper left), sporangiophore (upper right), characteristic chlamidospore appearance (down left) and massive production of hyphal swellings (down right)

3.6.2. Група изолати на *Phytophthora colocasiae* Racibirski

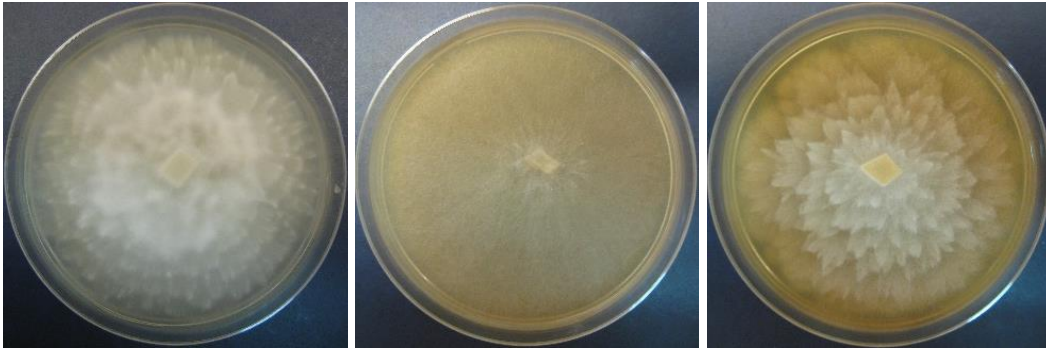
Оваа група се состоеше од 7 изолати, сите изолирани од 2 почвени проби, колектирани од саксии од расадникот Еуропеан плантс, Тетово. Растението домаќин од каде почвените примероци беа колектирани е *Berberis thunbergii* Golden rocket, зеленика (фотографија 24). Карактеристично за мицелијата на овие изолати беше што најчесто се развиваше во внатрешноста на хранливата подлога, одгледана на ПДА V8 агар и MEA хранливи подлоги (фотографија 25), за разлика од културите на другите видови кои најчесто развиваа мицелија и на површината на хранливата подлога во Петри садот. Просечната брзината на пораст на мицелијата изнесуваше приближно 6,5 mm на ден, на ПДА хранлива

подлога, на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно. Овој вид формираше ооспори со приближна големина од $25 \mu\text{m}$. Спорангиите беа со просечна големина од $60 \times 30 \mu\text{m}$, овоидни и елипсовидни и можеше да се забележи и дршка (pedicel), односно на местото каде е формирана на спорангиофорот може да се забележи еден вид „приклучок“, или хифално задебелување (фотографија 26).



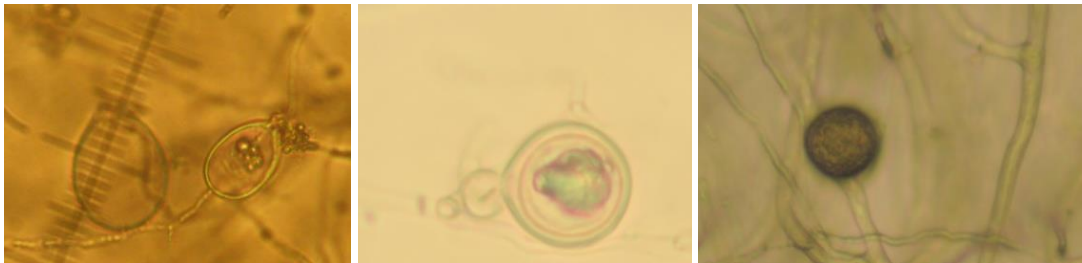
Фотографија 24. Колекција на почва од саксии со *Berberis thunbergii* Orange rocket (зеленика), во расадник Еуропеан плантс, Тетово

Figure 24. Collection of soil from pots with *Berberis thunbergii* Orange rocket (red barbery) in the European plants nurserie



Фотографија 25. Морфологија на култура *P. colocasiae* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 25. Culture morphology of *P. colocasiae* on PDA, V8 agar and MEA nutritious media, from left towards right



Фотографија 26. Плодни тела на *P. colocasiae*: спорангија со карактеристична дршка, ооспора и терминална хламидоспора (од лево на десно)

Figure 26. Fructing bodies formed by *P. colocasiae*: sporangium with characteristic pedicel, oospore and terminal chlamidospore (from left towards right)

3.6.3. Група изолати на *Phytophthora megasperma* Drechsler

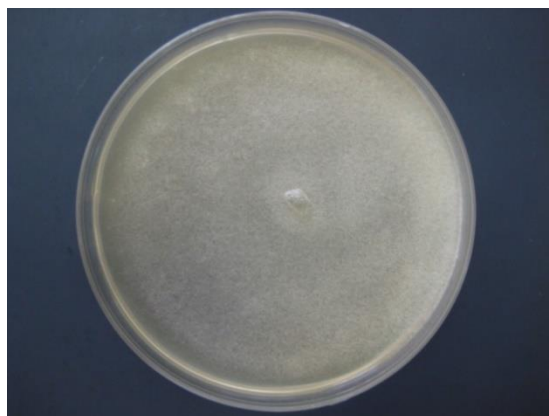
Оваа група се состои од 2 изолати. Примерокот почва од кој беа изолирани овие изолати беше колектиран од овоштарник од јаболка (*Malus domestica*) во сопственост на „Агроплод“ - Ресен (фотографија 30). Културите од овој вид на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, имаа дневен пораст од просечно 6 mm на ден на хранливи подлога ПДА. Формираните ооспори беа со големина од околу 38 μm . Спорангиите беа со просечна големина од 50 x 35 μm , со честа внатрешна пролиферација (ртење во спорангијата). Формата на спорангиите беше најчесто овоидна и обпириформна без папила. Забележано беше често

формирање на хифални задебелувања во корална форма во вид на кластери. Хламидоспори не беа забележани. Културите од овие 2 изолата беа изгубени пред да бидат документирани прецизно.



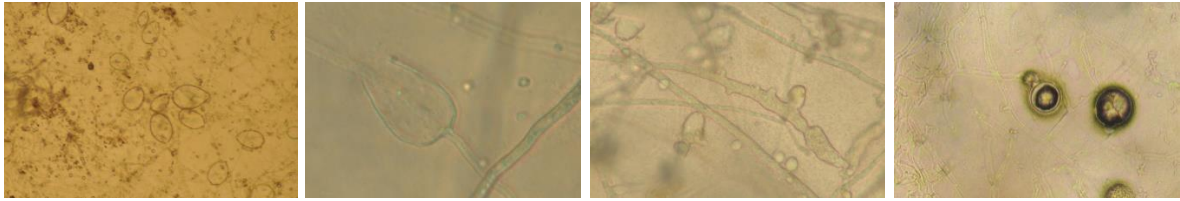
Фотографија 27. Место на колекција на примероци почва кои резултираа со
изолација на *P. megasperma* („Агроплод“, Ресен)

Figure 27. Collection site of the soil samples which resulted with isolation of *P. megasperma* (“Agroplod”, Resen)



Фотографија 28. Култура на *P. megasperma* на хранлива подлога ПДА

Figure 30. *P. megasperma* culture on PDA nutritious media



Фотографија 29. Плодни тела во култура на *P. megasperma*: спорангии, внатрешна пролиферација (ртење во споранагија), хифални задебелувања и ооспори (од лево кон десно)

Figure 29. Fructing bodies in culture of *P. megasperma*: sporangia, internal proliferation (sporangium proliferation), hyphal swellings and oospores (from left towards right)

3.6.4. Група изолати на *Phytophthora rosacearum* E.M. Hansen & Wilcox

Оваа група се состои од 1 изолат. Примерокот почва од кој овој изолат беше изолиран, колектиран беше од приватен овоштарник од јаболко (*Malus domestica*), во Претор (фотографија 30). Имајќи предвид дека овој вид е сегрегиран од комплексот *P. megasperma* оттаму и сличните карактеристики на овој вид со претходниот. Дневниот пораст беше просечно 6 mm на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, на ПДА хранлива подлога. Просечната големина на ооспорите и спорангиите не беше измерена. И за вој вид фотографии не постојат, зашто изолатот беше изгубен пред прецизно да биде документиран.



Фотографија 30. Јаболково стебло (*Malus domestica*) од Претор, каде беше
колектиран почвен примерок кој резултира со изолација на *P. rosacearum*.

Figure 30. Apple tree (*Malus domestica*) from Pretor, where collected soil sample
resulted with isolation of *P. rosacearum*



Фотографија 31. Култура на *P. rosacearum* на хранлива подлога ПДА

Figure 31. Culture of *P. rosacearum* on PDA nutritious media

3.6.5. Група изолати на *Phytophthora cactorum* (Lebert and Cohn) Schröeter

Оваа група се состои од 18 изолати. Примероците почва кои резултираа со изолати *P. cactorum*, беа колектирани во локалитетите: село Скудриње, Дебарско, по питом костен (*Castanea sativa*), село Мислешево, Струга, по јаболко (*Malus domestica*) и село Горна Бела Црква, Ресен по јаболко (*M. domestica*) (фотографии 32 и 33). Изолатите од овој вид имаа просечен дневен пораст од приближно 6,5 mm, на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, на хранлива подлога ПДА (слика 35). Видот е хомоталичен и формира округли и благо сплескани оогонии со просечни димензии 29 x 27 μm , со рамни сидови и правилни округли ооспори со просечни димензии 21 x 21 μm . Антеридиите беа со овална форма, паригени (paragenious) и странично прилепени (фотографија 35, долу). Просечните димензии на измерени антеридии изнесуваа 13 x 11 μm . Спорангиите беа со изразена папила (papillated), и беа формирани терминално, со правилна форма. Просечните димензии на измерените спорангии беа 45 x 35 μm . Формата на спорангиите беше елипсовидна, овоидна, округла или лимонеста. Спорангиофорите беа едноставни или симподијално разгранети и забележано беше типичното групно формирање на спорангии. Просечните димензии на хламидоспорите беа беа 22 x 21 μm , и ретко се формираа.



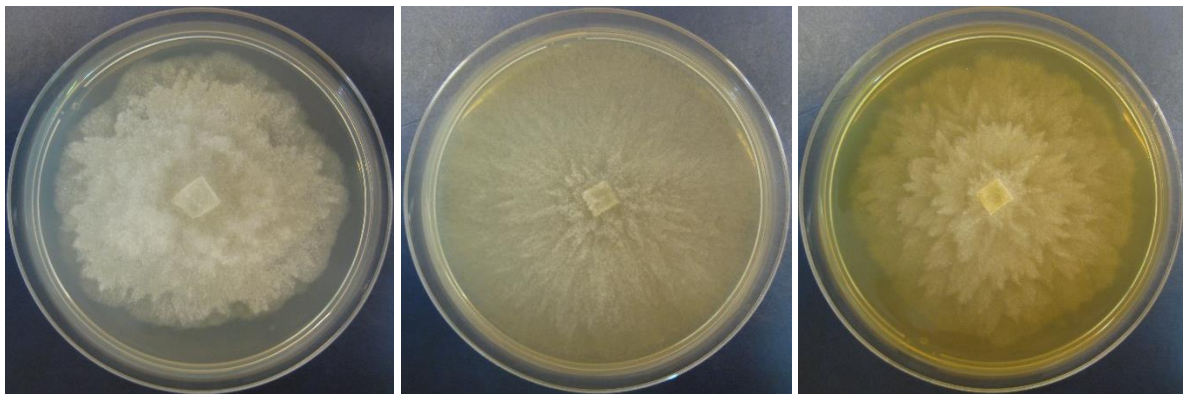
Фотографија 32. Колектирани примероци почва кои резултирале со изолати од *P. cactorum* од приватни расадници во Претор

Figure 32. Collected soil samples which resulted with isolates of *P. cactorum*, from private orchards in Pretor



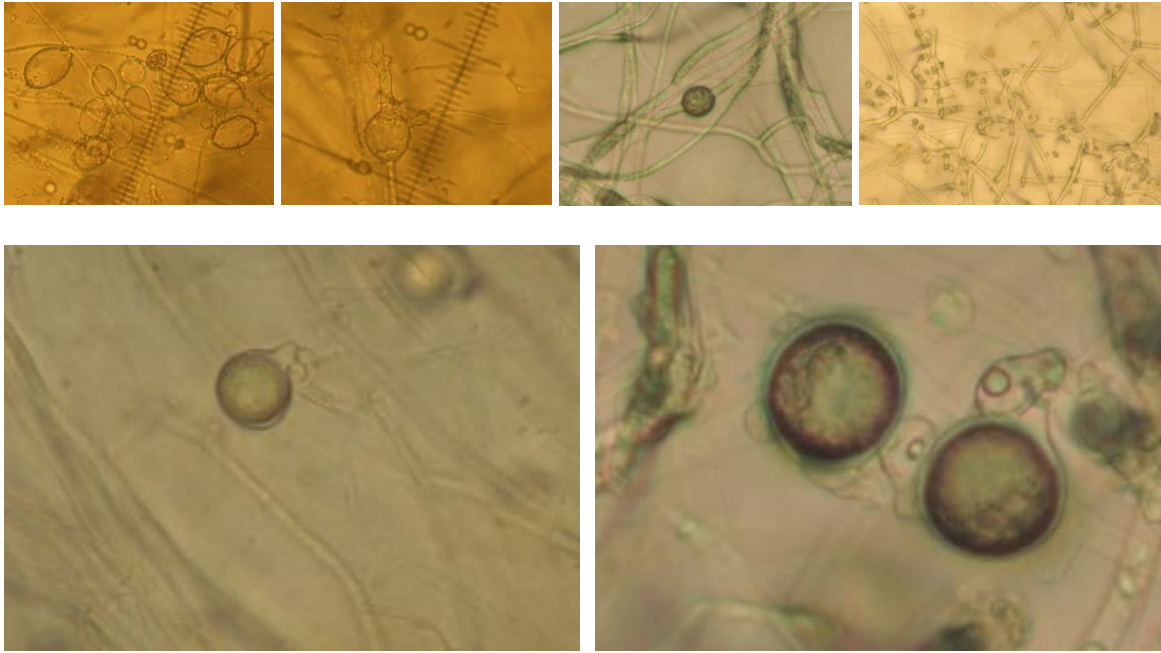
Фотографија 33. Симптоматски стебла од каде се колектирани примероци што резултирале со изолати од *P. cactorum*, јаболко (*M. domestica*) од село Мислешево, лево, и пупом костен (*C. sativa*) од село Калиште, десно

Image 33. Symptomatic trees where soil samples were collected and resulted with *P. cactorum* isolates, left apple tree (*M. domestica*) v. Mislesevo, left and sweet chestnut (*C. sativa*) v. Kaliste right



Фотографија 34. Морфологија на култура *P. cactorum* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 34. Culture morphology on PDA, V8 agar and MEA nutritious media, from left towards right



Фотографија 35. Плодни тела формирани од *P. cactorum*: карактеристично групно формирање спорангии, карактеристично `ртење на ооспора во спорангиофор, хламидоспора, карактеристични задебелувања на хифите (од лево на десно горе), оогонии со париген антеридиум (долу)

Figure 35. Fruting bodies formed by *P. cactorum*: characteristic oospore proliferation in sporangiophore, chlamidospore, characteristic hyphal swellings (upper left towards upper right), oogonia with paragenous antheridium (below)

3.6.6. Група изолати на *Phytophthora plurivora* Jung and Burgess

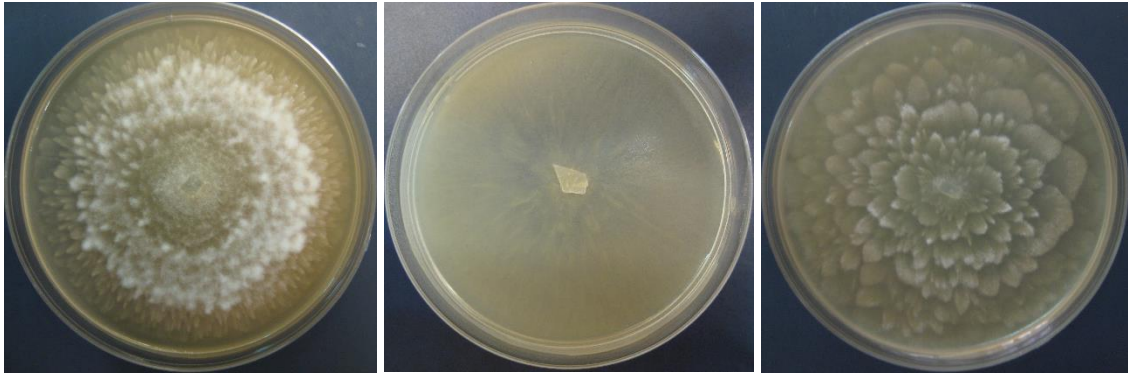
Оваа група се состоеше од 12 изолати. Почвените примероци кои резултираа со изолација на *P. plurivora* беа колектирани од *Salix alba* (врба) во близина на Бунец, и во расадник Еуропеан плантс, Тетово, на површина под садници од *Chamaecyparis stricta* (хамаеципарис) на микродепресија каде се слева вода (фотографија 36). Според морфолошките карактеристики овој вид бил порано идентификуван како *P. citricola* но сега е дел од комплексот *citricola*. Изолатите од овој вид имаа просечен пораст од приближно 7,5 mm дневно на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, на ПДА хранлива подлога. Видот е хомоталусен, формираше округли ооспори со просечни димензии од 18 μm . Има округли оогонии со просечни димензии од 25 μm и исто така округли и елипсовидни антеридии со различна положба на прилепување на оогонијата.

Формираните спорангии (фотографија 38, горе) беа со различни облици, од овоидни, обовоидни, во форма на лимон како и различни неправилни форми, и полубрадавичести (semi papillated). Просечните димензии на спорангиите беа 45 x 32 μm . Најчесто спорангиите беа формирани терминално на спорангиофори. Не беа забележани хламидоспори.



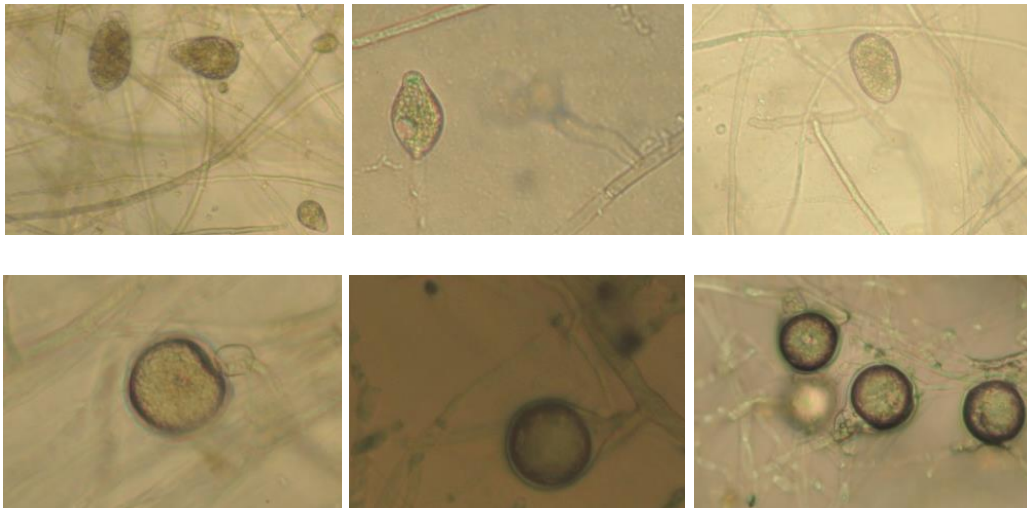
Фотографија 36. Микродепресија со *Chamaecyparis lawsoniana stricta* каде е колектиран примерок почва кој резултирал со изолат од *P. plurivora*

Figure 36. Microdepression with *Chamaecyparis lawsoniana stricta*, where collected soil sample which resulted with *P. plurivora* isolate



Фотографија 37. Морфологија на култура од *P. plurivora* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 37. Culture morphology of *P. plurivora* on PDA, V8 agar and MEA, from left towards right



Фотографија 38. Различни форми на спорангии од *P. plurivora*: овоидна, во форма на лимон со карактеристична дршка и овоидна интеркаларно вглабната (од лево на десно горе) и оогонии со различни форми (долу)

Figure 38. Different types of sporangia formed by *P. plurivora*, ovoid, lemon shaped with characteristic pedicel and ovoid intercalary profound (up left towards up right) and oogonia different types of oogonia (below)

3.6.7. Група изолати на *Phytophthora gonapodyides* (H.E. Petersen) Buisman

Оваа група се состои од 1 изолат. Почвениот примерок од кој беше изолиран овој изолат, колектиран беше од мешана шума од *Abies alba* (ела) и *Fagus toesiaca* (бука) во НП „Маврово“ и тоа во близина на калиште од диви свињи. Културата на овој вид има карактеристична форма на лепеза, одгледана на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA (фотографија 39). Дневниот пораст на културата изнесуваше приближно 3 mm на ден, на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, на ПДА хранлива подлога. Хифите беа со неправилна форма со проширувања и стеснувања на местата на странично разгранување. Овој вид е хетероталусен. Во чистите култури на овие изолати не беа забележани плодни тела и гаметангии. Исто така во чисти култури не формираше спорангии. Детектирањето на овој вид се базираше само на молекуларни методи.



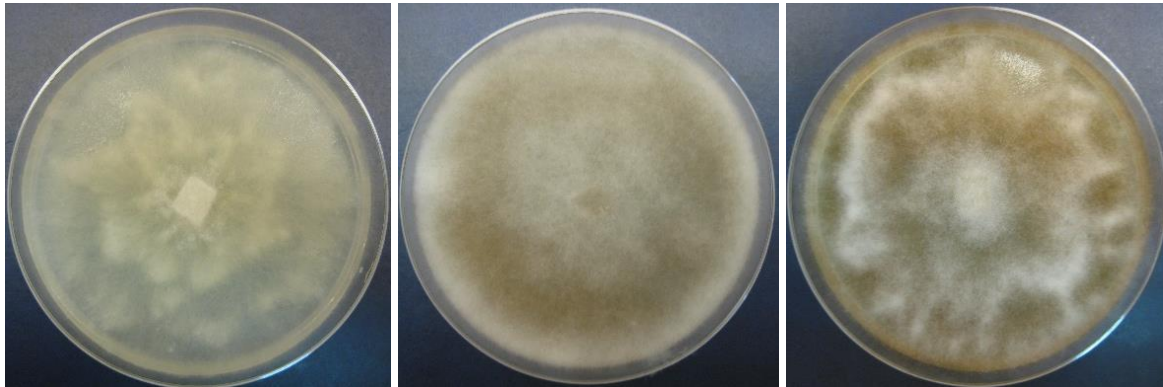
Фотографија 39. Морфологија на култура од *P. gonapodyides* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 39. Culture morphology of *P. gonapodyides* on PDA, V8 agar and MEA, from left towards right

3.6.8. Група изолати на *Phytophthora inundata* Brasier, Sanchez-Hernandez & S. A. Kirk

Оваа група се состоеше од 2 изолати. Примерокот почва кој резултираше со изолација на овие изолати беше колектиран од несимптоматско стебло на

Trachicarpus fortunei (палма) од расадникот „Комуналец“ во Охрид. Имајќи предвид дека овој вид е во истиот ITS 6 клад со претходниот вид, забележани беа и сличности во морфологијата на мицелијата. Просечниот дневен пораст на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, на ПДА хранлива подлога на изолатите беше просечно 4,5 mm. Хетероталусен вид, отука не формираше ооспори во чиста култура. Спорангии во културите на овие два изолата не беа регистрирани.



Фотографија 40. Морфологија на култура *P. inundata* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 40. Culture morphology of *P. inundata* on PDA, V8 agar and MEA, from left towards right

3.6.9. Група изолати на *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman

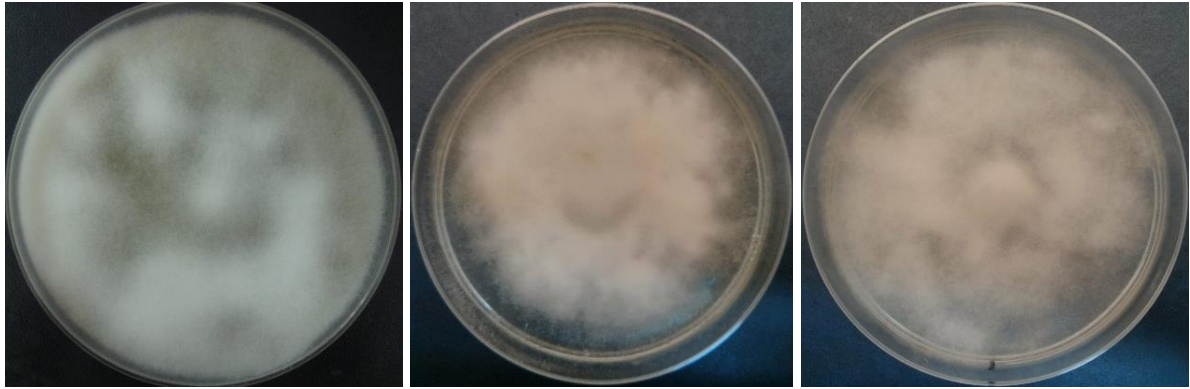
Оваа група ја сочинуваа 1 изолат. Примерокот почва кој резултираше со изолат *P. cambivora* беше колектирани од село Скудриње, Дебарско, по питом костен (*Castanea sativa*). Изолатите од овој вид имаа изразена, карактеристична влакнетост, или воздушна мицелија. Просечната брзина на пораст на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), во темно, на ПДА хранлива подлога беше приближно 5,5 mm. Хифите имаа карактеристичен изглед на корал и со ретка појава на орнаменти. Спорангиите беа со рамен врв без папила (non-papillate) со различни облици. Спорангиите беа формирани терминално на врв на спорангиофори. Просечните димензии на спорангиите беа $48 \times 32 \mu\text{m}$. Забележана беше честа појава на повеќекратно внатрешно `ртење или пролиферација (nested internal proliferation-`ртење една во друга спорангија), како и појавата на внатрешно

ртење со надворешно формирање на спорангија (extended internal proliferation) (фотографија 43, горе). Спорангиите беа овоидни и елипсести. Оогониите беа со димензии од околу 40 μm со кружни украси на површината оогониите. Ооспорите беа благо округли со просечни димензии од 30 μm (фотографија 43, долу). Просечната димензија на антеридиите изнесуваше 25 x 15 μm .



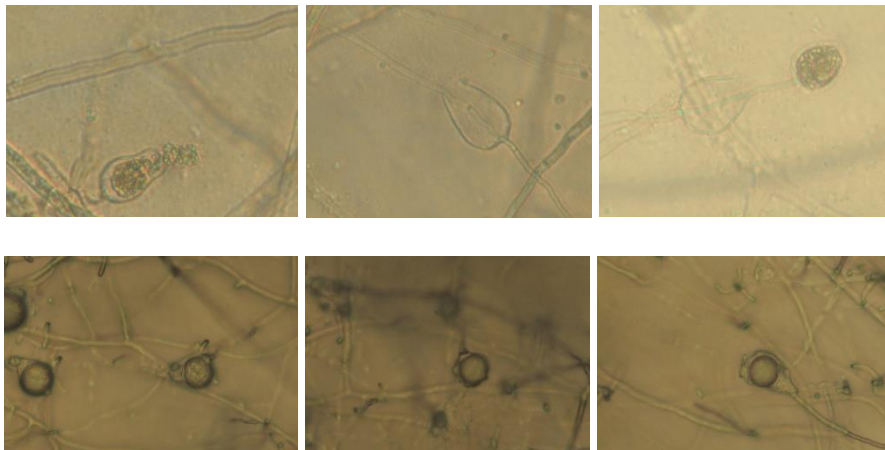
Фотографија 41. Колекција на почвен примерок кој резултирал со *P. cambivora* изолати, село Скудриње, Дебарско

Figure 41. Soil sample collection which resulted with *P. cambivora* isolate: v. Skudrinje, Debar



Фотографија 42. Морфологија на култура *P. cambivora* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 42. Culture morphology of *P. cambivora* on PDA, V8 agar and MEA, from left towards right



Фотографија 43. Плодни тела формирани во култура на *P. cambivora*: спорангија која ослободува зооспори, внатрешно прортување на спорангија, внатрешно `ртење со надворешно формирање спорангија (горе од лево кон десно) и ооспори со карактеристични кружни украси на површината (долу)

Figure 43. Fructing bodies produced in *P. cambivora* culture: sporangium releasing zoospores, internal proliferation of sporangium, internal proliferation with external sporangium production (up left towards up right) and oospore with characteristic circle ornaments on the surface of the oospore (below)

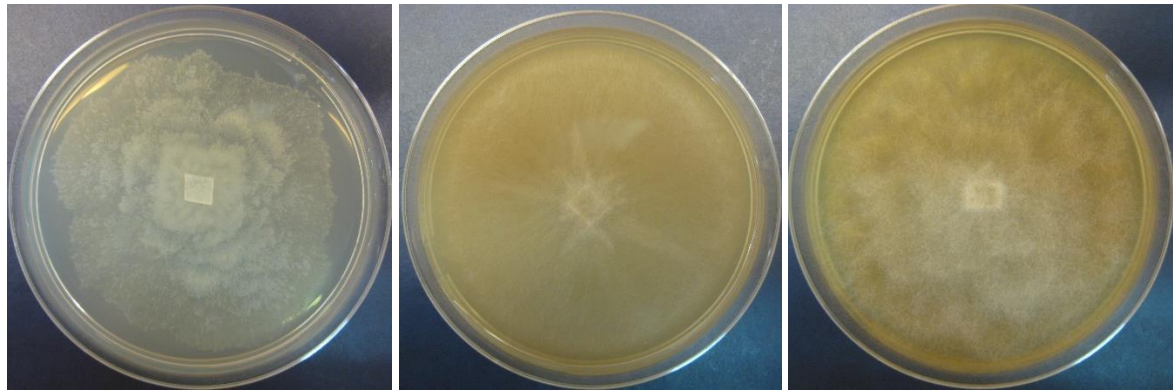
3.6.10. Група изолати на *Phytophthora Taxon Walnut*

Оваа група ја сочинуваа 4 изолати. Почвените проби од кои беа изолирани овие изолати беа колектирани од расадникот Еуропеан плантс (фотографија 44), Тетово, од микродепресија каде се собираше вода, со растителен вид туја ивоне (*Thuja ivone*). Колониите од овој вид формираа густа и воздушна мицелија, и имаа просечен дневен прираст од 5,5 mm на хранлива подлога PDA, на собна температура ($24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$), на темно. Формирање плодни тела не беше забележано, и затоа идентификацијата на овој вид беше базирана на молекуларни методи.



Фотографија 44. Колекција на почвен примерок кој резултирал со изолати на *P. taxon Walnut*, Еуропеам плантс, Тетово

Figure 44. Soil sample collection which resulted with *P. taxon Walnut* isolats, European plants, Tetovo



Фотографија 45. Морфологија на култура *P. taxon Walnut* на хранлива подлога PDA, V8 agar и MEA, од лево кон десно

Figure 45. Culture morphology of *P. taxon Walnut* on PDA, V8 agar and MEA, from left towards right

На табела број 12 даден е приказ на видовите *Phytophthora* според екосистемите во кои се детектирани, додека на табела број 13, даден е приказ на видовите *Phytophthora* според растението домаќин од каде беше колектиран почвениот примерок.

Табела 12. Детектирани *Phytophthora* видови според припадност во екосистеми

Table 12. Detected *Phytophthora* species according to ecosystem they belong

	Шумски екосистеми Forest ecosystems	Земјоделски екосистеми Agrycultural ecosystems
Детектирани <i>Phytophthora</i> видови	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cactorum</i>
	<i>P. cambivora</i>	<i>P. megasperma</i>
	<i>P. cactorum</i>	<i>P. rosacearum</i>
	<i>P. plurivora</i>	
	<i>P. gonapodyides</i>	
	<i>P. colocasiae</i>	
	<i>P. taxon Walnut</i>	
	<i>P. inundata</i>	

Табела 13. *Phytophthora* видови според растенија домаќини

Table 13. *Phytophthora* species according to host plants

Видови <i>Phytophthora</i> <i>Species Phytophthora</i>	Растенија домаќини Host plants
<i>P. cinnamomi</i>	Туја ивоне (<i>Thuja ivone</i>)
<i>P. cambivora</i>	Питом костен (<i>Castanea sativa</i>)
<i>P. cactorum</i>	Питом костен (<i>Castanea sativa</i>), јаболко (<i>Malus domestica</i>)
<i>P. plurivora</i>	Врба (<i>Salix alba</i>), хамаеципарис (<i>Chamaecyparis lawsoniana stricta</i>)
<i>P. gonapodyides</i>	Мешана шума од <i>Abies alba</i> (ела) и <i>Fagus moesiaca</i> (бука)
<i>P. colocasiae</i>	Зеленика (<i>Berberis thunbergii</i> Golden rocket)
<i>P. taxon Walnut</i>	Туја ивоне (<i>Thuja ivone</i>)
<i>P. inundata</i>	Палма (<i>Trachicarpus fortunei</i>)
<i>P. megasperma</i>	Јаболко (<i>Malus domestica</i>)
<i>P. rosacearum</i>	Јаболко (<i>Malus domestica</i>)

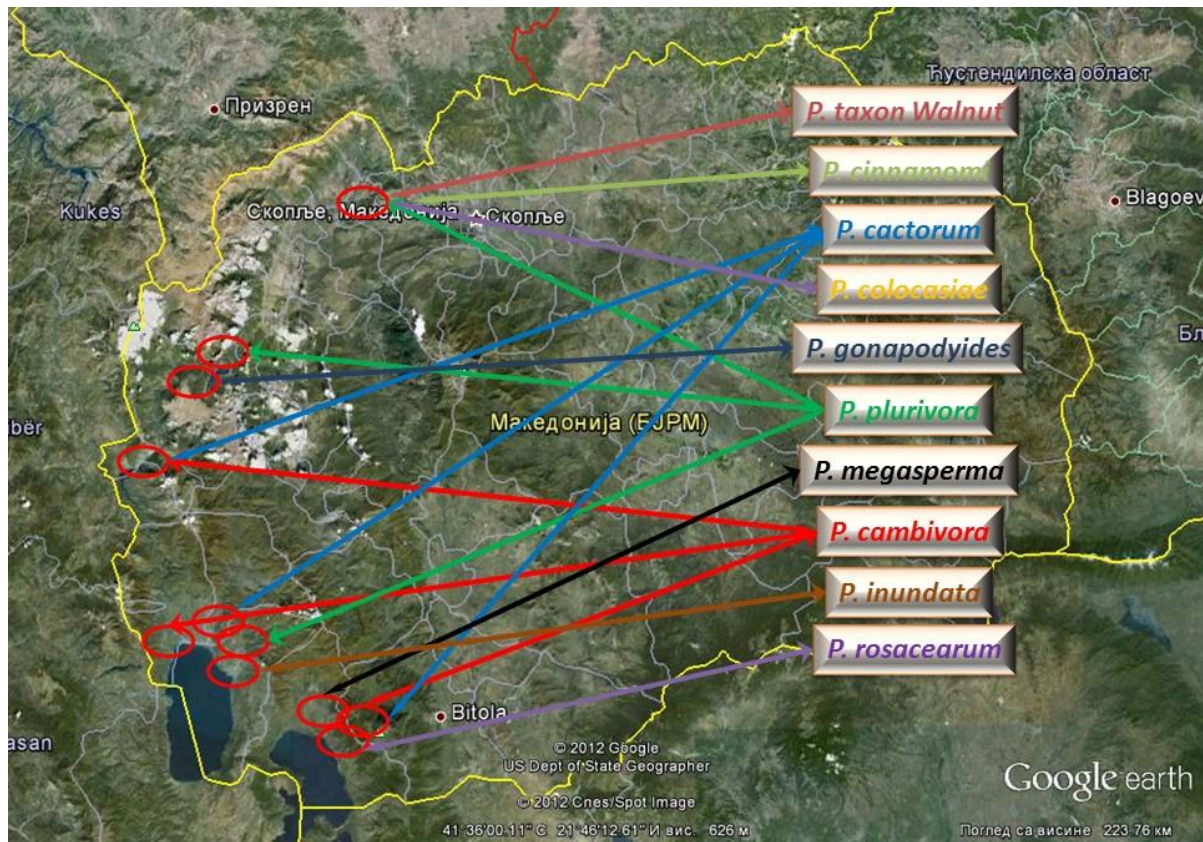
На следната табела (табела број 14) претставени се изолираните видови *Phytophthora* според: морфолошката група на која припаѓаат (Waterhouse, 1963a), ITS кладовите на кои припаѓаат културите според нивните филогенетски карактеристики (Martin et al., 2014), бројот на изолати со потеклото од кој екосистем се изолирани (шумски или земјоделски), како и информацијата за тоа дека сите видови се за првпат регистрирани во Македонија.

Табела 14. Поделба на детектираните *Phytophthora* видови според морфолошките групи на кои припаѓаат

Table 14. Classification in morphological groups of the detected *Phytophthora* species

Број No	Вид Species	Морфолошка група Morphological group	ITS Clade	Број на изолати Number of isolats Σ (me + ze) Σ (fe + ae)	Прв наод во Македонија First report for Macedonia
1	<i>P. cinnamomi</i>	VI	7	1 (1+0)	+
2	<i>P. cambivora</i>	VI	7	1 (1+0)	+
3	<i>P. cactorum</i>	I	1	18 (4+14)	+
4	<i>P. plurivora</i>	III	2	12 (12+0)	+
5	<i>P. gonapodyides</i>	V/VI	6	1 (1+0)	+
6	<i>P. colocasiae</i>	IV	2	7 (7+0)	+
7	<i>P. megasperma</i>	V	6	2 (0+2)	+
8	<i>P. rosacearum</i>	V	6	1 (0+1)	+
9	<i>P. inundata</i>	VI	6	2 (2+0)	+
10	<i>P. taxon Walnut</i>	/	6	4 (4+0)	+

На следната карта прикажана е дистрибуцијата на *Phytophthora* видовите според местата каде се колектирани.



Карта 3. Дистрибуција на *Phytophthora* видови на територијата на Република Македонија

Map 3. Distribution of *Phytophthora* species on the Republic of Macedonia territory

Од картата на дистрибуција на видовите *Phytophthora* на територијата на Македонија, може да се забележи дека локалитетите со детектирани изолати од овој вид се распространети во крајните западни делови на Македонија. Видовите *P. cactorum*, *P. plurivora* и *P. cambivora* беа детектирани на по три локалитети, видовите *P. rosacearum*, *P. inundata*, *P. megasperma*, *P. gonapodyides*, *P. colocasiae* и *P. cinnamomi* беа детектирани на само по еден локалитет. На еден локалитет, односно објектот Еуропеан плантс од Тетово детектирани беа 4 различни видови *Phytophthora*, и тоа *P. taxon Walnut*, *P. cinnamomi*, *P. colocasiae* и *P. plurivora*, од кои *P. taxon Walnut*, *P. cinnamomi*, *P. colocasiae* се ексклузивно присутни само на овој објект.

Имајќи предвид, дека објектот Еуропеан плантс од Тетово освен производител е најголем увозник и извозник во Македонија (лична комуникација со вработени) моменталната состојба на присуство на неколку патогени заболувања кои не се присутни на други локалитети во Македонија претставува сериозна закана за проширување на овие регистрирани патогени во природните екосистеми на територијата на Република Македонија. Во предвид беше земено дека поголемиот број од симптоматски растенија потекнуваа од саксиско производство и препорачано беше симптоматските растенија да бидат уништени.

3.7. Патогеност

Користени беа 7 изолати според случаен избор и тоа по еден за секој од детектираните видовите *Phytophthora* за кои постојат живи култури. Предизвиканите лезии (фотографија 46) на секое стапче беа прецизно измерени и вредностите се претставени во тебела број 15.



Фотографија 46. Предизвикани лезии на инокулирани костенови стапчиња

Figure 46. Lesion produced on inoculated chestnut sticks

Табела 15. Вредности за предизвикани лезии на секое инокулирано стапче

Table 15. Dimensions of the produced lesions on the inoculated stics

Р.бр. №	Дијаметар на стапче Stick diameter (мм)	Вредности за димензии на предизвикани лезии според видови <i>Phytophthora</i> (cm) Values for the dimensions of the lesions produced according to species <i>Phytophthora</i> (cm)						
		<i>P.colocasiae</i>	<i>P.cambivora</i>	<i>P.taxon</i> Walnut	<i>P.cinnamomi</i>	<i>P.inundata</i>	<i>P.gonapodyides</i>	<i>P.cactorum</i>
1	5-10	4.9	3.3	0	1.9	0	1.6	5.7
2		3.2	2.9	4.2	3.5	2.1	2.4	4.9
3		3.4	3.5	2.4	2.4	2.1	2.2	4.1
4		0	2.2	2.2	2.4	2.4	2.4	4.7
5		3.8	2.9	2.1	2.1	1.9	1.8	4
6		5.1	3.1	0	3	2.2	3.4	2.9
7		3.1	3.5	2	2.9	1.8	2.1	3.4
8		4.7	3.1	2.4	3.1	2.3	2.2	4.7
9		4.1	3	2.2	2.2	2.2	1.8	5.1
10		3.2	3.4	2.1	2.2	1.9	1.9	3.9
11		3.4	3.6	2.5	2.4	2.2	2.6	4.2
12		3.9	2.4	2	2.4	2.6	2	4.6
13		3	3	2	3.6	2	2.4	4.9
14		4.7	2.2	2.5	2.6	2	3.6	5
15		5	3.9	2.6	3.3	2.4	2.1	4
16		3.2	3.3	2.5	2.9	2.5	2.6	5.9
17		5.2	3	2.1	3.3	2	2.4	3.6
18		3	3.9	2	2.3	2.6	2.4	3.2
19		4.1	3.6	2.9	2	2.2	2	2.2
20		4.9	3	3.9	2.6	2	2.7	3.1
1	10-15	0	3.3	2.9	2.3	2.4	2	3.9
2		3	2	2.2	2.7	2.3	2.7	3.5
3		2.9	2.2	2.4	3.1	2.1	2	4.4
4		4.1	2.2	1.9	2.9	2.2	2.9	4.9
5		3.8	2.1	4.4	2.8	2.4	2.8	3.3
6		0	2.2	2.1	1.9	2.2	2.9	3.9
7		3	1.9	2.4	2.9	2.1	2.3	3.3
8		3.3	3.1	1.9	2.4	2.7	1.9	4.9
9		2.9	2.9	1.9	3.1	2.9	2.9	3.8
10		3.5	3.6	3.9	2.7	2	2.5	4.7
11		3.6	3.6	2.2	3.6	2	2	5.3
12		1.9	3.1	2.1	2.6	2.4	2	3
13		3.9	3.5	2.3	2.4	2.4	2.4	3.9
14		5.1	3.2	4.1	2.6	2.2	2.3	5.9
15		5.1	3	4.1	3	2.5	2	5.5
16		3.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.6	4.1
17		3.2	3.4	2.1	3.2	2	2.4	4.1
18		4.7	2.9	2.4	2	2.6	2.4	4
19		3.3	3.1	2.1	2.2	2.1	2.3	3.1
20		4.2	3.4	2.2	2.7	2.7	3.3	3.5

Табела 16. Највисока и најниска вредност на предизвикани лезии на костенови стапчиња

Table 16. Highest and lowest values of the produced lesions on chestnut stics

Дијаметар на стапче Stick diameter (мм)		Користени видови <i>Phytophthora</i> во тест за оценка на патогеност Used <i>Phytophthora</i> species for pathogenicity tests						
		<i>P.colocasiae</i>	<i>P.cambivora</i>	<i>P.taxon</i> Walnut	<i>P.cinnamomi</i>	<i>P.inundata</i>	<i>P.gonapodyides</i>	<i>P.cactorum</i>
5-10	најниска вредност за лезија	3,3	2,2	2,1	1,9	1,8	1,6	2,2
	највисока вредност за лезија	5,2	3,9	4,2	3,5	2,6	3,6	5,9
10-15	најниска вредност за лезија	1,9	1,9	1,9	1,9	2,0	1,9	3,1
	највисока вредност за лезија	5,1	3,6	4,4	3,6	2,9	3,3	5,9

Од податоците во табела број 16 може да се забележат најниските и највисоките вредности на димензиите за лезиите предизвикани на костеновите стапчиња од секој *Phytophthora* вид чија патогеност кон питом костеновите стапчиња беше тестирана. Димензиите на предизвиканите лезии се движеа од 1,6 cm до 5,9 cm.

Анализата на податоците беше извршена со помош на алатката „two way ANOVA“ каде како фактор беа користени 2 различни дебелини на стапчиња од питом костен, и тоа 5-10 mm и 10-15 mm, додека двата фактора беа тестирани на 7 параметри, патоген потенцијал на 7 видови *Phytophthora*. Резултатите од статистичката анализа за секој параметар (*Phytophthora* вид) се претставени во табелата подолу:

Табела 17. Резултати од статистичка анализа на вредностите за должини на предизвиканите лезии

Table 17. Results of the statistical analysis of the dimensions of produced lesions

	<i>P.colocasiae</i>	<i>P.cambivora</i>	<i>P.taxon Walnut</i>	<i>P.cinnamomi</i>	<i>P.inundata</i>	<i>P.gonapodyides</i>	<i>P.cactorum</i>	Total
5-10 mm								
Count	20	20	20	20	20	20	20	140
Sum	71	61.8	29.2	51.4	37.8	43.6	86.8	381.6
Average	3.55	3.09	1.96	2.57	1.89	2.18	4.34	2.79714
Variance	2.10944	0.14988	1.47155	0.27122	0.47655	0.25511	0.70266	1.43216
10-15 mm								
Count	20	20	20	20	20	20	20	20
Sum	53	51	52	53.6	46.6	49.8	81.2	387.2
Average	2.65	2.55	2.6	2.68	2.33	2.49	4.06	2.76571
Variance	2.10944	0.37611	0.77555	0.144	0.08011	0.16766	0.39155	0.82257
Вкупно								
Count	40	40	40	40	40	40	40	
Sum	124	112.8	91.2	105	84.4	93.4	168	
Average	3.1	2.82	2.28	2.625	2.11	2.335	4.2	
Variance	2.21157	0.32589	1.17221	0.19986	0.31463	0.22555	0.53894	

Од сумарните податоци од статистичката анализа може да се забележи дека постои значителна варијација на вредностите на предизвиканите лезии на два различни дијаметри на костеновите стапчиња. Имено, за видот *P. colocasiae* варијабилноста на вредностите на предизвиканите лезии споредено за двете користени дебелини на костенови стапчиња е еднаква. За видот *P. inundata* вредностите за варијабилноста на предизвиканите лезии споредено за двете користени дебелини на костенови стапчиња е со најголема разлика. Сумарните вредности за варијабилност на предизвиканите лезии за двете дебелини на инокулирани костенови стапчиња покажуваат наголема варијабилност кај *P. cactorum* додека најмала кај *P. cinnamomi*.

Сумарните вредност од предизвиканите лезии за двете дебелини на инокулирани костенови стапчиња се најмалки за видот *P. inundata* а најголеми, односно двојно поголеми за видот *P. cactorum*. Од ова може да се констатира дека од видовите *Phytophthora* чија патогеност беше тестирана, видот *P. inundata* е најмалку патоген додека видот *P. cactorum* е најпатоген кон костеновите стапчиња.

На графицице број 3 и 4 може да се забележи дека највисоки вредности на димензии на лезиите без разлика на дијаметарот на костеновите стапчиња предизвикува видот *P. cactorum*, додека најниската вредност за димензии на предизвиканите лезии има видот *P. inundata*. На следната табела може да се забележат минималните и максималните вредности за секој *Phytophthora* вид за двата користени дијаметри на костенови стапчиња, исклучувајќи ги вредностите еднакви на 0, каде никаква лезија не се развила.

График 2. Графички приказ на вредностите за предизвикани лезии

Chart 2. Graphical view of the values of the prodiced lesions

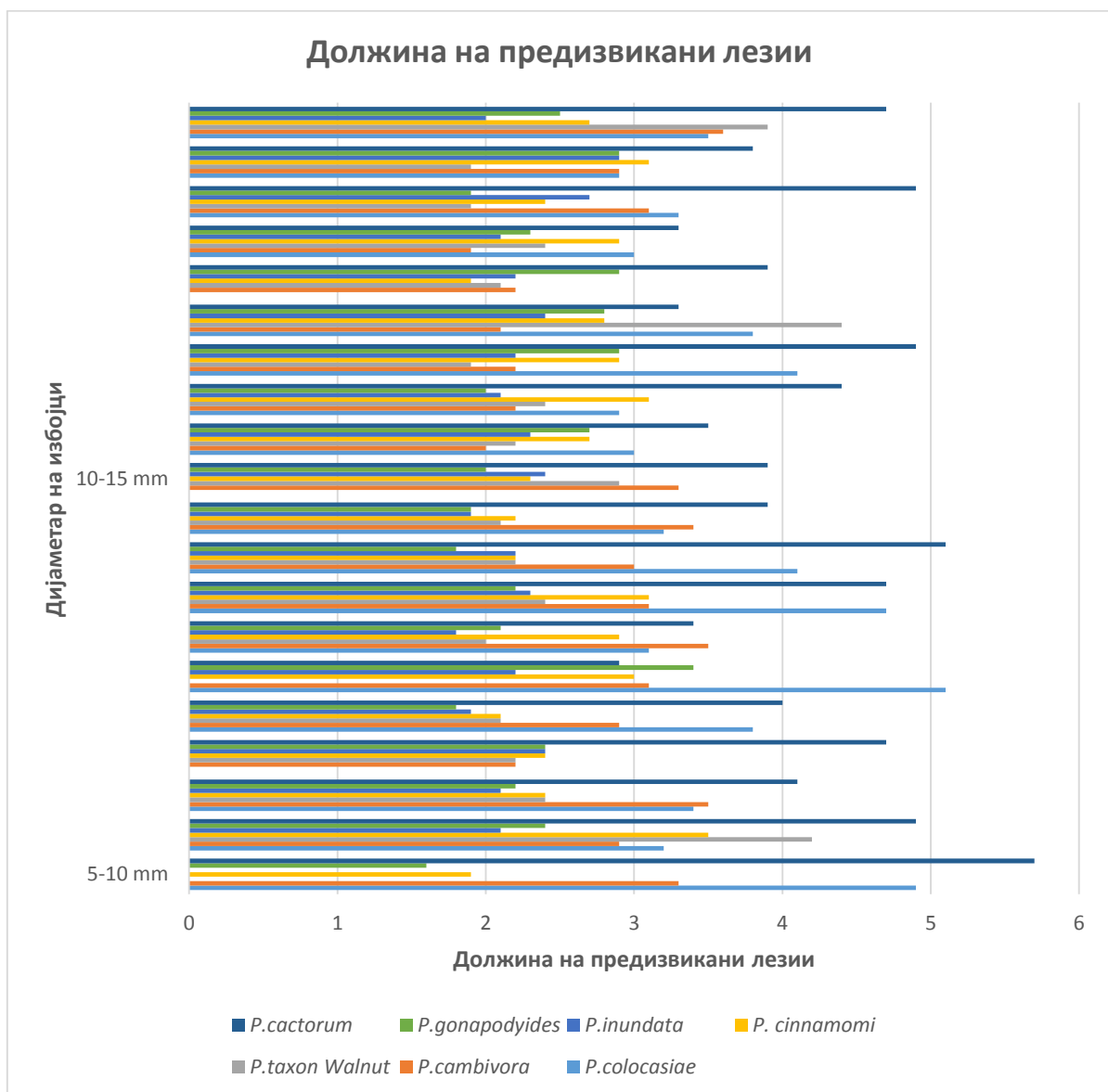


График 3. Радијален приказ на вредностите за предизвикани лезии

Chart 3. Radial view of the values of produced lesions



Споредено со достапната литература за досегашни истражувања на ова поле во Светот, спроведените тестови за патогеност тестираните видови е во корелација со постоечките истражувања:

- видот *P. cactorum* за прв пат бил регистриран како предизвикувач на гниење на кактус (*Cereus giganteus* и *Melocactus nigrotomentosus*) во Чешка (Lebert & Cohn, (1870), цитирано во (Erwin and Ribeiro, 1996)), но е широко распространет вид. Предизвикува гниење на кореновиот систем и базалниот дел, гниење на плодови, листови и изданци, како и рак рани. Паразитира повеќе од 200 растителни видови (меѓу кои: *Fagus* spp., *Juglans regia*, *Malus pumila*, *Castanea sativa*) во 150 родови претставници на 60 фамилии на растенија (Tucker, (1993) и Nienhaus, (1960), цитирано во Erwin and Ribeiro (1996)). Освен тоа, предизвикува некрози на инокулирани стебла од *Quercus robur* (Jung et al., 1996), на јаболко, јагода и рододендрон со изразена специфичност кон домаќин на гентски различни изолати (Hantula et al., 2000), париципира во комплексот предизвикувачи на мастилеста болест по питомиот костен (Vettraino et al., 2001) и предизвикува лезии на бреза (Lilja et al., 1998; Lilja et al., 1996).

- видот *P. cambivora* бил за прв пат опишан од Petri (1917) (цитирано во Erwin and Ribeiro (1996) како предизвикувач на мастилеста болест по костен и даб. Предизвикува рак рани, гниење на кореновиот систем на растенија претставници на 30 родови (меѓу кои: *Castanea* spp., *Fagus* spp., *Juglans* spp., *Malus* spp.) во 15 растителни фамилии, од кои голем број дрвенести растителни видови (често во заедница со други видови *Phytophthora*), како и гниење на тревести растенија доколку се вештачки инокулирани (Erwin and Ribeiro, 1996; Vettraino et al., 2001; Waterhouse and Waterston, 1966).

- видот *P. plurivora* била изолиран од природни екосистеми од различни домаќини и ралични делови од светот. Предизвикува провидност и умирање на крошна, рудиментирање и хлороза на листови, губење на коренова маса, лезии, гниење во базален дел, воздушни рак рани и умирање на изданци. Патоген кон голем број дрвенести растенија *Abies alba*, *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Acer platanoides*, *Aesculus hippocastanum*, *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus rubra*, *Rhododendron* spp., *Syringa vulgaris*, *Tilia* spp., *Tsuga Canadensis* (Jung and Burgess, 2009a).

- видот *P. cinnamomi* за првпат бил регистриран како патоген кој предизвикувал рак рани на циметно дрво (*Cinnamomum burmannii*) во Бурма (Rands, (1922), цитирано во Erwin and Ribeiro (1996)). Оттогаш овој *P. cinnamomi* претставува сериозен патоген кој најчесто предизвикува гниење на кореновиот систем, гниење на срцевина и сушење на бројни дрвенести растенија домаќини претставници од 266 родови во 90 растителни фамилии (Tucker, (1933), Thorne & Zentmyer, (1954), Zentmyer, (1980), цитирано во Erwin and Ribeiro (1996)).

- видот *P. colocasiae* за првпат бил регистриран како патоген предизвикувач на дамки на лист на таро (*Colocasia esculenta*) во Јава, Индонезија од страна на Raciborski, (1900)(цитирано во Erwin and Ribeiro (1996)). Оттогаш па навака, овој патоген е ограничувачки фактор за огледување на таро на многу области во југоисточна Азија и Пацификот. Во поволни услови за развој на овој патоген, 30-50 % од приносот на таро може да биде изгубен. Овој патоген предизвикува: сушење на листови, гниење на луковица, рак рани по стебло како и потемнување на стеблото освена на *C. esculenta* и *Aracaceae*ви

видови, на 6 други родови на растителни фамилии (Erwin and Ribeiro, 1996; Kroon et al., 2004).

- видот *P. gonapodyides* е за првпат регистриран во 1910 како причинител на гниење и умирање на јаболкови стебла во мочуриште во Данска (Petersen, (1910), цитирано во Erwin and Ribeiro (1996)). Овој организам најчесто предизвикува гниење на коренот и претставува незначителен патоген и тоа само по неколку домаќини: *Alnus* spp., *Fremontodendron* sp., *Malus pumila*, *Pyrus malus* (*Malus sylvestris*), *Rhamnus* sp., *Rhododendron* spp. и *Sciadopitys verticillata* (Brasier et al., 1989). Освен тоа често може да биде изолирана од муљ од водени текови каде вода често стои (Vettraino et al., 2001) но докажано е во *in vitro* тестови при инокулација на стебла од *Quercus robur* формира токсини кои предизвикуваат гниење (Jung et al., 1996).

- видот *P. megasperma* е космополит. Предизвикува гниење на коренов систем, крошна, изданоци, стебло и плодови. Предизвикува рак рани на стебло и базален дел, а предизвикува и формирање на гали. Регистриран е на различни домаќини: бројни видови перени, маслинка, јаболко, црешна, роза, ела и други видови (Drechler, (1931), Tompkins et al., (1936b), Hansen E.M. and Hamm (1983), цитирано во Erwin and Ribeiro (1996), Hansen et al. (2009b)).

- видот *P. rosacearum* е сегрегирани (одвоен) вид од комплексот *P. megasperma* (Hansen et al., 2009a). Паразитира растенија домаќини од фамилија Rosace а најчесто јаболко, црешна и кајсија (Hansen et al., 2009a).

- видот *P. inundata* е опишан од Brasier et al. (2003c) како предизвикувач на гниење на базалниот дел и кореновиот систем на листопадни видови дрвја и грмушки од фамилиите: *Aesculus*, *Olea*, *Salix*, *Prunus* како и *Vitis*. Но често се наоѓа и во остатоци од речни наноси и мочуришта.

- видот *P. taxon Walnut* сèште не е формално опишан. Овој вид е силно поврзан со шумските екосистеми како и крајбрежја на речни текови, односно влажни или поплавени месторастења (Brasier et al., 2003b).

3.8. Предлог мерки кои треба да се преземат

Ако се земе во предвид дека патогените организми од родот *Phytophthora* може да праразитираат широк спектар на домаќини како тревести растителни видови, грмушки и дрвенести видови и тоа во почвени и акватски средини, и тоа во шумарски и земјоделски екосистеми, може да се очекува дека со дополнителни истражувања ќе бидат откриени и други видови *Phytophthora* кои се можеби присутни и се потенцијал за појава на штети при евентуални поволни климатски услови за нивен развој.

Пред сè потребно е во иднина да се продолжи со колектирање на што поголем број на симптоматски, така и на асимптоматски примероци. Колку е поголем бројот на колектирани примероци за анализа на присуството на *Phytophthora* видовите, толку подетално ќе се формира слика за состојбата во однос на овие видови. Исто, потребно е да се спроведе колектирање примероци и поставување на метод на мамка *in situ* во акватски системи (водени текови, езера и водени акумулации).

Секојдневната трговија на растенија внатре во границите на Република Македонија како и увозот на садници и семе од странство сè сериозна закана во правец на зголемување на дистрибуција на веќе присутните *Phytophthora* видови, како и внесување на нови. Редовниот детален преглед на здравствената состојба на најголемите објекти (расадници) производители на саден материјал во државата ќе спречи потенцијално ширење на некој од овие видови кој е веќе етаблиран, додека засилените контроли на фитосанитарните служби ќе спречат внесување на нови видови.

Потребно е да се спроведат серија на нови тестови на патогеност на економски најзначајните видови во шумарството и земјоделството со цел да се процени можноста за настанување штети и нивниот обем при евентуално етаблирање на некој нов вид *Phytophthora*. Битен фактор е едукација на претставници кои на било кој начин се инволвирани во производството и трговија на саден материјал, како и заштитарските служби во јавните претпријатија со цел спречување на дистрибуција на одреден патоген во случај на негово етаблирање.

4. ЗАКЛУЧОЦИ

- Опсервирана беше здравствената состојба во шумски и земјоделски екосистеми ширум Македонија, во однос на симптоми на заболувања предизвикани од *Phytophthora* видовите.
- Вкупниот број на опсервирани локалитети од шумски екосистеми од каде беше извршена колекција на почва и растителен материјал беше 36, од кои 21 природен или вештачки подигнат насад и 15 расадници, при што опфатени беа 41 растителен вид како домаќини.
- Од шумски екосистеми извршена беше колекција на вкупно 205 примероци почва, корења и растително ткиво, од кои 162 (79%) од симптоматски домаќини и 43 (21%) од растенија домаќини без манифестиран било каков симптом на болест.
- Вкупниот број на обсервирани насади во земјоделски екосистеми беше 17, со опфатени 3 видови растенија домаќини, со повеќе сорти по вид.
- Од земјоделски екосистеми вкупно беа колектирани 93 примероци почва, корења и растително ткиво, од кои 74 (80%) колектирани примероци од симптоматски домаќини, и 19 (20%) примероци од растенија домаќини без манифестиран симптом на болест.
- Иако вкупниот број колектирани примероци од шумски екосистеми е драстично поголем од вкупниот број колектирани примероци од земјоделски екосистеми, процентот на симптоматски примероци е со ист тренд.
- При процесот на изолација, методот на мамка со користење на растителни листови се покажа како најуспешен, и затоа беше најкористен.
- Вкупниот број на изолати кои беа подложени на морфолошки анализи беше близу 400, при што издвоени беа 10 групи на изолати со слични карактеристики, најмалата група се состоеше од 1 изолат а најголемата група од 18 изолати.
- Од 240 култури екстрахирана беше ДНК и подложена на молекуларни анализи, притоа детектирани беа 49 секвенци на изолати, кои припаѓаа на 10 видови *Phytophthora*: *P. cactorum* (18 изолати), *P. plurivora* (12 изолати), *P. rosacearum* (1 изолат), *P. megasperma* (2 изолати), *P. colocasiae* (7 изолати), *P. taxon Walnut*

(4 изолати), *P. cinnamomi* (1 изолат), *P. cambivora* (1 изолат) и *P. inundata* (2 изолати). Детектирани беа и близу 30 изолато кои припаѓаа на неколку видови *Pythium*, како што се: *P. vexans*, *P. litorale*, *P. nigrum*, но и *Mortiera* spp. и *Phytophythium* spp.

- Од вкупниот број на теренски примероци, колектирани од шумски и земјоделски еко- Од детектирани 49 изолати припадници на *Phytophthora* видовите, 32 изолати беа од шумски екосистеми и 17 изолати од земјоделски екосистеми.

- Детектираните изолати кои припаѓаа на одреден *Phytophthora* вид потекнуваа од 18 колектирани примероци почва со симптоматско потекло на домаќинот, и само 1 почвен примерок од асимптоматско потекло.

- Теренските проби, колектирани од објектот Еуропеан плантс од Тетово, резултираа со дури 4 видови *Phytophthora*: *P. taxon Walnut*, *P. cinnamomi*, *P. colocasiae* и *P. plurivora*. Трите видови *Phytophthora* освен последниот се ексклузивни за овој објект и не се детектирани на друг локалитет.

- За сите детектирани видови *Phytophthora*, ова е прв наод за република Македонија.

- Спроведени беа тестови за патогеност на изолати за 7 од вкупно 10 детекторани видови *Phytophthora* кон костенови стапчиња. Тестовите за патогеност го издвоија видот *P. cactorum* како најпатоген кон костеновите стапчиња, додека видот и *P. inundata* како најмалку патоген кон костеновите стапчиња, без разлика на нивната дебелина.

5. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- ABAD G. Z., A. J. A., COFFEY M. D., OUDEMANS P. V., MAN IN'T VELD W. A., DE GRUYTER H., CUNNINGHAM J., LOUWS F. J. (2008). *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species identified in isolates from the Rosaceous raspberry, rose and strawberry in three continents. *Mycologia* **100**, 99-110.
- Abad, G. Z. (2014). The taxonomy of *Phytophthora*: What is done and what is needed for the correct identification and diagnostics of species in the Genus. *7th International Union of Forest Research Organizations, IUFRO*.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., and Fredericq, S. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**, 399-451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., and Spiegel, F. W. (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **59**, 429-514.
- Agrios, G. (2005). Plant pathology 5th Edition: Elsevier Academic Press. *Burlington, Ma. USA*.
- Akılı, S., Ulubaş Serçe, Ç., Katircioğlu, Y. Z., and Maden, S. (2013b). Does *Pythium anandrum* contribute to the dieback of sessile oak (*Quercus petraea*) in Turkey? *Forest Pathology* **43**, 505-508.
- Bakonyi, J., Árpád Nagy, Z., Burgess, T., Szigethy, A., Nechwatal, J., Koltay, A., Woodward, S., Belbahri, L., and Jung, T. (2012). Characterisation of the two informally designated ITS Clade 6 taxa *Phytophthora* taxon Forestsoil and *P. sp. hungarica*.
- Baldauf, S. L., Roger, A., Wenk-Siefert, I., and Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972-977.

- Beakes, G. W., Glockling, S. L., and Sekimoto, S. (2012). The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma* **249**, 3-19.
- Beakes, G. W., Thines, M., and Honda, D. (2015). Straminipile “Fungi” –Taxonomy. *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S.-Y., Geiser, D. M., and Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for Phytophthora utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 266 - 277.
- Boland, G., Melzer, M., Hopkin, A., Higgins, V., and Nassuth, A. (2004). Climate change and plant diseases in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* **26**, 335-350.
- Bourke, A. (1991). Potato blight in Europe in 1845: the scientific controversy. *Phytophthora*, 12-24.
- Brasier, C. (1975). Stimulation of sex organ formation in Phytophthora by antagonistic species of Trichoderma. *New Phytologist* **74**, 183-194.
- Brasier, C. (2009). Phytophthora biodiversity: how many Phytophthora species are there. *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems (eds.: EM Goheen, SJ Frankel)*. Albany, USDA Forest Service. General Technical Report, PSW-GTR-221, 101-115.
- Brasier, C., Hamm, P., and Hansen, E. (1989). Phytophthora diseases: Status of P. gonapodyides, P. drechsleri, and P. cryp-togea. *Report on Forest Research*, 45-46.
- Brasier, C., and Jung, T. (2006). Recent developments in Phytophthora diseases of trees and natural ecosystems in Europe. In "Proceedings of the Third International IUFRO Working Party (S07. 02.09) Meeting: Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees", pp. 5-16.
- Brasier, C. M. (2008). The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology* **57**, 792–808.
- Brasier, C. M., Cooke, D. E., Duncan, J. M., and Hansen, E. M. (2003a). Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in Phytophthora

- gonapodyides-P. megasperma ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological research* **107**, 277-290.
- Brasier, C. M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M., and Hansen, E. M. (2003b). Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides*-P. megasperma ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research* **107**, 277 - 290.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcan, J., Cooke, D. E., Jung, T., and In't Veld, W. A. M. (2004a). *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological research* **108**, 1172-1184.
- Brasier, C. M., Kirk, S. A., Delcan, J., Cooke, D. E. L., Jung, T., and Man In't Veld, W. A. (2004b). *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research* **108**, 1172-1184.
- Brasier, C. M., Sanchez-Hernandez, E., and Kirk, S. A. (2003c). *Phytophthora inundata* sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. *Mycological research* **107**, 477-484.
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S. I., Jakobsen, K. S., and Pawlowski, J. (2007). Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PloS one* **2**, e790.
- Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., and Pawlowski, J. (2008). Phylogenomics reveals a new 'megagroup' including most photosynthetic eukaryotes. *Biology letters* **4**, 366-369.
- Bush, E. A. (2002). Characterization of *Phytophthora* species in recycled irrigation water at a container nursery in southwestern Virginia, Virginia Tech.
- Calvano, T. P., Blatz, P. J., Vento, T. J., Wickes, B. L., Sutton, D. A., Thompson, E. H., White, C. E., Renz, E. M., and Hospenthal, D. R. (2011). *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. *Journal of clinical microbiology* **49**, 3710-3713.

- Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* **14**, 461-481.
- Cavalier-Smith, T. (1986). The kingdom Chromista: origin and systematics. *Progress in phycological research* **4**, 309-347.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **52**, 297-354.
- Cavalier-Smith, T., and Chao, E. E. (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *Journal of molecular evolution* **62**, 388-420.
- Cavalier-Smith, T. (1999). Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**, 347-366.
- Cooke, D., Drenth, A., Duncan, J., Wagels, G., and Brasier, C. (2000a). A molecular phylogeny of Phytophthora and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **30**, 17-32.
- Cooke, D., Duncan, J., Williams, N., Weerdt, M., and Bonants, P. (2000b). Identification of Phytophthora species on the basis of restriction enzyme fragment analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. *EPPO Bulletin* **30**, 519-523.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., and Brasier, C. M. (2000c). A molecular phylogeny of Phytophthora and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **30**, 17-32.
- Cooke, D. E. L., and Duncan, J. M. (1997). Phylogenetic analysis of Phytophthora species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* **101**, 667 - 677.
- Dick, M. W. (1997). Fungi, flagella and phylogeny. *Mycological Research* **101**, 385-394.
- Durán, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. (2008). *Phytophthora pinifolia* sp. nov.

- associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology* **57**, 715–727.
- Érsek, T., and Man in 't Veld, W. (2013). Phytophthora species hybrids: a novel threat to crops and natural ecosystems. *Phytophthora: A Global Perspective*, 37-47.
- Érsek, T., and Nagy, Z. (2008). Species hybrids in the genus *Phytophthora* with emphasis on the alder pathogen *Phytophthora alni*: a review. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 31-39.
- Erwin, D., and Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, American Phytopathological Society. APS Press).
- Evans, H. F., and Oszako, T. (2007). "Alien invasive species and international trade," Forest Research Institute.
- Ghimire, S., Richardson, P., Moorman, G., Lea-Cox, J., Ross, D., and Hong, C. (2009). An in-situ baiting bioassay for detecting *Phytophthora* species in irrigation runoff containment basins. *Plant pathology* **58**, 577-583.
- Greslebin, A. G., Hansen, E. M., Winton, L. M., and Rajchenberg, M. (2005). *Phytophthora* species from declining *Austrocedrus chilensis* forests in Patagonia, Argentina. *Mycologia* **97**, 218-228.
- Grünwald, N. J., Garbelotto, M., Goss, E. M., Heungens, K., and Prospero, S. (2012). Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends in Microbiology* **20**, 131 - 138.
- Hansen, E., Grünwald, N., Brasier, C., Reeser, P., Sims, L., and Sutton, W. (2014). Introducing...*Phytophthora chlamydospora* (née *P. taxon Pgchlamydo*), *P. obrutafolium* (née *P. taxon oaksoil*) and *P. "himalsylva-like"* (née *P. taxon ceanothus*). *7th International Union of Forest Research Organisations, IUFRO Working Party 7-02-09 Meeting, Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems*.
- Hansen, E., Kanaskie, A., Prospero, S., McWilliams, M., Goheen, E., Osterbauer, N., Reeser, P., and Sutton, W. (2008). Epidemiology of *Phytophthora ramorum* in Oregon tanoak forests. *Canadian Journal of Forest Research* **38**, 1133-1143.

- Hansen, E. M., and Maxwell, D. P. (1991). Species of the *Phytophthora megasperma* complex. *Mycologia*, **83**, 376-381.
- Hansen, E. M., Wilcox, W. F., Reeser, P. W., and Sutton, W. (2009). *Phytophthora rosacearum* and *P. sansomeana*, new species segregated from the *Phytophthora megasperma* "complex". *Mycologia* **101**, 129-135.
- Hantula, J., Lilja, A., Nuorteva, H., Parikka, P., and Werres, S. (2000). Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycological Research* **104**, 1062-1068.
- Hardy, G. S. J., Colquhoun, I. J., Shearer, B. L., and Tommerup, I. (2001). The impact and control of *Phytophthora cinnamomi* in native and rehabilitated forest ecosystems in Western Australia. *Forest Snow and Landscape Research* **76**, 337-343.
- HOLLIDAY, P. M. (1963). "Foot rot of *Piper nigrum* L., *Phytophthora Palmivora*."
- Hulvey, J., Telle, S., Nigrelli, L., Lamour, K., and Thines, M. (2010b). *Salisapiliaceae*—a new family of oomycetes from marsh grass litter of southeastern North America. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **25**, 109-116.
- Hwang, J., Oak, S. W., and Jeffers, S. (2008). Detecting *Phytophthora ramorum* and other species of *Phytophthora* in streams in natural ecosystems using baiting and filtration methods.
- Ilieva, E., Man in't Veld, W., Veenbaas-Rijks, W., and Pieters, R. (1998). *Phytophthora multivesiculata*, a new species causing rot in *Cymbidium*. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 677-684.
- Ioos, R., Barrés, B. 1., Andrieux, A., and Frey, P. (2007). Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni* ssp. *alni*, and cross-amplification with related taxa. *Molecular Ecology Notes* **7**, 133–137.
- Ivanovic, M. (1992). Mikoze biljaka. IP "Nauka", Univerzitet u Beogradu Poljoprivredni fakultet.
- Jenkins, S. F. (1962). "Preliminary Studies for Estimating the Disease Potential of *Phytophthora Parasitica* Var. *Nicotianae* in Infested Tobacco Soils."

- Jung, T. (2009). Beech decline in Central Europe driven by the interaction between Phytophthora infections and climatic extremes. *Forest pathology* **39**, 73-94.
- Jung, T., and Blaschke, H. (1996). Phytophthora root rot in declining forest trees. *PHYTON-HORN-* **36**, 95-102.
- Jung, T., Blaschke, H., and Neumann, P. (1996). Isolation, identification and pathogenicity of Phytophthora species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology* **26**, 253-272.
- Jung, T., Blaschke, H., and Oßwald, W. (2000). Involvement of soilborne Phytophthora species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* **49**, 706 - 718.
- Jung, T., and Burgess, T. (2009). Re-evaluation of Phytophthora citricola isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, Phytophthora plurivora sp. nov. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **22**, 95-110.
- Jung, T., Colquhoun, I. J., and Hardy, G. E. S. J. (2013a). New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen Phytophthora cinnamomi in different natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathology* **43**, 266-288.
- Jung, T., Cooke, D., Blaschke, H., Duncan, J., and Oßwald, W. (1999). Phytophthora quercina sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research* **103**, 785-798.
- Jung, T., and Nechwatal, J. (2008). Phytophthora gallica sp. nov., a new species from rhizosphere soil of declining oak and reed stands in France and Germany. *Mycological Research* **112**, 1195 - 1205.
- Jung, T., Stukely, M., Hardy, G. S. J., White, D., Paap, T., Dunstan, W., and Burgess, T. (2011). Multiple new Phytophthora species from ITS Clade 6 associated with natural ecosystems in Australia: evolutionary and ecological implications. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **26**, 13-39.

- Jung, T., Vettrano, A. M., Cech, T., and Vannini, A. (2013). The impact of invasive Phytophthora species on European forests. *Phytophthora: A Global Perspective*. Ed. by Lamour, K. Wallingford, UK: CABI, 146-158.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., and Stalpers, J. A. (2008). Dictionary of the fungi. *CABI International, UK*.
- Kroon, L. P. (2010). "The genus Phytophthora; phylogeny, speciation and host specificity."
- Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., van den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M., and Flier, W. G. (2004). Phylogenetic analysis of Phytophthora species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 766 - 782.
- Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., de Cock, A. W. A. M., and Govers, F. (2012). The genus Phytophthora anno 2012. *Phytopathology* **102**, 348 - 364.
- Lahr, D. J. (2011). "Phylogenetics and patterns of molecular evolution in amoebzoa," University of Massachusetts Amherst.
- Lamour, K. (2013). "Phytophthora: a global perspective," Cabi.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J., and Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology* **11**, 462-469.
- Lee, S. B. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. *PCR protocols, a guide to methods and applications*, 282-287.
- Lilja, A., Karjalainen, R., Parikka, P., Kammiovirta, K., and Nuorteva, H. (1998). Pathogenicity and genetic variation of Phytophthora cactorum from silver birch and strawberry. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 529-535.
- Lilja, A., Rikala, R., Hietala, A., and Heinonen, R. (1996). Stem lesions on Betula pendula seedlings in Finnish forest nurseries and the pathogenicity of Phytophthora cactorum. *European Journal of Forest Pathology* **26**, 89-96.
- Man in 't Veld, W. A., de Cock, A. W. A. M., and Summerbell, R. C. (2007). Natural hybrids of resident and introduced Phytophthora species proliferating on multiple new hosts. *European Journal of Plant Pathology* **117**, 25-33.

- Man in't Veld, W. A. (2007). Gene flow analysis demonstrates that *Phytophthora fragariae* var. *rubi* constitutes a distinct species, *Phytophthora rubi* comb. nov. *Mycologia* **99**, 222-226.
- Man in't Veld, W. A., Rosendahl, K. C., and Hong, C. (2012). *Phytophthora* × *serendipita* sp. nov. and *P.* × *pelgrandis*, two destructive pathogens generated by natural hybridization. *Mycologia* **104**, 1390-1396.
- Martin, F. N. (2013). Molecular identification of *Phytophthora*. *Book Chapter*, 19-27.
- Martin, F. N., Blair, J. E., and Coffey, M. D. (2014). A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* **66**, 19-32.
- Milenkovic, I., Keca, N., and Jung, T. (2011). Symptoms associated with *Phytophthora* species in forest ecosystems in Serbia. COST Action FP0801 Established and Emerging *Phytophthora*: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe. In "Program and abstracts of the Management Committee and Working Groups Meeting. Budapest, Hungary", pp. 21-22.
- Mohammadi, A. (2012). A simple method for detection of *Phytophthora nicotianae* from soybean soil. *Journal of Agrobiolgy* **29**, 29-32.
- Nagel, J. H., Gryzenhout, M., Slippers, B., Wingfield, M. J., Hardy, G. E. S. J., Stukely, M. J., and Burgess, T. I. (2013). Characterization of *Phytophthora* hybrids from ITS clade 6 associated with riparian ecosystems in South Africa and Australia. *Fungal Biology* **117**, 329-347.
- Nechwatal, J., Bakonyi, J., Cacciola, S. O., Cooke, D. E. L., Jung, T., Nagy, Z. Á., Vannini, Á., Vettraino, A. M., and Brasier, C. M. (2012). The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon *Salixsoil* and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. *Plant Pathology*, 355–369.
- Nelson, A., Weiland, G., and Hudler, G. (2010). Prevalence, distribution and identification of *Phytophthora* species from bleeding canker on European beech. *Phytopathology* **28**, 150–158.

- Nelson, A. H., and Hudler, G. W. (2007). A summary of North American hardwood tree diseases with bleeding canker symptoms. *Arboriculture and Urban Forestry* **33(2)**, 122-131.
- Newhook, F. J., Waterhouse, G. M., and Stamps, D. J. (1978). Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological papers*.
- Patterson, D. J. (1999). The diversity of eukaryotes. *the american naturalist* **154**, 96-124.
- Pegg, K. (1977). Soil application of elemental sulphur as a control of *Phytophthora cinnamomi* root and heart rot of pineapple. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **17**, 859-865.
- Pérez-Sierra, A., and Jung, T. (2013). *Phytophthora* in woody ornamental nurseries. *Phytophthora: a global perspective*, 166-177.
- Ribeiro, O. K. (2013). A historical perspective of *Phytophthora*. *Phytophthora: a global perspective*, 1-10.
- Rosenbaum, J. (1917). Studies of the genus *Phytophthora*. *Journal of Agricultural Research* **8**, 233-276.
- Saavedra, A., Hansen, E. M., and Goheen, D. J. (2007). *Phytophthora cambivora* in Oregon and its pathogenicity to *Chrysolepis chrysophylla*. *Forest Pathology* **37**, 409 - 419.
- Schubert, R., Bahnweg, G., Nechwatal, J., Jung, T., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M., Muller-Starck, G., Langebartels, C., Sandermann, H. J., and Osswald, W. (1999). Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *Forest Pathology* **29**, 169 - 188.
- Scott, P., Burgess, T., and Hardy, G. (2013). "Globalization and *Phytophthora*," CAB International, Wallingford, UK.
- Sleigh, M. (1989). Protozoa and other protists. Arnold. Routledge, London and New York.

- Sogin, M. L., Silberman, J. D., Hinkle, O., and Morrison, H. (1996). Problems with molecular diversity in the Eukarya. In "SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY", pp. 167-184.
- Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., and Hall, G. S. (1990). Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Mycological papers, CAB International, Wallingford Oxon* **162**, 1-28.
- Thines, M. (2013). Taxonomy and phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Phytophthora: A Global Perspective. CABI Plant Protection Series* **2**, 11-8.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**, 4673-4680.
- Venette, R. C. (2009). Implication of global climate change on the distribution and activity of *Phytophthora ramorum*.
- Venette, R. C., and Cohen, S. D. (2006). Potential climatic suitability for establishment of *Phytophthora ramorum* within the contiguous United States. *Forest Ecology and Management* **231**, 18-26.
- Vercauteren, A., Riedel, M., Maes, M., Werres, S., and Heungens, K. (2013). Survival of *Phytophthora ramorum* in *Rhododendron* root balls and in rootless substrates. *Plant pathology* **62**, 166-176.
- Vettraino, A., Natili, G., Anselmi, N., and Vannini, A. (2001). Recovery and pathogenicity of *Phytophthora* species associated with a resurgence of ink disease in *Castanea sativa* in Italy. *Plant Pathology* **50**, 90-96.
- Waterhouse, G., and Waterston, J. (1966). *Phytophthora cactorum*. *CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, 2.
- Waterhouse, G. M. (1963a). "Key to the species of *Phytophthora* de Barry," Commonwealth Mycological Institute; England.
- Waterhouse, G. M. (1963b). Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers* **92**, 1-22.

- Waterhouse, G. M. (1970). "The genus *Phytophthora* de Bary: Diagnoses (or descriptions) and figures from the original papers," Commonwealth Mycological Institute.
- Webster, J., and Weber, R. (2007). Introduction to fungi Third edition Cambridge University Press. *Cambridge, UK*.
- Yang, X., Copes, W., and Hong, C. (2013). *Phytophthora mississippiae* sp. nov., a new species recovered from irrigation reservoirs at a plant nursery in Mississippi. *J Plant Pathol Microbiol* **4**, 180.
- Yang, X., Copes, W. E., and Hong, C. (2014a). Two novel species representing a new clade and cluster of *Phytophthora*. *Fungal biology* **118**, 72-82.
- Yang, X., and Hong, C. (2014b). *Phytophthora virginiana* sp. nov., a high-temperature tolerant species from irrigation water in Virginia. *Mycotaxon* **126**, 167-176.
- Yang, X., Richardson, P. A., and Hong, C. (2014c). *Phytophthora* × *stagnum* nothosp. nov., a new hybrid from irrigation reservoirs at ornamental plant nurseries in Virginia. *PloS one* **9**, e103450.
- Филиповски, Ѓ., Митрикески, Ј., Петковски, Д., Мукаетов, Д., Андреевски, М., Василевски, К., Миткова, Т., and Маркоски, М. (2015). Почвена карта на Република Македонија. *Земјоделски институт - Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје*.