

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Miljana D. Jakovljević

Multipotentnost cikade *Euscelis incisus*
(Hemiptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) u
prenošenju i epidemiologiji fitoplazmi
(*'Candidatus Phytoplasma'*)

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Miljana D. Jakovljević

Multipotency of leafhopper *Euscelis incisus*
(Hemiptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) in
transmission and epidemiology of
phytoplasmas ('*Candidatus* Phytoplasma')

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

Prof. dr Željko Tomanović, redovni profesor
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Tatjana Cvrković, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
Beograd

Član komisije:

dr Milana Mitrović, naučni savetnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
Beograd

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, u okviru Odseka za štetočine bilja u Zemunu. Kompletna istraživanja su deo projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. III43001 - „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“ (rukovodilac prof. dr Željko Tomanović), podprojekat „Diverzitet i dinamika biljnih patogena i njihovih insekatskih vektora u agroekosistemima Srbije“ (rukovodilac dr Milana Mitrović). Istraživanja u okviru ove disertacije su delimično finansirana od strane SCOPES programa Švajcarske nacionalne naučne fondacije (IZ73ZO_152414) - „Epidemiology and management strategy of stolbur phytoplasma in agroecosystems“ (rukovodioci dr Milana Mitrović i dr Valeria Trivellone).

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Tatjani Cvrković na poverenju, prenetom znanju i usmeravanjima u našim zajedničkim istraživanjima. Na pokazanim prvim naučnim koracima. Na angažovanju i posvećenosti tokom svakog dela istraživanja i izrade disertacije. Na podršci. Vremenu. Strpljenju da finalni tekst izgleda ovako. Na svim zajedničkim realizovanim etapama istraživanja. Na mentorskim i prijateljskim savetima.

Zahvaljujem se prof. dr Željku Tomanoviću koji me je uveo u svet insekata još na osnovnim studijama i čija su predavanja dovela do toga da entomologija postane moja oblast interesovanja i istraživanja. Zahvaljujem se na svim savetima i sugestijama koje su značajno pomogle realizaciji i kvalitetu ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Milani Mitrović na pomoći oko network analize. Na svim korisnim sugestijama tokom kompletnog istraživanja. Na laboratorijskoj i terenskoj pomoći. Na ispravljenim zarezima. Na brzini i vremenu koje je uvek imala. Zahvalnost na savetima, podršci i neprestanom bodrenju dugujem direktoru, šefu, rukovodiocu, članu komisije ali pre svega prijatelju.

Zahvalnost dugujem i svim kolegama Odseka za štetočine bilja jer je svako od njih zaslužan što je ova disertacija realizovana: dr Ivi Toševskom dugujem neizmernu zahvalnost za pomoć oko statistike i za “final touch” disertacije. Za sve ideje, za

realizacije istih, za rešavanje metodoloških problema. Za sve savete i razgovore. Za sve sitnice koje su za mene bile velike. Za nepresušne ideje. Za sve stvari koje sam od njega naučila. Za vreme koje je uvek imao; dr Jeleni Jović na neprestanoj pomoći oko molekularnih analiza i zajedničkih tumačenja najčudnijih rezultata. Na savetima i kritikama; dr Oliveru Krstiću na pomoći oko postavljanja eksperimenata i kompletnoj logistici potrebnoj za iste. Na prijateljskim savetima i podršci. Na smehu; dr Andrei Kosovac na podršci prilikom prvih laboratorijskih koraka. Na pomoći i druženju; master biologu Slavici Marinković na pomoći oko finalnog fotografisanja primeraka insekata. Na pomoći oko svih najdosadnijih priprema i provera. Na pomoći kad god mi je bila potrebna. Na savetima i bodrenju. Na podršci u svakom aspektu i trenutku. Na predivnom dvanaestogodišnjem prijateljstvu.

Zahvalnost dugujem svojim prijateljima. Koji su brojni i za koje je ova zahvalnica suviše kratka. Hvala vam na prijateljstvu, podršci i pre svega na strpljenju koje ste imali tokom perioda pisanja ove disertacije. Hvala što ste učinili da ovaj period bude nezaboravan i pored brojnih obaveza. Bez nabiranja svih, moram da izdvojim moje Molere, Olgu i Slavku. Hvala vam što ste uvek bile tu. Hvala za vreme. Hvala za smeh. Hvala za “cakizam”.

Zahvalnost dugujem mom Petru. Jer je bio strpljiv. Jer je bio podrška. Jer je imao razumevanja. Jer je brinuo. Jer se radovao. Jer je bio tu.

Hvala Maci i Giletu jer su mi omogućili dovoljno vremena i prostora da disertaciju privedem kraju.

Zahvalnost mačku Micku. Za sve noći provedene pored laptopa.

Zahvalnost dugujem Mariji, Miši i Fići. Za veru u mene. Za savete i podršku. Za brbljanje i radost.

Zahvalnost dugujem svojim roditeljima. Mami, koja je uvek verovala u mene i bila ponosna na moje uspehe, koja je bila moja najveća podrška u svakom trenutku, ali koja nažalost nije doživela da ovaj doktorat drži u svojim rukama. Tati, koji me je ohrabrivao i uvek verovao da mogu da savladam svaki problem i prepreku i koji je moj najveći oslonac. Hvala vam što ste mi omogućili da dođem do ovog trenutka.

Disertaciju posvećujem vama.

Multipotentnost cikade *Euscelis incisus* (Hemiptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) u prenošenju i epidemiologiji fitoplazmi ('*Candidatus Phytoplasma*')

SAŽETAK:

Euscelis incisus je polifagna vrsta, koja je široko rasprostranjena i česta u različitim agroekosistemima. Ima dve generacije godišnje koje joj omogućavaju da uspešno ostvari kontakt sa različitim grupama i vrstama fitoplazmi. Od ukupno 510 analiziranih primeraka *E. incisus* sakupljenih na 8 lokaliteta u Srbiji, 53 (10.4%) je bilo pozitivno na prisustvo različitih fitoplazmi. RFLP analizom F2nR2 fragmenta 16S rRNK regiona, utvrđeno je prisustvo šest 16S ribozomalnih grupa i osam podgrupa fitoplazmi u jedinkama *E. incisus* (16SrI-R, 16SrI-F, 16SrII-E, 16SrIII-B, 16SrIX-C, 16SrIX-E, 16SrXI-G i 16SrXII-A). Najzastupljenija je bila 16SrXII-A podgrupa prisutna u jedinkama *E. incisus* sa dva multilokusna genotipa: STOLg i Rqg31g. Fitoplazme 16SrIX i 16SrXI grupe, kao i dve podgrupe unutar *Aster yellows* fitoplazme, 16SrI-F i 16SrI-R zabeležene su po prvi put u Srbiji. Fitoplazme 16SrII-E, 16SrIII-B, 16SrIX-C, 16SrIX-E i 16SrXI-G grupe predstavljaju prve nalaze ovih patogena u jedinkama *E. incisus*. U biljnom materijalu je prvi put registrovano prisustvo 16SrIII grupe fitoplazmi u biljkama *Cirsium vulgare*, *Carduus acanthoides*, *Lathyrus tuberosus* i *Lathyrus aphaca*, dok je prisustvo 16SrIX grupe fitoplazmi utvrđeno prvi put u biljkama *Cichorium intybus* i *Knautia arvensis* u Srbiji. Eksperimenti prenošenja fitoplazmi pomoću prirodno inficiranih populacija vrste *E. incisus* pokazali su da je ova vrsta uspešan prirodni vektor u prenošenju fitoplazmi 16SrIII i 16SrXII grupe. Eksperimenti prenošenja fitoplazmi pomoću laboratorijski dobijene populacije vrste *E. incisus* pokazali su da je ova vrsta uspešan eksperimentalni vektor u prenošenju fitoplazmi 16SrIII, 16SrV i 16SrXII grupe.

KLJUČNE REČI: *Euscelis incisus*, '*Candidatus Phytoplasma*' vrste, 16Sr fitoplazma grupe, multilokusna karakterizacija, vektorski potencijal, prenošenje fitoplazmi, epidemiologija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Entomologija

Multipotency of leafhopper *Euscelis incisus* (Hemiptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) in transmission and epidemiology of phytoplasmas ('*Candidatus* Phytoplasma')

ABSTRACT:

Euscelis incisus is polyphagous leafhopper widely distributed and abundant in diverse agroecosystems. Two generations per year allows this species to come into contact with a plethora of different phytoplasmas. Among the 510 analyzed *E. incisus* specimens collected from eight localities in Serbia, 53 (10.4%) tested positive for diverse '*Ca. Phytoplasma*' taxa. RFLP analysis and sequence comparison based on the F2nR2 fragment of the 16S rRNA gene revealed the presence of six 16S phytoplasma ribosomal groups and eight subgroups in *E. incisus* (16SrI-R, 16SrI-F, 16SrII-E, 16SrIII-B, 16SrIX-C, 16SrIX-E, 16SrXI-G and 16SrXII-A). The most prevalent phytoplasma subgroup identified in *E. incisus* specimens was 16SrXII-A, represented by two multilocus stolbur phytoplasma genotypes: STOLg and Rqg31g. Phytoplasmas of 16SrIX and 16SrXI groups, as well as two subgroups of *Aster yellows* phytoplasma, 16SrI-F and 16SrI-R, were recorded for the first time in Serbia. Phytoplasmas of 16SrII-E, 16SrIII-B, 16SrIX-C, 16SrIX-E and 16SrXI-G groups represent first records of these pathogens in *E. incisus*. The presence of the 16SrIII group was recorded for the first time in *Cirsium vulgare*, *Carduus acanthoides*, *Lathyrus tuberosus* and *Lathyrus aphaca*, while the presence of the 16SrIX group was recorded for the first time in *Cichorium intybus* and *Knautia arvensis* in Serbia. Transmission trials using naturally infected populations of *E. incisus* have shown that this leafhopper successfully transmitted phytoplasmas of the 16SrIII and 16SrXII groups, indicating their role as a natural vector. Transmission trials using *E. incisus* population reared in laboratory have shown that this species is a successful experimental vector of phytoplasmas of the 16SrIII, 16SrV and 16SrXII groups.

KEY WORDS: *Euscelis incisus*, '*Candidatus* Phytoplasma' species, 16Sr phytoplasma groups, multilocus characterization, vectoring potential, phytoplasma transmission, epidemiology

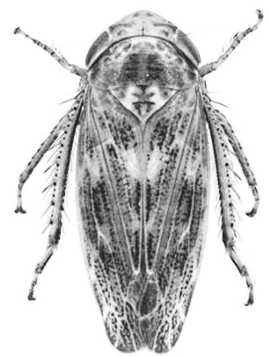
SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Entomology

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 Identifikacija i klasifikacija fitoplazmi	1
1.2 Fitoplazme prouzrokovajući oboljenja biljaka	4
1.3 Karakteristike insekata vektora fitoplazmi	6
1.4 Potfamilija Deltoccephalinae Dallas 1870	9
1.5 Vrsta <i>Euscelis incisus</i> (Kirschbaum, 1858)	11
1.6 Vektorska uloga vrste <i>E. incisus</i>	14
2. CILJEVI	18
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1 Opisi lokaliteta	20
3.2 Sakupljanje insekatskog materijala	23
3.2.1 Sakupljanje insekatskog materijala za detekciju fitoplazmi	23
3.2.2 Sakupljanje insekatskog materijala za testove prenošenja fitoplazmi	24
3.2.3 Sakupljanje insekatskog materijala za gajenje laboratorijske populacije	25
3.3 Sakupljanje biljnog materijala za detekciju fitoplazmi	25
3.4 Eksperimentalne procedure	27
3.4.1 Gajenje biljaka u kontrolisanim uslovima	27
3.4.2 Gajenje laboratorijske populacije vrste <i>E. incisus</i>	28
3.4.3 Eksperimenti prenošenja fitoplazmi prirodno inficiranim populacijama vrste <i>E. incisus</i>	30
3.4.4 Eksperimenti prenošenja fitoplazmi u laboratorijskim uslovima	32
3.5 Molekularne analize fitoplazmi	35
3.5.1 Ekstrakcija DNK iz biljaka	35
3.5.2 Ekstrakcija DNK iz insekata	36
3.5.2.1 Ekstrakcija pojedinačnih primeraka insekata	36
3.5.2.2 Ekstrakcija insekata u grupama	37
3.5.3 Detekcija i identifikacija fitoplazmi u biljnom i insekatskom materijalu	38
3.5.4 Molekularna karakterizacija fitoplazmi u biljnom i insekatskom materijalu	40
3.5.4.1 16S rRNK	41
3.5.4.2 <i>rplV</i> (<i>rpl22</i>) i <i>rpsC</i> (<i>rps3</i>) geni	41
3.5.4.3 <i>SecY</i> gen	42
3.5.4.4 <i>Tuf</i> / <i>stamp</i> / <i>vmp1</i> geni	43
3.5.5 Poređenje virtuelnih RFLP obrazaca i izračunavanje koeficijenta sličnosti	48

3.5.6	Filogenetske analize izolata fitoplazmi identifikovanih u prirodno inficiranim jedinkama <i>E. incisus</i> na osnovu 16S rRNK genskog lokusa.....	49
3.5.7	Multilokusna i epidemiološka karakterizacija.....	50
4.	REZULTATI	54
4.1	Biologija vrste <i>E. incisus</i>	54
4.2	Razviće i reproduktivno ponašanje vrste <i>E. incisus</i>	55
4.3	Identifikacija fitoplazmi kod prirodno inficiranih populacija vrste <i>E. incisus</i>	59
4.4	Analiza biljnog materijala na prisustvo fitoplazmi.....	67
4.5	Vektorska uloga prirodno inficiranih populacija vrste <i>E. incisus</i>	70
4.6	Vektorska uloga laboratorijski gajenih populacija vrste <i>E. incisus</i>	72
4.7	Taksonomska karakterizacija fitoplazmi u prirodno inficiranim populacijama <i>E. incisus</i> na osnovu 16S rRNK genskog regiona	80
4.7.1	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ' (16SrI grupa)	81
4.7.2	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ' (16SrII grupa).....	83
4.7.3	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' (16SrIII grupa)	83
4.7.4	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> ' (16SrIX grupa).....	84
4.7.5	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> ' (16SrXI grupa).....	85
4.7.6	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' (16SrXII grupa).....	86
4.8	Filogenetske analize izolata fitoplazmi identifikovanih u prirodno inficiranim jedinkama <i>E. incisus</i> na osnovu 16S rRNK genskog lokusa.....	86
4.9	Multilokusna (MLST) i epidemiološka karakterizacija izolata fitoplazmi detektovanih u populacijama vrste <i>E. incisus</i> i u testovima prenošenja.....	88
4.9.1	16SrI ribozomalna grupa	90
4.9.2	16SrII ribozomalna grupa.....	91
4.9.3	16SrIII ribozomalna grupa.....	93
4.9.4	16SrIX ribozomalna grupa	96
4.9.5	16SrXI ribozomalna grupa	99
4.9.6	16SrXII ribozomalna grupa.....	99
5.	DISKUSIJA	109
5.1	Biologija i rasprostranjenje vrste <i>E. incisus</i>	109
5.2	Epidemiološki ciklusi različitih vrsta i grupa fitoplazmi u kojima učestvuje cikada <i>E. incisus</i>	110
6.	ZAKLJUČCI	123
7.	LITERATURA	126
8.	PRILOZI	150



UVOD



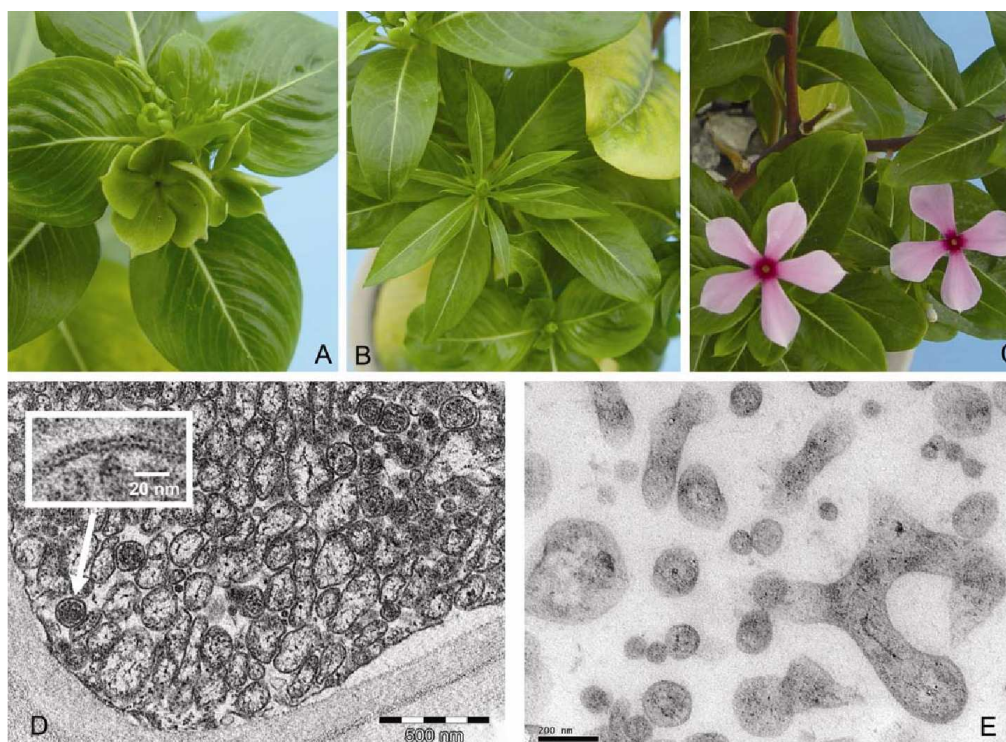
1.UVOD

1.1 Identifikacija i klasifikacija fitoplazmi

Fitoplazme predstavljaju grupu pleomorfnih prokariotskih organizama bez ćelijskog zida. Otkrivene su 1967. godine od strane japanskih istraživača (Doi i sar., 1967) koji su ih nazvali „mikoplazmama slični organizmi” (engl. *mycoplasma-like organisms*, MLOs). Ove bakterije pripadaju klasi *Mollicutes*, zajedno sa mikoplazmama, ureaplazmama, spiroplazmama i aholeplazmama (Razin i sar., 1998). Današnji naziv dobile su na Internacionalnoj konferenciji sistematizacije bakterija održanoj 1996. godine na Floridi (Seemüller i sar., 1998).

Fitoplazme su obligatni intracelularni mikroorganizmi prečnika od 300-500 nm koji imaju jednoslojnu ćelijsku membranu i poseduju jedan od najmanjih genoma među živim organizmima, između 600 kb i 900 kb (Oshima i sar., 2004; Sugio i Hogenhout 2012). Ne mogu se gajiti *in vitro*, a samim tim ni morfološki definisati. Shodno tome detekcija i karakterizacija fitoplazmi, zbog nedostatka odgovarajuće metodologije, nije bila moguća, pa su dugi niz godina bolesti koje prouzrokuju fitoplazme pripisivane drugim patogenima (Bertaccini, 2007). U početku njihova detekcija je bila zasnovana na elektronskoj mikroskopiji tkiva floema zaraženih biljaka i na osnovu simptoma koje ispoljavaju na biljkama kao što su virescencije, filodije, diskoloracije ili patupljasti rast (Bertaccini i Lee, 2018) (Slika 1). Detaljnije proučavanje fitoplazmi počinje razvojem molekularnih metoda, koje su omogućile njihovo utvrđivanje i karakterizaciju u biljkama i insektima vektorima, sagledavanje etiologije i epidemiologije biljnih bolesti.

Danas se klasifikacija i karakterizacija fitoplazmi zasniva na preciznim molekularnim metodama analize DNK, jer je dokazano da određena bolest na biljci na osnovu simptoma može da se poveže sa nekoliko fitoplazmi iz različitih, filogenetski udaljenih grupa. Isto tako, ista fitoplazma može izazvati različite simptome na različitim biljkama domaćinima, pa je jedino analizom DNK moguće utvrditi koja je fitoplazma u pitanju. Zbog toga su molekularne analize metod izbora za detekciju i klasifikaciju fitoplazmi, kako u biljkama tako i u insektima iz reda Hemiptera koji služe kao vektori (Schvester i sar., 1961).



Slika 1. (A, B i C) simptomi koje fitoplazme izazivaju na biljnoj vrsti *Catharanthus roseus*; (D i E) fitoplazme u biljnom tkivu (preuzeto iz Chen i sar., 2009).

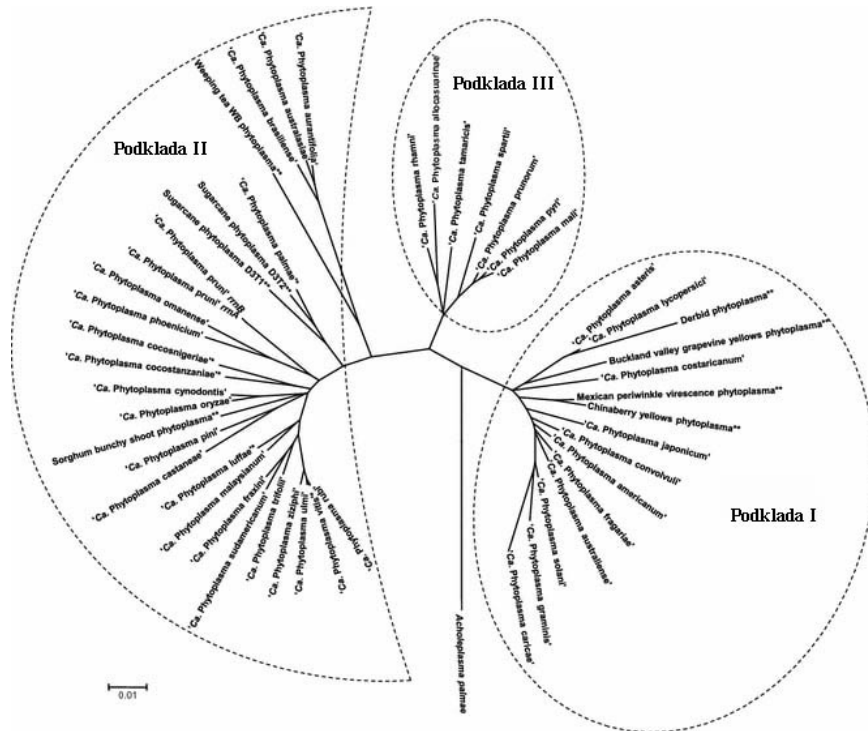
Sa pojavom prvih opisa vrsta unutar grupe fitoplazmi javila se potreba za uspostavljanjem jasnih kriterijuma na osnovu kojih se nova vrsta opisuje. Tokom 2004. godine Međunarodni odbor za sistematiku bakterija (engl. *International Committee of Systematic Bacteriology*) je predstavio i definisao kriterijume za opis nove vrste fitoplazmi (IRPCM, 2004). Prateći definisane kriterijume nova 'Candidatus Phytoplasma' vrsta se opisuje ukoliko njen 16S rRNK region (duži od 1200 bp) poseduje manje od 97.5% homologije sa sekvencama bilo koje prethodno opisane vrste. Zbog izuzetno visoke konzervativnosti 16S rRNK gena, biološke i ekološke osobenosti organizma se ne vide uvek jasno iz sekvenci ovog gena. Kod velikog broja fitoplazmi fenotipske karakteristike se jasno razlikuju između vrsta, a razlika na genomskom 16S rRNK regionu je manja od 2.5%, pa su zbog toga definisani dodatni kriterijumi za opise novih 'Ca. Phytoplasma' vrsta. Da bi se dve 'Ca. Phytoplasma' vrste koje dele više od 97.5% sličnosti 16S rRNK sekvence opisale kao različite vrste, potrebno je da ispune sledeće kriterijume: i) da se prenose različitim vektorima; ii) da imaju različite biljke domaćine; iii) da postoji jasan dokaz molekularnog diverziteta između njih. Za



detaljniju i precizniju klasifikaciju, koristi se višestruka karakterizacija na drugim genima, među kojima se ističu geni ribozomalnih proteina *rpl22-rps3*, gen faktora elongacije Tu (*tuf* gen), gen koji kodira protein translokazu (*secY* gen), kao i drugi geni koji su konzervativni, a ipak dovoljno varijabilni da mogu da ukažu na razlike koje su značajne za utvrđivanje molekularnog diverziteta između različitih vrsta (Hodgetts i Dickinson, 2010).

Klasifikacija fitoplazmi u okviru '*Ca. Phytoplasma*' vrsta primarno se vrši na osnovu sekvenci 16S rRNK gena, pri čemu se fitoplazme svrstavaju u ribozomalne grupe i podgrupe na osnovu postojanja određenih restrikcionih pozicija (Lee i sar., 1998a; Wei i sar., 2007; Zhao i sar., 2009). Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (RFLP) sa 17 restrikcionih enzima koristi se za precizno određivanje ribozomalnih grupa i podgrupa. Odvajanje većih grupa zasnovano je na sličnosti koeficijenata RFLP obrazaca za 1.2 kb PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) produkta 16S rRNK gena (Lee i sar., 1998a). Razgraničavanje podgrupa zasniva se na mestima restrikcije PCR produkata. Nova podgrupa se opisuje ukoliko nepoznat izolat fitoplazme ima jedno ili više različitih restrikcionih mesta u odnosu na sve ostale poznate izolate u toj grupi. Svaka podgrupa je definisana jedinstvenom kombinacijom RFLP obrazaca (Zhao i sar., 2010).

Po studiji Zhao i sar. (2010), klada fitoplazmi je podeljena na 3 odvojene podklade na osnovu analize 16S rRNK sekvenci, koje obuhvataju sve do tada opisane '*Ca. Phytoplasma*' vrste kao i one čiji opis još nije potvrđen. Filogeniju dobijenu od strane Zhao i sar. (2010) potvrđuje i studija Miyazaki i sar. (2018) koji su prilikom opisa '*Ca. Phytoplasma noviguineense*' vrste potvrdili obrazac grupisanja u okviru tri velike podklade (Slika 2).



Slika 2. Podklade fitoplazmi dobijene na osnovu 16Sr RNK sekvenci (preuzeto iz Zhao i sar., 2010- modifikovano).

Do 2018. godine, prihvaćen je opis ukupno 42 ‘*Ca. Phytoplasma*’ vrste. Pored njih, status 8 vrsta fitoplazmi još uvek nije jasan, ali je moguće da se radi o potencijalno novim vrstama (Šafářová i sar., 2016). Do sada je poznato i opisano 35 ribozomalnih grupa fitoplazmi (Wei i sar., 2007; Zhao i Davis, 2016; Naderali i sar., 2017; Miyazaki i sar., 2018). U literaturi se navode dodatne dve 16S rRNK grupe (Pérez-López i sar., 2016) čiji je status još uvek nejasan (Zhao i Davis, 2016).

1.2 Fitoplazme prouzrokovali oboljenja biljaka

Fitoplazme mogu biti unete u tkivo biljke domaćina na tri načina: i) kalemljenjem zaraženog biljnog materijala (Boudon-Padieu, 2003); ii) vaskularnim povezivanjem inficiranih i neinficiranih biljaka parazitskim cvetnicama (*Cuscuta* spp. L.) (Dale i Kim, 1969); iii) ishranom insekata vektora iz reda Hemiptera na nezaraženim biljkama (Schvester i sar., 1961). Najefikasniji i najčešći način prenošenja fitoplazmi predstavlja horizontalno prenošenje putem insekata vektora.



Ovi patogeni kontinuirano kruže između svojih biljnih domaćina i insekata vektora i pritom od oba domaćina zavisi uspešnost njihovog preživljavanja i širenja u ekosistemima. U zaraženim biljkama, kolonizuju floemske ćelije, uzrokujući različite simptome kao što su žutilo ili crvenilo biljnih delova, patuljast rast, filodije (retrogradna metamorfoza cvetnih organa u listove), virescence (abnormlano prisustvo hlorofila u cvetovima), intezivno grananje tkiva u razvoju (veštičja metla; engl. *witches'-broom*), propadanje i zakržljalost biljke. Sve navedene promene su sistemske i zahvataju delove biljaka ili čitave biljke i kao rezultat ovih promena često može doći do potpunog propadanja biljaka (Hogenhout i sar., 2008).

Fitoplazme izazivaju oboljenja više stotina biljnih vrsta, uključujući mnoge ratarske, povrtarske i voćarske kulture, ukrasne biljke, kao i biljne vrste od značaja za drvnu industriju (Oshima i sar., 2011). Ekonomske štete koje fitoplazme nanose gajenim biljkama kreću se od delimične redukcije u prinosu i kvalitetu, do potpunih gubitaka prinosa u biljnoj proizvodnji (Lee i sar., 2000; Weintraub i Beanland, 2006).

Na osnovu 16S rRNK klasifikacije, među 35 validnih opisanih grupa fitoplazmi, u Srbiji je zabeleženo 8 grupa i 15 podgrupa. Podaci o prisustvu fitoplazmi kao patogena u Srbiji potiču iz 1967. godine, kada su Aleksić i saradnici prijavili prisustvo stolbur fitoplazme (*Ca. Phytoplasma solani*) u veoma značajnim agronomskim kulturama: vinovoj lozi, kukuruzu, paradajzu i krompiru.

Zbog nedostatka razvijenih metoda detekcije fitoplazmi, dalja proučavanja ovih patogena su nastavljena tek od 2003. godine sa radom Tanasković i Carraro koji u kajsiji pronalaze *Ca. Phytoplasma prunorum* koja pripada 16SrX-B podgrupi koja je poznata i kao ESFY fitoplazma (engl. *European stone fruit yellows*). U okviru 16SrI ribozomalne grupe fitoplazmi, u Srbiji su zabeležene podgrupe -A, -B, -C i -P u biljkama šargarepe, topole i brokolija. U okviru 16SrII grupe, u biljkama *Picris hieracioides* L. utvrđeno je prisustvo 16SrII-E podgrupe (Mitrović i sar., 2012). Fitoplazma 16SrIII-B podgrupe utvrđena je u biljkama *Cirsium arvense* (L.) Scop. (Rančić i sar., 2005) a takođe je zabeležena i u biljkama *Medicago sativa* L. i *Arnica montana* L. (Pavlović i sar., 2012b; Starović i sar., 2012). Na teritoriji Srbije je utvrđeno prisustvo dve podgrupe 16SrV grupe. Podgrupa 16SrV-A zabeležena je u biljkama *Ulmus minor* Mill. i *Ulmus laevis* Pall. (Jović i sar., 2008). U okviru 16SrV-C podgrupe



nalaze se *Flavescence dorée* i *Alder yellows* fitoplazme koje su zabeležene u vinovoj lozi i u biljkama koje se često nalaze oko vinograda, kao što su *Clematis vitalba* L. i *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. (Duduk i sar., 2004; Cvrković i sar., 2008; Filipin i sar., 2009). Među fitoplazmama koje dovode do oboljenja voćaka u Srbiji su registrovane *Apple proliferation* (AP) na jabuci, *European stone fruit yellows* (ESFY) na kajsiji i *Pear decline* (PD) na kruški. Sve ove fitoplazme pripadaju 16SrX grupi, podgrupama – A, -B i –C (Duduk i sar., 2008a; Tanasković i Carraro, 2003; Duduk i sar., 2005). Najproučavanija i najzastupljenija fitoplazma u Srbiji je stolbur fitoplazma koja pripada vrsti ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ i podgrupi 16SrXII-A. Zabeležena je u velikom broju gajenih biljaka kao i u biljkama spontane flore (Duduk i sar., 2004; Jović i sar., 2009b; Ivanović i sar., 2011; Kuzmanović i sar., 2011; Trkulja i sar., 2011; Pavlović i sar., 2011; 2012a; 2014a; 2014b; Starović i sar., 2012; 2013; Mitrović i sar., 2012; 2013; 2015a; Jošić i sar., 2012; 2013; 2015; Kosovac i sar., 2013; 2019; Adamović i sar., 2014; Medić Pap i sar., 2018). Vrsta ‘*Ca. Phytoplasma convolvuli*’ pripada podgrupi 16SrXII-H i u Srbiji je zabeležena u biljci *Convolvulus arvensis* L. (Martini i sar., 2012a). Fitoplazma koja pripada 16SrXIV grupi i koja je karakteristična za predstavnike familije Poaceae, detektovana je u Srbiji u biljci *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Mitrović i sar., 2015b), dok je u biljci *Rhamnus cathartica* L. od strane Jović i sar. (2011), utvrđeno prisustvo ‘*Ca. Phytoplasma rhamni*’ vrste pripadnika 16SrXX-A podgrupe fitoplazmi (Prilog - Tabela 1).

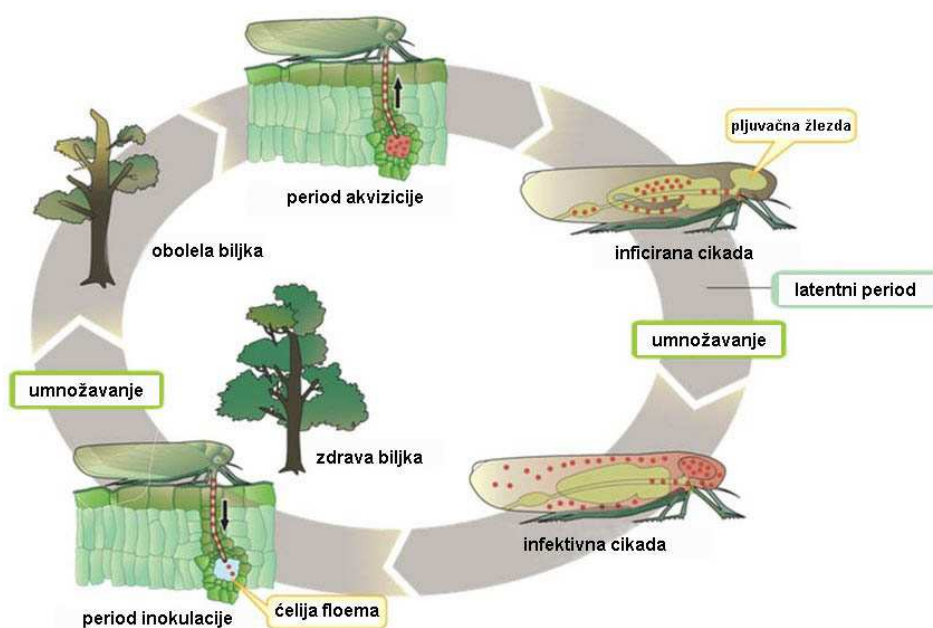
1.3 Karakteristike insekata vektora fitoplazmi

Vektori fitoplazmi su insekti iz reda Hemiptera koji se hrane floemskim sokovima biljaka, među kojima je najveći broj vrsta cikada (podred Auchenorrhyncha) i nekoliko vrsta psila (podred Sternorrhyncha) (Weintraub i Beanland, 2006).

Cikade kao najznačajniji vektori fitoplazmi imaju centralnu ulogu u epidemiologiji biljnih bolesti izazvanih ovim patogenima. Rasprostranjenost, učestalost i uticaj fitoplazmatičnih oboljenja na biljke zavise od osetljivosti biljke na delovanje fitoplazmi, kao i od bioekoloških osobnosti vektora. U kompleksnoj interakciji vektor-fitoplazma-biljka, vektori imaju ključnu ulogu u epidemiologiji bolesti, gde učestalost fitoplazmi u određenim biljkama zavisi od toga koje su biljke primarni domaćini samog vektora.



Cikade imaju stalnu i evolutivno stabilnu vezu sa fitoplazmama što ih čini uspešnim vektorima. Njihova ishrana nije destruktivna za biljke na kojima se hrane, što dovodi do uspešne inokulacije vaskularnog sistema insekta domaćina. Epidemiološki ciklus fitoplazmatskih oboljenja biljaka uključuje tri osnovne komponente: i) biljku rezervoar infekcije i izvor inokuluma; ii) insekta vektora; iii) obolelu biljku sa ili bez karakterističnih simptoma infekcije fitoplazmom (Slika 3).

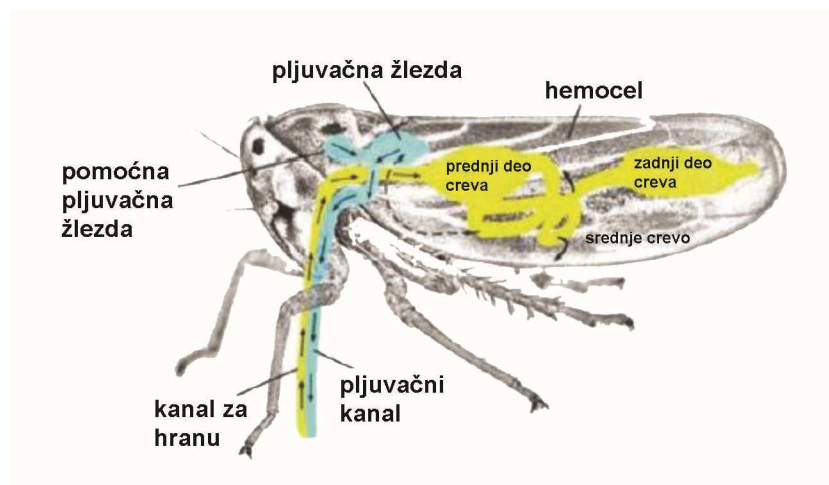


Slika 3. Epidemiološki ciklus oboljenja izazvanih fitoplazmama (preuzeto iz Oshima i sar., 2011- modifikovano).

Tipičan proces prenošenja fitoplazme se sastoji iz tri faze: i) period akvizicije (AAP) kada insekt sisajući floemske sokove usvaja fitoplazmu iz biljaka i postaje inficiran; ii) latentni period (LP, LAP) tokom kojeg se fitoplazma umnožava i kreće u telu insekta vektora; iii) period inokulacije (IAP) kada se pomoću insekta vektora, fitoplazma prenosi ishranom dalje na biljke. Period akvizicije može da traje od nekoliko minuta do nekoliko sati (Purcell, 1982). Dužina AAP perioda, utiče na uspešnost prenošenja patogena. Usvajanje patogena iz floema najčešće obavljaju nimfe koje su se razvijale na zaraženoj biljci (Alma i sar., 2015). Dužina latentnog perioda varira u zavisnosti od vrste fitoplazme, izvora inokuluma i insekta vektora i može da traje od 7 do 80 dana, a najčešće je oko 25 dana (Nagaich i sar., 2008). Tokom latentnog perioda



fitoplazme se kreću i umnožavaju u telu vektora, pa je trajanje latentnog perioda u direktnoj korelaciji sa brzinom umnožavanja i kretanja fitoplazme kroz telo insekta. Nakon prolaska kroz epitelne ćelije i srednje crevo, umnožene ćelije fitoplazme prolaze kroz bazalnu membranu i ulaze u hemolimfu, a odatle u skoro sva tkiva i organe, uključujući i pljuvačne žlezde u kojima se umnožavaju (Ammar i Hogenhout, 2006) (Slika 4). Fitoplazme cirkulišu kroz hemolimfu i tako se akumuliraju u drugim tkivima (Kawakita i sar., 2000). Krećući se kroz telo insekta, fitoplazme moraju da prođu kroz dve glavne prepreke, crevo i pljuvačne žlezde (Bosco i D'Amelio, 2010). Inokulaciju uglavnom obavljaju adulti insekata (Alma i sar., 2019). Smatralo se da kada se jednom inficira, insekt takav ostaje do kraja života (Christensen i sar., 2005). Međutim, nedavne studije su pokazale da titar fitoplazme u telu insekta može da se smanji tokom vremena (Bosco i sar., 2007; Aryan i sar., 2014).



Slika 4. Kretanje fitoplazme kroz telo insekta (preuzeto iz Weintraub i sar., 2019-modifikovano).

Način ishrane insekata vektora i fitoplazmi koje prenose su međusobno povezani. Dok su neki vektori specijalisti i prirodni vektori samo jedne fitoplazme (npr. *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 koji je vektor *Flavescence dorée* fitoplazme), neki su oligo- i polifagni generalisti i mogu da prenesu nekoliko različitih fitoplazmi (Weintraub i Beanland, 2006; Esmailzadeh-Hosseini i sar., 2007). Pojedine fitoplazme imaju visoku specifičnost prema vektorima i prenosi ih samo jedna vektorska vrsta. Sa druge strane, fitoplazme sa niskom specifičnošću prema insektima vektorima mogu biti



prenete pomoću više različitih vrsta insekata. Primer za to je vrsta '*Ca. Phytoplasma asteris*', koju prenose 24 vrste cikada vektora i pritom može da izazove više od 70 oboljenja na različitim biljnim vrstama (Lee i sar., 1998a; 2004a).

Infekcija fitoplazmom kod nekih cikada može dovesti do značajnih promena u njihovoj biologiji. Što su duže patogen i domaćin u asocijaciji jedni sa drugim, njihov odnos može da evoluirá iz patogenog u mutualistički (Purcell, 1982). Fitoplazme mogu da utiču na insekte vektore smanjujući ili povećavajući njihovo preživljavanje i fekunditet ili mogu biti bez uticaja (Bressan i sar., 2005a; 2005b; D'Amelio i sar., 2008; Kingdom i Hogenhout, 2007).

1.4 Potfamilija Deltocephalinae Dallas 1870

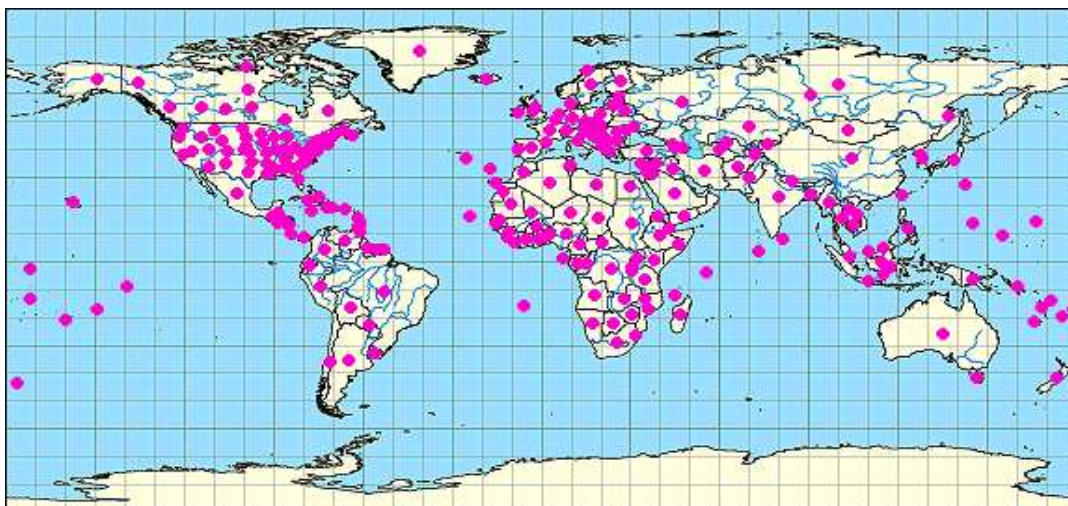
Podred Auchenorrhyncha je podeljen na dva infrareda: Fulgoromorpha (Archaeorrhyncha) i Cicadomorpha (Clypeorrhyncha). U okviru infrareda Cicadomorpha nalaze se 3 nadfamije (Cercopoidea, Cicadoidea i Membracoidea). Najbrojniju familiju nadfamije Membracoidea čini familija Cicadellidae koja obuhvata 40 potfamilija, među kojima je i potfamilija Deltocephalinae.

Potfamilija Deltocephalinae se sastoji od 39 tribusa, 926 rodova, oko 6700 opisanih vrsta i 274 podvrste. Oblik njihovog tela je vitak ili umereno robustan, dok veličina može da varira, a najčešće je dužine tela od 2-11 mm. Mogu biti makropterne ili brahipterne (Zahniser i Dietrich, 2013) (Slika 5). Kod ovih hemimetabolnih insekata larveni stupnjevi su jako slični adultima (Dmitriev, 2002). Ovo je ekonomski veoma značajna grupa koja sadrži brojne vektore biljnih patogena (Weintraub i Beanland, 2006). Više od 75% svih eksperimentalno potvrđenih vektora fitoplazmi pripada potfamiliji Deltocephalinae (Wilson i Weintraub, 2007).



Slika 5. Predstavnicu potfamilije Deltocephalinae. (A) *Neoliturus fenestratus*; (B) *Platymetopius major*; (C) *Psammotettix alienus*; (D) *Euscelis incisus*; (E) *Scaphoideus titanus*; (F) *Errastunus ocellaris*; (G) *Mocydia crocea*; (H) *Fieberiella septentrionalis*.

Predstavnicu potfamilije Deltocephalinae se hrane floemskim sokom velikog broja vaskularnih biljaka. Mogu biti monofagne i polifagne (Zahniser i Dietrich, 2010). Česte su i brojne u skoro svim klimatskim oblastima (Slika 6), a najveći diverzitet vrsta se može naći u travnatim ekosistemima u kojima veliki broj biljnih vrsta predstavlja rezervoare različitih grupa fitoplazmi (Wilson i Weintraub, 2007; Zahniser i Dietrich, 2010). Vrste ove potfamilije prenose fitoplazme koje izazivaju oboljenja različitih mono- i dikotiledonih višegodišnjih biljaka, kao što su šećerna trska, vinova loza, koštičavo voće, žitarice, povrće i ukrasno bilje (Martini i sar., 2018; De Oliveira i sar., 2018).



Slika 6. Rasprostanjenje cikada potfamilije Deltocephalinae (preuzeto sa <http://zahniser.speciesfile.org/>).

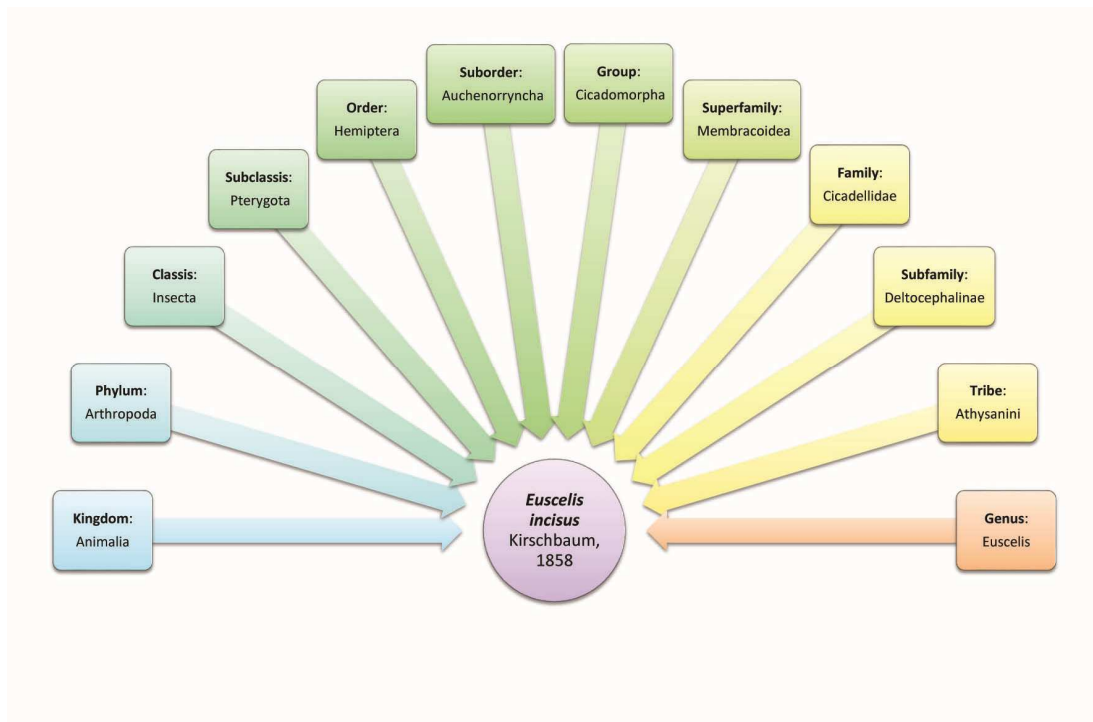
1.5 Vrsta *Euscelis incisus* (Kirschbaum, 1858)

Euscelis incisus je palearktička, široko rasprostranjena cikada u Evropi (Slika 7). Pripada potfamiliji Deltocephalinae i tribusu Athysanini (Zahniser i Dietrich, 2013) (Slika 8). Naseljava najčešće sunčana, vlažna ili umereno suva, eutrofna ili oligotrofna staništa, uglavnom livade, pašnjake, napuštena polja, ali se takođe često može naći i na travnatim površinama urbanih sredina (Nickel, 2003). Kao nitrofilna i polifagna vrsta *E. incisus* je česta u agroekosistemima, na korovskoj flori unutar i pored različitih useva (Maczey i sar., 2005; Orságová i sar., 2011). Zabeležena je u vinogradima (Cvrković i sar., 2011; Orságová i sar., 2011; Mazzoni i sar., 2001), kukuružima (Jović i sar., 2009a; 2009b) i zasadima krompira (Mitrović i sar., 2016; Girsova i sar., 2016).

Ima dve generacije godišnje koje se najčešće označavaju kao letnja i zimska generacija koje karakteriše drugačija obojenost (svetlije obojena letnja i tamnije obojena zimska forma) i morfološke razlike u izgledu kopulatornih struktura mužjaka (*aedeagus*) (Biedermann i Niedringhaus, 2004).



Slika 7. Distribucija vrste *E. incisus* u Evropi (preuzeto sa <http://www.eu-nomen.eu/portal/index.php>).

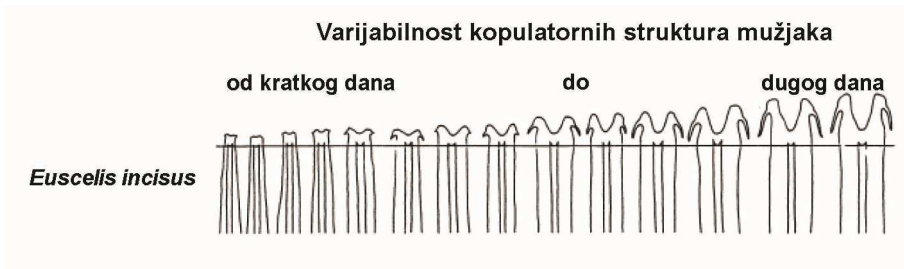


Slika 8. Taksonomska klasifikacija vrste *E. incisus*.



Iako izgled samih kopulatornih struktura mužjaka omogućava identifikaciju vrsta, za pouzdan opis se koriste geografska distribucija, temperaturni i klimatski faktori, odabir biljaka domaćina, ponašanje populacije i jedinki, akustični signali (Strübing i Drosopoulos, 2006). Zbog svega navedenog identifikacija vrsta je najpotpunija kombinovanjem što više parametara.

Pojava sezonske varijabilnosti kod roda *Euscelis* Brullé 1832, zasnovane na dužini dana poznata je još iz 50-ih godina 20. veka (Müller, 1954). U studiji Strübing i Drosopoulos (2006) pokazano je da postoji čitav niz prelaznih formi, nazvanih eunomskim linijama, koje se odnose na pigmentaciju i veličinu tela kod formi *incisus* i *plebejus*. Forma *incisus* (engl. *incisus morphs*) je zimska forma, javlja se tokom proleća i odlikuje se manjom veličinom tela i tamnijom obojenošću, dok se *plebejus* forma (engl. *plebejus morphs*) javlja tokom leta, jedinke su krupnije i svetlije. Zbog tih razlika u veličini i obojenosti, dugo se smatralo da je *plebejus* forma zapravo odvojena vrsta, *E. plebejus* Fallén (Strübing i Drosopoulos, 2006). Laboratorijski eksperimenti sa menjanjem dužine trajanja svetlog i mračnog perioda dana, su doveli do pojave međuforni. Isti metodi gajenja pod različitim uslovima, pokazali su promenu u veličini kopulatornih struktura kod *incisus* i *plebejus* forme (Slika 9) (Strübing i Drosopoulos, 2006). Tada se nametnulo pitanje da li uvek važi sistem “ključ-brava” ukoliko se veličina kopulatornih struktura razlikuje kod *incisus* i *plebejus* forme. Kunze (1959) je pokazao da veličina kopulatornih struktura ne utiče na privlačenje i fertilitet ženki. Šta više, kao bitniji faktor su se pokazali akustični signali, koji su pokazali da ženke podjednako odgovaraju na akustične signale obe forme, ostavljajući plodno potomstvo. To je dokazalo da forme *incisus* i *plebejus* pripadaju istoj vrsti označenoj kao *E. incisus* (Kirschbaum, 1858) (Strübing i Drosopoulos, 2006).



Slika 9. Promene u veličini i izgledu kopulatornih struktura mužjaka kod *incisus* (kratki dan) i *plebejus* (dugi dan) forme (preuzeto iz Strübing i Drosopoulos, 2006-modifikovano).

Rezultati istraživanja su kao odgovarajuće biljke za život i razvoj ove cikade naveli *Trifolium repens* L., *Chrysanthemum carinatum* L., *Vicia faba* L., *Senecio vulgaris* L., *Pisum sativum* L., dok su neodgovarajuće biljke *Rubus fruticosus* L., *Lycopersicum esculentum* L., *Mentha rotundifolia* (L.) Huds., *Fragaria ananassa* Duchesne, *Callistephus chinensis* (L.) Nees i *Bromus inermis* Leys. (Brčák, 1979).

1.6 Vektorska uloga vrste *E. incisus*

Vrsta *E. incisus* je vektor ili nosilac različitih vrsta i grupa fitoplazmi. U Italiji je zabeležena kao prirodni (Conti i sar., 1988) i eksperimentalni vektor (Bosco i sar., 1997; Alma i sar. 2001) 16SrI-B podgrupe u asocijaciji sa biljkama *C. carinatum*, *Chrysanthemum frutescens* (L.) Sch. Bip. i *Vitis vinifera* L. (engl. *Chrysanthemum yellows phytoplasma*, CY) (Prilog - Tabela 2). U Engleskoj je zabeležena kao prirodni i eksperimentalni vektor u prenošenju 16SrI-C podgrupe (engl. *Clover phyllody strawberry* i *Strawberry green petal disease*) (Frazier i Posnette, 1957; Posnette i Ellenberger, 1963; Brčák, 1979) i prirodni vektor *Clover witches'-broom* fitoplazme koja pripada 16SrVI grupi (Posnette i Ellenberger, 1963). Jedinke ove vrste cikade učestvuju u epidemiologiji *Clover phyllody* (CP) fitoplazme u Švajcarskoj, Čehoslovačkoj, Francuskoj, Italiji, Rumuniji i Nemačkoj (Brčák, 1979). Fitoplazma CP je takođe zabeležena u tadašnjoj Jugoslaviji, izazivajući oboljenje jagoda (engl. *Strawberry green petal disease*) i deteline (Brčák, 1979) koje su Ivanauskas i sar. (2014) kasnije zabeležili i u Litvaniji (Prilog - Tabela 2).



Kao potencijalan vektor 16SrI-F podgrupe (engl. *Aster yellows phytoplasma*) unutar vinograda, opisan je u Češkoj (Orságová i sar., 2011). Takođe, iako nije dokazan vektor, pretpostavlja se da ima ulogu u prenošenju fitoplazme 16SrIII grupe na maslačak u Litvaniji i u zasadima krompira u Rusiji (Ivanauskas i sar., 2014; Girsova i sar., 2016). U svojoj studiji Bressan i sar. (2006) su pokazali da je *E. incisus* eksperimentalni vektor *Flavescence dorée* (FD) fitoplazme u Francuskoj, usvajajući fitoplazmu iz zaraženih biljaka boba (Prilog - Tabela 2).

Oboljenje deteline *Clover dwarf* (CD), koje izaziva patuljasti rast biljke, takođe je zabeleženo u Čehoslovačkoj, Italiji, Nemačkoj i Mađarskoj (Brčák, 1979). Utvrđeno je da je *E. incisus* u prirodnim uslovima uspešan vektor ovog oboljenja, na osnovu eksperimentalnog injektiranja ekstrakta inficiranih cikada u telo zdravih jedinki vrste *E. incisus* i testovima prenošenja u kojima su dobijene inficiranje biljke bele deteline (Brčák, 1979). Pokazano je da jedinke vrste *E. incisus* mogu da prenesu CD na predstavnike iz familije Poaceae (*Hordeum distichum* L., *Avena sativa* L., *Poa annua* L.), dok na iste biljne predstavnike nisu uspeli da prenesu CP patogene, što je otvorilo pitanje epidemiologije ova dva oboljenja kod žitarica (Brčák, 1979). Vektorska uloga vrste *E. incisus*, u prenošenju pomenutih patogena, zavisi i od biljne vrste koja je uključena u proces prenošenja patogena. Zabeleženo je da *E. incisus* može vrlo efikasno da inficira biljnu vrstu *Vinca rosea* (danas *Catharanthus roseus* (L.) G. Don) CP i CD patogenom, dok je znatno manja verovatnoća i efikasnost usvajanja fitoplazme iz te biljne vrste (Brčák, 1979).

Kao potencijalni prirodni vektor jedne od najznačajnijih, najrasprostranjenijih i najistraživanijih fitoplazmi u Evropi, fitoplazme iz 16SrXII grupe (stolbur), *E. incisus* je zabeležen u Češkoj, Francuskoj i Sloveniji, na biljkama krompira, beloj detelini i vinovoj lozi (Valenta i sar., 1961; Posnette i Ellenberger, 1963; Fos i sar., 1992; Mehle i sar., 2011; Šafářová i sar., 2018). Ova vrsta je bila deo istraživanja faune cikada u vinogradima Srbije koji su zaraženi stolbur fitoplazmom. Jedinke *E. incisus* su pronađene u vinogradima u Vršcu, Topoli i Rajcu i svuda je njena brojnost bila značajna (Cvrković, 2009; Jakovljević i sar., 2013).

Sva pomenuta saznanja, kao i činjenica da je, zbog svog životnog ciklusa, vrsta *E. incisus* prisutna tokom cele godine u prirodnim ekosistemima, u kojima lako dolazi u



kontakt sa različitim fitoplazmama, ukazuju na njenu potencijalnu ulogu u različitim epidemiološkim ciklusima fitoplazmatičnih oboljenja i širenju biljnih patogena u prirodi. Zbog toga su ova istraživanja usmerena na proučavanje vrste *E. incisus* kao bioindikatora prisustva fitoplazmi unutar različitih ekosistema, interakcija ove cikade sa različitim fitoplazmama i njene potencijalne uloge u prenošenju fitoplazmatičnih oboljenja, što može imati važnu ulogu u otkrivanju i predviđanju uticaja oboljenja nastalih prenošenjem patogena pomoću insekta vektora na različite biljne vrste.



CILJEVI



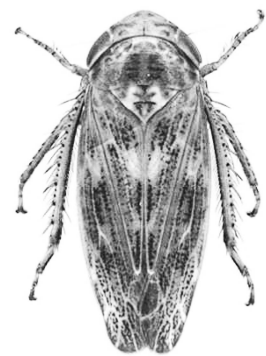
2. CILJEVI

Opšti cilj ove disertacije jeste utvrđivanje prisustva fitoplazmi u jedinkama vrste *E. incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae) i ispitivanje vektorske uloge ove cikade u prenošenju različitih grupa i vrsta fitoplazmi. Za dobijanje podataka o potencijalnoj multipotentnosti ove vrste, prethodni uslovi su podrazumevali ispitivanje i praćenje biologije *E. incisus*, njeno reproduktivno ponašanje, rasprostranjenje i preferentnost prema biljkama domaćinima. Istraživanje je zahtevalo informacije o biljkama na kojima se populacije vrste *E. incisus* hrane i/ili prave agregacije.

Molekularne analize su imale za cilj utvrđivanje diverziteta fitoplazmi koje ova vrsta može da usvoji i/ili prenese kao i uspostavljanje korelacije između fitoplazmi utvrđenih u primercima *E. incisus* i u simptomatskim i asimptomatskim biljkama sakupljenim na lokalitetima širom Srbije. Molekularna karakterizacija fitoplazmi na osnovu nekoliko genskih lokusa je imala za cilj utvrđivanje diverziteta fitoplazmi zastupljenih u jedinkama *E. incisus* kao i u biljnim vrstama na različitim lokalitetima gde su jedinke sakupljane.

Na osnovu navedenog, glavni ciljevi ove disertacije su:

- * Utvrđivanje zastupljenosti vrste *E. incisus* u fitocenološkim sklopovima u kojima su prisutne različite fitoplazme;
- * Ispitivanje preferentnosti populacija *E. incisus* prema određenim biljnim domaćinima;
- * Utvrđivanje inficiranosti populacija vrste *E. incisus* različitim fitoplazmama u prirodnim uslovima;
- * Ispitivanje vektorke uloge vrste *E. incisus* korišćenjem prirodno inficiranih i laboratorijski dobijenih populacija;
- * Utvrđivanje diverziteta, identifikacije i karakterizacije različitih grupa fitoplazmi u čijim epidemiološkim ciklusima kao vektor učestvuje vrsta *E. incisus*.



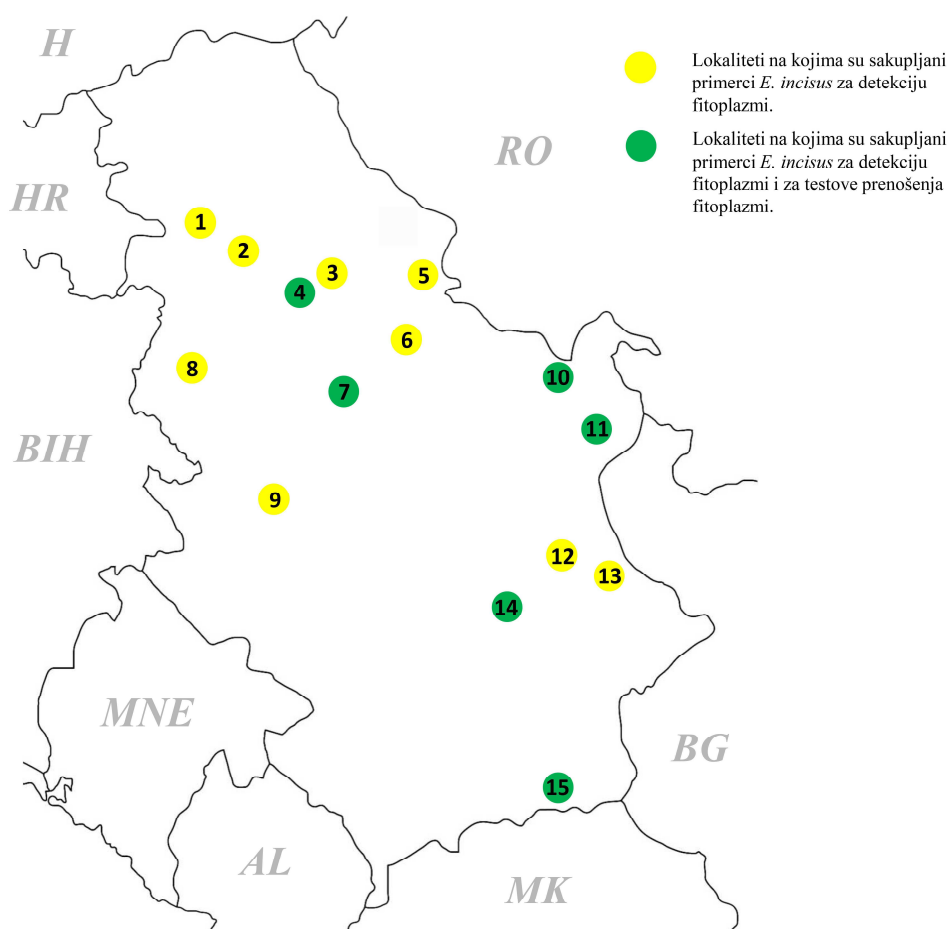
MATERIJAL I METODE



3. MATERIJAL I METODE

3.1 Opisi lokaliteta

Sakupljanje primeraka vrste *E. incisus* u cilju utvrđivanja populacija prirodno zaraženih fitoplazmama, vršeno je na ukupno 15 lokaliteta, dok su sa 6 lokaliteta sakupljane jedinke koje su korišćene kao prirodno inficirane u testovima prenošenja fitoplazmi. Sakupljanjem je obuhvaćeno 12 okruga širom Srbije: Južnobački, Sremski, Grad Beograd, Južnobanatski, Braničevski, Šumadijski, Mačvanski, Moravički, Borski, Pirotski, Nišavski i Pčinjski (Tabela 1, Slika 10).



Slika 10. Mapa lokaliteta na kojima su sakupljani primerci *E. incisus* za detekciju fitoplazmi i za testove prenošenja fitoplazmi prirodno inficiranim populacijama (preuzeto sa https://d-maps.com/carte.php?num_car=2071&lang=en).



Tabela 1. Spisak lokaliteta za sakupljanje primeraka *E. incisus* za detekciju fitoplazmi u prirodno inficiranim populacijama i za testove prenošenja fitoplazmi populacijama iz prirode.

Oznaka lokaliteta (Slika 10)	Lokalitet	Okrug	GPS koordinate	Dominantne biljne vrste	Broj sakupljenih primeraka za analizu/broj sakupljenih primeraka za testove prenošenja
1	Čerević	Južnobački	N45 12.767 E19 39.902	<i>Vitis vinifera, Convolvulus arvensis, Salvia pratensis</i>	37
2	Slankamen	Sremski	N45 8.358 E20 14.998	<i>Medicago sativa, Trifolium pratense, Trifolium repens, Alopecurus pratensis, Hordeum murinum, Lolium perenne, Poa annua</i>	18
3	Zemun	Sremski	N44 52.102 E20 20.601	<i>Carduus acanthoides, Cirsium arvense, Picris hieracioides, Coronilla varia, Lathyrus aphaca, Lens culinaris, Medicago lupulina, Melilotus indica, Trifolium campestre, Trifolium repens, Vicia angustifolia, Vicia villosa, Lolium perenne, Poa pratensis, Sorghum halepense</i>	30
4	Dobanovci	Grad Beograd	N44 50.890 E20 10.089	<i>Carduus acanthoides, Cirsium arvense, Picris hieracioides, Medicago lupulina, Melilotus indica, Lathyrus aphaca, Lathyrus cicera, Lathyrus tuberosus, Trifolium pratense, Trifolium repens, Vicia angustifolia, Briza media, Hordeum murinum, Poa annua, Sorghum halepense</i>	132 / 520
5	Bela Crkva	Južnobanatski	N44 53.572 E21 26.710	<i>Solanum tuberosum, Sonchus arvensis, Senecio vulgaris, Potentilla reptans</i>	30
6	Požarevac	Braničevski	N44 35.328 E21 13.769	<i>Trifolium pratense, Convolvulus arvensis, Poa annua, Poa pratensis, Setaria viridis</i>	21
7	Topola	Šumadijski	N44 13.468 E20 40.198	<i>Achillea millefolium, Crepis foetida, Lathyrus tuberosus, Medicago lupulina, Trifolium campestre, Trifolium pratense, Trifolium repens, Vicia angustifolia, Vicia villosa, Salvia pratensis, Vitis vinifera, Plantago lanceolata, Lolium perenne, Poa annua, Sorghum halepense</i>	50 / 500
8	Zavlaka	Mačvanski	N44 27.876 E19 29.978	<i>Solanum tuberosum, Solanum dulcamara, Amaranthus retroflexus, Sonchus arvensis</i>	19
9	Guča	Moravički	N43 47.518 E20 14.999	<i>Solanum tuberosum, Convolvulus arvensis, Mentha piperita, Chenopodium album, Agropyrum repens, Setaria viridis</i>	26
10	Donji Milanovac	Borski	N44 31.501 E22 02.500	<i>Cichorium intybus, Doricnium herbaceum, Genista tinctoria, Lathyrus latifolius, Knautia arvensis, Knautia dipsacifolia, Scabiosa lucida,</i>	41 / 210



Oznaka lokaliteta (Slika 10)	Lokalitet	Okrug	GPS koordinate	Dominantne biljne vrste	Broj sakupljenih primeraka za analizu/broj sakupljenih primeraka za testove prenošenja
				<i>Convolvulus arvensis, Agropyrum repens, Dactylis glomerata, Poa pratensis</i>	
11	Negotin	Borski	N44 16.604 E22 30.484	<i>Carduus acanthoides, Cirsium arvense, Crepis foetida, Lathyrus tuberosus, Lotus corniculatus, Knautia arvensis, Salvia pratensis, Daucus carota, Falcaria vulgaris, Convolvulus arvensis, Linaria genistifolia, Linaria vulgaris, Alopecurus pratensis, Lolium perenne, Poa annua</i>	61 / 330
12	Bela Palanka	Pirotski	N43 14.068 E22 18.669	<i>Crepis foetida, Medicago lupulina, Lotus corniculatus, Trifolium pratense, Trifolium repens, Briza media, Poa pratensis, Setaria viridis</i>	26
13	Babin zub	Pirotski	N43 21.610 E22 35.688	<i>Lathyrus pratensis, Medicago falcata, Ononis spinosa, Trifolium campestre, Trifolium montanum, Vicia grandiflora, Angelica sylvestris, Gentiana lutea, Chelidonium majus, Vaccinium myrtillus, Alopecurus pratensis, Bromus sterilis, Poa annua</i>	18
14	Jasenovik	Nišavski	N43 21.909 E22 01.341	<i>Crepis foetida, Picris hieracioides, Trifolium pratense, Clematis vitalba, Dactylis glomerata, Hordeum murinum</i>	88 / 780
15	Vranje	Pčinjski	N42 29.308 E21 53.757	<i>Centaurea maculosa, Cichorium intybus, Crepis foetida, Picris hieracioides, Genista tinctoria, Lathyrus tuberosus, Lotus corniculatus, Medicago lupulina, Trifolium campestre, Trifolium pratense, Trifolium repens, Ononis spinosa, Vicia pannonica, Vicia villosa, Knautia arvensis, Knautia dipsacifolia, Scabiosa lucida, Scabiosa ochroleuca, Festuca pratensis, Lolium perenne</i>	90 / 845



Lokaliteti su obuhvatali različite tipove vegetacije, uključujući napuštene livade i pašnjake, umereno vlažne do vlažne livade i kserotermna ruderalna staništa. Na lokalitetima Topola i Jasenovik jedinke su sakupljane na korovskoj flori u vinogradima i njihovoj okolini, dok je u Beloj Crkvi, Zavlaci i Guči sakupljanje vršeno u zasadima krompira. Zastupljenost biljnih vrsta je varirala u zavisnosti od tipa staništa i nadmorske visine, ali su na svim lokalitetima dominantne bile vrste familija Poaceae, Fabaceae, Asteraceae i Caprifoliaceae.

3.2 Sakupljanje insekatskog materijala

Adulti vrste *E. incisus* sakupljani su metodom košenja, standardnim entomološkim mrežama i usnim ekshaustorima.

3.2.1 Sakupljanje insekatskog materijala za detekciju fitoplazmi

Materijal za ispitivanje i praćenje biologije i ekologije vrste *E. incisus* kao i za utvrđivanje prisustva fitoplazmi u njima, sakupljan je od početka aprila do početka septembra u periodu od 2013. do 2018. godine (Tabela 1).

Na svakom od 15 lokaliteta određen je transekt dimenzija 50 x 3 m, u kome su adulti sakupljani standardnim entomološkim mrežama, metodom košenja i usisavanja usnim ekshaustorom. Sakupljeni primerci prebacivani su u kriotubice od 2 ml (Sarstedt, Numbrecht, Nemačka) napunjene 96% etanolom i u ručnom frižideru, na temperaturi od 10°C, prenošeni do laboratorije gde su determinisani pod stereomikroskopom Leica MZ7.5, na osnovu spoljašnje morfologije mužjaka i ženki i izgleda muškog genitalnog aparata, koristeći taksonomske ključeve Biedermann i Niedringhaus (2004). Nakon završene determinacije, insekti su čuvani u tubicama sa 96% etanolom, na 4°C do ekstrakcije DNK.

Na svim lokalitetima, izuzev Dobanovaca, sakupljani su samo primerci vrste *E. incisus*, dok su na lokalitetu Dobanovci sakupljane sve cikade koje su bile u asocijaciji sa biljkama *C. arvense* (palamida) da bi se utvrdilo prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe u njima.



3.2.2 Sakupljanje insekatskog materijala za testove prenošenja fitoplazmi

Od ukupno 15 lokaliteta na kojima je vršeno sakupljanje jedinki *E. incisus* za detekciju fitoplazmi, izabrano je 6 lokaliteta: Dobanovci, Topola, Negotin, Donji Milanovac, Jasenovik i Vranje (Tabela 1, Slika 10) na kojima su sakupljane prirodno zaražene jedinke za testove prenošenja različitih grupa fitoplazmi. Primerci su sakupljeni na biljkama familije Fabaceae na kojima su se javljale agregacije populacija vrste *E. incisus*. Tako sakupljeni primerci prebacivani su u plastične cilindre zatvorene pomoću suđera, koji su imali deo sa mrežicom zbog cirkulacije vazduha (Slika 11). U cilindrima su se nalazile biljke iz familije Fabaceae i Poaceae koje su služile kao hrana insektima tokom prenošenja do laboratorije.

Cilindri sa insektima su do laboratorije transportovani u ručnom prenosivom frižideru na temperaturi od 10°C na kojoj je aktivnost insekata je bila smanjena i njihovo prebacivanje na test biljke je bilo olakšano. Po dolasku u laboratoriju, 4-5 primeraka iz svakog cilindra je izdvajano u alkohol i vršena je identifikacija vrste, kako je opisano (3.2.1). Nakon potvrđene identifikacije, uz pomoć usnog ekshaustora primerci su prebacivani u cilindre sa test biljkama (Slika 11).



Slika 11. Plastični cilindri. (A) cilindar za prenošenje insekata do laboratorije; (B) cilindar sa test biljkom korišćen u testovima prenošenja fitoplazmi.



3.2.3 Sakupljanje insekatskog materijala za gajenje laboratorijske populacije

Za formiranje laboratorijske populacije, koja je kasnije korišćena za praćenje biologije vrste *E. incisus* i za testove prenošenja fitoplazmi, sakupljani su adulti zimske generacije tokom četiri godine (2013 - 2016), od kraja marta do početka maja, jer je u ovom periodu bio prisutan najveći broj gravidnih ženki koje su svoje razviće i polaganje jaja nastavljale u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Adulti su sakupljani na lokalitetima Zemun, Dobanovci i Topola (Slika 12) koji su izabrani na osnovu prethodno utvrđene visoke brojnosti populacija cikade *E. incisus* (Tabela 2). Adulti sakupljani na isti način kao za testove prenošenja fitoplazmi, smeštani su u kaveze namenjene gajenju laboratorijske populacije.



Slika 12. Izgled lokaliteta u Topoli.

Tabela 2. Broj sakupljenih adulta *E. incisus* za formiranje laboratorijske populacije.

Godina sakupljanja	Period sakupljanja	Broj sakupljenih adulta
2013.	24.03. - 30.03.	2420
2014.	08.04. - 08.05.	2600
2015.	22.04. - 01.05.	1280
2016.	13.04. - 20.04.	2300

3.3 Sakupljanje biljnog materijala za detekciju fitoplazmi

Biljni materijal je sakupljan na 7 lokaliteta u okviru 6 okruga u Srbiji (Tabela 3). Pet lokaliteta (Sečanj, Ruma, Zemun, Stari Tamiš i Dobanovci) izabrano je zbog prisustva velikog broja biljaka iz rodova *Cirsium* Mill i *Carduus* L. (Asteraceae) koji su



pokazivali simptome multiplih glavica, karakterističnih za fitoplazme 16SrIII grupe, opisane u radu Rančić i sar. (2005). Na ostalim lokalitetima najveća pažnja usmerena je na sakupljanje biljaka iz familija Asteraceae, Fabaceae i Caprifoliaceae. Na svim lokalitetima vršeno je uzorkovanje i simptomatskih i asimptomatskih biljaka.

Tabela 3. Sakupljanje uzoraka biljnog materijala na lokalitetima u Srbiji, u cilju utvrđivanja prisustva fitoplazmi u njima.

Lokalitet	Okrug	GPS koordinate	Uzorkovane biljne vrste	Broj uzoraka			
Sečanj	Srednjobanatski	N45 21.912 E20 47.122	<i>Cirsium arvense</i>	10			
Ruma	Sremski	N44 57.798 E19 48.303	<i>Cirsium arvense</i>	10			
Zemun	Sremski	N44 52.102 E20 20.601	<i>Cirsium arvense</i>	10			
			<i>Lathyrus aphaca</i>	6			
			<i>Medicago lupulina</i>	5			
			<i>Melilotus indica</i>	5			
			<i>Vicia angustifolia</i>	5			
			<i>Picris hieracioides</i>	4			
			<i>Trifolium pratense</i>	4			
			<i>Trifolium repens</i>	2			
			<i>Lens culinaris</i>	3			
			<i>Vicia villosa</i>	3			
Stari Tamiš	Južnobanatski	N44 52.062 E20 45.333	<i>Coronilla varia</i>	3			
			<i>Cirsium arvense</i>	10			
			<i>Cirsium vulgare</i>	6			
			<i>Cirsium arvense</i>	12			
			<i>Carduus acanthoides</i>	8			
			<i>Cirsium vulgare</i>	5			
			<i>Tanacetum vulgare</i>	5			
			<i>Arctium lappa</i>	5			
			<i>Lathyrus tuberosus</i>	5			
			<i>Lathyrus cicera</i>	5			
			<i>Lathyrus aphaca</i>	5			
			<i>Genista tinctoria</i>	5			
			Dobanovci	Grad Beograd	N44 50.890 E20 10.089	<i>Astragalus onobrychis</i>	5
<i>Lotus corniculatus</i>	5						
<i>Knautia arvensis</i>	5						
<i>Myosotis arvensis</i>	5						
<i>Symphytum officinale</i>	5						
<i>Dipsacus laciniatus</i>	5						
<i>Ballota nigra</i>	5						
<i>Sanguisorba minor</i>	5						
<i>Rubus idaeus</i>	5						
<i>Galium verum</i>	5						
<i>Knautia arvensis</i>	12						
Donji Milanovac	Borski	N44 31.501 E22 02.500				<i>Cichorium intybus</i>	8
						<i>Scabiosa lucida</i>	5
			<i>Knautia dipsacifolia</i>	5			
			<i>Lathyrus latifolius</i>	4			



Lokalitet	Okrug	GPS koordinate	Uzorkovane biljne vrste	Broj uzoraka
Vranje	Pčinjski okrug	N42 29.308 E21 53.757	<i>Scabiosa ochroleuca</i>	31
			<i>Trifolium campestre</i>	7
			<i>Trifolium repens</i>	7
			<i>Lotus corniculatus</i>	7
			<i>Picris hieracioides</i>	7
			<i>Ononis spinosa</i>	5
			<i>Centaurea maculosa</i>	5
			<i>Vicia pannonica</i>	4

Sakupljanje je vršeno tokom letnjih meseci 2012., 2016., 2017. i 2018. godine. Prilikom uzorkovanja biljaka *C. arvense* posebna pažnja posvećena je specifičnoj biologiji ove vrste, koja se ogleda u formiranju dubokog i veoma razgranatog korenovog sistema koji omogućava vegetativno širenje biljke. Kako bi se izbeglo sakupljanje biljaka jednog klona uzorkovane su samo biljke koje su međusobno udaljene najmanje 15 m od druge.

Za sve pomenute biljne vrste, vršeno je uzorkovanje listova, osim za vrste podtribusa *Carduinae* kod kojih su uzorkovane i cvetne glavice. Sakupljeni uzorci pojedinačnih biljaka stavljani su u plastične zip kese, obeleženi i u prenosivom ručnom frižideru, na temperaturi od 10°C, transportovani do laboratorije. U laboratoriji su od sakupljenog materijala pravljeni uzorci sečenjem glavnog nerva sakupljenih listova ili pravljenjem mešovitog uzorka cvetnih glavica i lisnih nerava u slučaju vrsta podtribusa *Carduinae*. Tako pripremljeni uzorci težine od 0.2 do 1 grama, pakovani su u aluminijumsku foliju i čuvani u zamrzivaču na -20°C do ekstrakcije DNK.

Biljke rodova *Cirsium* i *Carduus* sa lokaliteta Zemun su analizirane prajmerima specifičnim za 16SrIII grupu fitoplazmi, dok su sve ostale biljne vrste analizirane univerzalnim prajmerima na prisustvo različitih grupa fitoplazmi (3.5.3).

3.4 Eksperimentalne procedure

3.4.1 Gajenje biljaka u kontrolisanim uslovima

Istraživanja za potrebe ovog doktorata zahtevala su korišćenje biljaka gajenih iz semena, u kontrolisanim uslovima koji su podrazumevali temperaturu 24±1°C i 16/8 h perioda dan/noć.



Za pravljenje kaveza i razvoj larvi i adulta u njima korišćeno je seme crvene (*Trifolium pratense* L.) i bele deteline (*T. repens*), koje je stavljano direktno u saksije sa zemljom i zatim u velike prastične kutije prekrivene mrežom kako bi se sprečio ulazak štetočina. Tako napunjene kutije čuvane su u klima komori gde su se deteline razvijale. U kaveze su stavljane saksije u kojima su deteline već bile razvijene (Slika 13).

Semena ostalih biljnih vrsta koje su korišćene u eksperimentima prenošenja stavljana su u petri šolje, na vlažan filter papir. Tu su se razvijali klijanci koji su nakon razvoja dva lista presađivani u saksije. Saksije su stavljane u kutije i čuvane u klima komorama u kontrolisanim uslovima, do početka eksperimenata prenošenja. Spisak biljnih vrsta koje su korišćene za testove prenošenja različitih grupa fitoplazmi, kao i za proveru prirodne vektorske uloge vrste *E. incisus*, dat je u Tabeli 4.

Tabela 4. Biljne vrste korišćene u eksperimentima prenošenja različitih grupa fitoplazmi.

Grupa fitoplazme	Biljna vrsta korišćena u testovima prenošenja
16SrII	<i>Catharanthus roseus</i>
16SrIII	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Cirsium arvense</i> , <i>Cirsium creticum</i> , <i>Cirsium eriophorum</i> , <i>Cirsium oleraceum</i> , <i>Cirsium pannonicum</i> , <i>Carduus acanthoides</i> , <i>Carduus nutans</i>
16SrV	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Vitis vinifera</i>
16SrIX	<i>Catharanthus roseus</i>
16SrXII	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>Convolvulus arvensis</i>

3.4.2 Gajenje laboratorijske populacije vrste *E. incisus*

Gajenje laboratorijske populacije vrste *E. incisus* imalo je za cilj praćenje biologije, ekologije i dinamike razvića ove vrste, kao i korišćenje nove, nezaražene populacije u testovima prenošenja različitih grupa i vrsta fitoplazmi.

Insekti sakupljeni na lokalitetima Dobanovci, Zemun i Topola prebacivani su iz plastičnih cilindara u kaveze sastavljene od drvenih ramova obloženih mrežom, dimenzija 30 x 25 x 45 cm (Slika 13). U kavezima su se nalazile biljke crvene (*T. pratense*) i bele deteline (*T. repens*), gajene iz semena u kontrolisanim uslovima, u kojima su ženke vršile ovipoziciju. Praćeno je ponašanje jedinki u kavezima i stanje



biljaka i uslova sredine. Redovno održavanje kaveza je podrazumevalo praćenje eventualnih pojava štetnih organizama (biljne vaši, tripsi, grinje) kao i patogena koji izazivaju pepelnicu ili buđ i njihovo suzbijanje da bi se razviće vrste *E. incisus* i proces ovipozicije nesmetano odvijali.



Slika 13. Kavezi za gajenje laboratorijske populacije vrste *E. incisus*.

Početak i dužina trajanja svake etape razvića direktno je zavisila od vremenskih uslova. Pojava jaja na listovima deteline je praćena svakodnevno. Tokom ovipozicije, adulti su sukcesivno prebacivani u nove kaveze gde su nastavljali razviće, dok su biljke iz kaveza gde su jaja već položena, sećene. Svaki list je pregledan pod stereomikroskopom Leica MZ7.5 i brojana su jaja. Listovi sa jajima su stavljeni u plastične kutije dimenzija 13 x 11 cm i petri šolje dimenzija 15 x 3 cm do pojave prvog larvenog stupnja. U kutije sa jajima i larvama su svakodnevno dodavani sveži listovi deteline, gajene iz semena, na kojima su se hranile larve. Svakodnevno su ispiljene larve brojane i prebacivane u nove kaveze sa detelinom gajenom iz semena. Dalje razviće odvijalo se u kavezima sve do pojave adulta koji su korišćeni u eksperimentima i testovima prenošenja.

Dužina i širina jaja *E. incisus* merena su na stereomikroskopu Leica MZ7.5 a za izračunavanje srednjih vrednosti korišćena je destriptivna statistika u programu Statistica 5.1 (Statistica 5.1, StatSoft).



3.4.3 Eksperimenti prenošenja fitoplazmi prirodno inficiranim populacijama vrste E. incisus

Eksperimenti sa primercima sakupljenim na terenu imali su za cilj da se utvrdi prirodna vektorska uloga vrste *E. incisus* u prenošenju različitih grupa fitoplazmi na različite biljne vrste. Izbor biljnih vrsta koje će biti korišćene u eksperimentima prenošenja zavisio je od već postojećih podataka o biljkama domaćinima određene grupe fitoplazmi kao i od praćenja brojnosti populacija vrste *E. incisus* na određenim biljnim vrstama. Testovi prenošenja su postavljani tokom šest eksperimentalnih godina, od 2013. do 2018. godine.

Lokaliteti na kojima su sakupljane jedinke *E. incisus* za utvrđivanje vektorske uloge izabrani su na osnovu prethodno utvrđenog prisustva fitoplazmi na tom lokalitetu. Testovi prenošenja su postavljani za fitoplazme 16SrIII, 16SrIX i 16SrXII grupe.

Testovi prenošenja 16SrIII grupe fitoplazmi

Dobanovci: Na ovom lokalitetu je prethodno utvrđeno prisustvo velikog broja biljaka *C. arvensis* sa simptomima multiplih inflorescenci karakterističnih za 16SrIII grupu fitoplazmi. Tokom jula 2013. godine, ukupno je sakupljeno 180 primeraka *E. incisus* i po 30 je stavljeno da se hrani 48h na 3 biljke *C. roseus* (perivinka) i 3 biljke *C. arvensis* gajene iz semena. Po dve dodatne biljke perivinke i palamide su služile kao kontrolne biljke.

Testovi prenošenja 16SrIX grupe

Vranje: Lokalitet Vranje je izabran nakon identifikacije 16SrIX grupe u primercima *E. incisus* sakupljenim na ovom lokalitetu. Sakupljanje jedinki vrste *E. incisus* vršeno je tokom četiri eksperimentalne godine (2015 - 2018). Tokom svake eksperimentalne godine po 30 sakupljenih primeraka *E. incisus* se hranilo na ukupno 6 perivinki, u periodu od 48h. Dodatne 3 perivinke služile su kao kontrolne biljke tokom svake eksperimentalne godine.

Donji Milanovac: Na ovom lokalitetu je takođe utvrđeno prisustvo 16SrIX grupe u jedinkama *E. incisus*. Ovaj lokalitet se odlikovao značajno manje brojnom populacijom, tako da je sakupljanje sprovedeno samo početkom avgusta 2018. godine



kada je po 30 primeraka *E. incisus* postavljeno na šest perivinki, na period od 48h. Dodatne tri perivinke su korišćene kao kontrolne biljke.

Testovi prenošenja 16SrXII grupe

Tokom 2014. i 2016. godine, eksperimenti prenošenja su postavljani sa populacijama vrste *E. incisus* sakupljenim na lokalitetima Topola, Jasenovik i Dobanovci, gde je prethodno utvrđeno postojanje 16SrXII grupe fitoplazmi, dok je 2018. sakupljanje primeraka *E. incisus* vršeno na lokalitetu Negotin.

Dobanovci: Eksperimenti su postavljeni tokom 2014. godine. Po 30 jedinki *E. incisus* stavljano je na 6 biljaka *C. roseus* i 4 biljke *C. arvensis* (poponac), tokom perioda od 48h. Po dve biljke *C. roseus* i *C. arvensis* korišćene su kao kontrolne biljke.

Topola: Sakupljanje prirodno inficirane populacije *E. incisus* za testove prenošenja, sprovedeno je u julu 2014. i 2016. godine. Tokom prve eksperimentalne godine po 30 primeraka *E. incisus* se hranilo 48h na 6 perivinki, dok je tokom druge eksperimentalne godine po 30 primeraka *E. incisus* stavljano na 6 perivinki i 4 vinove loze sorte šardone (engl. *Chardonnay*). Tokom prve eksperimentalne godine, 3 biljke *C. roseus* su služile kao kontrolne biljke, dok su tokom druge godine korišćene 3 perivinke i dve vinove loze kao kontrolne biljke.

Jasenovik: Eksperimenti su postavljeni tokom 2014. i 2016. godine. Krajem jula 2014. godine, po 30 jedinki *E. incisus* je stavljeno na šest perivinki i četiri vinove loze sorte šardone na period inokulacije od 48h. Krajem jula 2016. godine, po 30 jedinki stavljeno je na period od 48h na 6 perivinki, 4 vinove loze i 4 biljke poponca. Tokom prve eksperimentalne godine, 3 perivinke i 2 vinove su korišćene kao kontrolne biljke, dok su tokom druge godine korišćene 3 perivinke, 2 vinove loze i 2 biljke poponca.

Negotin: U drugoj polovini jula 2018. godine, postavljeno je 10 replikacija u kojima se po 30 primeraka *E. incisus* hranilo 48h na biljkama *C. roseus*. Dodatne 3 perivinke su služile kao kontrolne biljke.

Nakon perioda inokulacije, sve test i kontrolne biljke čuvane su u klima komorama na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ i 16/8 h perioda dan/noć, gde je praćena pojava simptoma. Sve biljke su uzorkovane i analizirane na prisustvo fitoplazmi nakon 3 meseca dok je vinova loza analizirana nakon godinu dana.



Sve biljke koje su korišćene u testovima prenošenja fitoplazmi putem prirodno inficiranih jedinki *E. incisus*, analizirane su opštim prajmerima na prisustvo fitoplazmi. Pozitivni uzorci su sećeni *MSeI* enzimom RFLP analizom. Karakterizacija fitoplazmi na osnovu različitih genskih lokusa, vršena je umnožavanjem ciljnih regiona specifičnim prajmerima za određenu grupu fitoplazmi i sekvenciranjem. Izuzetak je detekcija 16SrIII grupe gde je inicijalna identifikacija rađena pomoću specifičnih prajmera za umnožavanje 16S rRNK regiona 16SrIII grupe.

3.4.4 Eksperimenti prenošenja fitoplazmi u laboratorijskim uslovima

Testovi prenošenja fitoplazmi u cilju dokazivanja vektorske uloge vrste *E. incisus* u laboratorijskim uslovima postavljani su tokom četiri eksperimentalne godine, od 2013. do 2016. godine.

Testovi prenošenja 16SrIII grupe

Tokom prve eksperimentalne godine, postavljeni su eksperimenti u kojima su korišćene biljke *C. arvense* sa simptomima multiplih inflorescenci (16SrIII grupa fitoplazmi), sakupljene na terenu i u svežem stanju transportovane do laboratorije, i jedinke vrste *E. incisus* koje su dobijene laboratorijskim gajenjem u kontrolisanim uslovima (odjeljak 3.4.2). U testovima prenošenja ukupno se 400 adulta hranilo na simptomatskim biljkama *C. arvense*, tokom 48h akvizicijskog perioda, a zatim su prebaćeni u nove kaveze sa crvenom i belom detelinom, gde su proveli 28 dana latentnog perioda potrebnog za umnožavanje fitoplazme u telu insekta. Nakon tog perioda, po 30 potencijalno inficiranih adulta prebaćeno je da se hrani u trajanju od 24h na šest perivinki i 6 palamida gajenih iz semena.

Tokom iste eksperimentalne godine, na lokalitetu Dobanovci, sakupljene su biljke *Carduus acanthoides* (L.) koje su pokazivale tipične simptome multiplih inflorescenci. Na sakupljene biljke je stavljeno ukupno 400 adulta *E. incisus* laboratorijski dobijene populacije, na 48h akvizicije. Nakon akvizicije preživeli adulti su prebaćeni u kaveze sa belom i crvenom detelinom, na 28 dana. Po isteku latentnog perioda, po 30 adulta *E. incisus* prebaćeno je da se hrani 24h na 6 biljaka *C. roseus* i 4 biljke *C. arvense*, gajene iz semena pod kontrolisanim uslovima.



Tokom druge eksperimentalne godine postavljeni su dodatni testovi prenošenja 16SrIII grupe fitoplazmi, na biljne vrste: *Cirsium creticum* (Lam.) D'Urv., *Cirsium eriophorum* (L.) Scop., *Cirsium oleraceum* (L.) Scop., *Cirsium pannonicum* (L.f.) Link i *Carduus nutans* L. (familija Asteraceae, podtribus Carduinae). Ukupno 850 jedinki iz laboratorijski dobijene populacije su se hranile 48h na simptomatskim biljkama *C. arvense* sakupljenim u prirodi. Nakon tog perioda svi preživeli adulti prebačeni su u kaveze sa detelinom na 28 dana, a zatim je stavljeno po 30 primeraka *E. incisus* na svaku od eksperimentalnih biljaka u 4 replikacije, na period od 24h.

Dodatno, 830 primeraka iz laboratorijske populacije hranilo se 48h na inficiranim biljkama *C. roseus*, a nakon 28 dana latentnog perioda u kavezima, po 30 preživelih primeraka stavljeno je na eksperimentalne biljke podtribusa Carduinae u 4 replikacije i na 6 perivinki.

Nakon završenog perioda inokulacije, adulti iz svih eksperimenata su pomoću usnog aspiratora skinuti sa biljaka, stavljani u krio tubice od 2 ml napunjene 96% etanolom i odložene na -20°C do DNK ekstrakcije. Po tri biljke *C. roseus* i *C. arvense* kao i po 2 biljke svake od ostalih vrsta podtribusa Carduinae, koje su gajene i praćene u istim uslovima, a nisu došle u kontakt sa potencijalno inficiranim insektima, služile su kao kontrolne biljke.

Biljke iz testova i kontrolne biljke su držane u kontrolisanim uslovima u klima komorama na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ i na 16/8 dan/noć period. Tokom naredna 3 meseca je praćena pojava simptoma. Nakon 3 meseca, listovi svih biljaka su uzorkovani i analizirani. Svi insekti su analizirani pojedinačno na prisustvo 16SrIII grupe fitoplazmi. Identifikacija 16SrIII grupe u insektima i simptomatskim test biljkama je urađena specifičnim prajmerima za umnožavanje 16S rRNK regiona 16SrIII grupe.

Testovi prenošenja 16SrII grupe

Tokom 2014. i 2015. godine postavljeni su eksperimenti prenošenja sa fitoplazmom 16SrII grupe. Tokom dve eksperimentalne godine, ukupno 700 primeraka laboratorijski dobijene populacije hranilo se na perivinkama inficiranim 16SrII grupom. Nakon 48h ishrane na zaraženim biljkama insekti su prebačeni u kaveze na 28 dana, a zatim je po 30 primeraka stavljeno da se hrani na 12 zdravih sejanaca biljke *C. roseus* (po 6 u svakoj godini). Dodatne 3 perivinke u svakoj godini služile su kao kontrolne



biljke. Posle 24h ishrane na zdravim biljkama, insekti su prebačeni u tubice od 2 ml sa 96% etanolom i čuvani u zamrzivaču na -20°C i kasnije pojedinačno analizirani, a biljke su praćene u klima komori pod kontrolisanim uslovima na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ i na 16/8 dan/noć period. Test i kontrolne biljke su uzorkovane i analizirane nakon 3 meseca na prisustvo 16SrII grupe fitoplazmi.

Testovi prenošenja 16SrV grupe

Tokom 2014. i 2015. godine postavljeni su eksperimenti prenošenja fitoplazme 16SrV grupe. Za usvajanje fitoplazme 16SrV grupe korišćene su zaražene biljke *C. vitalba* (pavitina) i perivinke. U prvoj godini se 580 primeraka laboratorijski dobijene populacije hranilo 48h na zaraženoj biljci pavitine donetoj iz prirode, a zatim su preživeli adulti prebačeni u kaveze. Nakon 28 dana, po 30 primeraka potencijalno inficiranih insekata stavljeno je na 6 zdravih perivinki i 4 vinove loze sorte šardone na period od 24h. Dodatne 3 perivinke i 2 vinove loze su služile kao kontrolne biljke. U drugoj eksperimentalnoj godini, 570 primeraka je stavljeno na zaražene biljke *C. roseus*, da se hrane u toku 48h, a zatim su prebačene u kaveze. Nakon latentnog perioda od 28 dana, po 30 primeraka je stavljeno na 6 perivinki i 4 vinove loze. Posle 24h ishrane na zdravim biljkama, insekti su prebačeni u tubice sa 96% etanolom i čuvani u zamrzivaču na -20°C i kasnije pojedinačno analizirani. Dodatne 3 perivinke i 2 vinove loze su služile kao kontrolne biljke. Test i kontrolne biljke su čuvane u klima komorama pod kontrolisanim uslovima na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ i na 16/8 dan/noć, gde je praćena pojava simptoma. Perivinke iz eksperimenata kao i kontrolne perivinke su uzorkovane i analizirane nakon 3 meseca, dok su sejanci vinove loze sorte šardone iz eksperimenata i kontrolne biljke vinove loze uzorkovane nakon 12 meseci. Svi insekti su analizirani pojedinačno na prisustvo fitoplazme 16SrV grupe.

Testovi prenošenja 16SrXII grupe

Tokom četiri eksperimentalne godine (2013 - 2016) postavljeni su eksperimenti prenošenja stolbur fitoplazme, koja pripada 16SrXII grupi, pomoću laboratorijski dobijene populacije. Akvizicija je vršena sa četiri perivinke koje su u sebi nosile različite genotipove stolbur fitoplazme: i) STOLg (*tuf-b/V2-TA/STOL*), ii) Rqg50g (*tuf-b/V2-TA/STOL*), iii) BG4560g (*tuf-b/V7-A/BG4560*) i iv) 19-25g (*tuf-ab/V18/19-25*).



Ukupno 550 jedinki je usvajalo stolbur fitoplazmu genotipa BG4560g tokom 48h na inficiranim perivinkama. Nakon 28 dana latentnog perioda, po 30 jedinki *E. incisus* je stavljano da se hrane 24h na 6 perivinki i 4 vinove loze sorte šardone.

Ukupno 830 jedinki *E. incisus* je tokom dve godine vršilo akviziciju na perivinkama koje u sebi imaju genotip stolbur fitoplazme STOLg. Nakon 48h akvizicije, insekti su 28 dana bili u kavezima sa detelinom. Po završetku latentnog perioda, po 30 *E. incisus* se hranilo tokom 24h na 6 perivinki i 4 vinove loze tokom svake godine.

Usvajanje fitoplazme sa perivinki koje su zaražene genotipom Rqg50g stolbur fitoplazme vršeno je od strane ukupno 910 primeraka *E. incisus*, tokom dve eksperimentalne godine. Nakon 48h akvizicije, svi insekti su prebačeni u kaveze sa detelinom na 28 dana latentnog perioda. Nakon toga, po 30 primeraka je stavljano na test biljke, na ukupno 12 perivinki, 8 vinovih loza i 4 poponca.

Tokom dve eksperimentalne godine akvizicija je rađena sa perivinkama koje su bile zaražene genotipom 19-25g stolbur fitoplazme. U obe godine po 500 jedinki je vršilo akviziciju tokom 48h, a nakon 28 dana latentnog perioda, po 30 jedinki *E. incisus* stavljano je na po 6 perivinki i 4 vinove loze na period inokulacije od 24h.

Nakon 24h inokulacijskog perioda u svakom eksperimentu, preživeli insekti su ubačeni u tubice sa 96% etanolom, čuvani na -20°C i analizirani pojedinačno na prisustvo fitoplazmi. Tokom svake eksperimentalne godine, biljke koje su korišćene u eksperimentima (po 3 perivinke, 2 vinove loze i 2 biljke poponca) služile su kao kontrola. Biljke su čuvane u klima komorama pod kontrolisanim uslovima na temperaturi $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ i 16/8 dan/noć, gde je praćena pojava simptoma. Test i kontrolne perivinke i poponac uzorkovane su i analizirane nakon 3 meseca, dok su biljke vinove loze analizirane nakon 12 meseci.

3.5 Molekularne analize fitoplazmi

3.5.1 Ekstrakcija DNK iz biljaka

Ekstrakcija DNK iz biljnog materijala vršena je iz listova ili iz mešovutih uzoraka lisnih nerava i cvetnih glavica kod biljaka podtribusa Carduinae. Ukupna DNK



je izolovana iz biljnog materijala po CTAB (engl. *cethyl-trimethyl-ammonium bromide*) protokolu izolacije opisanom od strane Angelini i sar. (2001).

Svaki uzorak usitnjen je u avanu sa tučkom pomoću tečnog azota i homogenizovan u 7 ml / 1 g uzorka 3% CTAB pufera (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1.4 M NaCl) u koji je dodat PVP (engl. *polyvinylpyrrolidone*) u koncentraciji od 3% i β -merkaptoetanol u koncentraciji od 0.2%. Iz tako dobijene suspenzije, izdvojen je 1 ml svakog uzorka, prebačen u plastične tubice zapremine 2 ml i inkubiran 20 minuta na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon toga, u svaku tubicu je dodat 1 ml hloroforma i izdvojena je DNK centrifugiranjem 10 minuta na 11000 obrtaja/min na sobnoj temperaturi. Supernatant je prebačen u novu tubicu od 1.5 ml i dodato je 750 μ l ledeno-hladnog izoprasonola. Nakon centrifugiranja od 15 minuta na 11000 obrtaja/min na sobnoj temperaturi istaložena je DNK na dnu rastvora. Tako izolovana DNK isprana je sa 1 ml 96% ledeno-hladnog etanola i osušena strujanjem sterilnog vazduha u digestoru. Dobijena DNK rastvorena je u 100 μ l TE pufera (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.6), ostavljena preko noći da se rastvara u frižideru, a sledećeg dana je odložena na dalje čuvanje u zamrzivaču na -20°C.

3.5.2 Ekstrakcija DNK iz insekata

3.5.2.1 Ekstrakcija pojedinačnih primeraka insekata

Ukupna DNK je ekstrahovana iz pojedinačnih primaraka nedestruktivnom metodom opisanom u radu Kosovac i sar. (2018) koja predstavlja modifikaciju protokola ekstrakcije TES (Tris-EDTA-SDS) opisane u radovima Rees i sar. (2001) i Mahuku (2004). Svaki analizirani primerak *E. incisus* je punktiran sterilnom iglom između drugog i trećeg tergita toraksa. Primerak je stavljen u tubicu od 2 ml u kojoj se nalazilo 400 μ l TES pufera za ekstrakciju (0.5% SDS, 20 mM Tris, 10 mM EDTA) i 4 μ l proteinaze K (Fermentas) u koncentraciji 187.5 μ g/mL⁻¹. Tubice sa insektima u puferu su inkubirane preko noći u vodenom kupatilu, na 56°C. Nakon inkubacije, pufer u kome su se insekti nalazili prebačen je u tubicu od 1.5 ml, dok je primerak insekta neoštećen čuvan u 96% etanolu u frižideru. Ekstrakcija je nastavljena dodavanjem 750 μ l hloroforma i centrifugiranjem 10 min na 4°C i 11000 obrtaja/min. Supernatant u kome se nalazila DNK prebačen je u novu tubicu od 1.5 ml i ponavljan je korak sa hloroformom. Nakon još jednog koraka centrifugiranja pod već opisanim uslovima,



supernatant je prebačen u novu tubicu od 1.5 ml i dodato je 750 μ l ledeno-hladnog izoprapronola koji omogućava dehidraciju i precipitaciju. Centrifugiranjem od 15 min na 4°C i 12000 obrtaja/min izolavana je DNK, koja je zatim isprana sa 1 ml 96% ledeno-hladnog etanola i osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru. Dobijena DNK rastvorena je u 50 μ l TE pufera (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.6), ostavljena preko noći da se rastvara u frižideru a sledećeg dana odložena na dalje čuvanje u zamrzivaču na -20°C.

Opisana metoda ekstrakcije omogućava u potpunosti očuvanje i zadržavanje svih morfoloških karakteristika primeraka *E. incisus*.

DNK iz primeraka *E. incisus* koji su sakupljeni u malom broju ekstrahovana je *DNeasy Blood & Tissue Kit*-om (Qiagen, Limburg, Holandija), prateći uputstva proizvođača. Ova metoda izolacije DNK je takođe omogućila očuvanje morfologije analiziranih primeraka.

3.5.2.2 Ekstrakcija insekata u grupama

Primerci različitih vrsta podreda Auchenorrhyncha sakupljeni na lokalitetu Dobanovci, od kraja juna do početka avgusta 2013. godine, analizirani su u grupama (engl. *pools*) od 3-5 jedinki, zavisno od veličine samih primeraka. Ovaj tip ekstrakcije primenjen je za dobijanje početnih informacija o prisustvu fitoplazme 16SrIII grupe u cikadama. Primerci *E. incisus* koji su sakupljeni ovom prilikom, takođe su analizirani u grupama. Svi ostali primerci ove vrste analizirani su pojedinačno.

Ekstrakcija u grupama je vršena koristeći modifikovanu CTAB metodu prema Gatineau i sar. (2001). CTAB protokol koji se koristi za ekstrakciju DNK iz insekatskog materijala je veoma sličan protokolu za ekstrakciju DNK iz biljnog materijala. Razlike u pomenutim protokolima potiču od razlika samog tkiva iz koga se vrši ekstrakcija DNK.

Grupe od 3 do 5 primeraka stavljane su u tubicu od 2 ml i uz pomoć štapića (engl. *micropestle*) usitnjeni u tečnom azotu. U tubice je zatim dodato 400 μ l 2%-tnog CTAB pufera (2% CTAB, 1 M TRIS, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA) sa 0.2% β -merkaptetoetanolom i one su inkubirane na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon 30 minuta u svaku tubicu je dodato 400 μ l hloroforma. Tubice su centrifugirane 10 min na 4°C i 11000 obrtaja/min i izdvojena je DNK. Supernatant je prebačen u novu tubicu od 1.5 ml



i korak sa dodavanjem hloroforma je ponovljen. Nakon završenog procesa centrifugiranja, supernatant je prebačen u nove tubice od 1.5 ml i dodato je 400 μ l ledeno-hladnog izopropanola nakon čega je, tokom još jednog procesa centrifugiranja od 15 min na 4°C i 12000 obrtaja/min istaložena DNK, koja je isprana sa 1 ml ledeno-hladnog etanola i ostavljena da se suši pod strujom sterilnog vazduha u digestoru. Dobijena DNK je rastvorena u 100 μ l TE pufera (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.6), ostavljena preko noći da se rastvara u frižideru a sledećeg dana odložena na čuvanje u zamrzivaču na -20°C.

3.5.3 Detekcija i identifikacija fitoplazmi u biljnom i insekatskom materijalu

Identifikacija različitih grupa fitoplazmi u biljnom i insekatskom materijalu izvršena je umnožavanjem 16S rRNK gena pomoću univerzalnih P1 i P7 prajmera (Deng i Hiruki, 1991; Smart i sar., 1996) u direktnoj PCR reakciji. Zatim su umnoženi produkti iz direktne PCR reakcije korišćeni za sledeću amplifikaciju, tzv. nested PCR, koristeći kombinacije prajmera P1A i P7A (Lee i sar., 2004b), R16F2n i R16R2 (Gundersen i Lee, 1996) ili 16s758f i M23Sr (Gibb i sar., 1995; Padovan i sar., 1995) (Tabela 5, Prilog - Tabela 3). Umnožavanje je vršeno u Eppendorf Mastercycler ep gradient S, po modifikovanom protokolu (Lee i sar., 1998b). Prajmeri za direktni PCR umnožavaju region 16S rRNK, 16S-23S međugenski region i početak 23S rRNK gena, ukupne dužine oko 1850 bp. Umnožavanje DNK u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u 20 μ l zapremine PCR smeše (Tabela 5) i ciljne DNK koja je u direktnoj reakciji predstavljala 1 μ l genomske DNK izolovane iz jedinki *E. incisus* ili 1:10 razređene DNK biljaka, a u nested reakciji 1:50 razređeni produkt direktne reakcije umnožavanja. Isti termalni protokol je primenjen za direktnu i nested reakciju amplifikacije i sastoji se iz tri faze. U prvoj fazi dolazi do inicijalne denaturacije DNK na temperaturi od 94°C u trajanju od 1 min i 30s. U drugoj fazi se 34 puta ponavlja ciklus od tri koraka: 1. denaturacija na 94°C/ 1 min; 2. hibridizacija prajmera na 50°C/ 2min; 3. elongacija na 72°C/ 3 min. U poslednjoj, trećoj fazi PCR amplifikacije, dolazi do finalne elongacije na 72°C/ 10 min.

Kako bi se izbegla mogućnost unakrsne kontaminacije tokom pripreme uzoraka na svakih 10 uzoraka stavljana je jedna negativna kontrola, koju je predstavljala dodatna tubica sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 μ l uzorka



korišćen 1 μ l vode (engl. *nuclease-free water*, QIAGEN). Kao pozitivne kontrole korišćeni su referentni izolati: 16SrI-C (obezbeđen od strane E. Boudon-Padieu, Dijon, Francuska); 16SrI-B (obezbeđen od strane E. Angelini, CRA-VIT, Conegliano, Italija); 16SrII-C, *Faba bean phyllody* (FBP) i 16SrII-D, *Tomato big bud* (TBB) (obezbeđen od strane A. Bertaccini, Bologna, Italija); 16SrII-E izolati iz *P. hieracioides* iz jugoistočne Srbije (Mitrović i sar., 2012); 16SrIII-F (VAC izolat) iz eksperimentalno inficirane perivinke (obezbeđen od strane E. Angelini, CRA-VIT, Conegliano, Italija); 16SrV-C, *Flavescence dorée* (FD-C) izolat iz prirodno zaražene vinove loze iz Srbije; 16SrXII-A, eksperimentalno inficirana perivinka fitoplazmom koju je preneo *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 iz Srbije.

Nakon umnožavanja, po 5 μ l nested PCR produkata, uključujući i pozitivnu i negativne kontrole, elektroforetski je razvojeno na 1% agaroznom gelu u TBE puferu (90 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA) obojenom etidijum bromidom i vizualiziranom pod UV transiluminatorom.

Dalja diferencijacija i identifikacija različitih grupa fitoplazmi vršena je primenom RFLP metode. Produkti dobijeni u nested PCR reakciji sa R16F2n i R16R2 prajmerima, ukupne dužine 1250 bp, podvrgnuti su digestiji koja je urađena u ukupnoj zapremini 15 μ l RFLP smeše koja je sadržala 3.4 μ l H₂O, 1.5 μ l 10 x pufer za digestiju, 1 U MseI enzima (Fermentas, Litvanija) koncentracije 10 U/ μ l (0.1 μ l) i 10 μ l PCR produkta. Digestija je trajala 16 sati na temperaturi od 65°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Restrikcioni fragmenti su razdvojeni pomoću automatskog sistema za kapilarnu elektroforezu QIAxcel *Advanced* (QIAGEN) upotrebom kertridža *High Resolution Gel Cartridge* (QIAGEN) pod sledećim uslovima: voltaža injektiranja uzorka 5 kV, vreme injektiranja uzorka 8-10 s, voltaža separacije 6 kV i vreme separacije 320 s. *Alignment* marker (QIAGEN) 15 bp/5 kb je korišćen za poravnanje poređenih fragmenata, a QX DNK FX174/HaeIII (QIAGEN) je korišćen za poređenje dužine fragmenata.

Prateći preporuke studije Zhao i sar. (2009), virtuelna digestija dobijenih izolata 16SrXI grupe fitoplazmi je potkrepljena pravom digestijom u kojoj su dobijeni izolati poređeni sa najbližom opisanom podgrupom 16SrXI grupe. Digestija F2nR2 regiona 16S rRNK gena 16SrXI grupe fitoplazmi pomoću *TaqI* enzima je urađena nakon



provere koja restrikciona endonukleaza pokazuje različite dužine fragmenata sečenja kod 16SrXI grupe u programu pDRAW 32 (AcaClone Software, <http://www.acaclone.com>). Produkti digestije su razdvojeni vertikalnom odnosno poliakrilamidnom elektroforezom, koristeći 13% poliakrilamidni gel (H₂O, TBE x 5, 40% akrilamid-bis, TEMED, 0.1% APS) koji je omogućio da gel bude dovoljno čvrst i da se fragmenti DNK na njemu dobro razdvoje.

Dodatna identifikacija na 16S rRNK genu urađena je za pozitivne uzorke 16SrIII i 16SrV grupe fitoplazmi. U oba slučaja, korišćena je već opisana direktna PCR reakcija, čiji su produkti dobijeni korišćenjem P1 i P7 prajmera, sa istim termalnim protokolom i PCR smešom (Tabela 5) kao i kod inicijalne identifikacije fitoplazmi. Nested PCR reakcije su urađene sa prajmerima specifičnim za pomenute grupe: R16(III)F2/R1 za 16SrIII grupu i R16(V)F1/R1 za 16SrV grupu (Prilog - Tabela 3), koristeći istu PCR smešu i termalni protokol kao i u direktnoj PCR reakciji.

3.5.4 Molekularna karakterizacija fitoplazmi u biljnom i insekatskom materijalu

Molekularna karakterizacija svih pozitivnih uzoraka biljaka i insekata sakupljenih u prirodi, kao i biljaka koje su korišćene u testovima prenošenja pomoću prirodno inficiranih populacija, izvršena je na osnovu: i) dva ribozomalna gena -16S ribozomalna RNK i operon gena ribozomalnih proteina koji se sastoji od *rplV* (*rpl22*) i *rpsC* (*rps3*) gena koji kodiraju ribozomalne proteine L22 i S3; ii) dva *house-keeping* gena – *secY* genski region koji obuhvata 3' kraj gena ribozomalnog proteina L15 i *secY* gen koji kodira protein translokazu i *tuf* gen koji kodira faktor elongacije translacije Tu; iii) dva gena membranskih proteina – gen antigenskog membranskog proteina *stamp* i gen varijabilnog membranskog proteina *vmp1*, zavisno od vrste odnosno grupe ispitivanih fitoplazmi.

Umnožavanje ciljnih regiona je urađeno u direktnim i nested PCR reakcijama. Dalja analiza dobijenih produkata je vršena RFLP analizom (16S rRNK i *vmp1* regioni) ili sekvenciranjem dobijenih produkata (16S rRNK, *rpl22-rps3*, *secY*, *stamp*, *tuf* regioni). Za potrebe sekvenciranja, molekulska težina i količina DNK su određeni vizuelnim poređenjem sa DNK markerom 100 bp *DNK Ladder Extended* (SERVA). Dobijeni produkti su sekvencirani u Macrogen Inc. (Seul, Južna Koreja) na ABI Prism 3700 automatskom sekvenatoru. Prajmeri korišćeni za sekvenciranje različitih genskih



regiona su dati u Tabeli 6 i u Prilogu - Tabela 3. Dobijene sekvence su obrađivane u programu FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>), a sređivanje, poravnanje i kompletiranje sekvenci je izvršeno pomoću Clustal W programa (Thompson i sar., 1994), integrisanog unutar softverskih paketa MEGA 5.2 (Tamura i sar., 2011) i MEGA 7.0 (Kumar i sar., 2016). Sekvence su deponovane u NCBI bazu podataka (engl. *National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.5.4.1 16S rRNK

16S rRNK region genomske DNK se koristi za molekularnu identifikaciju i klasifikaciju fitoplazmi. Ovaj region je vrlo pogodan za međusobno poređenje, jer poseduje i konzervativne i varijabilne delove gena. Kombinacijom prajmera opisanih u poglavlju 3.5.3. postignuta je višestruka amplifikacija svakog ciljnog dela 16S rRNK (Tabele 5 i 6, Prilog - Tabela 3). Nukleotidne sekvence različitih 16S rRNK grupa i podgrupa fitoplazmi su deponovane u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima KP663643-KP663648 i MN047255-MN047263.

3.5.4.2 *rplV (rpl22)* i *rpsC (rps3)* geni

Analiza *rp* gena omogućava razlikovanje i razgraničavanje izolata koji ne pokazuju jasne razlike samo analizom 16S rRNK (Martini i sar., 2007). Veća varijabilnost sekvenci *rp* gena, čini ih boljim molekularnim alatom za klasifikaciju fitoplazmi. Genetski udaljene fitoplazme koje se ne mogu razlikovati na veoma konzervativnom 16S rRNK genu, mogu da pokažu razlike na varijabilnijim *rp* genima. Region operona ribozomalnih proteina *rpl22-rps3* ukupne dužine od 1000 bp – 1142 bp, zavisno od ispitivane 16Sr grupe fitoplazmi, umnožen je pomoću specifičnih prajmera za određenu grupu (Tabela 6, Prilog - Tabela 3). Uslovi reakcije, PCR smeše (Tabela 5) i termalni protokoli su se razlikovali zavisno od ispitivane grupe fitoplazmi, ali su uslovi u okviru iste grupe bili identični za direktni i nested PCR. Dobijene sekvence *rpl22-rps3* regiona su deponovane u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima KP663649-KP663654 i MN076655-MN076662.

PCR smeša je bila identična za 16SrI, 16SrII, 16SrIX i 16SrXII grupu fitoplazmi (Tabela 5), dok je identičan termalni protokol korišćen za 16SrI, 16SrII i 16SrIX grupu.



16SrI, 16SrII, 16SrIX grupa				
I	1'	94°C	inicijalna denaturacija	
1.	1'	94°C	denaturacija	
II	2.	2'	50°C	hibridizacija prajmera
3.	3'	72°C	72°C	
III	7'	72°C	finalna elongacija	

x 38

16SrIII grupa				
I	1'	94°C	inicijalna denaturacija	
1.	1'	94°C	denaturacija	
II	2.	2'	50°C	hibridizacija prajmera
3.	3'	72°C	72°C	
III	7'	72°C	finalna elongacija	

x34

16SrXII grupa				
I	2'	94°C	inicijalna denaturacija	
1.	1'	94°C	denaturacija	
II	2.	45''	53°C	hibridizacija prajmera
3.	2'	72°C	72°C	
III	8'	72°C	finalna elongacija	

x40

Za izolate 16SrIII ribozomalne grupe PCR smeša je pravljena po protokolu opisanom u studiji Martini i sar. (2007) dok je termalni protokol podrazumevao modifikaciju u odnosu na protokol opisan u pomenutoj studiji.

Termalni protokol korišćen za umnožavanje *rpl22-rps3* regiona 16SrXII grupe je podrazumevao modifikaciju protokola opisanog u Martini i sar. (2007).

3.5.4.3 *SecY* gen

Genski region ukupne dužine 1504 bp, koji obuhvata 3' kraj gena ribozomalnog proteina L15 i *secY* gen koji kodira protein translokaze umnožen je kod 16SrIII grupe. Kod 16SrI, 16SrIX i 16SrXII grupe, umnožen i sekvenciran je samo *secY* gen (Tabela 6, Prilog - Tabela 3). Sekvence su deponovane u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima: KP663655-KP663660 i MN076647-MN076654.

Za umnožavanje *secY* regiona 16SrI grupe, korišćena je PCR smeša (Tabela 5) i termalni protokol opisan u radu Lee i sar. (2004a).

Smeša za PCR bila je identična za umnožavanje *secY* gena fitoplazmi 16SrIII i 16SrIX grupe (Tabela 5). Razlikovali su se jedino prajmeri specifični u odnosu na grupu fitoplazmi. Umnožavanje izolata 16SrIII grupe fitoplazmi urađeno je po modifikovanom protokolu opisanom u radu Lee i sar. (2010).



16SrI grupa			
I	1'	94°C	inicijalna denaturacija
1.	1'	94°C	denaturacija
II	2.	55°C	hibridizacija prajmera
3.	3'	72°C	elongacija
III	7'	72°C	finalna elongacija

x38

16SrIII grupa			
I	1'	94°C	inicijalna denaturacija
1.	30''	94°C	denaturacija
II	2.	1'	55°C hibridizacija prajmera
3.	3'	72°C	elongacija
III	10'	72°C	finalna elongacija

x35

16SrIX grupa			
I	1'	94°C	inicijalna denaturacija
1.	30''	94°C	denaturacija
II	2.	1'	50°C hibridizacija
3.	5'	68°C	elongacija
III	10'	72°C	finalna elongacija

x35

16SrXII grupa: direktni PCR / nested PCR			
I	3'	95°C	inicijalna denaturacija
1.	30''	95°C	denaturacija
II	2.	30''	54°C/ hibridizacija prajmera
3.	1'30''/1'	72°C	elongacija
III	10'	72°C	finalna elongacija

x35

Zbog dobijanja nejasnih sekvenci *secY* regiona 16SrIX grupe, dodatna sekvenciranja su urađena sa još dva reverzna prajmera: *secYR1(IX)* i *secYR2(IX)* (Tabela 6, Prilog - Tabela 3). Termalni protokol bio je identičan kao u radu Lee i sar. (2010).

Različit termalni protokol za direktni i nested PCR, za umnožavanje *secY* regiona, primenjen je kod 16SrXII grupe. Razlika se sastoji u različitoj temperaturi hibridizacije prajmera i dužini procesa elongacije. PCR smeša (Tabela 5) i termalni protokol preuzeti su iz studije Fialová i sar. (2009).

3.5.4.4 *Tuf* / *stamp* / *vmp1* geni

Za karakterizaciju pozitivnih uzoraka u okviru 16SrXII grupe fitoplazmi korišćena su dodatna tri gena: i) *house-keeping* gen *tuf* koji kodira faktor translacije Tu; dva gena membranskih proteina - ii) gen antigenskog membranskog proteina *stamp* i iii) gen varijabilnog membranskog proteina *vmp1*. Sva tri gena su korišćena za multilokusnu karakterizaciju (engl. *Multilocus Sequence Typing* - MLST) izolata 16SrXII grupe.

Konzervativni *tuf* gen kodira faktor elongacije i učestvuje u procesu translacije. Koristi se za klasifikaciju fitoplazmi, u filogenetskim analizama i u epidemiološkim divergencijama fitoplazmi iz 16SrXII grupe (Langer i sar., 2003; Langer i Maixner, 2004). Protokol po kome je umnožen ovaj region je opisan u studiji Langer i Maixner



(2004). Termalni protokoli za direktni i nested PCR se razlikuju u temperaturi hibridizacije prajmera. Određivanje *tuf* profila je rađeno sekvenciranjem produkta nested PCR reakcije i RFLP analizom koristeći *HpaII* restrikcionu endonukleazu, po proceduri opisanoj u odeljku 3.5.3, koja pokazuje različite paterne *tuf*-a i *tuf*-b tipa. 'C. Phytoplasma solani' DNK korišćena kao pozitivna kontrola za poređenje restrikcioni profila i *tuf*-a i *tuf*-b RFLP tipa potiče iz prirodno inficiranih primeraka *H. obsoletus* iz Middle-Rhine i Mosel regiona u Nemačkoj (nabavljeni od strane M. Maixner, Bernkastel-Kues). Produkti digestije su razdvojeni pomoću automatskog sistema za kapilarnu elektroforezu QIAxcel *Advanced* (QIAGEN), kao što je već opisano u odeljku 3.5.3. Oba prajmera iz nested amplifikacije su korišćena za sekvenciranje dobijenih produkata (Tabela 6, Prilog - Tabela 3). Sekvenca *tuf* gena je deponovana u NCBI banku gena pod pristupnim brojem: MN076646.

Stamp gen predstavlja varijabilni gen koji kodira antigenski membranski protein. Ovaj gen ima evolutivnu ulogu u interakciji fitoplazme 16SrXII grupe sa insektom vektorom (Fabre i sar., 2011). PCR smeša (Tabela 5) i termalni protokol su opisani u radu Fabre i sar. (2011). Razlike u termalnom protokolu u direktnom i nested PCR-u su u razlikama temperature hibridizacije prajmera, kao i u dužini procesa elongacije. Dobijeni produkti su deponovani u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima: MN076644 i MN076645.

Filogenetski odnosi, kao i predački genotipovi fitoplazmi, najbolje se mogu prikazati izradom haplotipske (genotipske) mreže. *Stamp* genotipovi fitoplazmi su analizirani metodom statističke parsimonije u okviru programa TCS 2.1 (Clement i sar., 2000) i metodom *median-joining* kalkulacije (Bandelt i sar., 1999) integrisane u program NETWORK 4.6. (<http://www.fluxus-engineering.com>). U analizu su uključeni izolati dobijeni iz jedinki *E. incisus* sakupljenih na terenu i biljnih vrsta u kojima je detektovana stolbur fitoplazma, nakon testova prenošenja prirodno inficiranim populacijama *E. incisus*, kao i referentni izolati grupe autora Cvrković i sar. (2014).

Vmp1 gen kodira varijabilni membranski protein kod fitoplazmi 16SrXII grupe. Za ovaj gen su karakteristične varijacije u dužini i sekvencama i one mogu uticati na njihovu preferentnost prema domaćinima (Cimerman i sar., 2009). Protokol po kome su rađene PCR reakcije je opisan u radu Fialová i sar. (2009). Termalni protokol korišćen u



direktnom i nested PCR-u se razlikovao u temperaturi hibridizacije prajmera. Zbog postojanja varijabilnosti u dužini dobijenih produkata, *vmp1* gen nije sekvenciran već je pripadnost određenom *vmp1* profilu određena RFLP analizom produkta nested PCR-a, sečenjem *RsaI* restrikcionom endonukleazom po proceduri opisanoj u odeljku 3.5.3. Dodatno razlikovanje profila V2 i V2-TA je urađeno RFLP digestijom sa *AluI* i *TaqI* restrikcionim endonukleazama, prateći prethodno opisan metod za razlikovanje V2 i V2-TA profila (Cvrković i sar., 2014).

Sledeći izolati i profili su korišćeni kao referentni za poređenje restrikcionih paterna *vmp1* genskog lokusa: V1 profil –vinova loza iz Italije; V2 profil –vinova loza iz Nemačke; V2-TA profil –*Reptalus panzeri* (Low, 1883) iz Srbije; V3 profil –vinova loza iz Hrvatske; V4 profil –*Reptalus quinquecostatus* (Dufour, 1833) iz Srbije; V5 profil –vinova loza iz Nemačke; V14 profil –vinova loza iz Srbije; V15 profil –*H. obsoletus* iz Francuske. Referentni izolati su preuzeti iz Cvrković i sar. (2014) ili nabavljeni od X. Foissac (Bordeaux-France).

<i>tuf</i> gen: direktni PCR / nested PCR				
I	2'	95°C	inicijalna denaturacija	
1.	30''	95°C	denaturacija	
II	2.	30''	45°C/53°C	hibridizacija prajmera
3.	60''	72°C	elongacija	
III	5'	72°C	finalna elongacija	

<i>stamp</i> gen: direktni PCR / nested PCR			
I	4'	94°C	inicijalna denaturacija
1.	30''	94°C	denaturacija
2.	30''	56°C/52°C	hibridizacija prajmera
3.	1'30''/1'	72°C	elongacija
III	7'	72°C	finalna elongacija

<i>vmp1</i> gen: direktni PCR / nested PCR				
I	4'	94°C	inicijalna denaturacija	
1.	30''	94°C	denaturacija	
II	2.	30''	52°C/55°C	hibridizacija prajmera
3.	2'	72°C	elongacija	
III	10'	72°C	finalna elongacija	



Tabela 5. Sastojci i koncentracije u PCR smeši za sve analizirane 16Sr grupe i gene.

Sastojak gen	Koncentracija u stoku	Finalna kocentracija u PCR smeši							
		16S rRNK I,II,III,IX, XI,XII	<i>rpl22-rps3</i> I,II,IX,XII III		<i>secY</i> I III,IX XII			<i>tuf</i> XII	<i>Stamp/vmp1</i> XII
H ₂ O*									
Buffer A (1.5 mM MgCl ₂)	10x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂	25 mM	/	0.5 mM	/	0.5 mM	1.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.4 mM	0.3 mM	0.2 mM	0.3 mM
<i>F</i> prajmer [#]	20 μM	0.6 μM	0.4 μM	0.4 μM	0.4 μM	0.8 μM	0.75 μM	0.4 μM	0.75 μM
<i>R</i> prajmer [#]	20 μM	0.6 μM	0.4 μM	0.4 μM	0.4 μM	0.8 μM	0.75 μM	0.4 μM	0.75 μM
<i>Taq</i>	5 U/μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM	0.375 U/ μM

*- dodaje se u finalnoj PCR smeši

- spisak prajmera korišćenih za amplifikaciju i sekvenciranje svakog pojedinačnog gena dati su u Tabeli 6 a sekvence svih prajmera u Prilogu - Tabela 3.



Tabela 6. Prajmeri i protokoli korišćeni za identifikaciju i karakterizaciju fitoplazmi u asocijaciji sa *E. incisus*.

Gen	16S rRNK grupa fitoplazmi	dPCR par prajmera	Reference	nPCR par prajmera	Reference	Uslovi reakcije (Reference)
16S rRNK	16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrIX, 16SrXI, 16SrXII	P1/P7*	Deng i Hiruki, 1991, Smart i sar., 1996	R16F2n*/R16R2* P1A*/P7A 16s758f*/M23Sr R16(III)F2/R1 R16(V)F1/R1	Gundersen i Lee, 1996 Lee i sar., 2004b Gibb i sar., 1995; Padovan i sar., 1995 Lee i sar., 1994 Lee i sar., 1994	Lee i sar., 1998b
<i>rpl22-rps3</i>	16SrI 16SrII 16SrIII 16SrIX 16SrXII	rpF1/rpR1 rpF1C/rp(I)R1A rpl2F3/rp(I)R1A rpF1/rpR1 rpF1C/rp(I)R1A rpStoF / rpStoR	Lim i Sears, 1992 Martini i sar., 2007 Martini i sar., 2007 Lim i Sears, 1992 Martini i sar., 2007 Martini i sar., 2007	rp(I)F1A*/rp(I)R1A* rp(II)F1*/rp(II)R2* rp(III)F1*/rp(III)R1* rpF1*/rp(I)R1A* rp(IX)F2*/rp(IX)R2* rpStoF2*/rpStoR*	Martini i sar., 2007 Martini i sar., 2007;, Mitrović i sar., 2012 Martini i sar., 2007 Martini i sar., 2007 Martini i sar., 2007 Martini i sar., 2007	Martini i sar., 2007
<i>secY</i>	16SrI 16SrIII 16SrIX 16SrXII	L15F1A(I)/MapR1A(I) L15F1A(III)/MapR1A(III) L15F1/MapR1 PosecF1/PosecR1	Lee i sar., 2010 Lee i sar., 2010 Lee i sar., 2010 Fialová i sar., 2009	AYsecYF1*/AYsecYR1* SecYF2 (III)*/SecYR1 (III)* L15F2 (IX)*/MapR2 (IX)* secYR1 (IX)* secYR2 (IX)* PosecF3/PosecR3*	Lee i sar., 2006 Lee i sar., 2010 Lee i sar., 2012 Fialová i sar., 2009 Schneider i Gibb, 1997	Lee i sar., 2004b modifikacija protokola Lee i sar., 2010 Lee i sar., 2010 Fialová i sar., 2009 Langer i Maixner, 2004
<i>tuf</i>	16SrXII 16SrXII	Tuf1f/Tuf1r	Schneider i Gibb, 1997	TufAYf*/TufAYr*	Schneider i Gibb, 1997	Langer i Maixner, 2004
<i>vmp1</i>	16SrXII	StoH10F1/StoH10R1	Cimerman i sar., 2009	TYPH10F/TYPH10R	Fialová i sar., 2009	Fialová i sar., 2009
<i>stamp</i>	16SrXII	StampF/StampR0	Fabre i sar., 2011	StampF1*/StampR1	Fabre i sar., 2011	Fabre i sar., 2011

* prajmeri korišćeni za sekvenciranje



3.5.5 Poređenje virtuelnih RFLP obrazaca i izračunavanje koeficijenta sličnosti

Poređenje virtuelnih RFLP obrazaca i računanje koeficijenta sličnosti je urađeno za svaki pozitivan uzorak sa ciljem da se odredi taksonomska pozicija fitoplazmi detektovanih u prirodno inficiranim primercima *E. incisus*. RFLP koeficijent sličnosti je automatski računat korišćenjem online programa *iPhyClassifier* (<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) za sve 16Sr grupe fitoplazmi za koje u pomenutoj bazi postoje podaci i sve definisane podgrupe. Računanje koeficijenta sličnosti zasnovano je na F2nR2 regionu 16S rRNK, ukupne dužine 1250 bp. Ubacivanjem ciljnih sekvenci, za koje je trebalo odrediti taksonomsku pripadnost, u programu *iPhyClassifier* vršeno je programsko poređenje sa svim postojećim podacima o postojanju 16Sr grupa i podgrupa. Za određivanje pripadnosti određenoj pogrupi, sekvence F2nR2 regiona 16SrIX i 16SrXI grupe su, u programu za *in silico* restrikcionu analizu pDRAW32, isečene pomoću 17 restrikcioničkih enzima (*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* i *TaqI*) koji se koriste za diferencijaciju sojeva fitoplazmi (Lee i sar., 1998b; Wei i sar., 2007). Koeficijent sličnosti (F) je računat primenjujući formulu (Nei i Li, 1979; Lee i sar., 1998b). Zbog nedovoljno podataka o podgrupama 16SrIX i 16SrXI grupe, računanje koeficijenta sličnosti je obavljeno ručno primenjujući istu formulu.

Prag koeficijenta sličnosti za određivanje nove podgrupe u okviru postojeće grupe je jednak ili manji od 0.97 (Zhao i sar., 2009). Koeficijent sličnosti od 0.85 ili manje ukazuje na postojanje nove grupe fitoplazmi (Zhao i sar., 2009). Rezultati studije su pokazali da neki članovi određenih podgrupa pokazuju RFLP obrasce koji nisu identični reprezentativnim članovima odgovarajućih podgrupa, sa koeficijentima sličnosti od 0.99 i 0.98. Ovi tipovi uzoraka se nazivaju varijantama određene podgrupe i označeni su jednom ili dvema zvezdicama (* ili **) prateći odgovarajuće oznake grupa (npr. 16SrI-A* i 16SrI-A**) (Wei i sar., 2008; Zhao i sar., 2009).

Koeficijent sličnosti na osnovu 17 enzima takođe je određen za *rpl22-rps3* i *secY* gene kod predstavnika 16SrIX-E podgrupe u okviru koje se podgrupe obeležavaju sa E1 i E2, za oba gena. Zasnovano na postojećim podacima, prag koeficijenta sličnosti za



određivanje nove podgrupe kod *rp* gena je manji ili jednak 0.91 dok kod *secY* gena iznosi manje ili jednako 0.90 (Lee i sar., 2012).

3.5.6 Filogenetske analize izolata fitoplazmi identifikovanih u prirodno inficiranim jedinkama E. incisus na osnovu 16S rRNK genskog lokusa

Filogenetski odnosi između izolata prirodno inficiranih primeraka *E. incisus* ove doktorske teze i pripadnika različitih grupa i podgrupa fitoplazmi, su definisani za analizirane gene. Referentne sekvence 16S rRNK, *rpl22-rps3* i *secY* gena svih grupa i podgrupa koje su služile za poređenje i definisanje filogenetskih odnosa, uzete su iz NCBI banke gena i korišćene za konstruisanje filogenetskih stabala. Filogenetske analize odabirom *Neighbor-joining* (NJ) i *Maximum parsimony* (MP) metoda odrađene su u okviru softverskih programa MEGA 5.2 i MEGA 7.0. uz podršku od 500 ili 1000 replikacija (engl. *bootstrap*) za dobijenu topologiju.

Filogenetske pozicije i odnosi fitoplazmi izolovanih iz *E. incisus* i referentnih izolata 16Sr grupa i podgrupa i 'Ca. Phytoplasma' vrsta utvrđeni su analizom 16S rRNK gena NJ algoritmom implementiranim u MEGA 7.0 softver. Odrađeno je 1000 ponavljanja da bi se pokazala stabilna podrška i topologija. Glavno 16S rRNK stablo je konstruisano poređenjem 42 do sada opisane 'Ca. Phytoplasma' vrste i 8 poznatih ali još uvek neopisanih vrsta (Prilog - Tabela 4). Radi boljeg grupisanja sekvenci i bolje rezolucije samog stabla, za potrebe konstruisanja filogenetskog stabla korišćene su filogenetski udaljenije vrste *Acholeplasma laidlawii* (Sabin, 1941) Edward i Freundt, 1970 (M23932), *Acholeplasma palmae* Tully *et al.* 1994, sp. nov. (L33734) i *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872 (MH978625). Klade u okviru filogenetskog stabla su definisane prema Zhao i sar. (2010). Pozicije naših izolata preciznije su definisane formiranjem pojedinačnih filogenetskih stabala sa referentnim izolatima različitih podgrupa u okviru svake grupe fitoplazmi (Prilog - Tabela 5). Za filogenetske analize 16SrI grupe, korišćene su samo podgrupe severne hemisfere. Fokus filogenetskih analiza 16SrII grupe je bio na predstavnicima evropskih podgrupa, dok su za 16SrXII grupu korišćene samo potvrđene podgrupe. Pristupni brojevi svih referentnih izolata korišćenih za konstruisanje glavnog filogenetskog stabla su dati u Prilogu - Tabela 4, dok su pristupni brojevi i opisi referentnih sojeva 16Sr podgrupa dati u Prilogu - Tabela 5.



3.5.7 Multilokusna i epidemiološka karakterizacija

Osnovna identifikacija i karakterizacija fitoplazmi utvrđenih u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus* i biljkama iz testova prenošenja urađena je na osnovu 16S rRNK genskog regiona. Za detaljniju klasifikaciju i epidemiološku karakterizaciju, koriste se drugi geni koji imaju različit stepen konzervativnosti. U odeljku 3.5.4 su opisani svi dodatni genski lokusi korišćeni za karakterizaciju izolata svih grupa fitoplazmi identifikovanih u našim istraživanjima.

Uporedne filogenetske analize na osnovu *rpl22* i *rps3* gena su urađene poređenjem uzoraka naših analiza i sekvenci *rpl22-rps3* gena određenih podgrupa, uzetih iz NCBI baze. Ribozomalni geni *rpl22-rps3* su rešili nejasnoće u formiraju klada i podklada dobijenih analizom 16S rRNK gena. Prema Martini i sar. (2007), izolati poreklom iz prirodno inficiranih jedinki *E. incisus* i testova prenošenja, upoređeni su sa 19 opisanih podklada.

Sekvence operona gena ribozomalnih proteina *rpl22-rps3* i *secY* gena, su poređene sa referentnim izolatima date grupe i 'Ca. Phytoplasma' vrstama za dati genski marker: 'Ca. Phytoplasma asteris' (16SrI; Lee i sar., 2004a; 2006), 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' (16SrII; Martini i sar., 2007), 'Ca. Phytoplasma pruni' (16SrIII; Davis i sar., 2013), 'Ca. Phytoplasma phoenicium' (16SrIX; Lee i sar., 2012) i 'Ca. Phytoplasma solani' (Fabre i sar., 2011; Quaglino i sar., 2013; Cvrković i sar., 2014).

16SrI ribozomalna grupa

Multilokusna karakterizacija izolata 16SrI grupe u primercima *E. incisus* je urađena na osnovu 979 bp 16S rRNK regiona, 1051 bp *rpl22-rps3* i 1211 bp *secY* gena. Za sva tri gena, 10 izolata iz Srbije je poređeno sa referentnim sekvencama 16SrI grupe (Lee i sar., 2004a; Lee i sar., 2006) preuzetim iz NCBI banke gena i korišćenim za konstruisanje filogenetskih stabala. Radi što boljeg grupisanja sekvenci, za potrebe konstruisanja stabla korišćene su filogenetski udaljene sekvence vrsta *A. laidlawii*, *A. palmae* i *B. subtilis* za 16S rRNK, *A. laidlawii* za *rpl22-rps3* i 'Ca. Phytoplasma ulmi' za *secY* gen.



16SrII ribozomalna grupa

Multilokusna karakterizacija izolata 16SrII grupe u primercima *E. incisus* je urađena na osnovu 985 bp 16S rRNK i 951 bp *rpl22-rps3* gena. Sve četiri sekvence izolata iz jedinki *E. incisus* iz Srbije, poređene su sa referentnim sekvencama 16SrII grupe (Martini i sar., 2007; Mitrović i sar., 2012) koje su preuzete iz NCBI banke gena. Radi dobijanja što bolje rezolucije i preglednosti samog stabla, korišćene su sekvence udaljenijih vrsta *A. laidlawii* i *A. palmae* za 16S rRNK i *A. laidlawii* i 'Ca. *Phytoplasma mali*' za *rpl22-rps3* gene.

16SrIII ribozomalna grupa

Za dobijanje informacija o filogeniji, diverzitetu i varijabilnosti 16SrIII fitoplazme, okarakterisane su biljke sakupljene na terenu sa simptomima prisustva 16SrIII grupe, dve asimptomatske biljke (*Lathyrus tuberosus* L. i *Lathyrus aphaca* L.) kao i primerci *E. incisus*. Karakterizacija svih pozitivnih uzoraka je rađena analizom 1169 bp 16S rRNK, 1024 bp *rpl22-rps3* i 1491 bp *secY* genskih markera. Za sva tri gena, sekvence dobijene u ovoj studiji su poređene sa referentnim sekvencama 16SrIII grupe fitoplazmi (Zhao i sar., 2009; Amaral Mello i sar., 2011; Davis i sar., 2013; Galdeano i sar., 2013; Lee i sar., 2014) preuzetim iz NCBI banke gena i korišćene za konstruisanje filogenetskih stabala. Radi bolje rezolucije filogenetskih stabala, kao filogenetski udaljenije grupe korišćene su 'Ca. *Phytoplasma mali*' (16SrX grupa) za 16S rRNK, 'Ca. *Phytoplasma phoenicium*' (16SrIX-B podgrupa) za *rpl22-rps3* genski region i 16SrII-C pogrupa (*Cotton phyllody phytoplasma*) za *secY* region.

16SrIX ribozomalna grupa

Multilokusna karakterizacija izolata 16SrIX grupe u primercima *E. incisus* i biljkama sakupljenih na terenu, je urađena na osnovu 987 bp 16S rRNK, 1062 bp *rpl22-rps3* gena i 1215 bp *secY* gena. Svih osam sekvenci izolata iz jedinki *E. incisus* iz Srbije, kao i iz biljnih uzoraka sakupljenih na terenu, poređeno je sa referentnim sekvencama 16SrIX grupe (Lee i sar., 2012) koje su preuzete iz NCBI banke gena. Zbog što boljeg grupisanja sekvenci za potrebe konstruisanja filogenetskog stabla korišćene su sekvence udaljenijih vrsta *Acholeplasma* sp. Edward i Freundt, 1970 (*A. laidlawii* i *A. palmae*) i *B. subtilis* za 16S rRNK i 'Ca. *Phytoplasma trifolii*' za *rpl22-rps3* i *secY* gene.



16SrXI ribozomalna grupa

Karakterizacija izolata 16SrXI grupe u primercima *E. incisus* sakupljenim na terenu urađena je na osnovu 982 bp 16S rRNK gena. Dve sekvence izolata iz jedinki *E. incisus* iz Srbije, poređene su sa referentnim sekvencama 16SrXI grupe (Jung i sar., 2003; Šafářová i sar., 2016) koje su preuzete iz NCBI banke gena. Zbog bolje rezolucije samog filogenetskog stabla, korišćene su sekvence udaljenijih vrsta *Acholeplasma* sp. (*A. laidlawii* i *A. palmae*) i *B. subtilis*.

16SrXII ribozomalna grupa

Multilokusna karakterizacija izolata 16SrXII grupe u primercima *E. incisus* sakupljenim na terenu i u biljkama iz testova prenošenja pomoću prirodno inficiranih populacija *E. incisus*, je urađena na osnovu 987 bp 16S rRNK, 1000 bp *rpl22-rps3* gena, 708 bp *secY* gena, 474 bp *stamp* gena, 1302 bp *vmp1* gena i 873 bp *tuf* gena. Sve sekvence izolata iz Srbije, poređene su sa referentnim sekvencama 16SrXII grupe (Langer i sar., 2003; Langer i Maixner, 2004; Fabre i sar., 2011; Quaglino i sar., 2013; Cvrković i sar., 2014; Mitrović i sar., 2016) koje su preuzete iz NCBI banke gena. Zbog što boljeg grupisanja sekvenci za potrebe konstruisanja filogenetskog stabla korišćene su sekvence udaljenijih vrsta *Acholeplasma* sp. (*A. laidlawii* i *A. palmae*) i *B. subtilis*.

Pripadnost određenom *vmp1* profilu je utvrđena na osnovu opisanih RFLP profila prema Murolo i sar. (2010; 2013), korišćenjem *RsaI* enzima. Profil V2-TA je potvrđen na osnovu digestije korišćenjem *TaqI* i *AluI* restrikcionih enzima (Cvrković i sar., 2014).



REZULTATI

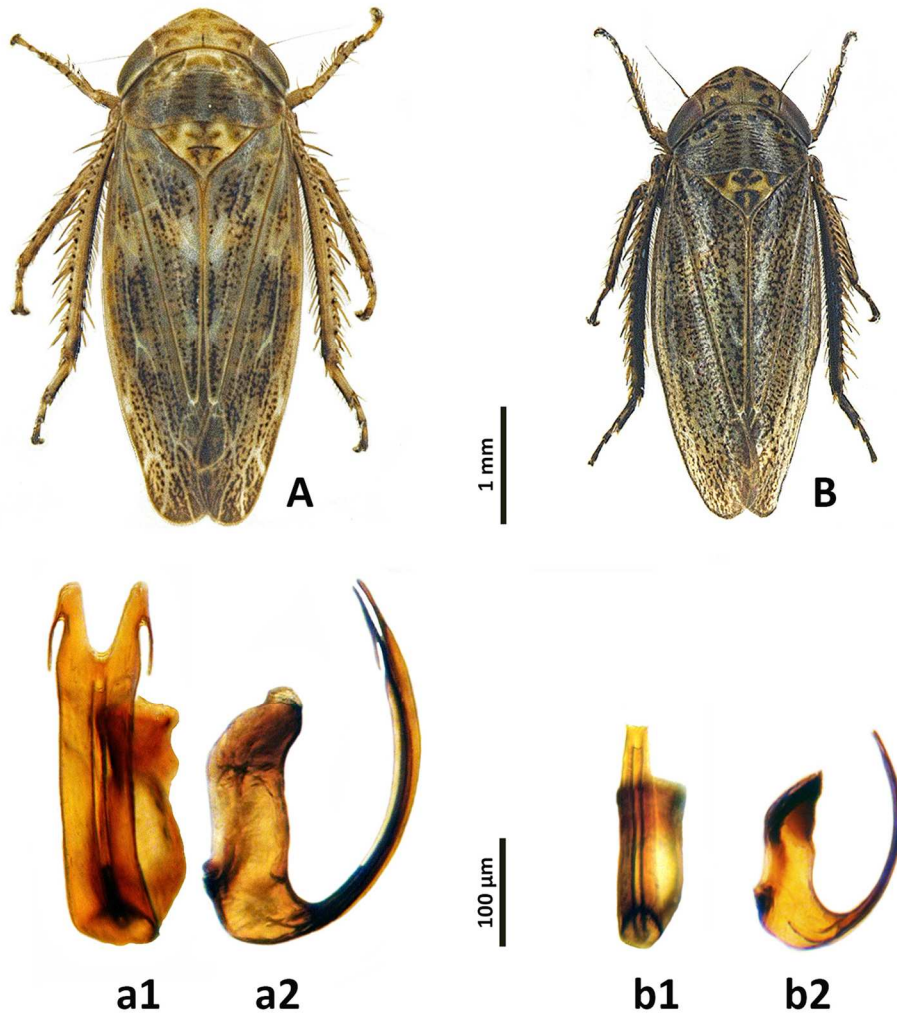


4. REZULTATI

4.1 Biologija vrste *E. incisus*

Tokom šest eksperimentalnih godina, praćena je biologija vrste *E. incisus*, u poljskim i u laboratorijskim uslovima. Pojava i brojnost jedinki praćeni su od marta do kraja novembra, u cilju stvaranja sveobuhvatne slike o ponašanju i biologiji ove vrste. Utvrđeno je da postoje dve generacije, označene kao letnja i zimska. Najranije zabeleženi primerci *E. incisus* u prirodi sakupljeni su 23. marta na lokalitetu Zemun, a najkasnije 22. novembra na lokalitetu Dobanovci. Praćenjem stupnjeva razvića, utvrđeno je da jedinke ove vrste prezimljavaju primarno kao adulti u Srbiji. Ženke zimske generacije polažu jaja tokom aprila, a jedinke ove generacije su prisutne do početka jula. Letnja generacija je zastupljena od početka maja do početka septembra, a tokom čitavog juna i početkom jula se može naći zajedno sa zimskom generacijom. Ženke letnje generacije polažu jaja krajem juna i početkom jula, a jedinke nove zimske generacije se mogu naći od septembra do decembra, kada adulti odlaze na prezimljavanje.

Sezonski dimorfizam se ogleda u razlikama u veličini i obojenosti tela i izgledu genitalnog aparata mužjaka (Slika 14). Primerci sakupljeni tokom aprila i maja odgovaraju zimskoj generaciji koja se odlikuje manjim i tamnije obojenim telom (označava se kao nominalna forma *incisus*), dok su primerci letnje generacije, sakupljeni od kraja juna do početka septembra, krupniji i svetlije obojeni (označavaju se kao *plebejus* forma (Slika 14). Izgled kopolatornih struktura mužjaka se značajno razlikuje kod mužjaka letnje i zimske generacije. Mužjaci letnje generacije odlikuju se kopolatornim strukturama koje imaju specifične trnove (engl. *thorns*) koji su iste dužine kao udubljenje na vrhu kopolatornih struktura, ili su duži od ovog udubljenja (Slika 14, a1). Kopolatorne strukture mužjaka zimske generacije su cevastog oblika i ne sadrže trnove (Slika 14, b1).



Slika 14. Sezonski dimorfizam cikade *E. incisus*. (A) letnja forma (*plebejus* Fallén forma); a1 - ventralni prikaz kopulatornih struktura mužjaka; a2 - desni lateralni prikaz kopulatornih struktura mužjaka; (B) zimska forma (nominalna *incisus* forma); b1 - ventralni prikaz kopulatornih struktura mužjaka; b2 - desni lateralni prikaz kopulatornih struktura mužjaka.

4.2 Razviće i reproduktivno ponašanje vrste *E. incisus*

Reproduktivno ponašanje i stadijumi razvića praćeni su tokom četiri eksperimentane godine u poljskim i laboratorijskim uslovima. Na lokalitetima Dobanovci, Zemun i Topola sakupljani su adulti prezimele generacije *E. incisus*, u periodu od kraja marta do početka maja, kada su najbrojnije bile gravidne ženke.



Tokom istraživanja nije uočena značajna razlika u brojnosti adulta na istraživanim lokalitetima.

U Tabeli 7 prikazan je broj sakupljenih jedinki, dinamika i trajanje pojedinačnih faza razvića, koje su zavisile pre svega od temperaturnih i drugih uslova sredine. Ovipozicija je vršena u kavezima (Slika 13) u kojima su se nalazile biljke bele (*T. repens*) i crvene deteline (*T. pratense*). Literaturni podaci navode da se vrsta *E. incisus* najuspešnije gaji na biljkama boba (Strübing i Drosopoulos, 2006), ali je naše iskustvo pokazalo da je kompletan životni ciklus uspešan na biljkama crvene i bele deteline.

Tabela 7. Broj sakupljenih jedinki *E. incisus*, broj jaja i ispiljenih larvi tokom četiri eksperimentalne godine.

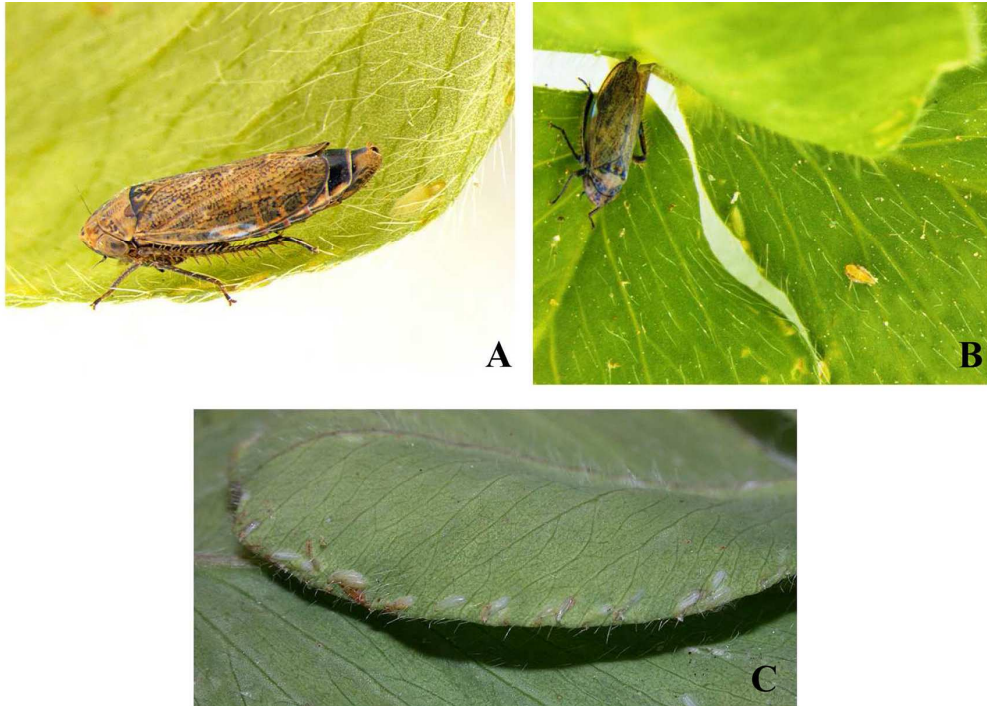
Godina sakupljanja	Broj sakupljenih adulta/ period sakupljanja	Broj jaja/ period polaganja jaja	Broj ispiljenih larvi/ period izleganja	% ispiljenih larvi
2013.	2420 / 24.03.-30.03.	4303 / 12.04.-30.04.	3600 / 05.05.-17.05.	83.7
2014.	2600 / 08.04.-08.05.	5346 / 30.04.-17.05.	3782 / 12.05.-09.06.	70.7
2015.	1280 / 22.04.-01.05.	9290 / 27.04.-25.05.	8691 / 11.05.-16.06.	93.6
2016.	2300 / 13.04.-20.04.	8315 / 05.05.-09.06.	5691 / 11.05.-25.06.	68.4

Ženke jaja polažu po obodu listova i uz centralni lisni nerv, učestalije na naličju nego na licu listova deteline. Jaja su svetlo zelenkasto – žuta, u središnjem delu blago zakrivljena tako da imaju formu bumeranga. Prosečna dužina jaja je 1.26 ± 0.07 mm (opseg 1.16 – 1.37, n=30), a širina 0.32 ± 0.03 mm (opseg 0.26 – 0.37, n=30).

Na jednom listu ih može biti i po nekoliko desetina (Slika 15). Sa razvojem jaja, menja se njihova obojenost, od blage zamućenosti preko biserno bele, do svetložute, a u fazi pred piljenje mogu se uočiti tamne tačkice na vršnom delu starijih jaja, koje predstavljaju začetak ocela. Za potpuno sazrevanje jaja i pojavu prvog larvenog stupnja potrebno je 7-10 dana. Vrsta *E. incisus* ima 5 larvenih stupnjeva koji se označavaju kao L1 - L5 (Slika 16).



Celokupni ciklus razvića ove cikade, od polaganja jaja do pojave adulta iznosi oko 35 - 40 dana, a trajanje određenog perioda u razviću značajno zavisi od uslova sredine. Larve se od adulta razlikuju po nedostatku razvijenih krila.



Slika 15. Stadijumi razvića vrste *E. incisus*. (A) adult i položeno jaje; (B) položena jaja, L1 larva i adult; (C) položena jaja na listu deteline.

Tokom 2013. godine temperature u aprilu su bile najveće, tako da je masovno polaganje jaja započelo 12. aprila i trajalo do kraja aprila. Ukupno je položeno 4303 jaja, na obodima i uz glavni lisni nerv listova deteline. Listovi sa položenim jajima su prebačeni u plastične kutije (13 x 11 cm) i petri šolje (15 x 3 cm), gde je praćena pojava larvi. Od 5. do 17. maja, ukupno se ispilo 3600 larvi, odnosno 83.7% (Tabela 7). U naredne dve godine, 2014. i 2015., prolećne temperature su bile niže, pa je polaganje jaja započelo krajem aprila i trajalo do 25. maja. Tokom 2014. godine položeno je ukupno 5346 jaja iz kojih se uspešno ispilo 3782 larve (70.7%) do 9. juna. Od 9290 položenih jaja od 27. aprila do 25. maja 2015. godine, ukupno se ispilo 8691 larva (93.6%) do 16. juna. U 2016. godini zabeležen je najkasniji početak polaganja jaja, kada je u periodu od 5. maja do 9. juna ukupno položeno 8315 jaja. Za razliku od prethodnih godina, tokom 2016. piljenje larvi je završeno tek 25. juna, do kada se ispilo 5691 larva (68.4%).

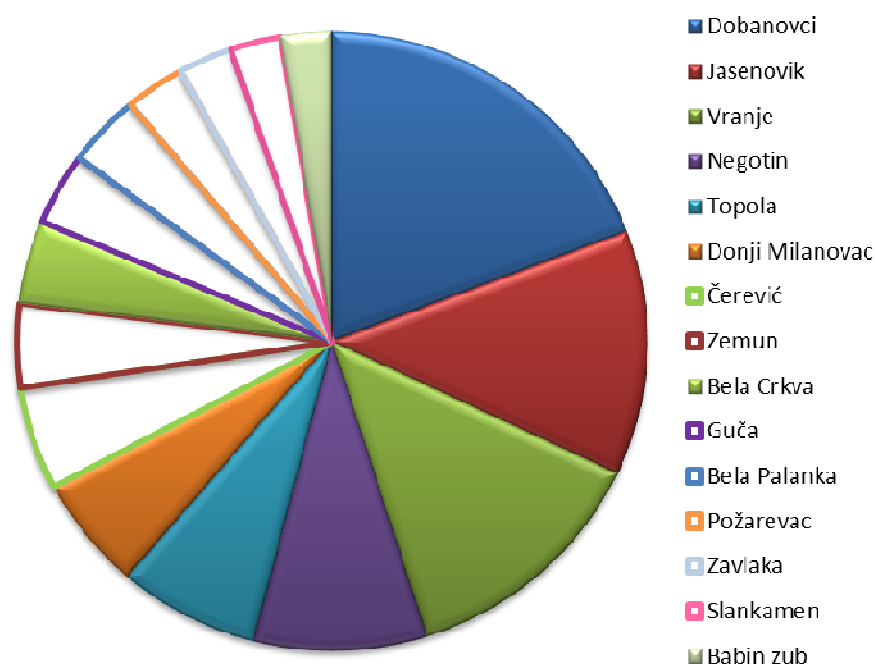


Slika 16. Morfologija larvenih stupnjeva (L1 - L5) i adulta vrste *E. incisus*.



4.3 Identifikacija fitoplazmi kod prirodno inficiranih populacija vrste *E. incisus*

Tokom četiri istraživačke godine, na 15 lokaliteta u okviru 12 okruga u Srbiji ukupno je sakupljeno 687 primeraka *E. incisus* za utvrđivanje prisustva fitoplazmi u njima. Najviše primeraka sakupljeno je na lokalitetima Dobanovci, Vranje i Jasenovik, dok je najmanje jedinki sakupljeno u Požarevcu, Zavlaci, Slankamenu i na Babinom zubu (Tabela 1, Slika 17).



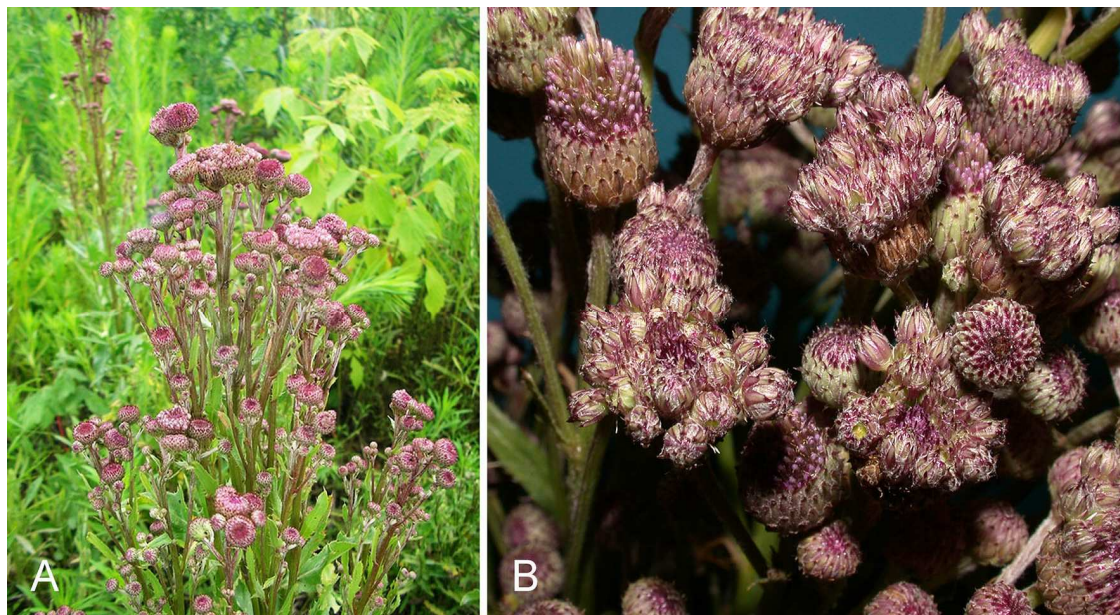
Slika 17. Zastupljenost primeraka *E. incisus* sakupljenih za analize na 15 lokaliteta u Srbiji. Obojena polja predstavljaju lokalitete na kojima je identifikovana fitoplazma u primercima *E. incisus*.

Prirodno inficirane populacije vrste *E. incisus* zabeležene su na 8 od 15 ispitivanih lokaliteta, na kojima je ukupno sakupljeno 510 jedinki *E. incisus*, računajući i jedinke sakupljane u Dobanovcima za prvobitnu proveru inficiranosti različitih vrsta podreda Auchenorrhyncha. Među jedinkama analiziranim na prisustvo različitih grupa fitoplazmi, analizom 16S rRNK genskog lokusa PCR metodom pozitivna su bila 53 primerka (10.4%). RFLP analiza korišćenjem *MseI* dijagnostičkog enzima pokazala je



prisustvo šest različitih grupa u primercima *E. incisus*: 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrIX, 16SrXI i 16SrXII (Tabela 8).

Mezofilna livada na lokalitetu Dobanovci izabrana je kao najpogodnija za identifikaciju potencijalnih vektora uključenih u prenošenje 16SrIII grupe na biljke *C. arvensis*, zbog višegodišnjeg prisustva simptoma multiplih inflorescenci na pomenutoj vrsti podtribusa *Cardiunae* (Slika 18). Zbog toga su na ovom lokalitetu sakupljani svi predstavnici podreda *Auchenorrhyncha*, nekoliko puta u periodu od kraja juna do početka avgusta 2013. Godine (Tabela 9). Ukupno je sakupljeno 1097 primeraka iz 6 familija, 8 potfamilija i 19 vrsta, uključujući i vrstu *E. incisus*. Najzastupljeniji su bili predstavnici familije *Cicadellidae*, sa ukupno 855 sakupljenih jedinki, među kojima su se po brojnosti isticali predstavnici potfamilija *Deltocephalinae* i *Typhlocybinae*. Najveći broj sakupljenih jedinki zabeležen je za vrstu *Psammotettix alienus* (Dahlbom, 1850), vrste *Macrosteles* sp. Fieber, 1866, zatim za vrste *Zyginidia pullula* (Boheman, 1845), *E. incisus* i *Emelyanoviana mollicula* (Boheman, 1845). Među predstavnicima ostalih familija po brojnosti se isticala jedino vrsta *Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758), koja pripada familiji *Cercopidae*, dok su vrste ostalih familija bile znatno manje brojne. Jedinke sakupljenih vrsta nisu bile u specifičnoj asocijaciji sa biljkama *C. arvensis*, kao glavnim izvorom hrane, već su bile prisutne kao slučajni posetoci na ovoj biljnoj vrsti. Sakupljene cikade analizirane su u grupama od 3 ili 5 jedinki, zavisno od veličine primeraka različitih vrsta. Od svih sakupljenih predstavnika podreda *Auchenorrhyncha*, samo su jedinke vrste *E. incisus* bile pozitivne na prisustvo 16SrIII grupe fitoplazmi, sa 8 od 30 pozitivnih grupa uzoraka, koji su se sastojali od po 3 jedinke (Tabela 9).



Slika 18. Simptomi multiplih inflorescenci (CMI) na biljkama *C. arvensis*, prirodno inficiranim 16SrIII-B fitoplazmom na lokalitetu Dobanovci. (A) izgled inficirane biljke *in situ*; (B) cvetne glavice sa multiplim inflorescencama.

Nakon utvrđivanja prisustva fitoplazme 16SrIII grupe, primerci *E. incisus* sa ovog lokaliteta su analizirani pojedinačno da bi se utvrdila frekvencija pojave fitoplazme. Pozitivno je bilo ukupno 5 od 42 pojedinačno analizirane jedinice (Tabela 8, Slika 19).

Tokom svih istraživačkih godina, u najvećem broju primeraka *E. incisus* identifikovano je prisustvo stolbur fitoplazme (16SrXII grupa). Ova grupa je zabeležena u 18 primeraka sakupljenih na 5 od 8 lokaliteta: Dobanovci (2/132), Bela Crkva (2/30), Topola (3/50), Negotin (7/61), Jasenovik (4/88). U primercima *E. incisus* sakupljenim na biljnoj vegetaciji prisutnoj u zasadu krompira na lokalitetu Bela Crkva, u vinogradu na lokalitetu Topola i na napuštenoj livadi sa mešovitom biljnom vegetacijom u Negotinu, utvrđeno je prisustvo jedino stolbur fitoplazme, dok su na lokalitetu Jasenovik, na kamenitoj livadi zapadne ekspozicije, u primercima *E. incisus* zabeležene 16SrXII i 16SrI grupa fitoplazmi (Tabela 8, Slika 19).



U primercima *E. incisus* sakupljenim na planinskim kamenitim padinama, na 1593 m nadmorske visine (Babin zub, jugoistočna Srbija) i na kserotermnim ruderalnim padinama Vranja u južnoj Srbiji, takođe je registrovana 16SrI grupa. Ukupno 3 od 18 primeraka sakupljenih na lokalitetu Babin zub i 3 od 90 primeraka sakupljenih na lokalitetu Vranje, bilo je pozitivno na prisustvo fitoplazme 16SrI grupe (Tabela 8, Slika 19).

Najveći diverzitet fitoplazmi u populaciji vrste *E. incisus*, zabeležen je na kserotermnoj ruderalnoj padini u Vranju, gde je pored 16SrI grupe u primercima bilo identifikovano i prisustvo 16SrII i 16SrIX grupe. U 4 od 90 analiziranih primeraka iz Vranja, detektovano je prisustvo 16SrII ribozomalne grupe, dok je u 5 primeraka registrovana 16SrIX grupa (Tabela 8, Slika 19).

Prisustvo fitoplazmi koje pripadaju 16SrIX i 16SrXI grupi utvrđeno je u jedinkama sakupljenim na lokalitetu Donji Milanovac u istočnoj Srbiji, na napuštenim padinama između Velikog i Malog Kazana. U 3 od ukupno 41 analizirane jedinke identifikovana je 16SrIX grupa, dok je prisustvo 16SrXI grupe utvrđeno u 2 od 41 analizirane jedinke *E. incisus* (Tabela 8, Slika 19). Identifikacija 16SrIX i 16SrXI grupe u primercima vrste *E. incisus* predstavljaju prvi nalaz ovih grupa fitoplazmi u Srbiji i u jedinkama *E. incisus* vrste uopšte.



Tabela 8. Prisustvo fitoplazmi u jedinkama vrste *E. incisus* sakupljenim na različitim tipovima staništa.

Lokalitet (GPS)	Tip staništa	Datum sakupljanja	Broj sakupljenih i analiziranih primeraka	Broj fitoplazma pozitivnih primeraka	16S rRNK podgrupa
Dobanovci (N44 50.890, E20 10.089, 73m)	Mezofilna livada	26-Jun-2013	38 [*]	2 [^]	16SrIII-B
		17-Jul-2013	24 [*]	3 [^]	16SrIII-B
		23-Jul-2013	28 [*]	3 [^]	16SrIII-B
		1-April-2017	20 [#]	3	16SrIII-B
		24-Jun-2017	22 ^{*/#}	2	16SrXII-A
Bela Crkva (N44 53.572, E21 26.710, 84m)	Zasad krompira	14-Jul-2016	9 [*]	0	-
		21-Jul-2017	10 [*]	2	16SrXII-A
		22-Jul-2018	11 [*]	0	-
Topola (N44 13.468, E20 40.198, 288m)	Vinogradarski region	13-Apr-2016	16 [#]	0	-
		16-Jul-2016	20 [*]	0	-
		2-Avg-2017	14 [*]	3	16SrXII-A
Donji Milanovac (N44 31.501, E22 02.500, 229m)	Napušteni pašnjak istočne ekspozicije	21-Apr-2017	9 [#]	2	16SrXI-G
		20-Jul-2017	8 [*]	1	16SrIX-C
		11-Avg-2018	14 [*]	2	16SrIX-C
		05-Sep-2018	10 [*]	0	-
Negotin (N44 16.604, E22 30.484, 73m)	Napuštena livada južne ekspozicije	30-Jun-2016	5 ^{*/#}	0	-
		14-Jul-2016	3 [*]	0	-
		18-Avg-2016	3 [*]	3	16SrXII-A
		3-Apr-2017	2 [#]	0	-
		16-Jun-2017	15 ^{*/#}	0	-
		21-Jul-2017	20 [*]	3	16SrXII-A
		4-Sep-2017	2 [*]	1	16SrXII-A



Lokalitet (GPS)	Tip staništa	Datum sakupljanja	Broj sakupljenih i analiziranih primeraka	Broj fitoplazma pozitivnih primeraka	16S rRNK podgrupa
		28-Apr-2018	11 [#]	0	-
Babin zub (N43 21.610, E22 35.688,1593m)	Planinska kamenita padina južno-zapadne ekspozicije	27-Apr-2017	12 [#]	3	16SrI-R
		5-Sep-2017	6*	0	-
Jasenovik (N43 21.909, E22 01.341, 429m)	Kamenita livada zapadne ekspozicije	19-April-2016	17 [#]	0	-
		18-Maj-2016	14 [#]	0	-
		28-Jul-2017	30*	6	16SrI-R (4), 16SrXII-A (2)
		22-Avg-2017	27*	2	16SrXII-A
Vranje (N42 29.308, E21 53.757, 405m)	Kserotermna ruderalna padina južno-zapadne ekspozicije	14-Apr-2016	8 [#]	0	-
		2-Maj-2017	4 [#]	0	-
		4-Avg-2017	12*	2	16SrIX-E
		2-Jul-2018	18*	2	16SrIX-E
		26-Jul-2018	29*	5	16SrII-E (4), 16SrIX-E (1)
		13-Avg-2018	19*	3	16SrI-F

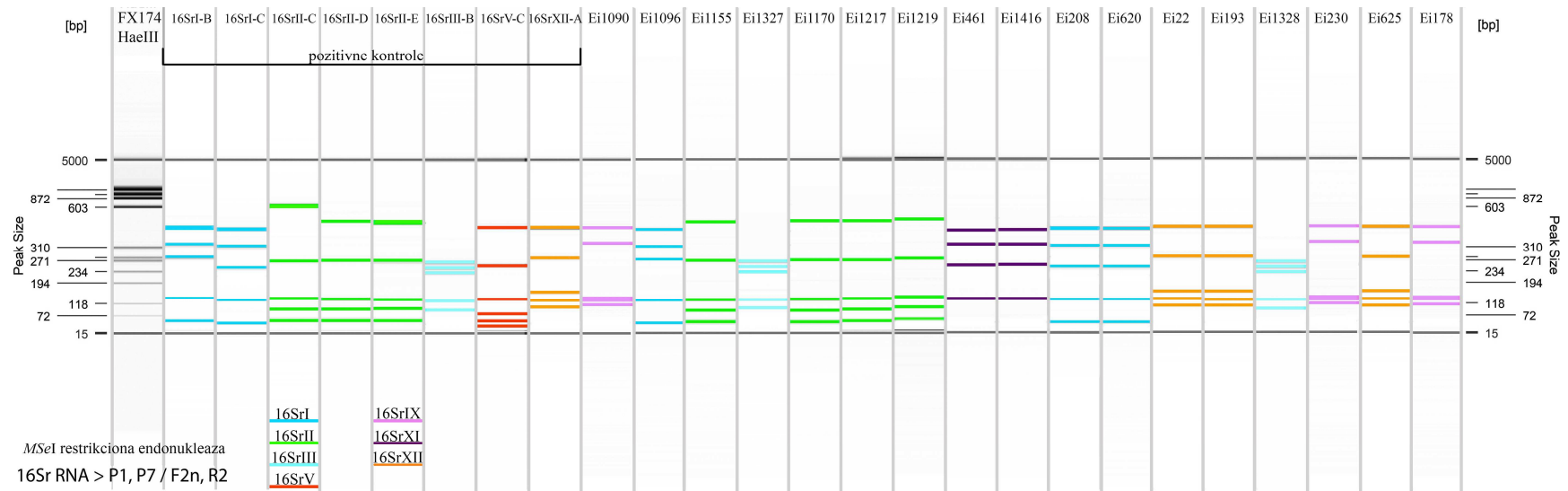
* letnja generacija; [#] zimska generacija; ^{*#} mešovite jedinke.

[^] jedinke analizirane u grupama od po 3 jedinke.



Tabela 9. Učestalost 'Ca. Phytoplasma pruni'- srodnog soja 16SrIII-B grupe fitoplazme u vrstama podreda Auchenorrhyncha na lokalitetu Dobanovci, gde je zabeležena dugogodišnja pojava *C. arvense* sa simptomima multiplih inflorescenci.

Familija	Potfamilija	Vrsta	Broj sakupljenih primeraka	Broj PCR pozitivnih/analiziranih primeraka
Cixiidae	Cixiinae	<i>Cixius wagneri</i>	17	0/17
		<i>Reptalus quinquecostatus</i>	49	0/40
Delphacidae	Delphacinae	<i>Stenocranus fuscovittatus</i>	17	0/17
Dictyopharidae	Dictyopharinae	<i>Dictyophara europaea</i>	15	0/15
Tettigometridae		<i>Tettigometra impressopunctata</i>	12	0/4
Cercopidae		<i>Philaenus spumarius</i>	132	0/50
Cicadellidae	Dorycephalinae	<i>Eupelix cuspidata</i>	12	0/12
	Agalliinae	<i>Anaceratagallia ribauti</i>	47	0/15
	Aphrodinae	<i>Aphrodes diminuta</i>	35	0/12
		<i>Aphrodes makarovi</i>	24	0/24
	Typhlocybinae	<i>Emelyanoviana mollicula</i>	88	0/17
		<i>Empoasca decipiens</i>	47	0/9
		<i>Eupteryx atropunctata</i>	63	0/12
		<i>Zyginidia pullula</i>	122	0/20
	Deltocephalinae	<i>Neoaliturus fenestratus</i>	28	0/9
		<i>Macrosteles</i> sp.	132	0/3
<i>Platymetopius major</i>		11	0/11	
<i>Euscelis incisus</i>		90	8/30	
		<i>Psammotettix alienus</i>	156	0/25



Slika 19. Utvrđivanje prisustva različitih 16Sr grupa fitoplazmi RFLP digestijom F2nR2 fragmenta, ukupne dužine 1250 bp, pomoću *MseI* restrikcione endonukleaze.



4.4 Analiza biljnog materijala na prisustvo fitoplazmi

U cilju utvrđivanja prisustva 16SrIII grupe fitoplazmi u *C. arvense* na 5 lokaliteta u severnoj Srbiji u julu 2012. godine sakupljeno je ukupno 27 biljaka *C. arvense*, 1 biljka *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. i 3 biljke *C. acanthoides* sa simptomima multiplih inflorescenci. Prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe utvrđeno je u svim simptomatskim biljkama. Nijedna od asimptomatskih biljaka sakupljenih na ovim lokalitetima nije bila pozitivna na prisustvo fitoplazmi (Tabela 10).

U daljem istraživanju, na lokalitetu Dobanovci, dodatno je sakupljeno i testirano na prisustvo 16SrIII grupe fitoplazmi 95 uzoraka 19 biljnih vrsta iz osam familija. Prisustvo 16SrIII grupe utvrđeno je u dve vrste iz familije Fabaceae: *L. tuberosus* (pozitivne 2/5) i *L. aphaca* (pozitivne 1/5). Ove biljke nisu pokazivale simptome prisustva fitoplazmi, ali su jedinke *E. incisus* na njima formirale agregacije. Sve ostale sakupljene asimptomatske biljke su bile negativne na prisustvo fitoplazmi (Tabela 11).



Tabela 10. Lokaliteti na kojima su prisutne biljke *C. arvense* sa simptomima multiplih inflorescenci (MI) i učestalost ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’- srodnog soja 16SrIII-B grupe fitoplazmi u simptomatskim *C. arvense* i srodnim vrstama.

Region	Lokalitet; GPS	Biljna vrsta	Zabeleženi simptomi	Broj analiziranih biljaka	Broj pozitivnih biljaka na prisustvo 16SrIII-B fitoplazme
Srem	Dobanovci; N44 50.890, E20 10.089	<i>Cirsium arvense</i>	MI	7	7
			asimptomatska	5	0
			<i>Carduus acanthoides</i>	MI	3
	Zemun; N44 52.102, E20 20.601	<i>Cirsium arvense</i>	asimptomatska	5	0
			MI	5	5
			<i>Cirsium arvense</i>	MI	5
Banat	Ruma; N44 57.798, E19 48.303	<i>Cirsium arvense</i>	asimptomatska	5	0
			MI	5	5
			<i>Cirsium arvense</i>	MI	5
	Sečanj; N45 21.912, E20 47.122	<i>Cirsium arvense</i>	asimptomatska	5	0
			MI	5	5
			<i>Cirsium arvense</i>	MI	5
Stari Tamiš; N44 52.062, E20 45.333	<i>Cirsium arvense</i>	asimptomatska	5	0	
		MI	5	5	
		<i>Cirsium vulgare</i>	MI	1	1
			asimptomatska	5	0
				31 MI biljka	31
				35 asimptomatskih biljaka	



Tabela 11. Prisustvo ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’- srodnog soja 16SrIII-B fitoplazme u asimptomatskim biljkama na lokalitetu Dobanovci, sa zabeleženom dugogodišnjom pojavom *C. arvense* sa simptomima multiplih inflorescenci.

Familija	Biljna vrsta	Broj analiziranih biljaka	Broj biljaka pozitivnih na prisustvo 16SrIII-B fitoplazme
Asteraceae	<i>Cirsium arvense</i>	5	0
	<i>Cirsium vulgare</i>	5	0
	<i>Carduus acanthoides</i>	5	0
	<i>Tanacetum vulgare</i>	5	0
	<i>Arctium lappa</i>	5	0
Boraginaceae	<i>Myosotis arvensis</i>	5	0
	<i>Symphytum officinale</i>	5	0
Caprifoliaceae	<i>Knautia arvensis</i>	5	0
Dipsacaceae	<i>Dipsacus laciniatus</i>	5	0
Fabaceae	<i>Lathyrus tuberosus</i>	5	2
	<i>Lathyrus aphaca</i>	5	1
	<i>Lathyrus cicera</i>	5	0
	<i>Genista tinctoria</i>	5	0
	<i>Astragalus onobrychis</i>	5	0
	<i>Lotus corniculatus</i>	5	0
Lamiaceae	<i>Ballota nigra</i>	5	0
Rosaceae	<i>Sanguisorba minor</i>	5	0
	<i>Rubus idaeus</i>	5	0
Rubiaceae	<i>Galium verum</i>	5	0

Na lokalitetu Donji Milanovac sakupljeno je 34 uzorka 5 biljnih vrsta. Prisustvo simptoma fitoplazmi utvrđeno je jedino kod biljaka vrste *Cichorium intybus* L. Simptomi su bili u vidu pojave veštičijih metli pri osnovi rozeta. Uzorkovano je 5 simptomatskih i 3 asimptomatske biljke ove vrste. Biljke ostalih vrsta uzorkovanih na ovom lokalitetu bile su asimptomatske. Svih 5 analiziranih simptomatskih biljaka *C. intybus*, bilo je pozitivno, dok su 3 asimptomatske biljke bile negativne na prisustvo fitoplazmi. Jedna od dvanaest sakupljenih biljaka vrste *Knautia arvensis* (L.) Coult. je takođe bila pozitivna na prisustvo fitoplazmi (Tabela 12). PCR analizom opštim prajmerima, RFLP analizom pomoću *MseI* restrikcione endonukleaze i sekvenciranjem 16S rRNK regiona utvrđeno je da svi pozitivni uzorci sadrže 16SrIX grupu fitoplazmi.

Na lokalitetu Vranje je tokom tri godine, od kraja juna do početka septembra, ukupno sakupljeno 73 uzorka 8 biljnih vrsta iz familija Asteraceae, Caprifoliaceae i



Fabaceae. Najviše uzoraka je pripadalo vrsti *Scabiosa ochroleuca* L. (Tabela 12). PCR analizom utvrđeno je da nijedan uzorak nije pozitivan na prisustvo fitoplazmi.

Tabela 12. Biljne vrste sakupljane na lokalitetima Donji Milanovac i Vranje, u cilju identifikacije fitoplazmi u njima.

Lokalitet	Familija	Biljna vrsta	Broj sakupljenih biljaka	Broj pozitivnih biljaka na prisustvo fitoplazmi
Donji Milanovac	Asteraceae	<i>Cichorium intybus</i>	8	5*
	Caprifoliaceae	<i>Knautia arvensis</i>	12	1
		<i>Knautia dipsacifolia</i>	5	0
		<i>Scabiosa lucida</i>	5	0
	Fabaceae	<i>Lathyrus latifolius</i>	4	0
Vranje	Asteraceae	<i>Centaurea maculosa</i>	5	0
		<i>Picris hieracioides</i>	7	0
	Caprifoliaceae	<i>Scabiosa ochroleuca</i>	31	0
	Fabaceae	<i>Lotus corniculatus</i>	7	0
		<i>Ononis spinosa</i>	5	0
		<i>Trifolium campestre</i>	7	0
		<i>Trifolium repens</i>	7	0
		<i>Vicia pannonica</i>	4	0

*simptomatske biljke

4.5 Vektorska uloga prirodno inficiranih populacija vrste *E. incisus*

Eksperimenti prenošenja 16SrIII, 16SrIX i 16SrXII grupe fitoplazmi prirodno inficiranim populacijama vrste *E. incisus* imali su za cilj da se utvrdi uloga ove vrste kao prirodnog vektora u prenošenju fitoplazmi. Testovi su postavljeni od 2013. do 2018. godine. Jedinke vrste *E. incisus*, sakupljene za testove prenošenja fitoplazmi potiču sa 6 lokaliteta: Dobanovci, Topola, Negotin, Donji Milanovac, Jasenovik i Vranje (Tabela 1).



Testovi prenošenja 16SrIII grupe

Testovi prenošenja fitoplazme 16SrIII grupe prirodno zaraženim primercima cikade *E. incisus* sakupljenim na lokalitetu Dobanovci, pokazali su da je ova cikada visoko efikasan vektor ove fitoplazme. PCR analizom test biljaka, prisustvo 16SrIII grupe je zabeleženo u 2 od 3 biljke *C. roseus* i 3 od 3 biljke *C. arvensis* (Tabela 13). Razvoj simptoma uočen je nakon 4 nedelje kod 2 perivinke, prvo u vidu pojave vršnih virescenci, a zatim višestrukim kompletno razvijenim virescencama i filodija u kasnijim fazama. Prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe je utvrđeno u obe biljke *C. roseus* sa simptomima virescenci i filodija. Dve biljke *C. arvensis* su razvile simptome multiplih inflorescenci nakon 2 meseca, dok je treća biljka pokazivala odsustvo cvetanja i simptome skraćenih internodija. Sve kontrolne biljke su bile asimptomatske i u njima nije utvrđeno prisustvo fitoplazmi. Četiri meseca nakon inokulacije sve tri test biljke *C. arvensis* su pokazale ubrzano propadanje i uvenuće.

Testovi prenošenja 16SrIX grupe

Sposobnost prirodno inficiranih jedinki *E. incisus* sakupljenih na lokalitetima Vranje i Donji Milanovac, u prenošenju fitoplazme 16SrIX grupe nije utvrđena. Rezultati su pokazali da nijedna od perivinki koje su korišćene u testovima nije pokazivala simptome fitoplazmatskih oboljenja, niti je bila pozitivna na prisustvo fitoplazme 16SrIX grupe (Tabela 13).

Testovi prenošenja 16SrXII grupe

Rezultati testova vektorske uloge prirodno zaraženih jedinki vrste *E. incisus* u prenošenju stolbur fitoplazme pokazali su da ova vrsta ima sposobnost da prenese 16SrXII grupu fitoplazmi na biljke *C. roseus* i *C. arvensis*. Od ukupno 40 perivinki na kojima su se hranile jedinke *E. incisus* sakupljene na lokalitetima Dobanovci, Topola, Jasenovik i Negotin, 15 biljaka je bilo pozitivno na prisustvo stolbur fitoplazme. Biljke su nakon 2 meseca razvile simptome žutila i skraćivanje internodija. Analizom eksperimentalnih biljaka *C. arvensis* utvrđeno je prisustvo stolbur fitoplazme u 1 od 8 *C. arvensis*, čime je dokazana sposobnost vrste *E. incisus* da prenese ovu fitoplazmu na biljke poponca. Vektorska uloga vrste *E. incisus* u prenošenju stolbur fitoplazme na vinovu lozu nije utvrđena, jer nijedna od 12 biljaka vinove loze koje su korišćene u



eksperimentima prenošenja nije bila pozitivna na prisustvo stolbur fitoplazme (Tabela 13).

Tabela 13. Test biljke korišćene u testovima prenošenja fitoplazmi pomoću prirodno inficiranih populacija *E. incisus*.

Lokalitet	Broj sakupljenih primeraka za testove prenošenja	Test biljka	Broj analiziranih biljaka/broj pozitivnih biljaka*	Identifikovana 16Sr grupa fitoplazme
Dobanovci	520	<i>Cirsium arvense</i>	3 / 3	16SrIII
		<i>Catharanthus roseus</i>	3+6 / 2+1	16SrIII/ 16SrXII
		<i>Convolvulus arvensis</i>	4 / 0	-
Topola	500	<i>Catharanthus roseus</i>	6+6 / 3+4	16SrXII/ 16SrXII
		<i>Vitis vinifera</i>	4 / 0	-
		<i>Catharanthus roseus</i>	6 / 0	-
Donji Milanovac	210	<i>Catharanthus roseus</i>	6 / 0	-
Negotin	330	<i>Catharanthus roseus</i>	10 / 3	16SrXII
Jasenovik	780	<i>Catharanthus roseus</i>	6+6 / 2+2	16SrXII/ 16SrXII
		<i>Vitis vinifera</i>	4+4 / 0+0	-
		<i>Convolvulus arvensis</i>	4 / 1	16SrXII
Vranje	845	<i>Catharanthus roseus</i>	6+6+6+6/0+0+0+0	-

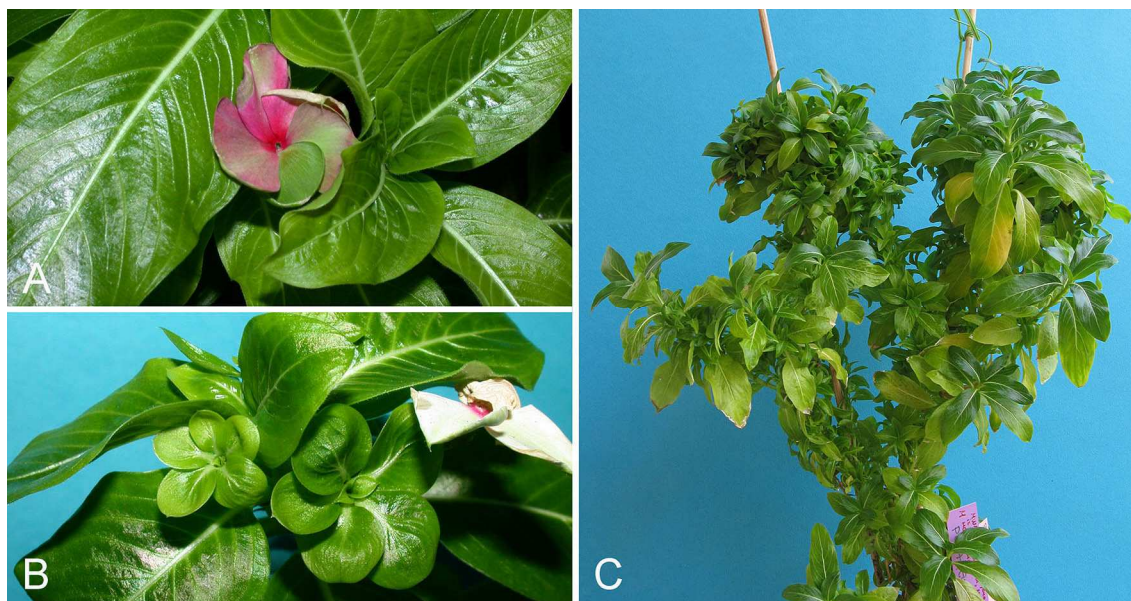
*+ označava postavljanje testova tokom više godina

4.6 Vektorska uloga laboratorijski gajenih populacija vrste *E. incisus*

Testovi prenošenja fitoplazmi pomoću laboratorijski gajenih populacija imali su za cilj da pokažu sposobnost vrste *E. incisus* da usvaja i da prenosi različite grupe fitoplazmi u kontrolisanim uslovima.

Testovi prenošenja 16SrIII grupe

Tri meseca nakon inokulacije, svih 6 perivinki i 6 palamida razvilo je simptome tipične za infekciju fitoplazmom, što je PCR analiza i potvrdila. Perivinke su najpre pokazivale simptome virescenci, a zatim i prisustvo filodija, da bi na kraju došlo do skraćivanja internodija, pojave sitnih listova i simptoma tipičnih za sistemsku infekciju (Slika 20).



Slika 20. Simptomi na biljci *C. roseus* inficiranoj CMI fitoplazmom (16SrIII) pomoću laboratorijski gajenih adulta *E. incisus*. (A) simptomi virescenci; (B) simptomi filodija; (C) izgled biljke 6 meseci nakon inokulacije.

Biljke *C. arvensis* su pokazivale simptome skraćenih internodija, gusto grananje stabljike sa razvojem sitnih listova, kovrdžanje listova, simptome multiplih inflorescenci ili odsustvo cvetanja (Slika 21). Sve test biljke *C. arvensis* su uvenule 5 meseci nakon inokulacije. Kontrolne biljke su bile asimptomatske i negativne na prisustvo fitoplazmi.



Slika 21. Simptomi na biljci *C. arvensis* inficiranoj CMI fitoplazmom (16SrIII) pomoću laboratorijski gajenih adulta *E. incisus*. (A) skraćene internodije; (B) kovrdžanje listova.



Svih 360 primeraka *E. incisus* koji su korišćeni u eksperimentu, preživeli su 24h inokulacije na test biljkama što pokazuje da su obe biljke pogodne za kratkotrajnu ishranu. Adulti su pojedinačno analizirani na prisustvo fitoplazmi i dobijeni rezultati pokazuju visoku stopu inficiranosti 16SrIII grupom, sa prosečnom vrednošću od 83% (opseg: 73-93%, n=12) (Tabela 14). Ovaj nalaz ukazuje da je *E. incisus* efikasan vektor 16SrIII grupe fitoplazme. Nivo inficiranosti najviše zavisi od dostupnosti inficiranih biljaka kao izvora patogena.

Tokom iste eksperimentalne godine, na lokalitetu Dobanovci sakupljene su simptomatske biljke *C. acanthoides* i na njih je stavljeno ukupno 400 novoispiljenih jedinki *E. incisus* na akviziciju. Prisustvo 16SrIII grupe identifikovano je u 3/6 perivinki i 2/4 biljke *C. arvense*. Pozitivne perivinke su pokazivale tipične simptome prisustva fitoplazmi, virescence i filodije, dok se kod pozitivnih *C. arvense* moglo uočiti skraćivanje internodija, kovrdžanje listova i uvenuće biljaka nakon 5 meseci.

Od ukupno 300 preživelih jedinki *E. incisus* koje su korišćeni u testovima prenošenja, 272 (90.7%) su bile pozitivne na prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe. Ovaj rezultat ukazuje da vrsta *E. incisus* ima sposobnost da usvoji fitoplazmu 16SrIII grupe sa zaraženih biljaka *C. arvense* i *C. acanthoides* u veoma visokom procentu i da je uspešno prenese na indikator biljku *C. roseus* i biljku *C. arvense*.

Nakon potvrđene vektorske uloge vrste *E. incisus* u prenošenju 16SrIII grupe fitoplazmi, tokom 2014. godine, postavljena su još dva eksperimenta u kojima je ispitivana sposobnost usvajanja i prenošenja 16SrIII grupe fitoplazmi, na 5 biljnih vrsta podtribusa Carduinae. Analizom je utvrđeno da samo jedna biljka *C. oleraceum*, na kojoj su se hranile jedinke koje su usvajale 16SrIII fitoplazmu sa zaraženog *C. arvense*, u sebi nosi 16SrIII grupu. Ostale test biljke, kao i kontrolne biljke su bile negativne na prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe. Od ukupno 600 adulta koji su korišćeni u testovima prenošenja, 312 je bilo pozitivno na prisustvo 16SrIII grupe (52%). Dodatni eksperiment se sastojao od korišćenja inficirane *C. roseus* kao biljke za akviziciju. Nakon tri meseca od inokulacije nijedna test biljka nije pokazivala simptome fitoplazmatičnog oboljenja. Prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe nije utvrđeno u analiziranim test i kontrolnim biljkama, kao ni u insektima.



Tabela 14. Testovi prenošenja CMI fitoplazme (16SrIII-B) na *C. arvense* i *C. roseus* pomoću laboratorijski gajene populacija *E. incisus*.

Eksperimentalna biljka	Postavka	Broj inficiranih <i>E. incisus</i> /broj izloženih	Prenošenje	Opaženi simptomi
<i>Cirsium arvense</i>	1	22/30	+	odusustvo cvetanja, skraćene internodije, sušenje biljke
	2	27/30	+	odusustvo cvetanja, skraćene internodije, kovrdžanje listova
	3	24/30	+	multiple inflorescence, skraćene internodije, sušenje biljke
	4	23/30	+	multiple inflorescence, skraćene internodije, sušenje biljke
	5	26/30	+	multiple inflorescence, skraćene internodije, sušenje biljke
	6	25/30	+	multiple inflorescence, skraćene internodije, sušenje biljke
<i>Catharanthus roseus</i>	7	27/30	+	virescence, filodije, intenzivno grananje
	8	22/30	+	filodije, skraćene internodije i petiole, veštičje metle
	9	25/30	+	filodije, skraćene internodije i petiole, veštičje metle
	10	26/30	+	virescence, filodije, intenzivno grananje
	11	25/30	+	virescence, filodije, intenzivno grananje
	12	28/30	+	virescence, filodije, intenzivno grananje
		300/360 (83%)		



Testovi prenošenja 16SrII grupe

Sposobnost vrste *E. incisus* u prenošenju fitoplazme 16SrII grupe pomoću laboratorijski gajene populacije nije utvrđena. Nakon tri meseca od inokulacije, nijedna od 12 indikator biljaka nije pokazivala simptome karakteristične za fitoplazme. Analizirane su sve test i kontrolne biljke kao i insekti koji su korišćeni u eksperimentima i svi su bili negativni na prisustvo fitoplazme 16SrII grupe (Tabela 15).

Tabela 15. Testovi prenošenja 16SrII grupe pomoću laboratorijski gajene populacije *E. incisus*.

Godina	Biljka na kojoj je vršena akvizicija	Test biljka	Broj pozitivnih/broj izloženih <i>E. incisus</i>	Broj pozitivnih/ukupan broj biljaka
2014	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	0/6
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
2015	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	0/6
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	

Testovi prenošenja 16SrV grupe

Rezultati eksperimenata prenošenja *Flavescence dorée* fitoplazme (16SrV grupa) pomoću laboratorijski gajene populacije pokazali su da vrsta *E. incisus* može da prenese ovu fitoplazmu na eksperimentalnu biljku *C. roseus*, dok sposobnost prenošenja FD fitoplazme na vinovu lozu, nije utvrđena. RFLP analizom i sečenjem sa *MSeI* enzimom je utvrđeno prisustvo 16SrV grupe u 2 od ukupno 12 perivinki, što je potvrđeno i sekvenciranjem 16S rRNK regiona. Insekti su uspešno preneli FD fitoplazmu samo kada su je usvajali sa zaražene biljke *C. vitalba*, dok kada su je usvajali sa zaražene indikator biljke *C. roseus*, nisu uspeli da je prenesu na eksperimentalne biljke. Svi insekti su bili negativni na prisustvo fitoplazmi (Tabela 16).



Biljke koje su bile pozitivne na prisustvo 16SrV grupe fitoplazmi, pokazivale su simptome žutila i patuljastog rasta.

Tabela 16. Testovi prenošenja 16SrV grupe pomoću laboratorijski gajene populacije *E. incisus*.

Godina	Biljka na kojoj je vršena akvizicija	Test biljka	Broj pozitivnih/ broj izloženih <i>E. incisus</i>	Broj pozitivnih/ ukupan broj biljaka	
2014	<i>Clematis vitalba</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	0/30		
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30		
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30	2/6	
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30		
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30		
		<i>Catharanthus roseus</i>	0/30		
	2015	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
			<i>Vitis vinifera</i>	0/30	0/4
			<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
			<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
<i>Catharanthus roseus</i>			0/30		
<i>Catharanthus roseus</i>			0/30	0/6	
<i>Catharanthus roseus</i>			0/30		
<i>Catharanthus roseus</i>			0/30		
2015	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Vitis vinifera</i>	0/30		
		<i>Vitis vinifera</i>	0/30	0/4	
		<i>Vitis vinifera</i>	0/30		
		<i>Vitis vinifera</i>	0/30		

Testovi prenošenja 16SrXII grupe

Eksperimenti usvajanja i prenošenja stolbur fitoplazme pomoću laboratorijski dobijene populacije *E. incisus* postavljani su tokom četiri eksperimentalne godine (2013-2016). Akvizicija je vršena sa 4 perivinke, koje su u sebi nosile 4 različita genotipa stolbur fitoplazme: STOLg (*tuf-b/V2-TA/STOL*), Rqg50 (*tuf-b/V2-TA, Rqg50*), BG4560g (*tuf-b/V7-A/BG4560*) i 19-25g (*tuf-ab/V18/19-25*). Rezultati testova prenošenja prikazani su u Tabeli 17.

Tokom dve eksperimentalne godine jedinke *E. incisus* su vršile akviziciju na perivinki sa genotipom STOLg. Insekti su uspešno preneli ovaj genotip na 5 od ukupno



12 perivinki i na 3 od 8 vinovih loza u obe eksperimentalne godine. Sve pozitivne biljke *C. roseus* su pokazivale simptome žutila, dok su listovi pozitivnih sejanaca vinove loze pokazivali žutilo i savijali se prema naličju lista. Od 600 analiziranih primeraka *E. incisus*, samo 5 (0.83%) je bilo pozitivno na prisustvo stolbur fitoplazme.

Vrsta *E. incisus* je uspešno prenela i genotip Rqg50g, koji je usvojila iz zaražene perivinke, tokom dve eksperimentalne godine. PCR analizom i sekvenciranjem utvrđeno je prisustvo ovog genotipa fitoplazme u 4 od ukupno 12 perivinki, 2 od 8 vinovih loza i 3 od 4 poponca. Sve biljke vinove loze iz eksperimenta kao i kontrolne biljke, posle godinu dana od inokulacije, bile su asimptomatske. Dve perivinke je karakterisao patuljasti rast nakon tri meseca, dok su dve imale i simptome žutila i patuljastog rasta. Sve 3 pozitivne biljke poponca su bile asimptomatske. Sve kontrolne biljke su bile asimptomatske i negativne na prisustvo fitoplazmi. Inficiranost insekata je bila vrlo niska. Od ukupno 720 analiziranih insekata, samo je 7 (0.97%) bilo pozitivno na prisustvo fitoplazme.

Jedinke *E. incisus* koje su bile na akviziciji na perivinki zaraženoj genotipom BG4560g, uspešno su prenele ovaj genotip na 2 od 6 perivinki, dok su sve biljke vinove loze i svi insekti bili negativni na prisustvo fitoplazmi. Na zaraženim perivinkama simptomi žutila su se razvili nakon tri meseca od inokulacije.

Sposobnost vrste *E. incisus* u prenošenju genotipa 19-25g nije potvrđena. Tokom dve eksperimentalne godine testovi prenošenja stolbur fitoplazme su postavljeni sa adultima *E. incisus*, koji su usvajali fitoplazmu sa perivinke zaražene *tuf*-ab tipom koji je isključivo povezan sa koprivom. PCR analizom nije utvrđeno prisustvo stolbur fitoplazme u testiranim, kao ni u kontrolnim biljkama. Svi analizirani insekti su takođe bili negativni na prisustvo fitoplazme.



Tabela 17. Testovi prenošenja 16SrXII grupe pomoću laboratorijski gajene populacije *E. incisus*.

Biljka na kojoj je vršena akvizicija	Test biljka	Broj pozitivnih/broj izloženih <i>E. incisus</i>	Broj pozitivnih/ukupan broj test biljaka	
Catharantus roseus BG4560g (tuf-b/V7-A/BG4560)	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	2/6	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	Catharantus roseus STOLg (tuf-b/V2-TA/STOL)	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	0/4
		<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
		<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
		<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
Catharantus roseus Rqg50g (tuf-b/V2-TA/STOL)		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	5/12
		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharantus roseus</i>	1/30	
		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	2/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	1/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	Catharantus roseus Rqg50g (tuf-b/V2-TA/STOL)	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
<i>Vitis vinifera</i>		1/30		
<i>Vitis vinifera</i>		0/30		
<i>Vitis vinifera</i>		0/30		
<i>Vitis vinifera</i>		0/30		
<i>Vitis vinifera</i>		0/30		
<i>Vitis vinifera</i>		0/30		
<i>Vitis vinifera</i>		0/30		
Catharantus roseus Rqg50g (tuf-b/V2-TA/STOL)		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	4/12
		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharantus roseus</i>	2/30	
		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
		<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
Catharantus roseus Rqg50g (tuf-b/V2-TA/STOL)	<i>Catharantus roseus</i>	1/30	2/8	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	1/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30		



Biljka na kojoj je vršena akvizicija	Test biljka	Broj pozitivnih/broj izloženih <i>E. incisus</i>	Broj pozitivnih/ukupan broj test biljaka
	<i>Convolvulus arvensis</i>	0/30	
	<i>Convolvulus arvensis</i>	0/30	3/4
	<i>Convolvulus arvensis</i>	1/30	
	<i>Convolvulus arvensis</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	0/12
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
<i>Catharantus roseus</i>	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
19-25g	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
(tuf-ab/V18/19-25)	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Catharantus roseus</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	0/8
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	
	<i>Vitis vinifera</i>	0/30	

4.7 Taksonomska karakterizacija fitoplazmi u prirodno inficiranim populacijama *E. incisus* na osnovu 16S rRNK genskog regiona

Kod svih jedinki *E. incisus* koje su bile pozitivne na prisustvo fitoplazmi uspešno je umnožen i sekvenciran 16S rRNK genski region fitoplazmi u okviru koga se nalazi taksonomski vrlo informativan F2nR2 fragment. Identifikovano je ukupno devet različitih tipova sekvenci 16S rRNK regiona. Poređenjem sa referentnim izolatima odgovarajućih 'Ca. Phytoplasma' taksona (Prilog - Tabela 4) utvrđena je njihova genetska sličnost, a poređenjem sa referentnim podgrupama, utvrđen je njihov RFLP koeficijent sličnosti i odgovarajuća taksonomska pripadnost (Prilog - Tabela 5).

Za pet od devet tipova sekvenci, sa koeficijentom sličnosti F=1.00, utvrđeni su standardni restrikcioni obrasci 16S rRNK podgrupa (16SrI-F, 16SrII-E, 16SrIII-B, 16SrIX-C i 16SrXII-A) koje su do sada definisane (Tabela 18). Preostala četiri tipa sekvenci razlikovala su se u digestiji sa jednim enzimom, od taksonomski najbližih izolata. Na osnovu ovih rezultata, među pozitivnim jedinkama *E. incisus* registrovana je varijanta 16SrI grupe (16SrI-R**) i varijanta 16SrIX grupe (16SrIX-E**), kod kojih je



koeficijent sličnosti $F=0.98$. Takođe, identifikovana je i nova podgrupa, 16SrXI-G, kod koje je koeficijent sličnosti bio $F=0.97$, u odnosu na taksonomski najbliži izolat 16SrXI-C podgrupe (Tabela 18).

Ukupno je među inficiranim jedinkama *E. incisus* identifikovano šest 'Ca. Phytoplasma' vrsta, od kojih je pet pokazivalo određene nukleotidne razlike u poređenju sa referentnim izolatima: 'Ca. Phytoplasma asteris', 'Ca. Phytoplasma aurantifolia', 'Ca. Phytoplasma pruni', 'Ca. Phytoplasma phoenicium' i 'Ca. Phytoplasma oryzae', a vrsta 'Ca. Phytoplasma solani' bila je 100% identična sa referentnim izolatom.

4.7.1 'Ca. Phytoplasma asteris' (16SrI grupa)

Od 10 izolata koji pripadaju 16SrI grupi u okviru 'Ca. Phytoplasma asteris'-srodnih sojeva, tri izolata sakupljena na lokalitetu Vranje imala su međusobno identične sekvence i pripadala su 16SrI-F podgrupi. U poređenju sa referentnim izolatom podgrupe *Leafhopper-borne phytoplasma* (CVB, AY265212), ova tri izolata 16SrI-F podgrupe imala su koeficijent sličnosti 1.00 i p-distancu koja iznosi 0.2% (Tabela 18).

Preostalih sedam izolata u okviru 16SrI grupe pripadala su varijanti 16SrI-R podgrupe, sa koeficijentom sličnosti 0.98 u poređenju sa referentnim izolatom *Strawberry phylloid fruit* (StrawPhF, AY102275) i p-distancama koje variraju od 0.1 do 0.2% zbog varijacija nukleotidnih sekvenci koje ne utiču na restrikciona mesta i RFLP obrasce sličnosti (Tabela 18). Tri od sedam izolata pripadala su primercima *E. incisus* sakupljenim na lokalitetu Babin zub, dok su preostala četiri bila iz jedinki sa lokaliteta Jasenovik. Od 17 dijagnostičkih enzima koji se koriste za razlikovanje RFLP obrazaca 16S rRNK podgrupa, *in silico* restrikcionim profilima dobijenim pomoću *HaeIII* enzima utvrđene su razlike između izolata 16SrI-R podgrupe naših istraživanja i referentnih izolata (Slika 22, Tabela 18).



Tabela 18. Taksonomska i epidemiološka karakterizacija fitoplazmi detektovanih u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus*.

Taksonomska pripradnost na osnovu 16S rRNK gena ^a				Epidemiološka karakterizacija ^f				
16Sr grupa	16Sr podgrupa	RFLP koeficijent sličnosti ^c /p-distance ^d	Dijagnostički enzim	' <i>Ca. Phytoplasma</i> ' vrsta ^e	<i>rps3-rpl22</i>	<i>secY</i>	<i>tuf/vmp1/stamp</i>	Epidemiološke korelacije
16SrI	F	1.00/0.2%	-	' <i>Ca. P. asteris</i> '-srodni soj	rp(I)-N	secY(I)-N	n.a.	Leafhopper borne (CVB)
16SrI	R**	0.98/0.1-0.2%	<i>HaeIII</i>	' <i>Ca. P. asteris</i> '-srodni soj	rp(I)-C	secY(I)-C	n.a.	<i>Cirsium</i> yellows phytoplasma (CirY), clover phyllody (CPh, CPh-C, CPh-L)
16SrII	E	1.00/1.1%	-	' <i>Ca. P. aurantifolia</i> '-srodni soj	rp(II)-E2 podklada <i>xviii</i>	n.a.	n.a.	Italian alfa-alfa witches'-broom (IAWB), <i>Picris echioides</i> phyllody (PEP)
16SrIII	B	1.00/0.3%	-	' <i>Ca. P. pruni</i> '-srodni soj	rp(III)-B podklada <i>iv</i>	secY(III)-B	n.a.	<i>Cirsium arvense</i> multiple inflorescence (CMI), <i>Carduus acanthoides</i> , <i>Lathyrus tuberosus</i> , <i>L. aphaca</i> , clover yellow edge (CYE)
16SrIX	C	1.00/0.1%	-	' <i>Ca. P. phoenicium</i> '-srodni soj	rp(IX)-C1	secY(IX)-C1	n.a.	<i>Picris echioides</i> yellows (PEY),
16SrIX	E**	0.98/0.4%	<i>HhaI</i>	' <i>Ca. P. phoenicium</i> '-srodni soj	rp(IX)-E3	secY(IX)-E3	n.a.	<i>Knautia arvensis</i> phyllody (KAP), <i>Vicia sativa</i>
16SrXI	G, nova podgrupa	0.97 (16SrXI-C)/1.8%	<i>TaqI</i>	' <i>Ca. P. oryzae</i> '-srodni soj	n.a.	n.a.	n.a.	Leafhopper-borne phytoplasma (BVK), <i>Cirsium arvense</i> -srodan ' <i>Ca. P. cirsii</i> '
16SrXII	A	1.00/0.3%	-	' <i>Ca. P. solani</i> '	rp(XII)-A	STOL11 (STOL) ^g GGY ^g	tuf-b/V2-TA/STOL ^h tuf-b/V2-TA /Rqg31 ^h	<i>Hyalesthes obsoletus</i> ex <i>Crepis foetida</i> i <i>Reptalus panzeri</i> transmisioni putevi <i>H. obsoletus</i> ex <i>Convolvulus arvensis</i> transmisioni putevi

n.a. – nije analizirano;

^a zasnovano na filogenetskoj rekonstrukciji i računanju RFLP koeficijenta sličnosti;

^b određivanje podgrupe je urađeno na osnovu praga RFLP koeficijenta sličnosti za određivanje nove podgrupe koji iznosi 0.97 (Wei i sar., 2008). Varijante RFLP obrazaca koje imaju koeficijent sličnosti 0.98 u poređenju sa standardnim obrascem referentnog izolata određene podgrupe, obeležene su sa dve zvezdice (**), kao što je predloženo u Wei i sar. (2008) i Zhao i sar. (2009);

^c automatsko računanje korišćenjem *iPhyClassifier* (Zhao i sar., 2009) i ručno u slučaju 16SrIX i 16SrXI grupa za koje *iPhyClassifier* baza nije imala precizno opisane podgrupe (Bertaccini i Lee, 2018);

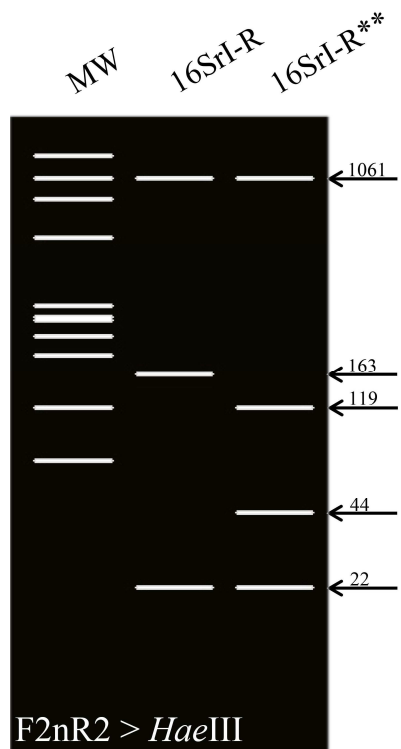
^d računane na osnovu 16S rRNK gena F2nR2 regiona korišćenjem MEGA 7.0. p-distance su računane poređenjem sa referentnim izolatima 16Sr podgrupa datih u Prilogu - Tabela 5;

^e '*Ca. Phytoplasma*' vrste su određene prema pravilima predloženim od strane Phytoplasma/Spiroplasma Working Team u okviru IRPCM (IRPCM, 2004), uključujući vodič na osnovu kojeg se fitoplazma izolati sa minimalnim razlikama u sekvencama 16S rRNK gena u poređenju sa referentnim izolatima '*Ca. Phytoplasma*' vrste označavaju kao "srodni" određenoj vrsti. Ovo pravilo nije primenjeno u slučaju '*Ca. Phytoplasma solani*', preteći opis fitoplazma vrste (Quaglino i sar., 2013);

^f zasnovano na poređenju sekvenci sa referentnim izolatima i RFLP profilima na osnovu Lee i sar. (2004a; 2006; 2012), Martini i sar. (2007) i Davis i sar. (2013);

^g prema Cimerman i sar. (2009) i Quaglino i sar. (2013);

^h u skladu sa oznakama genotipova na osnovu Cvrković i sar. (2014).



Slika 22. Virtuelni RFLP obrasci *in silico* digestije 16S rRNK regiona koji razlikuju 16Sr podgrupe i njihove varijante. *HaeIII* dijagnostički enzim razlikuje 16SrI-R podgrupu od 16SrI-R**. Strelice sa brojevima predstavljaju pozicije razdvojenih fragmenata (bp). 16SrI-R: referentni soj *Strawberry phylloid fruit* (StrawPhF, AY102275); 16SrI-R**: izolat iz *E. incisus* koji pripada varijanti 16SrI-R podgrupe (MN047255 i/ili MN047256). MW: marker ϕ X174/*HaeIII*. Veličina fragmenata (bp) od vrha ka dnu: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.

4.7.2 ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’ (16SrII grupa)

Četiri izolata 16SrII grupe, koji pripadaju ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’-srodnim sojevima imala su međusobno identične nukleotidne sekvence i RFLP koeficijent sličnosti 1.00 u poređenju sa referentnim izolatom 16SrII-E podgrupe *Picris echioides phyllody* (PEP, Y16393) (Tabela 18). Ipak, vrednost p distance je iznosila 1.1% i filogenetsko grupisanje je pokazalo diskretno izdvajanje podgrupa. Pripadnost izolata 16SrII-E podgrupe iz naše studije vrsti ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’ u okviru 16SrII-B podgrupe a ne ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’ vrsti u okviru 16SrII-D podgrupe je određena usled kasnijeg opisa (White i sar., 1998) koji nije u skladu sa pravilima određenim od strane *Phytoplasma/Spiroplasma* Radnog Tima u okviru IRPCM (2004) a koji se ogleda u njihovoj visokoj genetičkoj sličnosti sa prethodno opisanom ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’ (Zreik i sar., 1995).

4.7.3 ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’ (16SrIII grupa)

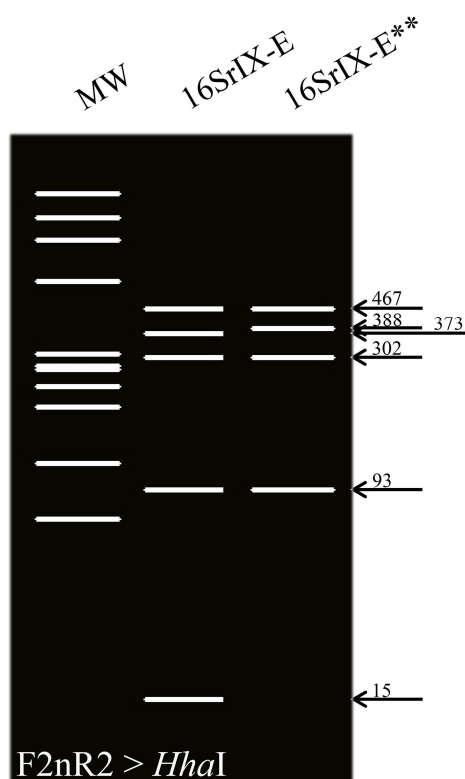
Ukupno 11 izolata 16SrIII grupe i ‘*Ca. Phytoplasma pruni*’-srodnih sojeva identifikovanih tokom rada na ovom doktoratu, imali su međusobno identične



nukleotidne sekvence i RFLP koeficijent sličnosti 1.00 u poređenju sa referentnim izolatom 16SrIII-B podgrupe *Clover yellow edge* (CYE, AF173558) (Tabela 18).

4.7.4 '*Ca. Phytoplasma phoenicium*' (16SrIX grupa)

Po prvi put na teritoriji Srbije utvrđeno je prisustvo 16SrIX grupe. Identifikovano je ukupno osam izolata na dva različita lokaliteta koji pripadaju '*Ca. Phytoplasma phoenicium*'-srodnim sojevima. Tri izolata identifikovana su u jedinkama *E. incisus* sa lokaliteta Donji Milanovac, kod Gvozdene kapije na Dunavu, sa koeficijentom sličnosti od 1.00 i p-distancom 0.1% u poređenju sa referentnim izolatom 16SrIX-C podgrupe *Picris echioides yellows* (PEY, Y16389) (Tabela 18). Preostalih 5 izolata čiji RFLP obrazac pokazuje pripadnost 16SrIX grupi, identifikovani su u primercima sakupljenim na jezeru u okolini Vranja. Izolati sa ovog lokaliteta poseduju različito mesto sečenja pomoću enzima *HhaI* sa koeficijentom sličnosti 0.98 i p-distancom 0.4%, u poređenju sa referentnim izolatom 16SrIX-E podgrupe *Juniperus witches'-broom* (JunWB, GQ925918) (Tabela 18). Zbog svega navedenog, ovi izolati predstavljaju varijantu 16SrIX-E podgrupe (Slika 23).



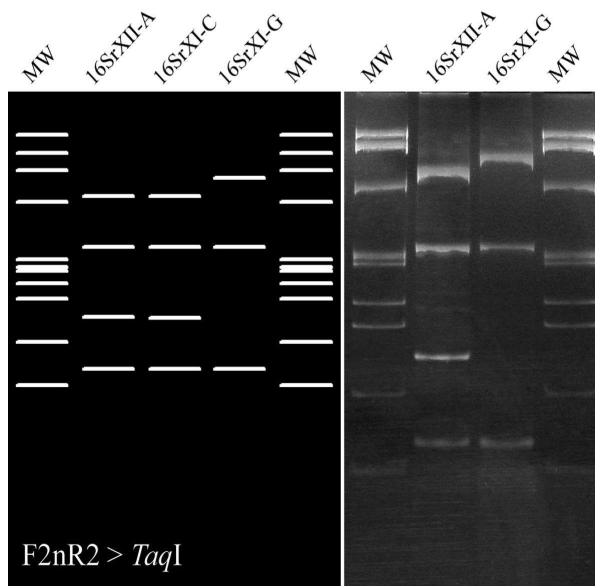
Slika 23. Virtuelni RFLP obrasci *in silico* digestije 16S rRNK regiona koji razlikuju 16Sr podgrupe i njihove varijante. *HhaI* dijagnostički enzim razlikuje 16SrIX-E podgrupu od 16SrIX-E**. Strelice sa brojevima predstavljaju pozicije razdvojenih fragmenata (bp). 16SrIX-E: referentni soj *Juniperus witches'-broom* JunWB (GQ925918); 16SrIX-R**: izolat iz *E. incisus* koji pripada varijanti 16SrIX-E podgrupe (MN047261). MW: marker ϕ X174/*HaeIII*. Veličina fragmenata (bp) od vrha ka dnu: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.



4.7.5 '*Ca. Phytoplasma oryzae*' (16SrXI grupa)

Najkompleksnija taksonomska determinacija vezana je za 16SrXI grupu, koja, pored toga što je prvi put identifikovana u Srbiji i u jedinkama vrste *E. incisus*, različita je od obe do sada opisane vrste koje pripadaju 16SrXI ribozomalnoj grupi fitoplazmi: '*Ca. Phytoplasma oryzae*' koja pripada 16SrXI-A podgrupi i '*Ca. Phytoplasma cirsii*' u okviru 16SrXI-E podgrupe. Dva izolata identifikovana tokom istraživanja najrodnija su sa 16SrXI-C podgrupom, ali se i od nje jasno razlikuju. Filogenetske analize i p-distance pokazuju bliskije odnose izolata iz Srbije sa '*Ca. Phytoplasma oryzae*' nego sa '*Ca. Phytoplasma cirsii*', što se objašnjava genetičkim razlikama F2nR2 regiona 16S rRNK gena, koje iznose 2.1% u poređenju izolata iz Srbije sa '*Ca. Phytoplasma oryzae*' i 2.9% sa '*Ca. Phytoplasma cirsii*'. Pošto prag za opis nove '*Ca. Phytoplasma*' vrste iznosi 2.5% genetičke razlike na F2nR2 regionu 16S rRNK gena (IRPCM, 2004), a vrednosti manje od 2.5% se tretiraju kao "srodni sojevi", mi smo isolate 16SrXI grupe iz Srbije označili kao sojeve srodne '*Ca. Phytoplasma oryzae*' vrsti.

RFLP koeficijent sličnosti i p-distance pokazuju najveću sličnost sa referentnim izolatom 16SrXI-C podgrupe *Leafhopper-borne phytoplasma* (BVK, X76429), sa koeficijentom sličnosti od $F=0.97$ i genetičnim distancama od 1.8% (Tabela 18). Prag koeficijenta sličnosti za opis nove 16Sr podgrupe iznosi 0.97 (Wei i sar., 2008; Zhao i sar., 2009), pa bi, na osnovu toga, 16SrXI grupu identifikovanu u izolatima iz Srbije trebalo opisati kao novu podgrupu. Prateći preporuke Zhao i sar. (2009), potvrdili smo *in silico* restrikcioni obrazac razlikovanja nove podgrupe i njoj najbliže 16SrXI-C, RFLP digestijom pomoću *TaqI* restrikcionog enzima i označili je kao 16SrXI-G podgrupu (Tabela 18, Slika 24).



Slika 24. Virtuelna *in silico* RFLP digestija pomoću *TaqI* enzima koji razlikuje novu 16SrXI-G od 16SrXI-C podgrupe dobijena analizom F2nR2 dela 16S rRNK genskog regiona (levo) i RFLP digestija sa istim enzimom prikazana na poliakriladmidnom gelu (desno). 16SrXII-A: referentni '*Ca. Phytoplasma solani*' izolat STOL11 (AF248959); 16SrXI-C: referentni *Leafhopper-borne* (BVK) izolat 16SrXI-C podgrupe (X76429); 16SrXI-G: izolat nove 16SrXI-G podgrupe izolovan iz *E. incisus* (MN047262); MW: marker ϕ X174/*HaeIII* (Fermentas). Veličine fragmenata (bp) od vrha ka dnu: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.

4.7.6 '*Ca. Phytoplasma solani*' (16SrXII grupa)

Svih 18 izolata 16SrXII grupe, identifikovanih na 5 različitih lokaliteta, pokazali su međusobno identične 16S rRNK sekvence i 4 nukleotidne razlike u odnosu na 16SrXII-A referentni izolat (STOL11, AF248959). RFLP koeficijent sličnosti iznosio je 1.00 u poređenju sa istim referentni izolatom (Tabela 18). Iako svi izolati iz Srbije pokazuju 0.3% p-distance u odnosu na referentni izolat, oni ispunjavaju sva tri kriterijuma opisana u radu Quaglino i sar. (2013), koji ih svrstavaju u vrstu '*Ca. Phytoplasma solani*'.

4.8 Filogenetske analize izolata fitoplazmi identifikovanih u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus* na osnovu 16S rRNK genskog lokusa

Filogenetske pozicije i odnosi izolata fitoplazmi identifikovanih u primercima *E. incisus* iz Srbije i referentnih izolata svih do danas poznatih 16S rRNK grupa i opisanih ili predloženih '*Ca. Phytoplasma*' vrsta, određeni su pomoću *Neighbor-joining* analize 16S rRNK gena. U analizu su uključene 42 opisane '*Ca. Phytoplasma*' vrste i osam izolata koji još uvek nisu opisani kao zasebne '*Ca. Phytoplasma*' vrste, ali pokazuju razlike u odnosu na sve do sad poznate i opisane vrste (Prilog - Tabela 4). Sve



'*Ca. Phytoplasma*' vrste uključene u filogenetske analize grupisane su u 35 grupa fitoplazmi, koje su do sada opisane. Na filogenetskom stablu definisane su, sa visokim vrednostima podrške, tri glavne filogenetske podklade. Izolati iz primeraka *E. incisus* iz Srbije grupisani su u dve podklade, podkladu I i II (Slika 25), dok se nijedan od naših izolata ne nalazi u okviru podklade III u okviru koje se nalaze izolati fitoplazme 16SrX grupe i srodnih 16Sr grupa/vrsta (*Apple proliferation*).

U filogenetske analize su, takođe, uključeni izolati fitoplazmi 16SrI, 16SrII i 16SrXII grupe, koji su do sada registrovani u Srbiji.

Filogenetske pozicije šest različitih grupa fitoplazmi, identifikovanih u jedinkama *E. incisus*, na filogenetskom stablu, potvrđuju njihov diverzitet i genetičku segregaciju (Slika 25). U okviru svake grupacije na stablu, koja je predstavljala izdvajanje određene grupe fitoplazmi, urađene su detaljnije filogenetske analize da bi se razrešile njihove asocijacije i odnosi.

U okviru podklade I nalaze se izolati fitoplazmi 16SrI i 16SrXII grupe. Izolati 16SrXII-A podgrupe međusobno su identični sa već poznatim izolatima iz Srbije i grupišu se sa referentnim izolatom STOL11. Takođe, u Srbiji je zabeležena i 16SrXII-H podgrupa koja pripada vrsti '*Ca. Phytoplasma convolvuli*', ali se ona nalazi u odvojenoj kladi u okviru 16SrXII grupe.

Podgrupe 16SrI-F i 16SrI-R su bliske sa 16SrI-B i 16SrI-C podgrupama koje su registrovane u Srbiji. Izolati koji pripadaju 16SrI-R podgrupi se jasno izdvajaju sa referentnim izolatom -R podgrupe i predstavnikom -C podgrupe. Naši izolati 16SrI-F grupe formiraju zajedničku grupu sa referentnim izolatom -F podgrupe, uz podršku od 96% (Slika 25).

U okviru podklade II nalaze se izolati preostale četiri grupe fitoplazmi koje su registrovane u ovim istraživanjima. Izolati 16SrII-E podgrupe smešteni su u okviru bazalne grupe podklade zajedno sa 16SrXV-A podgrupom, ali kao odvojena grana od prethodno identifikovanih izolata koji su zabeleženi u okviru iste podgrupe u *Picris hieracioides* (PHBS) iz Srbije. Linije u okviru 16SrII grupe jasno su odvojene sa visokom podrškom. Izolati iz naše studije se grupišu sa izolatom *Italian alfalfa witches'- broom* (IAWB), dok referentni izolat 16SrII grupe (PEP) i već opisani izolat iz Srbije (PHBS) formiraju odvojenu liniju sa podrškom od 87% (Slika 25).



Izolati 16SrIII grupe fitoplazmi identifikovani u jedinkama *E. incisus* su identični sa nukleotidnim sekvencama dobijenim analizom simptomatskih biljaka *C. arvense*, *C. vulgare* i *C. acanthoides* i asimptomatskih *L. tuberosus* i *L. aphaca*, sa lokaliteta Dobanovci. Oni su deo najveće podklade u okviru 16SrIII klade. Podrške unutar same grupe su veoma niske (Slika 25).

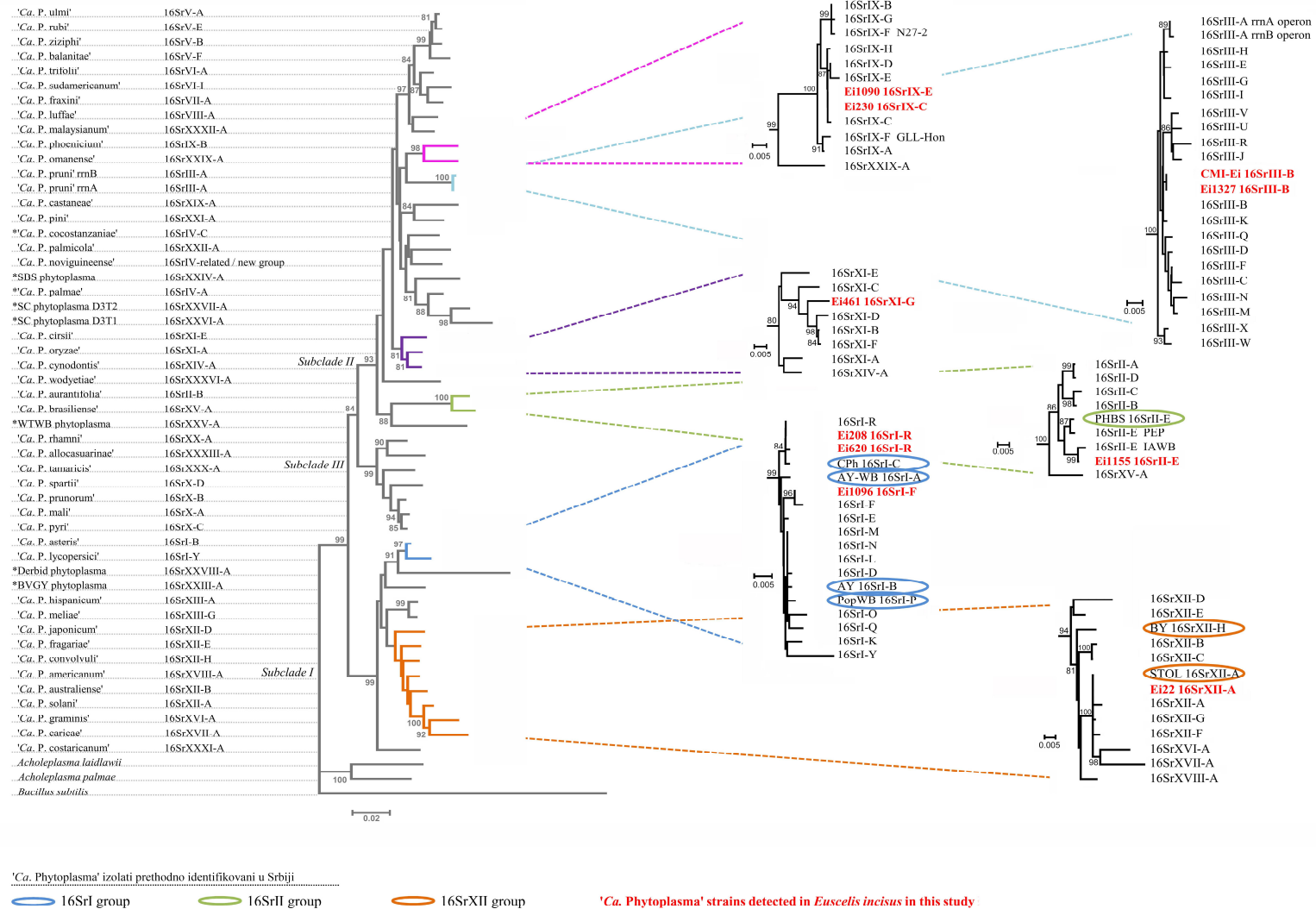
Podgrupe 16SrIX grupe se grupišu zajedno sa 16SrXXIX grupom, u okviru podklade II, s tim što postoji jasno razdvajanje sa najvećim nivoom podrške između ovih grupa. U okviru 16SrIX grupe, izolati iz naše studije, koji pripadaju –C i –E podgrupama grupišu se, sa podrškom od 87%, sa referentnim izolatima pomenutih podgrupa, kao i sa referentnim izolatima 16SrIX–D i –H podgrupe (Slika 25).

Prvi put identifikovana 16SrXI-G podgrupa formira odvojenu granu u okviru grupe koji čine 16SrXI i 16SrXIV grupa, a u kome se nalazi i ‘*Ca. Phytoplasma cynodontis*’ vrsta koja je zabeležena u Srbiji. Na osnovu grupisanja koje se vidi na stablu na slici 25, izolat iz Srbije pripada grupi čiju bazalnu granu čini 16SrXI-E podgrupa, odnosno ‘*Ca. Phytoplasma cirsii*’. Podrške za odvajanje glavnih grupa u okviru 16SrXI grupe su veoma niske.

4.9 Multilokusna (MLST) i epidemiološka karakterizacija izolata fitoplazmi detektovanih u populacijama vrste *E. incisus* i u testovima prenošenja

Osnovna identifikacija i karakterizacija izolata fitoplazmi identifikovanih u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus* i biljkama iz testova prenošenja je urađena na osnovu 16S rRNK genskog regiona. Genetičke varijacije na 16S rRNK genu su detaljno determinisane na osnovu *rpl22-rps3* i *secY* gena, dok su za izolate stolbur fitoplazme korišćena tri dodatna genetička lokusa: *tuf*, *stamp* i *vmp1* gen.

Multilokusna karakterizacija je vrlo korisna za potpuno razdvajanje izolata na podgrupe i tipove u okviru svakog gena, što daje dobru osnovu za detaljniji prikaz epidemiologije određene grupe i ‘*Ca. Phytoplasma*’ vrste. Izolati iz ovih istraživanja, iako pripadaju filogenetski veoma različitim grupama, podgrupama i vrstama, pokazuju bliske i srodne odnose sa izolatima koji vode poreklo iz nekoliko prirodnih domaćina: i) detelina (*Trifolium* spp.), lucerka (*M. sativa*), *Lathyrus* spp. i druge leguminoze; ii) *Picris echinoides* L. i *P. hieracioides*; iii) *C. arvense* (Carduinae) i iv) cikade.



Slika 25. Filogenetski odnosi među fitoplazmama različitih grupa i podgrupa detektovanih u *E. incisus* i 50 do sada opisanih ili predloženih *'Ca. Phytoplasma'* taksona.



4.9.1 16SrI ribozomalna grupa

Karakterizacijom na osnovu 16S rRNK gena, utvrđeno je da izolati iz jedinki *E. incisus* koji pripadaju 16SrI-F podgrupi formiraju zasebnu liniju sa referentnim izolatom 16SrI-F podgrupe, identifikovanim u cikadi iz Nemačke (CVB) i da su sa njim najrodniji, sa 99.8% sličnosti nukleotidnih sekvenci odnosno dva nukleotida razlike (Tabela 18, Slika 26). Izolati koji pripadaju 16SrI-R pokazuju dva različita obrasca nukleotidnih sekvenci. Izolati iz primeraka *E. incisus* sa lokaliteta Babin zub su identični sa referentnim izolatom –R podgrupe (StrawPhF) (Tabela 18), dok izolati iz jedinki *E. incisus* sa lokaliteta Jasenovik pokazuju jednu nukleotidnu razliku u odnosu na izolate sa Babinog zuba i referentnog izolata. Izolati koji pripadaju 16SrI-R podgrupi pokazuju sličnost od 99.8-99.9%, u poređenju sa *Cirsium yellows phytoplasma* (CirY, AF200431) identifikovanoj u *C. arvense* u Litvaniji i sa fitoplazmom pronađenoj u *Trifolium sativum* (Schreb.) Crome u Kanadi (CPh, AF222065). Naši izolati formiraju posebnu kladu na filogenetskom stablu sa referentnim izolatom 16SrI-R podgrupe i referentnim izolatom 16SrI-C podgrupe u koju spada i izolat iz deteline CPh (Tabele 18 i 23, Slika 26), sa podrškom od 73%.

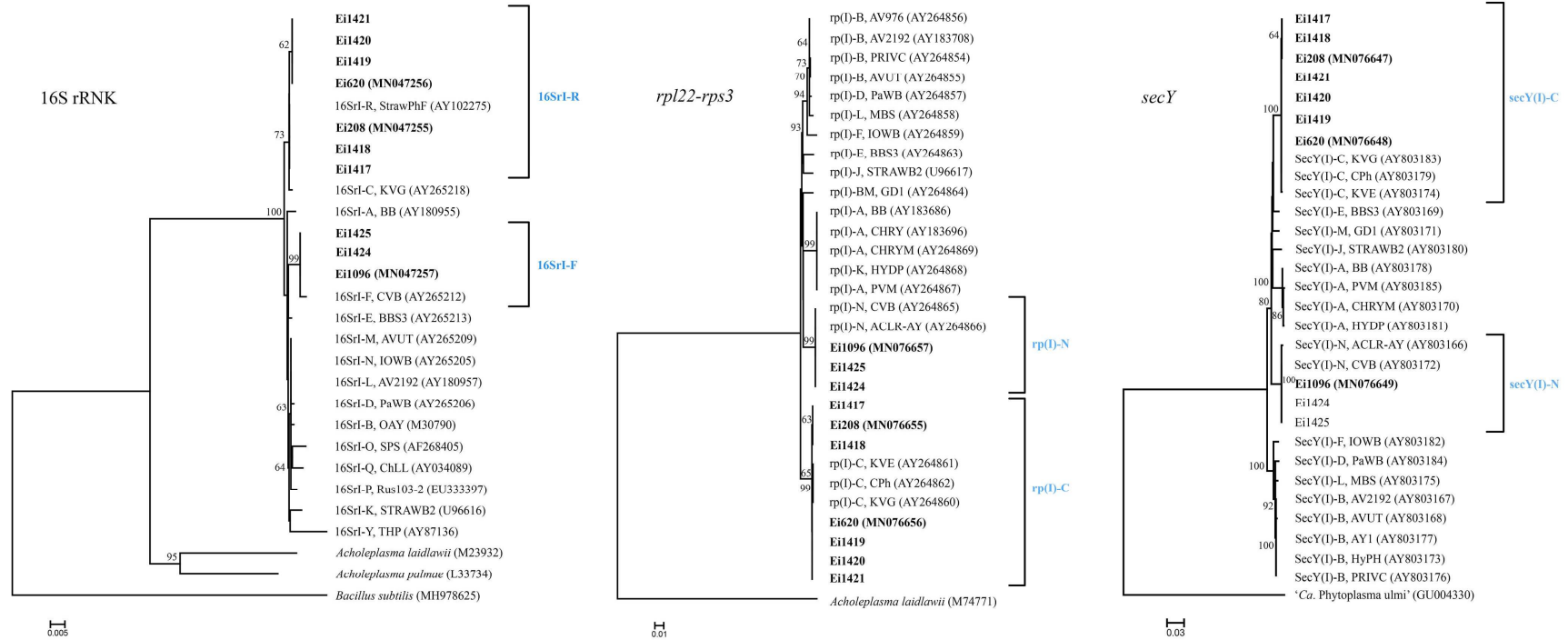
Karakterizacija na osnovu *rpl22-rps3* i *secY* gena je potvrdila pomenute nalaze. Prateći identifikaciju i karakterizaciju na osnovu 16S rRNK gena, identifikovane su dve *rp* grupe među izolatima pronađenim u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus*. Analiza *rpl22-rps3* gena na osnovu 1051 bp sekvenci izolata iz Srbije i referentnih izolata pokazala je da su sve sekvence 16SrI-F podgrupe međusobno identične, kao i da su identične sa sekvencom izolata iz cikade (CVB, AY264865), koji odgovara rp(I)-N ribozomalnoj podgrupi. Sekvence izolata jedinki *E. incisus* iz Jasenovika, koji pripadaju 16SrI-R podgrupi, pokazuju 99.9% sličnosti nukleotidnih sekvenci (1 nukleotidna razlika) sa izolatima fitoplazme identifikovane u *T. sativum* (CPh, AY264862), dok izolat poreklom iz *E. incisus* sa lokaliteta Babin zub pokazuje 99.8% sličnosti (2 nukleotidne razlike) sa drugim izolatom fitoplazme identifikovane u *T. repens* (*Clover phyllody phytoplasma*, KVG, AY264860). Svi izolati koji pripadaju 16SrI-R podgrupi odgovaraju rp(I)-C ribozomalnoj podgrupi na osnovu *rpl22-rps3* gena (Tabele 19 i 23, Slika 26).



Karakterizacija na osnovu 1211 bp sekvenci *secY* gena prati karakterizaciju na osnovu 16S rRNK i *rpl22-rps3* gena. Sekvence *secY* gena izolata koji pripadaju 16SrI-F podgrupi su identične, kako međusobno tako i sa referentnim izolatom iz cikade (CVB, AY803172) i odgovaraju *secY*(I)-N podgrupi (Tabele 18 i 23, Slika 26). Sekvence izolata identifikovanih u primercima *E. incisus* iz Jasenovika, koji pripadaju 16SrI-R podgrupi su 100% identični sa referentnim izolatom izolovanim iz biljke *T. sativum* (CPh, AY803179), dok izolati iz *E. incisus* sa lokaliteta Babin zub pokazuju 99.9% identiteta (1 nukleotidna razlika) sa pomenutim referentnim izolatom. Svi izolati koji pripadaju 16SrI-R podgrupi okarakterisani su na *secY* genu kao pripadnici *secY*(I)-C podgrupe (Tabele 18 i 23, Slika 26). Izolati iz Srbije koji pripadaju *secY*(I)-C podgrupi, formiraju odvojenu grupu sa podrškom od 100% sa referentnim izolatima *secY*(I)-C podgrupe. Takođe, naše sekvence koje pripadaju *secY*(I)-N podgrupi se jasno grupišu sa referentnim izolatima te podgrupe (Slika 26).

4.9.2 16SrII ribozomalna grupa

Nukleotidne sekvence 985 bp 16S rRNK gena izolata koji su srodni vrsti 'Ca. *Phytoplasma aurantifolia*' iz jedinki *E. incisus* sakupljenih na lokalitetu Vranje, međusobno su identične i pokazuju 99.8% (3 nukleotidne razlike) sličnosti sekvenci sa izolatom fitoplazme 16SrII grupe iz vrste *M. sativa* iz Italije (IAWB, EF193356). U odnosu na referentni izolat 16SrII grupe iz *P. echioides* (PEP), sličnost naših izolata iznosi 98.9% (14 nukleotidnih razlika) (Tabela 18), dok je u odnosu na izolat iz vrste *P. hieracioides* registrovan u Srbiji (PHBS, JQ743505) sličnost 99.2% (10 nukleotida razlike) (Slika 27). Naši izolati formiraju podkladu u okviru 16SrII-E podgrupe, sa izolatom IAWB, sa podrškom od 99%. (Slika 27).



Slika 26. Filogenetska stabla konstruisana na osnovu 16S rRNK, *rpl22-rps3* i *secY* gena 16SrI ribozomalne grupe fitoplazmi, detektovane u primercima *E. incisus*. Podrške ispod 50% nisu prikazane. Pristupni brojevi u NCBI banci gena su dati u zagradama.

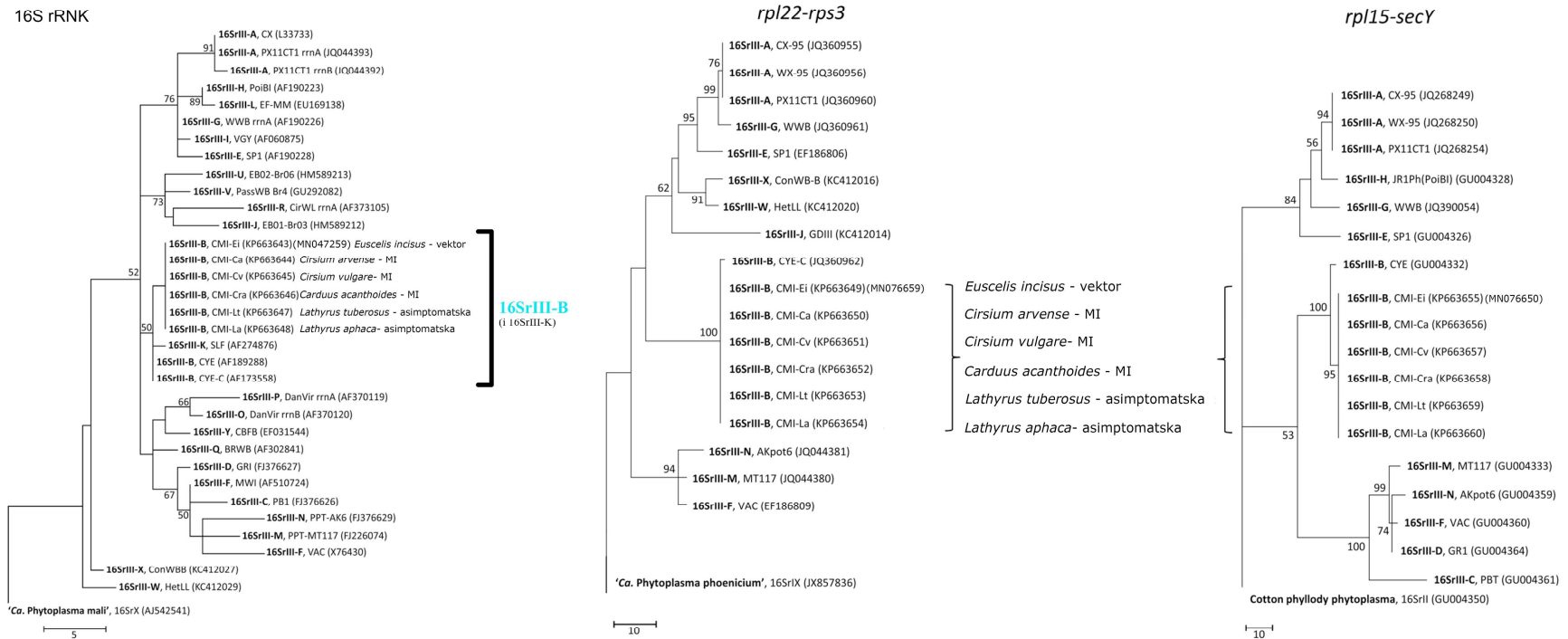


Analizirani genski markeri su pokazivali različite nivoe varijabilnosti. Filogenetskom analizom 1169 bp 16S rRNK gena 'Ca. Phytoplasma pruni'-srodnih sojeva utvrđeno je da su sekvence svih izolata iz prirodno inficiranih jedinki *E. incisus* i zaraženih biljaka *C. arvense*, *C. vulgare*, *C. acanthoides*, *L. tuberosus* i *L. aphaca*, međusobno identične. Takođe, izolati iz Srbije pokazuju 99.7% sličnosti sa referentnim izolatom 16SrIII grupe (CYE) koji je poreklom iz *T. repens* iz Litvanije (Tabela 18, Slika 28). Sa podrškom od 50%, naši izolati formiraju grupu sa referentnim izolatima 16SrIII-B i 16SrIII-K podgrupe.

Parcijalne sekvence 1024 bp *rpl22-rps3* gena identifikovanog u izolatima iz Srbije pokazuju 99.9% sličnosti (1 nukleotidna razlika) sa izolatom iz deteline u Kanadi (CYE-C, JQ360962) i time odgovaraju ribozomalnoj subkladi *iv* (Martini i sar., 2007) i rp(III)-B ribozomalnoj podgrupi (Tabele 18 i 23, Slika 28). Ovaj nalaz dodatno potvrđuje pripadnost izolata iz Srbije 16SrIII-B podgrupi. Sa podrškom od 100%, naši izolati se klastiraju sa referentnim izolatom rp(III)-B podgrupe (Slika 28).

Kompletne sekvence od 1491 bp *rpl15-secY* gena izolata iz Srbije međusobno su identične i pokazuju 99.6% sličnosti (5 nukleotidnih razlika) sekvenci sa izolatom iz deteline (CYE, GU004332) i time odgovaraju secY(III)-B podgrupi (Tabele 18 i 23). Sa podrškom od 100% naši izolati se klastiraju sa referentnim izolatom secY(III)-B podgrupe (Slika 28).

Poredeći filogenetske odnose između sva tri gena, topologija dobijenih stabala je bila slična i izolati iz Srbije su se grupisali sa referentnim izolatom 16SrIII-B podgrupe (CYE) koji potiče iz biljke *Trifolium* spp. iz Kanade i Litvanije (Slika 28).



Slika 28. Filogenetska stabla konstruisana na osnovu 16S rRNK, *rpl22-rps3* i *rpl15-secY* gena 16SrIII ribozomalne grupe fitoplazmi, detektovane u primercima *E. incisus* i u eksperimentalnim biljkama na kojima su se hranili prirodno inficirani primerci. Podrške ispod 50% nisu prikazane. Pristupni brojevi u NCBI banci gena su dati u zagradama.



4.9.4 16SrIX ribozomalna grupa

Fitoplazma 16SrIX grupe je identifikovana u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus* sakupljenim na lokalitetima Donji Milanovac i Vranje, kao i u biljkama *C. intybus* i *K. arvensis* sakupljenim u Donjem Milanovcu. U testovima prenošenja, ova grupa fitoplazmi nije identifikovana u biljnom materijalu.

U okviru 'Ca. *Phytoplasma phoenicium*'-srodnih sojeva, članovi 16SrIX-C podgrupe identifikovani u jedinkama *E. incisus* i biljnom materijalu (*C. intybus* i *K. arvensis*) sa lokaliteta Donji Milanovac, pokazuju međusobno identične 16S rRNK sekvence i 99.9% sličnosti sekvenci (3 nukleotidne razlike) sa PEY fitoplazmom (Y16389) (Tabela 18, Slika 29).

Na osnovu analize 987 bp 16S rRNK regiona utvrđeno je da izolati identifikovani u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus* sa lokaliteta Vranje, pripadaju 16SrIX-E podgrupi i pokazuju 99.6% sličnosti sekvenci (5 nukleotidnih razlika) sa referentnim izolatom 16SrIX-E podgrupe (JunWB) (Tabela 18, Slika 29). Izolati iz Srbije, zajedno sa odgovarajućim referentnim podgrupama, formiraju posebnu liniju, ali sa niskom podrškom (Slika 29).

Analizama je obuhvaćeno 1062 bp sekvence *rpl22* i *rps3* gena. Utvrđeno je da su sekvence izolata 16SrIX-C podgrupe 100% identične sa italijanskim izolatom PEP dobijenim iz kolekcije fitoplazmi u okviru INRA Bordo, Francuska (KJ806629) i 99.8% slične (2 nukleotidne razlike) sa referentnim izolatom *Periwinkle virescence* fitoplazma iz Italije (NaxY, JN712782) koje pripadaju rp(IX)-C1 ribozomalnoj podgrupi (Tabela 18, Slika 29). Sekvence izolata 16SrIX-E podgrupe pokazuju sličnost od 98.1% sa referentnim izolatom fitoplazme iz borovnice u Sjedinjenim Američkim Državama (*Blueberry stunt phytoplasma*, BBS3NJ, JN712787) koji pripada rp(IX)-E2 ribozomalnoj podgrupi. Zasnovano na rekonstrukciji filogenetskih odnosa (Slika 29) i RFLP koeficijenta sličnosti, naši izolati 16SrIX-E podgrupe formiraju odvojenu liniju u okviru rp(IX)-E izolata ribozomalnih podgrupa i zbog toga su okarakterisani kao članovi nove rp(IX)-E3 podgrupe (Tabele 18, 19 i 23, Slika 29). Naš izolat rp(IX)-E podgrupe formira jasno izdvojenu kladu sa svim izolatima -E podgrupe, sa podrškom od 95%, dok sa podrškom od 100%, referentni izolati -C podgrupe i naši izolati koji pripadaju pomenutoj podgrupi, formiraju posebnu kladu (Slika 29).



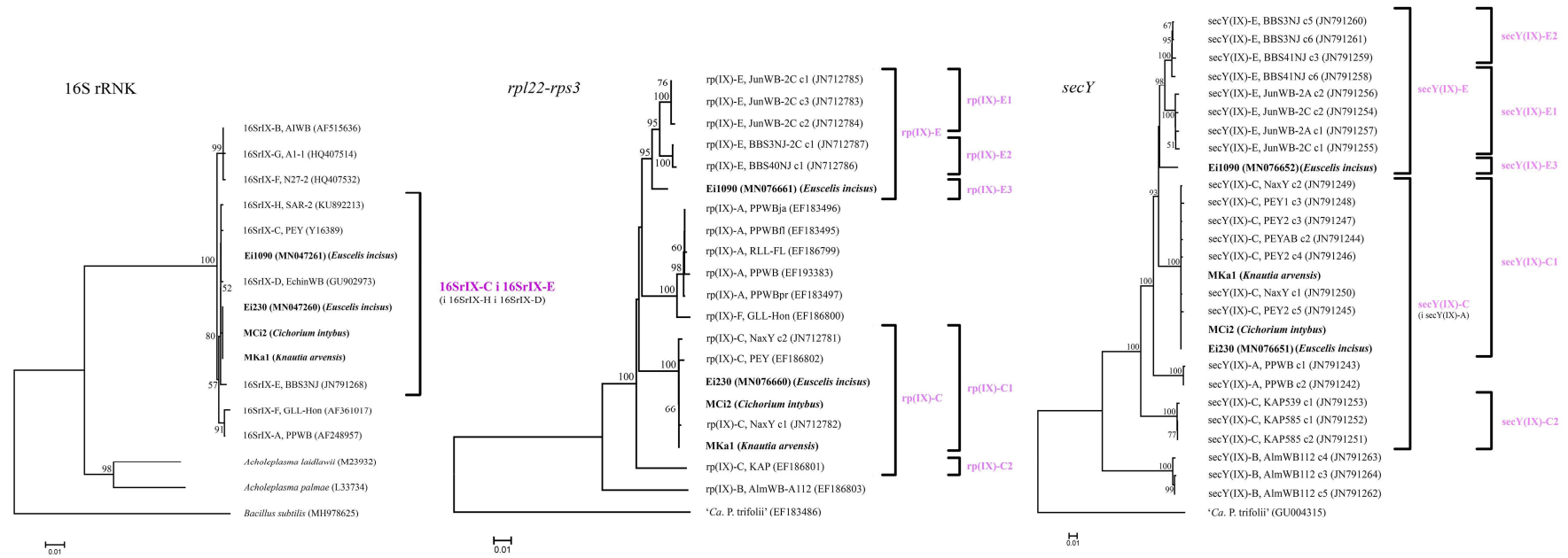
Tabela 19. RFLP koeficijent sličnosti između izolata iz jedinki *E. incisus* i referentnih izolata rp(IX)-E podgrupe.

Izolat	rp podgrupa	Pristupni broj	RFLP koeficijent sličnosti	
1 JunWB-2C c1	rp(IX)-E1	JN712785		
2 BBS3NJ c1	rp(IX)-E2	JN712787	0.92	
3 Ei1090	rp(IX)-E3	MN076661	0.87	0.85

Poređenjem 1215 bp sekvenci *secY* gena, izolati 16SrIX-C podgrupe pokazuju sličnost sekvenci od 99.9% (1 nukleotidna razlika) sa izolatima klona 3 referentnog izolata *P. echioides* iz Italije (PEY2c3, JN791247) koji pripadaju secY(IX)-C1 podgrupi (Tabela 18, Slika 29). Kompletne *secY* sekvence 16SrIX-E podgrupe imaju najveću sličnost (95.5%) sa klonom 5 referentnog izolata iz borovnice (BBS3NJc5, JN791260) koji pripada secY(IX)-E2 podgrupi. Na osnovu filogenetske rekonstrukcije izolati 16SrIX-E podgrupe iz Srbije formiraju odvojenu granu blisku kladi secY(IX)-E podgrupa E1 i E2 i zbog toga su okarakterisani kao članovi nove secY(IX)-E3 podgrupe (Tabele 18, 20 i 23, Slika 29). Naš izolat secY(IX)-E podgrupe formira jasnu liniju sa svim izolatima -E podgrupe, ali sa niskom podrškom, dok sa podrškom od 100%, referentni izolati -C podgrupe i naši izolati koji pripadaju pomenutoj podgrupi, formiraju posebnu liniju (Slika 29).

Tabela 20. RFLP koeficijent sličnosti između izolata iz jedinki *E. incisus* i referentnih izolata secY(IX)-E podgrupe.

Izolat	secY podgrupa	Pristupni broj	RFLP koeficijent sličnosti	
1 JunWB-2C c1	secY(IX)-E1	JN791255		
2 BBS3NJ c5	secY (IX)-E2	JN791260	0.86	
3 Ei1090	secY (IX)-E3	MN076652	0.62	0.61



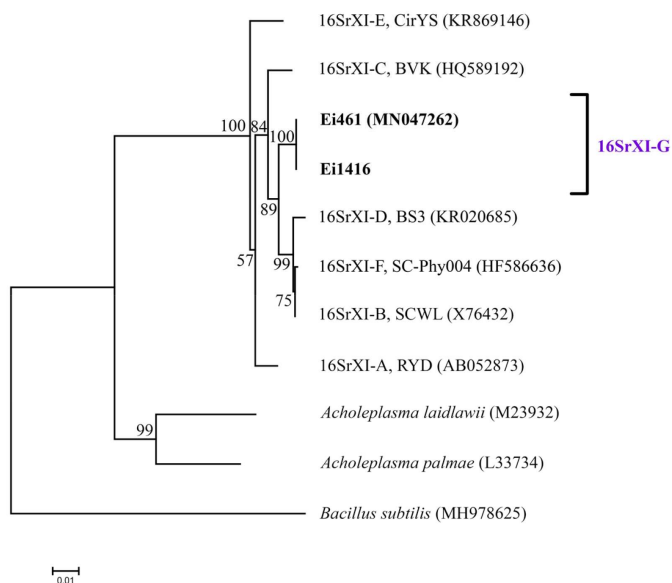
Slika 29. Filogenetska stabla konstruisana na osnovu 16S rRNK i *rpl22-rps3* i *secY* gena 16SrIX ribozomalne grupe fitoplazmi, detektovane u primercima *E. incisus* i u eksperimentalnim biljkama na kojima su se hranili prirodno inficirani primerci. Podrške ispod 50% nisu prikazane. Pristupni brojevi u NCBI banci gena su dati u zagradama.



4.9.5 16SrXI ribozomalna grupa

Analiza podgrupe 16SrXI-G, srodne vrsti '*Ca. Phytoplasma oryzae*' urađena je na osnovu 982 bp 16S rRNK gena. Naši izolati novoidentifikovane podgrupe su međusobno identični na 16S rRNK genu i pokazuju najveću srodnost sa referentnim izolatom 16SrXI-C podgrupe (BVK), sa kojom dele 98.2% sličnosti sekvenci (Tabela 18). Ovi izolati formiraju odvojenu grupu sa referentnim izolatima -D, -F i -B podgrupe i izolatom BVK kao bazalnim za celu grupu, sa podrškom od 84%. Potvrđena je i filogenetska povezanost sa izolatom '*Ca. Phytoplasma cirsii*' fitoplazme koja pripada 16SrXI-E podgrupi i koja je u asocijaciji sa vrstom *C. arvensis* (Slika 30).

Dva izolata koja pripadaju 16SrXI-G podgrupi su umnožena samo na 16S rRNK genu (Tabele 18 i 23). Umnožavanje drugih gena nije dobijeno, verovatno zbog jedinstvenosti sekvence i nesposobnosti prajmera i protokola da umnože diverzitetne izolate fitoplazmi.



Slika 30. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu 16S rRNK gena 16SrXI ribozomalne grupe fitoplazmi detektovane u primercima *E. incisus*. Podrške ispod 50% nisu prikazane. Pristupni brojevi u NCBI banci gena su dati u zagradama.

4.9.6 16SrXII ribozomalna grupa

Karakterizacija izolata '*Ca. Phytoplasma solani*' je obuhvatala 18 izolata identifikovanih u jedinkama *E. incisus* sakupljenih na pet različitih lokaliteta, kao i 16 izolata identifikovanih u biljkama na kojima su inokulaciju vršili primerci *E. incisus* sa lokaliteta Topola, Jasenovik, Dobanovci i Negotin (Tabele 21 i 22).



Analizom 987 bp 16S rRNK gena, utvrđeno je da svi izolati iz naše studije imaju identične nukleotidne sekvence i svi pripadaju 16SrXII-A podgrupi. Sa podrškom od 100%, izolati iz Srbije formiraju grupaciju sa referentnim izolatima –A, -F i –G podgrupe (Slika 31).

Analiza sekvenci *rpl22-rps3* gena, pokazala je da 'Ca. Phytoplasma solani' izolati identifikovani u jedinkama *E. incisus* sa različitih lokaliteta kao i u eksperimentalnim biljkama na kojima su bili primerci *E. incisus* sa terena, pripadaju istoj podgrupi, rp(XII)-A (Tabele 21, 22 i 23).

Prema *tuf/secY/vmp1/stamp* klasifikaciji, dva multilokusna genotipa stolbur fitoplazme su identifikovana među primercima *E. incisus* sakupljenim na terenu. Prvi je STOLg (*tuf*-b/STOL/V2-TA/STOL), identifikovan u 15/18 jedinki *E. incisus*, koje su bile pozitivne na prisustvo stolbur fitoplazme (Tabele 18 i 22, Slika 32). Ovaj genotip je pronađen na četiri lokaliteta: Dobanovci, Bela Crkva, Negotin i Jasenovik. Drugi genotip je Rqg31g (*tuf*-b/GGY/V2-TA/Rqg31) koji je pronađen u 3/18 stolbur pozitivnih jedinki *E. incisus* sakupljenih na terenu (Tabele 18 i 22, Slika 32). Sve tri jedinke u kojima je bio prisutan ovaj genotip sakupljane su u vinogradu u Topoli.

U 6 od 7 stolbur pozitivnih perivinki na kojima su bile jedinke *E. incisus* sakupljane na lokalitetu Topola, uspešno su se umnožila 3 gena: *secY*, *vmp1* i *stamp*. Karakterizacijom na osnovu ovih gena utvrđeno je prisustvo GGY/V2-TA/STOL genotipa. Jedna perivinka okarakterisana je na *vmp1* (V2-TA) i *stamp* genu (STOL tip sa jednom nukleotidnom razlikom), dok se *secY* gen nije umnožio. U 2 od 4 stolbur pozitivne perivinke na kojima su se hranile jedinke *E. incisus* sakupljene na lokalitetu Jasenovik, identifikovan je genotip STOLg (*tuf*-b/STOL/V2-TA/STOL) (Tabela 21, Slika 32). Kod preostale 2 perivinke, identifikovan je isti tip na *secY* genu i dva tipa na *stamp* genu: Rqg31 i STOL tip sa dve nukleotidne razlike, a *vmp1* gen nije umnožen (Tabela 21). U poponcu na kome su se hranile jedinke *E. incisus* iz Jasenovika utvrđeno je prisustvo STOL tipa na *secY* genu i Rqg50 tipa sa 1 nukleotidnom razlikom na *stamp* genu. Ostali geni nisu umnoženi za ovaj uzorak. U perivinki na kojoj su se hranili primerci *E. incisus* iz Dobanovaca identifikovan je Rqg31g (*tuf*-b/GGY/V4/Rqg31) (Tabela 21, Slika 32). U 3 stolbur pozitivne perivinke na kojima su se hranile jedinke *E. incisus* sakupljene u Negotinu utvrđeno je prisustvo genotipa STOLg (*tuf*-b/STOL/V2-



TA/STOL) (Tabela 21, Slika 32) koji je bio najčešće prisutan u primercima *E. incisus* (15/18 jedinki).

Tabela 21. Karakterizacija eksperimentalnih biljaka pozitivnih na prisustvo stolbur fitoplazme na kojima su bile jedinke *E. incisus* sakupljane u prirodi.

Šifra uzorka	Biljna vrsta	Lokalitet	16S rRNK	<i>rpl22-rps3</i>	<i>secY</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i> *	<i>tuf</i>
MW42	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	STOL	V2-TA	-
MW164	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	STOL	V2-TA	-
MW165	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	STOL	V2-TA	-
MW103	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	-	STOL (1nt)	V2-TA	-
MW108	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	STOL	V2-TA	-
MW166	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	STOL	V2-TA	-
MW167	<i>Catharanthus roseus</i>	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	STOL	V2-TA	-
MW49	<i>Catharanthus roseus</i>	Jasenovik	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	Rqg31	-	<i>tuf-b</i>
MW50	<i>Catharanthus roseus</i>	Jasenovik	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL (2nt)	-	-
MW113	<i>Catharanthus roseus</i>	Jasenovik	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf-b</i>
MW114	<i>Catharanthus roseus</i>	Jasenovik	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf-b</i>
MCon10	<i>Convolvulus arvensis</i>	Jasenovik	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	Rqg50 (1nt)	-	-
MW58	<i>Catharanthus roseus</i>	Dobanovci	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	Rqg31	V4	<i>tuf-b</i>
MW168	<i>Catharanthus roseus</i>	Negotin	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf-b</i>
MW169	<i>Catharanthus roseus</i>	Negotin	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf-b</i>
MW170	<i>Catharanthus roseus</i>	Negotin	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf-b</i>

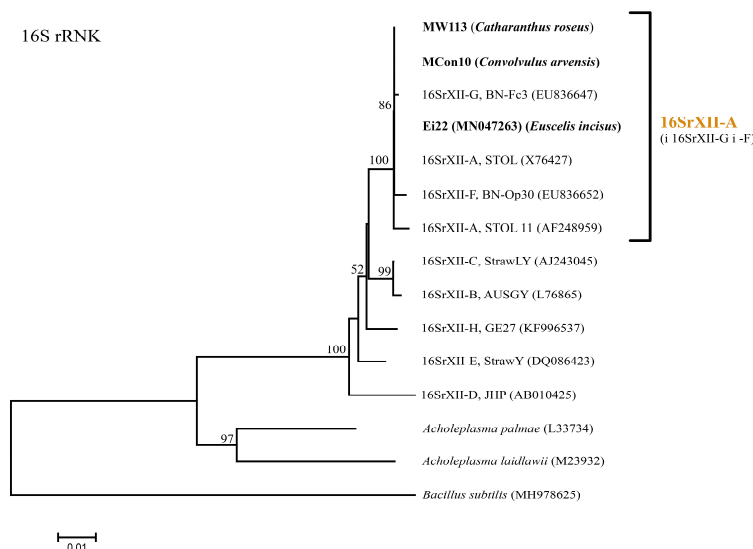
* *vmp1* profil je određen na osnovu opisanih RFLP profila prema Murolo i sar. (2010; 2013), korišćenjem *RsaI* enzima. Profil V2-TA je potvrđen na osnovu digestije korišćenjem *TaqI* i *AluI* restrikcionih enzima (Cvrković i sar., 2014) (Slika 32).



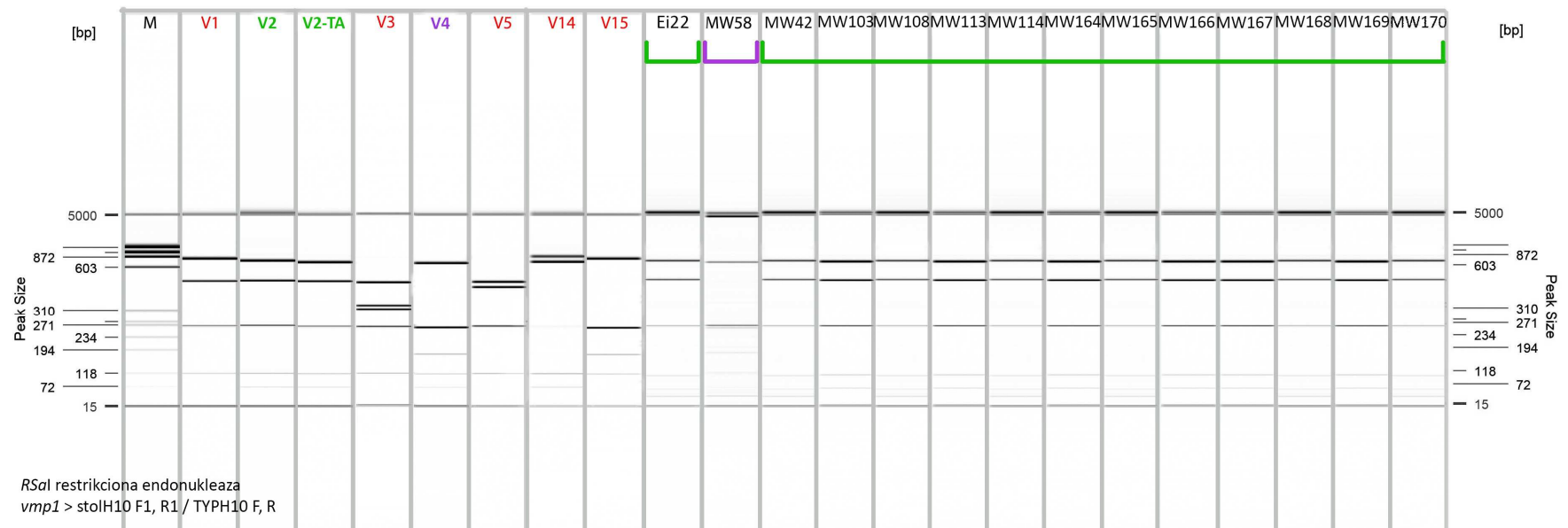
Tabela 22. Karakterizacija primeraka *E. incisus* pozitivnih na prisustvo stolbur fitoplazme sakupljenih u prirodi.

Šifra uzorka	Lokalitet	16S rRNK	<i>rpl22-rps3</i>	<i>secY</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i> *	<i>tuf</i>
Ei193	Dobanovci	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1414		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1332	Bela Crkva	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei12715		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei22	Negotin	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei191		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei192		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei194		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei196		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1261		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1426	Jasenovik	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei616		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1330		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1427	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei14280		16SrXII-A	rpXII-A	STOL	STOL	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei625	Topola	16SrXII-A	rpXII-A	GGY	Rqg31	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1331		16SrXII-A	rpXII-A	GGY	Rqg31	V2-TA	<i>tuf</i> -b
Ei1415		16SrXII-A	rpXII-A	GGY	Rqg31	V2-TA	<i>tuf</i> -b

* *vmp1* profil je određen na osnovu opisanih RFLP profila prema Murolo i sar. (2010; 2013), korišćenjem *RsaI* enzima. Profil V2-TA je potvrđen na osnovu digestije korišćenjem *TaqI* i *AluI* restrikcionih enzima (Cvrković i sar., 2014) (Slika 32).



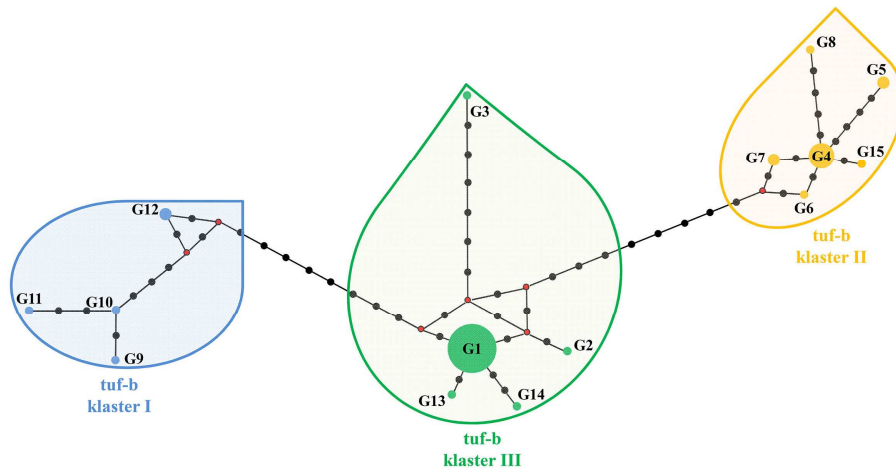
Slika 31. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu 16S rRNK gena 16SrXII ribozomalne grupe fitoplazmi detektovane u primercima *E. incisus* i u eksperimentalnim biljkama na kojima su se hranili prirodno inficirani primerci. Podrške ispod 50% nisu prikazane. Pristupni brojevi u NCBI banci gena su dati u zagradama.



Slika 32. RFLP digestija *vmp1* gena uzoraka pozitivnih na prisustvo stolbur fitoplazme pomoću *RSaI* restrikcione endonukleaze. RFLP profili jedinki *E. incisus* su identični, pa je na slici predstavljan samo jedan izolat, Ei22. Izolati eksperimentalnih perivinki na kojima su bili prirodno inficirani primerci *E. incisus* obeleženi su oznakama MW42-MW170.



Formiranje genotipskih mreža koristeći programe TCS 2.1 i NETWORK 4.6. je pokazalo identične obrasce klasifikacije, te su u daljem tekstu prikazani rezultati dobijeni *median-joining* metodom kalkulacije (Slika 33). Ukupno je u analizu uključeno 60 sekvenci *stamp* gena, ukupne dužine od 495 baznih parova. U finalnom poravnanju sekvenci, utvrđene su razlike u nukleotidnom sastavu, pa je nakon isključenja nedostajućih mesta (engl. *gaps*), dužina *stamp* sekvenci uključenih u analizu iznosila 474 bazna para. Među 60 analiziranih *stamp* sekvenci, ukupno je utvrđeno 15 genotipova (G1-G15). Svi analizirani uzorci pripadaju grupacijama II i III *tuf-b* tipa (Slika 33). U okviru genotipa G1 grupisao se najveći broj analiziranih izolata, ukupno 34. Sledi genotip G4 sa 10 izolata, zatim G5, G7 i G12 sa po dva izolata i genotipovi G2, G3, G6, G8, G9, G10, G11, G13, G14 i G15 sa po jednim izolatom. Najveći broj izolata originalno sakupljenih iz jedinki *E. incisus* i test biljaka izloženih vektoru pripada genotipu G1 (26/34) (MW42, MW164, MW165, MW108, MW166, MW167, MW113, MW114, MW168, MW169, MW170, Ei193, Ei1414, Ei1332, Ei12715, Ei22, Ei191, Ei192, Ei194, Ei196, Ei1261, Ei1426, Ei616, Ei1330, Ei1427, Ei1428) i ovi izolati su identični referentnim izolatima iz studije Cvrković i sar. (2014) (Rpq39, Rpm34, Rqg60, Rpm5, Rpq11, Vv21, GR328, STOL). Genotip G13 kome pripada analizirani uzorak perivinke (MW103) pokazuje jednu nukleotidnu razliku u odnosu na uzorke genotipa G1, dok uzorak MW50 koji pripada genotipu G14 pokazuje dve nukleotidne razlike u odnosu na G1. U okviru genotipova G2 i G3, unutar grupe III nema analiziranih uzoraka *stamp* gena dobijenih iz jedinki *E. incisus*, kao iz test biljaka. Unutar grupe II, analizirani uzorci perivinki (MW49, MW58) i jedinki *E. incisus* (Ei625, Ei1331, Ei1415) pripadaju G4 genotipu, zajedno sa referentnim izolatima Rqg31, Rqg50, Rpg47, Vv17 i Vv5 (Cvrković i sar., 2014). Dodatno, unutar grupe II se nalazi i genotip G15 kome pripada izolat dobijen iz biljke *C. arvensis* koji pokazuje jednu nukleotidnu razliku u odnosu na genotip G4. Unutar grupe II nalaze se i genotipovi G5, G6, G7 i G8, ali njima ne pripada nijedan analizirani uzorak biljaka ili jedinki *E. incisus*. Klastiranje u potpunosti odgovara rezultatima dobijenim u Cvrković i sar. (2014).



Cvrković i sar. (2014)

- G1** > Rpq39, Rpm34, Rqg60, Rpm5, Rpg11, Vv21, GR328, STOL
- G2** > P7
- G3** > Rpm35
- G4** > Rqg31, Rqg50, Rpg47, Vv17, Vv5
- G5** > NGA9, GGY
- G6** > Vv24
- G7** > BG4560, Rqg42
- G8** > L646
- G9** > STOLBUR C
- G10** > PO
- G11** > LG
- G12** > G299, L973

Izolati istraživanja ovog doktorata

- G1** > MW42, MW164, MW165, MW108, MW166, MW167, MW113, MW114, MW168, MW169, MW170, Ei193, Ei1414, Ei1332, Ei12715, Ei22, Ei191, Ei192, Ei194, Ei196, Ei1261, Ei1426, Ei616, Ei1330, Ei1427, Ei1428
- G4** > MW49, MW58, Ei625, Ei1331, Ei1415
- G13** > MW103
- G14** > MW50
- G15** > MCon10

Slika 33. Median-joining mreža stamp genotipova stolbur fitoplazme. Krugovi predstavljaju stamp genotipove [G1 – G15]. Crne tačke su mutacije odnosno pojedinačne nukleotidne razlike između genotipova. Crvene tačke su vektori odnosno nedostajući genotipovi. Veličina kruga odgovara broju izolata koji dele isti genotip. Ispod mreže navedeni su referentni izolati preuzeti iz Cvrković i sar. (2014) i originalni izolati iz disertacije i njihovo grupisanje u okviru određenih genotipova.



Tabela 23. Pristupni brojevi izolata fitoplazmi iz primeraka *E. incisus*, eksperimentalnih biljaka na kojima su se hranili prirodno inficirani primerci i biljaka sakupljenih iz prirode, okarakterisani na više različitih genskih lokusa.

' <i>Ca. Phytoplasma</i> ' vrsta	16Sr grupa	Lokalitet	Izolat	16S rRНК	Pristupni broj	rpl22-rps3	Pristupni broj	secY	Pristupni broj	stamp	Pristupni broj	tuf	Pristupni broj
' <i>Ca. P. asteris</i> '-srodni soj	16SrI	Vranje	Ei1096	16SrI-F	MN047257	rp(I)-N	MN076657	secY(I)-N	MN076649	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
			Ei1424										
		Babin zub	Ei1425	16SrI-R	MN047255	rp(I)-C	MN076655	secY(I)-C	MN076647	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
			Ei208										
Jasenovik	Ei1417	16SrII-E	MN047256	MN076656	MN076648	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
	Ei1418												
' <i>Ca. P. aurantifolia</i> '-srodni soj	16SrII	Vranje	Ei620	16SrII-E	MN047258	rp(II)-E2	MN076658	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
			Ei1419										
			Ei1420										
' <i>Ca. P. pruni</i> '-srodni soj	16SrIII	Dobanovci	Ei1421	16SrIII-B	MN047259	rp(III)-B	MN076659	secY(III)-B	MN076650	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
			Ei1155										
			Ei1170										
			Ei1217										
			Ei1219										
			Ei1327										
			Ei1328										
			Ei1329										
CMI-Ei	KP663643	KP663649	KP663655										
CMI-Ca	KP663644	KP663650	KP663656										
CMI-Cv	KP663645	KP663651	KP663657										
CMI-Cra	KP663646	KP663652	KP663658										
CMI-Lt	KP663647	KP663653	KP663659										
CMI-La	KP663648	KP663654	KP663660										
' <i>Ca. P. phoenicium</i> '-srodni soj	16SrIX	Donji Milanovac	Ei230	16SrIX-C	MN047260	rp(IX)-C1	MN076660	secY(IX)-C1	MN076651	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
			Ei1412										
		Ei1413											
		MCi2											
Vranje	MKa1	16SrIX-E	MN047261	rp(IX)-E3	MN076661	secY(IX)-E3	MN076652	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
	Ei178												
	Ei1090												
	Ei1167												
Ei1422													
Ei1423													



'Ca. Phytoplasma' vrsta	16Sr grupa	Lokalitet	Izol	16S rRNK	Pristupni broj	rpl22-rps3	Pristupni broj	secY	Pristupni broj	stamp	Pristupni broj	tuf	Pristupni broj
'Ca. P. oryzae'-srodni soj	16SrXI	Donji Milanovac	Ei461	16SrXI-G	MN047262	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
			Ei1416										
		Dobanovci	Ei193										
			Ei1414										
		Bela Crkva	Ei1332										
			Ei12715										
		Negotin	Ei22										
			Ei191										
			Ei192										
			Ei194										
Ei196	STOL11 (STOL)		MN076653	STOL	MN076644	tuf-b	MN076646						
Ei1261													
Ei1426													
Ei616													
Ei1330													
Ei1427													
Ei1428													
MW113													
Jasenovik	MCon10	16SrXII-A	MN047263	rp(XII)-A	MN076662	-	-						
	Ei625												
	Ei1331												
Topola	Ei1415	GGY	MN076654	Rqg31	MN076645	tuf-b	MN076646						

n.a. - nije analizirano

-- nije umnoženo



DISKUSIJA



5. DISKUSIJA

5.1 Biologija i rasprostranjenje vrste *E. incisus*

E. incisus je polifagna, široko rasprostranjena vrsta zapadnog Palearktika. Može se naći na sunčanim, vlažnim ili umereno suvim staništima, od napuštenih livada i pašnjaka, preko ruderalnih staništa, pa sve do agroekosistema i urbanih sredina (Nickel, 2003). Često je prisutna u agroekosistemima, kao što su vinogradi (Cvrković i sar., 2011; Orságová i sar., 2011; Mazzoni i sar., 2001), kukuružišta (Jović i sar., 2009b) i zasadi krompira (Mitrović i sar., 2016; Girsova i sar., 2016).

Prvi podaci navode da jedinke *E. incisus* prezimljavaju u poslednjim larvenim stupnjevima (Brčák, 1979), dok prema podacima Nickel (2003), ova cikada prezimljava u trećem ili četvrtom larvenom stupnju ili u stadijumu jajeta, dok ostali larveni stupnjevi i adulti uginu tokom kasne jeseni. Ovi podaci su vezani za centralnu Evropu i razlikuju se od podataka dobijenih istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije, u kojima je utvrđeno da populacije iz jugoistočne Evrope pretežno prezimljavaju kao adulti. Naime, vrsta *E. incisus* se u Srbiji javlja od kraja marta pa sve do novembra. Jedinke koje su prezimlele i koje se pojavljuju već tokom marta, predstavljaju zimsku generaciju koja polaganjem jaja daje narednu, letnju generaciju. Letnja generacija je zastupljena tokom najtoplijeg i najsunčanijeg dela godine, od juna pa sve do septembra, i nju karakteriše svetlija obojenost tela. Pošto je pojava generacija i različite obojenosti tela uslovljena temperaturom i dužinom dana, kod populacija vrste *E. incisus* u Srbiji se javlja preklapanje generacija tokom juna meseca. Tada postepeno raste broj jedinki letnje generacije, ali još uvek ima i primeraka zimske generacije. Sa snižavanjem temperature početkom jeseni, jedinke zimske generacije postaju brojnije i dominantnije i kao adulti odlaze na prezimljavanje, da bi dali narednu generaciju sledeće godine. Letnju i zimsku generaciju karakteriše različita obojenost (svetlije obojena letnja i tamnije obojena zimska generacija) i izražene razlike u morfologiji kopulatornih struktura mužjaka.

Iako je *E. incisus* polifagna vrsta, tokom naših istraživanja jasno je uočena preferentnost ove cikade prema određenim biljnim vrstama u mešovitim ekosistemima. To se pre svega ogleda u formiranju agregacija na biljkama porodice Fabaceae, na kojima je sakupljen najveći broj jedinki na svim lokalitetima (Jakovljević i sar., 2015).



5.2 Epidemiološki ciklusi različitih vrsta i grupa fitoplazmi u kojima učestvuje cikada *E. incisus*

Zbog široke rasprostranjenosti vrste *E. incisus*, prisutnosti u različitim ekosistemima, visoke brojnosti populacija zimske i letnje generacije čime je praktično stalno prisutna na staništima tokom godine, kao i naglašene polifagnosti, ova vrsta je veoma pogodna za uspostavljanje kontakta sa različitim fitoplazmama koje inficiraju različite biljne vrste.

Jedinstvena biologija fitoplazmi koja im omogućava da se uspešno umnožavaju u biljnim i insekatskim domaćinima, pretpostavlja postojanje različitih, ali prilagodljivih interakcija sa domaćinima koje dovode do promena biljnih fenotipova, insekata vektora i same okoline (Christensen i sar., 2005; Tomkins i sar., 2018). Nedavne studije nagoveštavaju veliku sposobnost obligatnih patogena kao što su fitoplazme, da menjaju i manipulišu svojim eukariotskim domaćinima, da bi time osigurale svoje širenje (Hogenhout i sar., 2008; Oshima i sar., 2011; Orlovskis i sar., 2015). Iz tog razloga navode se brojne koevolutivne interakcije patogena i domaćina, koje međutim, još uvek nisu jasno definisane ili razjašnjene (Beanland i sar., 2000; Bressan i sar., 2006).

Prethodno dokazana prirodna i eksperimentalna vektorska uloga vrste *E. incisus*, ukazivala je na njegovu multipotentnost, odnosno sposobnost da nosi i/ili prenosi različite fitoplazme (Conti i sar., 1988; Alma i sar., 2001; Bressan i sar., 2006; Bosco i sar., 2007; Ivanauskas i sar., 2014; Girsova i sar., 2016). U skladu sa tim, rezultati ovih istraživanja ukazali su na visoku filogenetsku raznolikost fitoplazmi povezanih sa vrstom *E. incisus*. Zbog toga, ova cikada predstavlja bitnu kariku u epidemiologiji, širenju i održavanju izvornih infekcija fitoplazmama u prirodnim ekosistemima.

U našim istraživanjima utvrđeno je prisustvo ukupno šest 16Sr grupa i osam podgrupa fitoplazmi kod vrste *E. incisus*. Fitoplazme 16SrII-E, 16SrIII-B, 16SrIX-C, 16SrIX-E i 16SrXI-G podgrupe predstavljaju prve nalaze ovih patogena kod ove vrste. Fitoplazme 16SrIX i 16SrXI grupe, kao i dve podgrupe unutar *Aster yellows* fitoplazme, 16SrI-F i 16SrI-R zabeležene su po prvi put u Srbiji. U ovim istraživanjima je u jedinkama *E. incisus* registrovano prisustvo 16SrXI-G podgrupe koja pripada vrsti '*Ca. Phytoplasma oryzae*', koja do sada nije bila poznata u svetu. U biljnom materijalu je



prvi put registrovano prisustvo fitoplazme 16SrIII grupe u biljkama *C. vulgare*, *C. acanthoides*, *L. tuberosus* i *L. aphaca* u svetu, dok je prisustvo 16SrIX grupe u *C. intybus* i *K. arvensis* registrovano prvi put u Srbiji.

Prikazani rezultati o identifikaciji šest različitih 'Ca. Phytoplasma' vrsta kod *E. incisus*, potvrđuju navode o postojanju vektora koji mogu da usvoje više različitih vrsta i grupa fitoplazmi. Zbog visoke polifagnosti povećava se sposobnost ovog vektora da usvoji više od jedne fitoplazme. Na lokalitetima Bela Crkva, Topola, Negotin i Jasenovik, u primercima *E. incisus* utvrđeno je prisustvo samo fitoplazme 16SrXII-A podgrupe. Na svim ostalim lokalitetima je zabeleženo prisustvo više od jedne vrste fitoplazme u analiziranim primercima. Identifikacija samo jedne vrste ili grupe u svakoj analiziranoj jedinki može biti posledica razlike u količini titra fitoplazme koji se nalazi u telu insekta. Identifikacijom fitoplazmi u analiziranim jedinkama utvrđena je korelacija između određenih grupa fitoplazmi i broja primeraka u kojima je ta grupa detektovana. U najvećem broju analiziranih primeraka identifikovana je stolbur fitoplazma, koja je ujedno detektovana i na najvećem broju istraživanih lokaliteta. Kao jedna od najšire rasprostranjenih fitoplazmi u Srbiji i sa najviše poznatih biljaka domaćina, stolbur fitoplazma je bila pristupačna jedinkama *E. incisus* na svim lokalitetima na kojima je utvrđeno njeno prisustvo. Zabeležena je u agroekosistemima (vinogradi, zasadi krompira) kao i na biljkama spontane flore oko agroekosistema koje predstavljaju rezervoare iz kojih jedinke *E. incisus* mogu da usvoje fitoplazmu.

Prisustvo 16SrI-R podgrupe u primercima *E. incisus*, sakupljenim na kamenitim livadama i planinskim kamenjarima, sa dominacijom biljaka iz familije Asteraceae (*Crepis foetida* L., *C. arvense*, *C. acanthoides*), ukazuju na potencijalnu ulogu ove vrste cikade u epidemiološkim ciklusima *Cirsium yellows* fitoplazme. Na to dodatno ukazuje nutritivno ponašanje vrste *E. incisus* prema biljkama vrste *C. arvense* (Jakovljević i sar., 2015). U jedinkama *E. incisus* koje naseljavaju kserotermne ruderalne padine, registrovano je i prisustvo 16SrI-F podgrupe u okviru *Aster yellows* fitoplazme. Na osnovu multilokusne karakterizacije, ova podgrupa je najsirodnija izolatu CVB koji je identifikovan u cikadi iz Nemačke (Schneider i sar., 1993; Lee i sar., 2004a), što može da ukazuje na postojanje zajedničkog hranidbenog izvora i biljke koja predstavlja rezervoar patogena između dve odvojene geografske regije.



Molekularna karakterizacija na genima 16S rRNK i *rpl22-rps3*, izolata koji pripadaju 16SrII-E podgrupi, pokazuje identične sekvence sa filogenetski najbližim izolatom IAWB koji je detektovan u inficiranoj *M. sativa* u južnoj Italiji (Marcone i sar., 1997). U svetlu epidemiologije, vredi napomenuti da adulti vrste *E. incisus* prave agregacije i preferiraju ishranu na različitim mahunarkama (Jakovljević i sar., 2015), što može da ukazuje na mogućnost vrste *E. incisus* da učestvuje u epidemiološkim ciklusima fitoplazme 16SrII-E podgrupe. Dodatno, naši izolati pokazuju 0.8% genetičke razlike u poređenju sa izolatima PHBS, oboljenja koje izaziva fitoplazma 16SrII-E podgrupe koju prenosi vrsta cikade *Neoliturus fenestratus* (Herrich-Schäffer, 1834) (Mitrović i sar., 2012) i 1.1% genetičke razlike sa izolatom PEP, poreklom iz biljne vrste *P. echioides* iz Italije (Marcone i sar., 1997). Ovo sugerije da postoji ekološka povezanost sa biljkama iz roda *Picris*, koja se ogleda u izboru staništa i navika u ishrani. Takođe, utvrđena povezanost sa fitoplazmama identifikovanim u biljkama roda *Picris*, ukazuje na asocijacije i povezanost sa dodatnim biljnim izvorima pored već poznatih predstavnika familija Fabaceae.

Fitoplazme 16SrIII-B podgrupe se povezuju sa pojavom epidemije takozvanog X-oboljenja (engl. *X-disease*) u voćnjacima Severne Amerike (Staniulis i sar., 2002; Davis i sar., 2013), dok su u Evropi registrovane u vinovoj lozi, borovnici, soji, trešnji i višnji (Riolo i sar., 2006; Valiunas i sar., 2007; 2009; Jomantiene i sar., 2000b; Landi i sar., 2007) i u korovskim biljkama (Jomantiene i sar., 2000a; 2002; Valiunas i sar., 2007). Pored toga, 16SrIII-B podgrupa je zabeležena kao jedna od najznačajnijih fitoplazmi u zasadima krompira u Rusiji, gde je cikada *E. incisus* identifikovana kao potencijalni vektor (Girsova i sar., 2016). Stoga bi sposobnost vrste *E. incisus* da unese fitoplazmu 16SrIII grupe u različite ekosisteme mogla biti vrlo značajna i zabrinjavajuća što zahteva dalje praćenje i kontrolu.

Prisustvo vrste 'Ca. Phytoplasma pruni', opisano je u biljkama *T. pratense* i *Trifolium hybridum* L. u Litvaniji (Staniulis i sar., 2000) i u *Chenopodium album* L. u Češkoj (Šafářová i sar., 2011). Različite podgrupe 16SrIII grupe fitoplazmi su identifikovane u različitim biljnim vrstama i očekuje se da buduća istraživanja pokažu dodatne ekološke i geografske podatke vezane za ovu izuzetno diverzitetnu grupu fitoplazmi. Svi ovi podaci dodatno ukazuju na široku rasprostranjenost i različite asocijacije fitoplazme 16SrIII grupe sa biljnim domaćinima. Ipak, znatno manje



podataka postoji o insektima vektorima 16SrIII grupe i njihovom rasprostranjenju u prirodnim ekosistemima, naročito u Evropi.

CYE koja pripada 16SrIII-B podgrupi identifikovana je u detelini, palamidi i poponcu u Litvaniji, Srbiji i Mađarskoj (Staniulis i sar., 2000; Palermo i sar., 2004; Rančić i sar., 2005). Takođe, ova fitoplazma je zabeležena u prirodno zaraženim biljkama *Echinacea purpurea* (L.) Moench u Češkoj Republici, gde su inficirane biljke pokazivale simptome filodija (Fránová i sar., 2013). Na osnovu molekularnih analiza utvrđeno je da postoje bliski odnosi između CMI fitoplazme iz Srbije i CYE fitoplazme poreklom iz biljaka deteline iz Litvanije i Kanade. Ipak, diverzitet na tri genska lokusa (16S rRNK, *rpl22-rps3* i *secY* gen), pokazuje male razlike u odnosu na CYE fitoplazmu, dok varijabilnost nije primećena među izolatima dobijenim iz različitih biljnih domaćina, insekata vektora ili onih koji su poreklom sa različitih lokaliteta. Ovi podaci sugerišu na ekološku specifičnost i jedinstvenost i jasno odvajanje CMI od filogenetski bliskih fitoplazmi, pa su potrebne dodatne studije bioekoloških svojstava, puteva prenošenja i ciklusa oboljenja da bi se razumele moguće interakcije fitoplazme 16SrIII grupe sa drugim biljnim vrstama iz okruženja.

Prisustvo 16SrIII-B podgrupe u dve relativno široko rasprostranjene i česte biljne vrste iz familije Fabaceae (*L. tuberosus* i *L. aphaca*) na lokalitetu Dobanovci, ukazuje na to da su pomenute vrste uključene u prirodne epidemiološke cikluse 16SrIII-B grupe. Ove biljne vrste se mogu smatrati biljkama domaćinima za adulte i/ili larve *E. incisus* i time predstavljaju potencijalni rezervoar 16SrIII-B fitoplazme. Obe biljne vrste su višegodišnje i ne pokazuju simptome fitoplazmatskih oboljenja, što ukazuje na komensalni odnos biljke i fitoplazme.

Navike u ishrani i preferentnost ka različitim mahunarkama praćene su za jedinke letnje generacije koje su sakupljane na terenu. Njihova ishrana na biljkama *C. arvensis* je okarakterisana kao slučajna i povremena poseta, jer na pomenutim biljkama nisu zabeležene agregacije primeraka *E. incisus* koje bi ukazivale na specifičnu povezanost. Stopa inficiranosti jedinki *E. incisus* 16SrIII-B fitoplazmom na terenu u poređenju sa stopom inficiranosti u kontrolisanim laboratorijskim uslovima, potvrđuje ovo zapažanje. Procenat jedinki sakupljenih na terenu, koje nose u sebi 16SrIII-B podgrupu je relativno nizak (10%), dok je procenat adulta laboratorijske populacije koje



su se hranile na zaraženim simptomatskim biljkama *C. arvense* i uspešno usvojile fitoplazmu vrlo visok (83%). Ishrana na biljkama *C. arvense* u laboratorijskim uslovima je nametnuta tako da jedinke *E. incisus* nisu imale izbora kao što je slučaj sa prirodnim populacijama koje u svom okruženju imaju širok izbor biljnih domaćina. Uspešnost vrste da prenese ovu fitoplazmu na eksperimentalne perivinke i palamide potvrđena je u 100% biljaka na kraju eksperimenta. Takođe, izuzetno visoka sposobnost usvajanja 16SrIII grupe fitoplazmi i prenošenja na eksperimentalne perivinke i palamide, utvrđena je i za jedinke koji su se hranile na zaraženim biljkama *C. acanthoides*. Znatno manja uspešnost utvrđena je pri akviziciji sa *C. arvense* i prenošenjem na različite biljne vrste tribusa Carduinae, gde je samo jedna biljka *C. oleraceum*, u sebi nosila 16SrIII grupu.

Naši rezultati sugerišu postojanje retkih i slučajnih kontakata između jedinki *E. incisus* i inficiranih biljaka *C. arvense*, kao i preferentnu ishranu ove cikade na mahunarkama u prirodnim uslovima. Međutim, širenje *C. arvense* u prirodi uglavnom vegetativnim razmnožavanjem, može povećati procenat inficiranih i simptomatskih biljaka, jer infekcija jedne biljke uzrokuje na kraju infekciju čitavog klona, što povećava značaj *C. arvense* u epidemiologiji fitoplazme 16SrIII-B grupe.

Koristeći zapažanja sa terena i rezultate eksperimenata prenošenja, utvrđeno je da je izuzetno snažan uticaj infekcije CMI fitoplazmom na rast biljaka *C. arvense*. Sve inficirane biljke dobijene u testovima prenošenja, razvile su atipično višestruko grananje, većina njih je ispoljila simptome multiplih inflorescenci i uvenula nakon 5 meseci. U poljskim uslovima, inficirane biljke su pokazale simptome sistemske infekcije, praćene simptomima multiplih inflorescenci na cvetnim izdancima, višestrukim grananjem mladih rastućih izdanaka i potom brzim isušivanjem i konačnim sušenjem celog klona *in situ*, uključujući njegove nadzemne i podzemne delove. Prema tome, negativan uticaj CMI fitoplazme na biljke *C. arvense* može imati značaja u brzom uklanjanju i uništavanju ovog vrlo konkurentnog korova iz useva u agroekosistemima, kao što su livade i pašnjaci, posebno u sistemima organske proizvodnje hrane koji imaju problem sa uklanjanjem ovog korova.

CMI fitoplazma nije zabeležena kao značajan biljni patogen za dve inficirane vrste mahunarki iz roda *Lathyrus*, a njeno prisustvo nije utvrđeno u ostalih 14 analiziranih biljaka na proučavanom lokalitetu u Dobanovcima. Ovi rezultati, zajedno sa



uticajem koji je zabeležen za vrstu *C. arvensis* i druge vrste podtribusa Carduinae, nagoveštavaju da bi interakcije između patogena, biljne vrste i vrste *E. incisus* kao vektora, mogle biti odgovor koji je specifičan za usko srodne biljne vrste iz istog podtribusa. Treba imati na umu, da su ove vrste podtribusa Carduinae dvogodišnje, tako da najverovatnije imaju manje značaja u epidemiologiji CMI fitoplazme. Međutim, posmatrane interakcije takođe mogu biti specifične za istraživane lokalitete. Stoga su potrebna dodatna eksperimentalna ispitivanja da bi se utvrdile specifične reakcije (simptomatologija) između CMI fitoplazme, vrsta podtribusa Carduinae i vrsta porodice Fabaceae.

Uloga vrste *E. incisus* kao eksperimentalnog vektora *Flavescence dorée* fitoplazme utvrđena je u eksperimentima koje su sproveli Bressan i sar. (2006). U našim eksperimentima jedinke laboratorijske populacije ove cikade su uspešno prenele 16SrV grupu na dve perivinke. Rezultatima ovih testova otvara se pitanje o potencijalnoj ulozi *E. incisus* u epidemiološkom ciklusu *Flavescence dorée* (FD) fitoplazme, koja predstavlja izuzetno destruktivno oboljenje vinove loze, koje je uništilo preko 80% zasada vinograda u Francuskoj (Magarey, 1986) i više od 50% vinograda u severnoj Italiji (Belli i sar., 1997). Od 2004. godine ovo oboljenje je skoro u potpunosti uništilo nekoliko značajnih vinogorja u Srbiji (Duduk i sar., 2004; Krnjajić i sar., 2007; Kuzmanović i sar., 2008). Glavni vektor FD fitoplazme je monofagna vrsta *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 (Constable, 2010), ali je utvrđeno da u epidemiološkom ciklusu ovog oboljenja može da učestvuje i polifagna vrsta *Dictyophara europaea* (Linnaeus, 1767) (Filippin i sar., 2009). S obzrom da je *E. incisus* polifagna vrsta koja je prisutna tokom osam meseci na biljkama spontane flore u vinogradima Srbije, kao i da je utvrđena njena sposobnost da prenese FD fitoplazmu, pretpostavlja se da ova vrsta može da ima ulogu intermedijernog vektora i da na taj način učestvuje u epidemiološkom ciklusu FD fitoplazme, održavajući permanentno prisustvo patogena u ekosistemu.

Studija koju su objavili Conti i sar. (1988) pokazala je da se koncentracija fitoplazme *Chrysanthemum yellows* koju su usvajale mlade nimfe vrste *E. incisus* sa inficiranih biljaka *C. carinatum* smanjivala u telu insekta sa prolaskom vremena. U testovima prenošenja 16SrV grupe, pomoću laboratorijski gajenih jedinki vrste *E. incisus*, pokazana je eksperimentalna vektorska uloga ove vrste, jer su kao rezultat prenošenja dobijene dve pozitivne perivinke od ukupno 12 koje su korišćene u



testovima. Jedinke *E. incisus* koje su učestvovala u testovima prenošenja 16SrV grupe analizirane su 4 nedelje nakon akvizicije i nijedna od analiziranih jedinki nije bila pozitivna na prisustvo fitoplazme. Pretpostavlja se da je količina fitoplazme u telu insekta nakon 4 nedelje bila izuzetno niska, pa je onemogućena njena detekcija klasičnom PCR metodom.

'*Ca. Phytoplasma phoenicium*' koja pripada 16SrIX grupi, izaziva *witches'-broom* oboljenje na bademu, breskvi i nektarinama na Srednjem Istoku sa postojanjem rizika za širenje ovog oboljenja na evro-mediteranske zemlje (Verdin i sar., 2003; Tedechi i sar., 2015). Prema literaturnim podacima, blisko srodna 16SrIX-C podgrupa, koja je u našim istraživanjima u vezi sa vrstom *E. incisus*, identifikovana je u biljkama iz familija Asteraceae, Apiaceae, Rubiaceae i Convolvulaceae u Italiji (Marchi i sar., 2015). Zbog širokog rasprostranjenja 16SrIX-C pogrupe, predpostavlja se da se ova fitoplazma prenosi ili vektorom čija je ishrana izuzetno polifagna ili većim brojem vektora koji se mogu naći u različitim ekološkim nišama (Casati i sar., 2016). U Italiji su vršena istraživanja fitoplazmi u spontanoj flori vinograda i zabeleženo je da pored stolbur fitoplazme dominiraju predstavnici 16SrIX grupe, šta više, ove dve fitoplazme su imale zajedničke biljke domaćine (Marchi i sar., 2015). Ovo istraživanje je pokazalo sposobnost zadržavanja inokuluma fitoplazme duži niz godina, kolonizujući korenov sistem biljaka kao što je *C. arvense* (Marchi i sar., 2015). Vrsta *N. fenestratus* je uspešno prenela 16SrIX-C podgrupu na *Cichorium* sp. (Ermacora i sar., 2013). Ista podgrupa fitoplazmi izaziva pojavu *Chicory phyllody* na biljkama vrste *C. intybus* i infekciju mahunarke *Vicia sativa* L. (Martini i sar., 2012b). Dodatno, ova grupa fitoplazmi je u asocijaciji sa *Knautia arvensis phyllody* (KAP) i PEY koji su prijavljeni od strane Marcone i sar. (1997). Stoga, identifikacija fitoplazmi 16SrIX-C pogrupe u jedinkama *E. incisus* ukazuje na epidemiološku povezanost ove cikade sa vrstama roda *Picris* i različitim predstavnicima familije Fabaceae. Naši rezultati analize biljnog materijala sa lokaliteta Donji Milanovac pokazuju prisustvo 16SrIX-C podgrupe u biljkama *C. intybus* i *K. arvensis*. Ekološka asocijacija izolata 16SrIX-E podgrupe sa vrstom *E. incisus* treba da se utvrdi i definiše u budućim istraživanjima, zato što ova fitoplazma pokazuje genetičku divergenciju na sva tri analizirana genska lokusa u odnosu na sve poznate izolate ove podgrupe i do sada je identifikovana samo u biljkama severnoameričkih staništa (Lee i sar., 2012).



U našem istraživanju, nova podgrupa 16SrXI grupe u okviru 'Ca. Phytoplasma oryzae' vrste, označena kao 16SrXI-G, identifikovana je u primercima *E. incisus* sakupljenim na napuštenom pašnjaku istočne ekspozicije na lokalitetu Donji Milanovac, koji se nalazi između Velikog i Malog Kazana na Dunavu, na delu koji predstavlja prodor sa istoka. Time se objašnjava veza fitoplazmi 16SrXI grupe nađene na ovom lokalitetu sa izvornim poreklom sojeva pomenute grupe, koji potiču iz Azije (Jung i sar., 2003). Fitoplazma 16SrXI-G podgrupe detektovana je u samo dva primerka *E. incisus*, što ujedno predstavlja i prvi nalaz ove grupe u vrsti *E. incisus*. Mala brojnost primeraka u kojima je utvrđeno prisustvo ove fitoplazme objašnjava se time da još uvek nije identifikovana biljka domaćin ove vrste u Srbiji. Identifikovana 16SrXI-G podgrupa pokazuje 98.2% sličnosti sekvence sa 16SrXI-C podgrupom (izolat BVK), koja je identifikovana u cikadi *Psammotettix cephalotes* (Herrich-Schäffer, 1834) (Jung i sar., 2003) i 97.1% sličnosti sekvenci sa vrstom 'Ca. Phytoplasma cirsii' (16SrXI-E) koja inficira biljke *C. arvensis* i *Dahlia* sp. Cav., što potvrđuje veliki diverzitet izolata i sojeva unutar 16SrXI grupe (Šafářová i sar., 2016), kao i asocijacije u ishrani između vrste *E. incisus* i biljke *C. arvensis*. Biljke palamide zaražene 16SrXI-E podgrupom pokazuju simptome žutila, inflorescenci i proliferaciju biljnog tkiva (Šafářová i sar., 2016). Bitno je napomenuti da je 16SrXI grupa najčešće u korelaciji sa biljkama iz familije Poaceae i predstavlja izuzetno značajnog patogena pirinča i šećerne trske u južnoj Aziji i Australiji (Jung i sar., 2003; Viswanathan i sar., 2011; Ramaswamy i sar., 2013; Blanche i sar., 2003), dok su izolati 16SrXI-E ('Ca. Phytoplasma cirsii') podgrupe zabeleženi za sada samo u Evropi (Šafářová i sar., 2016; Duduk i sar., 2018).

Predstavnici cikada koji uspešno prirodno i eksperimentalno prenose 16SrXI grupu fitoplazmi su vrste *Nephotettix cincticeps* (Uhler, 1896), *Nephotettix virescens* (Distant, 1908) i *Nephotettix nigropictus* (Stål, 1870). Ove vrste međutim, nisu prisutne u Evropi već samo u Aziji, Africi i Australiji (Jung i sar., 2003). Vrste koje prenose ovu fitoplazmu u Aziji su i *Deltocephalus vulgaris* Dash & Viraktamath, 1998 (Srivastava i sar., 2006), *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura, 1914) (Hanboosong i sar., 2002), *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura, 1914 (Hanboosong i sar., 2006). Sve ove vrste pripadaju familiji Cicadellidae i potfamiliji Deltocephalinae. Vektori ove fitoplazme u Evropi još nisu otkriveni, tako da *E. incisus* može biti potencijalni kandidat, jer kao i svi pomenuti vektori sa drugih kontinenata, pripada potfamiliji



Deltocephalinae i u bliskoj je evolutivnoj vezi sa biljnom vrstom *C. arvensis* u kojoj je identifikovana 16SrIX-E podgrupa.

Dva genotipa '*Ca. Phytoplasma solani*' identifikovana su u prirodno inficiranim jedinkama *E. incisus*. Preovladajući je multilokusni genotip STOLg, u literaturi poznat kao referenti soj stolbur fitoplazme koji potiče iz paprika iz Srbije (Quaglino i sar., 2013) i u asocijaciji je sa izolatima iz jugoistočne Evrope (Cvrković i sar., 2014; Kosovac i sar., 2016). Ovaj genotip je prethodno opisan kao preovlađujući u epidemiološkim ciklusima bolesti koje izazava '*Ca. Phytoplasma solani*', a koje prenosi cikada *R. panzeri* u poljoprivrednim usevima u severoistočnoj Srbiji kao što su: crvenilo kukuruza (engl. *maize redness*, MR) na kukuruzu; *bois noir* (BN) oboljenje na vinovoj lozi i stolbur oboljenje krompira (Jović i sar., 2007; 2009b; Cvrković i sar., 2014; Mitrović i sar., 2016). Takođe, genotip STOLg je pronađen u vinogradima istočne Srbije zaraženim BN fitoplazmom, gde je izvor infekcije biljna vrsta *C. foetida* i u primorskom delu Crne Gore gde je izvor biljka *Vitex agnus-castus* L. U oba slučaja fitoplazmu 16SrXII grupe je sa biljaka rezervoara na biljke vinove loze prenela odgovarajuća populacija vrste *H. obsoletus* (Kosovac i sar., 2016; 2019). Drugi '*Ca. Phytoplasma solani*' genotip identifikovan u jedinkama *E. incisus* je Rqg31g koji je prethodno registrovan u vinovoj lozi i u populacijama vrste *R. quinquecostatus* sakupljenim u vinogradima Srbije (Cvrković i sar., 2014). Takođe, ovaj genotip je utvrđen i u populacijama vrsta *R. panzeri* i *H. obsoletus* koje su sakupljane u zasadima krompira u severnoj Srbiji. Eksperimentalno prenošenje na biljke krompira i vinove loze bilo je uspešno samo sa vrstom *H. obsoletus* koja je u asocijaciji sa biljkama poponca (Mitrović i sar., 2016; Kosovac i sar., 2019).

Rezultati testova prenošenja 16SrXII-A podgrupe fitoplazmi pokazali su da je vrsta *E. incisus* uspešan vektor ove podgrupe, kako u prirodnim tako i u eksperimentalnim uslovima, ali da postoje razlike u uspešnosti prenošenja različitih genotipova '*Ca. Phytoplasma solani*'. U testovima prenošenja pomoću prirodno inficiranih populacija *E. incisus*, stolbur fitoplazma je uspešno prenet na eksperimentalne perivinke i poponac, dok biljke vinove loze nisu bile inficirane. Na biljke *C. roseus*, uspešno je bilo prenošenje sa populacijama sa svih lokaliteta (Dobanovci, Topola, Negotin i Jasenovik) na kojima su u jedinkama *E. incisus* registrovani različiti genotipovi stolbur fitoplazme, dok je uspešno prenošenje na biljku



C. arvensis registrovano za populaciju sa lokaliteta Jasenovik, u kojoj je detektovano prisustvo STOLg genotipa. Iako je prenošenje na vinovu lozu sa jedinkama ove populacije bilo neuspešno, u testovima prenošenja sa laboratorijski gajenom populacijom, nakon akvizicije na perivinki sa STOLg genotipom, fitoplazma je uspešno preneti na 3/8 biljaka vinove loze, sorte *Chardonnay*. Takođe, u eksperimentalnim uslovima uspešno su preneti i genotipovi BG4560g i Rqg50. Jedini genotip koji jedinke *E. incisus* nisu uspele da prenesu jeste 19-25g, što se objašnjava činjenicom da je ovaj genotip vezan za epidemiološke cikluse u koje je uključena biljka *Urtica dioica* L., a populacije *E. incisus* još uvek nisu registrovane u asocijaciji sa tom biljnom vrstom. S obzirom da je laboratorijska populacija pokazala uspešnost u prenošenju stolbur fitoplazme na vinovu lozu, a da stolbur fitoplazma nije utvrđena u biljkama vinove loze inokulisanim putem prirodno zaražene populacije *E. incisus*, može se pretpostaviti da je koncentracija fitoplazme u insektima koji su učestvovali u testovima, kao i u biljkama vinove loze na kojima su se hranili zaraženi insekti, bila niska i da zbog toga nije mogla da bude detektovana klasičnom PCR metodom. Druga pretpostavka koja se javlja na osnovu ovih rezultata, ukazuje na mogućnost da *E. incisus* nije značajan kao vektor koji unosi fitoplazmu u vinograd, zbog nepostojanja preferentnosti i koevolutivne povezanosti sa vinovom lozom, ali je njegova uloga veoma značajna u širenju ovog patogena unutar drugih ekosistema.

Širenje stolbur fitoplazme u ekosistemima je veoma kompleksno usled kretanja vektora između korovskih i gajenih biljaka, postojanja različitih korovskih biljaka koje predstavljaju rezervoare patogena i usled diverziteta i asocijacija između cikada vektora i biljaka domaćina (Cvrković i sar., 2014; Chuche i sar., 2016; Kosovac i sar., 2016).

Epidemiološka povezanost patosistema istraživanih u ovoj disertaciji smatra se vrlo kompleksnom i postoje pretpostavke o dodatnim vrstama cikada koje se ponašaju kao intermedijarni vektori između prirodne vegetacije staništa koja okružuju agroekosisteme i samih useva. Intermedijarni vektori su uključeni u širenje i održavanje patogena unutar ekosistema (Cvrković i sar., 2014; Kosovac i sar., 2016). Naši nalazi da populacije *E. incisus* nose STOLg i Rqg31g genotipove, eksperimentalna potvrda njihove vektorske sposobnosti da prenesu STOLg, BG4560g i Rqg50g genotip i njihova životna strategija dugoživećih polifagnih insekata, dovodi do zaključka da ova vrsta može biti jedan od značajnih vektora unutar složenih epidemioloških ciklusa različitih



oboljenja izazvanih 'Ca. Phytoplasma solani' fitoplazmom. Ulogu *E. incisus* u specifičnim odnosima biljka - patogen i efikasnost u prenošenju patogena na širem geografskom području, povezujući sve delove epidemioloških ciklusa bolesti, treba dodatno razraditi i potvrditi.

U prirodnim uslovima, oboljenja biljaka koje uzrokuju fitoplazme najčešće su povezane sa sporadičnim dešavanjima u kojima zaražene biljke pokazuju neke od karakterističnih simptoma kao što su žutilo ili crvenilo, veštičje metle, skraćivanje internodija, pojava virescenci i filodija. Broj biljaka inficiranih fitoplazmom koje ispoljavaju simptome u prirodnim ekosistemima je relativno mali, dok se čini da je broj asimptomatskih biljaka koje nose u sebi fitoplazmu znatno veći. Primer biljaka koje ne ispoljavaju simptome, a u sebi nose patogena je stolbur fitoplazma identifikovana u biljkama *Sorghum halepense* L., *C. arvensis*, *U. dioica*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* (Jović i sar., 2009b; Kosovac i sar., 2016; 2019), kao i 16SrIII-B podgrupa u *L. tuberosus* i *L. aphaca*. U našim istraživanjima simptome tipične za prisustvo fitoplazme ispoljavale su biljke *C. arvensis*, *C. vulgare* i *C. acanthoides* u kojima je registrovano prisustvo 16SrIII-B podgrupe, dok su sve ostale biljke sakupljene na terenu bile asimptomatske. Nažalost, istraživanja fitoplazmi prvenstveno su zasnovana na ispitivanju i sakupljanju biljaka sa prepoznatljivim simptomima koje izazivaju ovi patogeni, a nedostatak istraživanja koja se bave prisustvom fitoplazmi u asimptomatskim biljkama, otežavaju uključivanje ovog segmenta u interakcije između biljaka domaćina i patogena koje, u širem smislu, mogu imati karakteristike komensalnih odnosa. U pojedinim slučajevima su asimptomatske biljke, kao prirodni rezervoari patogena, bile od značaja za razumevanje epidemioloških puteva ekonomski vrlo značajnih fitoplazmi (Arnaud i sar., 2007; Filippin i sar., 2009; Kosovac i sar., 2016; 2019). Primer za ovo je FD fitoplazma koja pogađa vinovu lozu u evropskim vinogradima, a koja ne izaziva simptome kod dve biljne vrste koje predstavljaju rezervoare patogena, *C. vitalba* i *Alnus* spp Mill. Iako se pojava FD prvobitno vezuje za pojavu epidemija u francuskim vinogradima sredinom prošlog veka (Schvester i sar., 1963), prirodni rezervoari ovog patogena su otkriveni tek 50 godina kasnije, jer zaražene biljke nisu pokazivale simptome fitoplazmatičnih oboljenja (Angelini i sar., 2004; Malembic-Maher i sar., 2007; Filippin i sar., 2009; Jeger i sar., 2016; Krstić i sar., 2018).



Diverzitet fitoplazmi utvrđen u istraživanim populacijama *E. incisus* u Srbiji, ukazuje da je ova polifagna cikada bioindikator prisustva fitoplazmi unutar različitih ekosistema, što može imati važnu ulogu u otkrivanju i predviđanju uticaja oboljenja nastalih prenošenjem patogena pomoću insekata vektora. Takođe, sposobnost prenošenja tri grupe fitoplazmi na različite biljne vrste, ukazuje na potencijal vrste *E. incisus* da učestvuje u epidemiologiji različitih fitoplazmatičnih oboljenja. Prisustvo visoko brojnih populacije ove vrste tokom celog vegetativnog perioda u različitim ekosistemima na teritoriji Srbije, sugerise da ova vrsta može veoma lako da dođe u kontakt sa biljnim patogenima koje može da usvoji i prenese dalje svojom ishranom. Preferentnost u ishrani prema biljkama familija Fabaceae, Asteraceae i Caprifoliaceae, među kojima je zabeležen znatan broj korovskih vrsta u agroekosistemima, čini ovu vrstu značajnim članom epidemioloških ciklusa različitih grupa i vrsta fitoplazmi i omogućava širenje fitoplazmatičnih oboljenja širom Srbije.



ZAKLJUČCI



6. ZAKLJUČCI

Proučavanje biologije, ekologije i rasprostranjenosti vrste cikade *Euscelis incisus* kao i proučavanje diverziteta fitoplazmi koje jedinke ove vrste mogu da usvoje i/ili prenesu, doveli su do sledećih zaključaka:

- 1) *E. incisus* je široko rasprostranjena vrsta u Srbiji. Kao izuzetni polifag naseljava livade, pašnjake, napuštena polja i ruderalna staništa koja se odlikuju mešovitim biljnim sastojinama sa dominacijom biljnih vrsta iz familija Fabaceae i Poaceae.
- 2) Vrsta *E. incisus* ima dve generacije godišnje koje karakteriše različita obojenost tela adulta i razlike u morfologiji genitalnog aparata mužjaka. Ima 5 larvenih stupnjeva. Celokupan ciklus razvića, od polaganja jaja do pojave adulta iznosi 35-40 dana, a trajanje određenog perioda u razviću značajno zavisi od uslova sredine.
- 3) Populacije *E. incisus* prirodno inficirane fitoplazmama zabeležene su na 8 od 15 istraživanih lokaliteta.
- 4) Molekularnim analizama utvrđeno je prisustvo šest različitih 16S ribozomalnih grupa i osam podgrupa u primercima *E. incisus*: 16SrI (16SrI-F, 16SrI-R), 16SrII (16SrII-E), 16SrIII (16SrIII-B), 16SrIX (16SrIX-C, 16SrIX-E), 16SrXI (16SrXI-G) i 16SrXII (16SrXII-A).
- 5) Tokom svih istraživačkih godina, u najvećem broju primeraka, identifikovana je 16SrXII grupa, poznatija kao stolbur fitoplazma ('*Ca. Phytoplasma solani*').
- 6) Identifikacija 16SrIX i 16SrXI grupe u primercima vrste *E. incisus* predstavlja prve nalaze ovih fitoplazmi u Srbiji.
- 7) Podgrupe 16SrI-F i 16SrI-R predstavljaju prve nalaze ovih podgrupa na teritoriji Srbije.



- 8) U biljnim vrstama sakupljenim na lokalitetima gde je vršeno i sakupljanje populacija *E. incisus*, identifikovane su dve grupe fitoplazmi: 16SrIII i 16SrIX. Pomenute grupe su zabeležene i u simptomatskim i u asimptomatskim biljkama.
- 9) Eksperimenti prenošenja fitoplazmi pomoću prirodno inficiranih populacija *E. incisus* pokazali su da je ova vrsta uspešan prirodni vektor u prenošenju fitoplazmi 16SrIII i 16SrXII grupe, dok prenošenje 16SrIX grupe nije utvrđeno.
- 10) Eksperimenti prenošenja fitoplazmi pomoću laboratorijski dobijene populacije vrste *E. incisus* pokazali su da je ova vrsta uspešan eksperimentalni vektor u prenošenju fitoplazmi 16SrIII, 16SrV i 16SrXII grupe, dok prenošenje 16SrII grupe nije utvrđeno.
- 11) Ukupno je među inficiranim jedinkama *E. incisus* identifikovano šest 'Ca. Phytoplasma' vrsta, od kojih je pet pokazivalo određene nukleotidne razlike u poređenju sa referentnim izolatima: 'Ca. Phytoplasma asteris', 'Ca. Phytoplasma aurantifolia', 'Ca. Phytoplasma pruni', 'Ca. Phytoplasma phoenicium' i 'Ca. Phytoplasma oryzae', a vrsta 'Ca. Phytoplasma solani' je bila 100% identična sa referentnim izolatom.
- 12) Multilokusna karakterizacija je korišćena za potpunu identifikaciju izolata do nivoa podgrupa i tipova u okviru svakog gena, što je dalo dobru osnovu za detaljniji prikaz epidemiologije određene grupe i 'Ca. Phytoplasma' vrste.
- 13) Izolati iz ovih istraživanja, iako pripadaju filogenetski veoma različitim grupama, podgrupama i vrstama, pokazuju bliske i srodne odnose sa izolatima koji vode poreklo iz nekoliko prirodnih domaćina: (i) detelina (*Trifolium* spp.), lucerka (*M. sativa*), *Lathyrus* spp. i druge leguminoze, (ii) *P. echiioides* i *P. hieracioides*, (iii) *C. arvense* (Carduinae), i (iv) cikade.



LITERATURA



7. LITERATURA

- Adamović, D., Djalović, I., Mitrović, P., Kojić, S., Starović, M., Purar, B. & Jošić, D. (2014). First report of 16SrXII-A subgroup phytoplasma (stolbur) associated with reddening of *Oenothera biennis* in Serbia. *Plant Disease*, 98(6), 841–841.
- Aleksić, Ž., Šutić, D. & Aleksić, D. (1967). Transmission intensity of stolbur virus by means of *Hyalesthes obsoletus* Sign. on some host plants. *Plant Protection*, 93(95), 67–73.
- Alma, A., Palermo, S., Boccardo, G. & Conti, M. (2001). Transmission of chrysanthemum yellows, a subgroup 16SrI-B phytoplasma, to grapevine by four leafhopper species. *Journal of Plant Pathology*, 83(3), 181-187.
- Alma, A., Tedeschi, R., Lessio, F., Picciau, L., Gonella, E. & Ferracini, C. (2015). Insect vectors of plant pathogenic mollicutes in the European-Mediterranean region. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(2), 53–73.
- Alma, A., Lessio, F. & Nickel, H. (2019). Insects as Phytoplasma Vectors: Ecological and Epidemiological Aspects. In Bertaccini, A., Weintraub, P.G., Rao, G. P. & Mori, N. (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II* (pp. 1-25). Singapore: Springer.
- Amaral Mello, A.P.O., Eckstein, B., Flores, D., Kreyci, P.F. & Bedendo, I.P. (2011). Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(6), 1454–1461.
- Ammar, E.D. & Hogenhout, S. A. (2006). Mollicutes associated with arthropods and plants. In Bourtzis, K. & Miller, T. A. (Eds.), *Insect Symbiosis*, Volume 2 (pp. 97-118). FL, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A. & Boudon-Padieu, E. (2001). *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder phytoplasma. *Vitis*, 40(2), 79–86.



- Angelini, E., Squizzato, F., Lucchetta, G. & Borgo, M. (2004). Detection of a phytoplasma associated with grapevine *Flavescence dorée* in *Clematis vitalba*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(2), 193-201.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E. & Foissac, X. (2007). Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct *Flavescence dorée* phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 4001–4010.
- Aryan, A., Brader, G., Mörtel, J., Pastar, M. & Riedle-Bauer, M. (2014). An abundant '*Candidatus Phytoplasma solani*' stolbur *tuf b* phytoplasma strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2), 213–227.
- Bandelt, G.J., Forster, P. & Rögl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A. & Nault, L.R. (2000). Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of Entomological Society of America*, 93(2), 271–276.
- Belli, G., Fortusini, A., Bianco, P., Torresin, G., Carraro, S. & Pizzoli, L. (1997). Grapevine *flavescence dorée* and other yellows of grapes. Flavescenza dorata e altri giallumi della vite. *L'Informatore Agrario*, 53(19).
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12(2), 673-689.
- Bertaccini, A. & Lee, I.-M. (2018). Phytoplasmas: an update. In Rao, G. P., Bertaccini, A., Fiore, N. & Liefting L.W. (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I* (pp. 1-29). Singapore: Springer.
- Biedermann, R. & Niedringhaus, R. (2004). Die Zikaden Deutschlands: Bestimmungstabellen für alle Arten. Wabv-Fründ.
- Blanche, K. R., Tran-Nguyen, L. T. T. & Gibb, K. S. (2003). Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northern Australia. *Plant Pathology*, 52(4), 505-512.



- Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G. & Conti, M. (1997). Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83(2), 219-224.
- Bosco, D., Galetto, L., Leoncini, P., Saracco, P., Raccach, B. & Marzachi, C. (2007). Interrelationships between “*Candidatus Phytoplasma asteris*” and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(5), 1504-1511.
- Bosco, D. & D’Amelio, R. (2010). Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In Weintraub, P. G. & Jones, P. (Eds.), *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (pp. 293-308). CABI, Wallingford, United Kingdom.
- Boudon-Padieu, E. (2003). Grapevine phytoplasmas. First internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes.
- Brčák, J. (1979). Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. In Maramorosch, K. & Harris, K. (Eds.), *Leafhopper vectors and plant disease agents* (pp. 97–146). New York: Academic Press.
- Bressan, A., Girolami, V. & Boudon-Padieu, E. (2005a). Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to “*flavescence dorée*” phytoplasma. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(2), 283–290.
- Bressan, A., Clair, D., Sémétey, O. & Boudon-Padieu, É. (2005b). Effect of two strains of “*Flavescence dorée*” phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(2), 144–149.
- Bressan, A., Clair, D., Sémétey, O. & Boudon-Padieu, E. (2006). Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of *Flavescence dorée* phytoplasma. *Phytopathology*, 96(7), 790-796.
- Casati, P., Quaglino, F., Abou-Jawdah, Y., Picciau, L., Cominetti, A., Tedeschi, R., Jawhari, M., Choueiri, E., Sobh, H., Lova, M. M. & Beyrouthy, M. (2016). Wild plants could play a role in the spread of diseases associated with phytoplasmas of pigeon pea witches'-broom group (16SrIX). *Journal of Plant Pathology*, 98(1), 71-81.



- Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, P. H. & Civerolo, E. L. (2009). A phytoplasma related to '*Candidatus* phytoplasma asteris' detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology*, 99 (3), 236-242.
- Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M. & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526–535.
- Chuche, J., Danet, J. L., Salar, P., Foissac, X. & Thiéry, D. (2016). Transmission of '*Candidatus* Phytoplasma solani' by *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of Applied Biology*, 169(2), 214–223.
- Cimerman, A., Pacifico, D., Salar, P., Marzachi, C. & Foissac, X. (2009). Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2951-2957.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659.
- Constable, F.E. (2010). Phytoplasma epidemiology: grapevine as a model. In Weintraub, P. G. & Jones, P. (Eds.), *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (pp. 188-212). Wallingford, United Kingdom: CABI.
- Conti, M., D'Agostino, G., Casetta, A. & Mela L. (1988). Some characteristics of chrysanthemum yellows disease. In VII International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, *Acta Horticulturae*, 234, 129–136.
- Cvrković, T., Jović, J., Mitrović, M., Petrović, A., Krnjajić, S., Malembic-Maher, S. & Toševski, I. (2008). First report of alder yellows phytoplasma on common alder (*Alnus glutinosa*) in Serbia. *Plant Pathology*, 57(4), 773–773.
- Cvrković, T. (2009). Diverzitet faune cikada u vinogradima Srbije i njihova uloga u prenošenju *Bois noir* fitoplazme. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Cvrković, T., Jović, J., Mitrović, M., Krstić, O., Krnjajić, S. & Toševski, I. (2011). Potential new hemipteran vectors of stolbur phytoplasma in Serbian vineyards. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 129–130.



- Cvrković, T., Jović, J., Mitrović, M., Krstić, O. & Toševski, I. (2014). Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology*, 63(1), 42–53.
- D'Amelio, R., Palermo, S., Marzachi, C. & Bosco, D. (2008). Influence of Chrysanthemum yellows phytoplasma on the fitness of two of its leafhopper vectors, *Macrostelus quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. *Bulletin of Insectology*, 61, 349–354.
- Dale, J. L., & Kim, K. S. (1969). Mycoplasma-like bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathology*, 59(11), 1765–1766.
- Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Lee, I.-M., Jomantiene, R. & Douglas, S. M. (2013). 'Candidatus Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(2), 766–776.
- De Oliveira, E., Valiūnas, D., Jović, J., Bedendo, I. P., Urbanavičiene, L. & de Oliveira, C. M. (2018). Occurrence and epidemiological aspects of phytoplasmas in cereals. In Rao, G. P., Bertaccini, A., Fiore, N. & Liefting L.W. (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I* (pp. 1-29). Singapore: Springer.
- Deng, S. & Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14(1), 53–61.
- Dmitriev, D. A. (2002). General morphology of leafhopper nymphs of the subfamily Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae). *Acta Entomologica Slovenica*, 10(1), 65-82.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yor, K. & Asuyama, H. (1967). Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33(4), 259 - 266.
- Drobnjaković, T., Perić, P., Marčić, D., Picciau, L., Alma, A., Mitrović, J., Duduk, B. & Bertaccini, A. (2010). Leafhoppers and cixiids in phytoplasma-infected carrot fields: species composition and potential phytoplasma vectors. *Pesticides and Phytomedicine*, 25(4), 311–318.



- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstić, B., Dukić, N. & Bertaccini, A. (2004). Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *Journal of Phytopathology*, 152(10), 575–579.
- Duduk, B., Ivanović, M., Obradović, A., Paltrinieri, S. & Bertaccini, A. (2005). First report of pear decline phytoplasmas on pear in Serbia. *Plant Disease*, 89(7), 774–774.
- Duduk, B., Bulajić, A., Duduk, N., Calari, A., Paltrinieri, S., Krstić, B. & Bertaccini, A. (2007). Identification of phytoplasmas belonging to aster yellows ribosomal group in vegetables in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 341–342.
- Duduk, B., Ivanović, M., Paltrinieri, S. & Bertaccini, A. (2008a). Phytoplasmas infecting fruit trees in Serbia. *Acta Horticulturae*, 781, 351–358.
- Duduk, B., Perić, P., Marčić, D., Drobnjaković, T., Picciau, L., Alma, A. & Bertaccini, A. (2008b). Phytoplasmas in carrots: disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 61(2), 327–331.
- Duduk, B., Stepanović, J., Yadav, A. & Rao, G. P. (2018). Phytoplasmas in Weeds and Wild Plants. In: Rao, G. P., Bertaccini, A., Fiore, N. & Liefting L.W. (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I* (pp. 313-345). Singapore: Springer.
- Ermacora, P., Ferrini, F., Martini, M., Pavan, F., Loschi, A., Loi, N., Moruzzi, S. & Osler, R. (2013). Caratterizzazione biologica e molecolare di un fitoplasma associato alla fillodia della cicoria nel nord-est dell'Italia. In Atti del Convegno: VI Incontro Nazionale sui Fitoplasmi e le Malattie da Fitoplasmi. Bologna, 17-19 Giugno / June, 2013 (ed. A. Bertaccini). *Petria* 23(1), 1-180.
- Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Mirzaie, A., Jafari-Nodooshan, A. & Rahimian, H. (2007). The first report of transmission of a phytoplasma associated with sesame phyllody by *Orosius albicinctus* in Iran. *Australasia Plant Disease Notes*, 2(1), 33–34.
- Fabre, A., Danet, J. L. & Foissac, X. (2011). The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene *stamp* is submitted to diversifying positive selection. *Gene*, 472(1), 37-41.
- Fialová, R., Válová, P., Balakishiyeva, G., Danet, J-L., Šafárová, D., Foissac, X. & Navrátil, M. (2009). Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop



- and wild plant species in South Moravia (Czech Republic). *Journal of Plant Pathology*, 91, 411–416.
- Filippin, L., Jović, J., Cvrković, T., Forte, V., Clair, D., Toševski, I., Boudon-Padieu, E., Borgo, M. & Angelini, E. (2009). Molecular characteristics of phytoplasmas associated with *Flavescence dorée* in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology*, 58(5), 826–837.
- Fos, A., Danet, J. L., Zreik, L., Garnier, M. & Bové, J. M. (1992). Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease*, 76(11), 1092-1096.
- Fránová, J., Špak, J. & Šimkova, M. (2013). First report of a 16SrIII-B subgroup phytoplasma associated with leaf reddening, virescence and phyllody of purple coneflower. *European Journal of Plant Pathology*, 136(1), 7–12.
- Frazier, N. W. & Posnette, A. F. (1957). Transmission and host range studies of strawberry green-petal virus. *Annals of Applied Biology*, 45(4), 580-588.
- Galdeano, E., Guzman, F.A., Fernandez, F. & Conci, L.R. (2013). Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), 753–764.
- Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard-Molard, M. & Boudon-Padieu, E. (2001). A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Plant Pathology*, 107(3), 263–271.
- Gibb, K. S., Padovan, A. C. & Mogen, B. D. (1995). Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology*, 85(2), 169-174.
- Girsova, N. V., Bottner-Parker, K. D., Bogoutdinov, D. Z., Meshkov, Y. I., Mozhaeva, K. A., Kastalyeva, T. B. & Lee, I.-M. (2016). Diverse phytoplasmas associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 145(1), 139–153.



- Gundersen, D. E. & Lee I.-M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediteranea*, 35, 144-151.
- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S. & Damak, S. (2002). Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*, 11(1), 97-103.
- Hanboonsong, Y., Ritthison, W., Choosai, C. & Sirithorn, P. (2006). Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *Journal of Economic Entomology*, 99(5), 1531–1537.
- Hodgetts, J. & Dickinson, M. (2010). Phytoplasma Phylogeny and Detection Based on Genes other than 16S rRNA. In: Weintraub, G. P., Jones, P. (Eds.), *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors* (pp.93-113). Wallingford, UK: CABI Publishing, 93–113.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N. & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 403–423.
- IRPCM, (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1243–1255.
- Ivanauskas, A., Valiūnas, D., Jomantienė, R., Picciau, L. & Davis, R. E. (2014). Possible insect vectors of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and 'Ca. Phytoplasma pruni'-related strains in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101(3), 313–320.
- Ivanović, Ž., Trkulja, N., Živković, S., Pfaf Dolovac, E., Dolovac, N., Jović, J. & Mitrović, M. (2011). First report of stolbur phytoplasma infecting celery in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 239–240.
- Jakovljević, M., Kosovac, A., Krstić, O., Mitrović, M., Jović, J., Toševski, I. & Cvrković, T. (2013). Diversity of Auchenorrhyncha species of subfamily Deltocephalinae in Serbian agroecosystems and potential phytoplasma vectors. *Zaštita bilja*, 64(3), 134-143.



- Jakovljević, M., Jović, J., Mitrović, M., Krstić, O., Kosovac, A., Toševski, I. & Cvrković, T. (2015). *Euscelis incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae), a natural vector of 16SrIII-B phytoplasma causing multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense*. *Annals of Applied Biology*, 167(3), 406–419.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Miret, J., Anton, J., MacLeod, A. & Navajas Navarro, M. (2016). Risk to plant health of *Flavescence dorée* for the EU territory. *EFSA Journal*, 14(12), e04603.
- Jomantiene, R., Valiunas, D., Alminaitė, A., Davis, R.E. & Staniulis, J. (2000a). Clover phyllody and *Cirsium* yellows phytoplasmas: strain diversity or species divergence. *Phytopathology*, 90(6) (Supplement), 39.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Antoniuk, L. & Staniulis, J. (2000b). First Report of Phytoplasmas in Soybean, Alfalfa, and *Lupinus* sp. in Lithuania. *Plant Disease*, 84(2), 198-198.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Valiunas, D. & Alminaitė, A. (2002). New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. *European Journal of Plant Pathology*, 108(6), 507–517.
- Jošić, D., Pavlović, S., Pivić, R., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Popović, T. & Starović, M. (2012). Cultivated and wild plantain (*Plantago major*) as a host of Stolbur phytoplasma in Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2), 284–288.
- Jošić, D., Starović, M., Stojanović, S., Popović, T., Dolovac, N., Zdravković, J. & Pavlović, S. (2013). First report of group 16SrXII-A phytoplasma causing stolbur disease in *Saponaria officinalis* plants in Serbia. *Plant Disease*, 97(3), 420–420.
- Jošić, D., Starović, M., Kojić, S., Pivić, R., Stanojković-Sebić, A., Zdravković, M. & Pavlović, S. (2015). *Dianthus barbatus* - A New Host of Stolbur Phytoplasma in Serbia. *Plant Disease*, 99(2), 283–283.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Krnjajić, S., Redinbaugh, M. G., Pratt, R. C., Gingery, R. E., Hogenhout, S. A. & Toševski, I. (2007). Roles of stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the



- epidemiology of Maize redness in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 85-89.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Petrović, A., Krnjajić, S. & Toševski, I. (2008). New strain of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' infecting *Ulmus minor* and *U. laevis* in Serbia. *Plant Pathology*, 57(6), 1174–1174.
- Jović, J. (2009a). Diverzitet cikada (Hemiptera: Auchenorrhyncha) u usevima kukuruza Srbije i njihova uloga u prenošenju fitoplazmi. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Krnjajić, S., Petrović, A., Redinbaugh, M. G., Pratt, R. C., Hogenhout, S. A. & Toševski, I. (2009b). Stolbur phytoplasma transmission to maize by *Reptalus panzeri* and the disease cycle of maize redness in Serbia. *Phytopathology*, 99(9), 1053–1061.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Petrović, A., Krstić, O., Krnjajić, S. & Toševski, I. (2010). Genetic variability among 'Candidatus Phytoplasma ulmi' strains infecting elms in Serbia and survey of potential vectors. *Current Status and Perspectives of Phytoplasma Disease Research and Management*. Eds Bertaccini A, Laviña A, Torres E. COST Action FA0807, Sitges, Spain, 18.
- Jović, J., Krstić, O., Toševski, I. & Gassmann, A. (2011). The occurrence of 'Candidatus phytoplasma rhamnii' in *Rhamnus cathartica* L. without symptoms. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 227–228.
- Jung, H. Y., Sawayanagi, T., Wongkaew, P., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., Oshima, K., Miyata, S. I., Ugaki, M., Hibi, T. & Namba, S. (2003). 'Candidatus Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1925-1929.
- Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K. & Sato M. (2000). Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatifomis*. *Phytopathology*, 90(8), 909-914.
- Kingdom, H. N. & Hogenhout, S. A. (2007). Aster yellows phytoplasma witches' broom (AY-WB; 'Candidatus Phytoplasma asteris') increases survival rates of *Macrosteles quadrilineatus* and *Dalbulus maidis* on various plant species. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 225–226.



- Kosovac, A., Johannesen, J., Krstić, O., Mitrović, M., Cvrković, T., Maixner, M., Toševski, I. & Jović, J. (2013). Microsatellite and mtDNA evidence of genetic differentiation in *Hyalesthes obsoletus* populations associated with a new major host, stinking hawk's-beard (*Crepis foetida*), in southeast Europe. In: Torres, E., Lavina, A. & Batlle, A. (Eds.), *Proceedings of 3rd European Bois Noir Workshop* (pp. 18–19). Barcelona, Spain.
- Kosovac, A., Radonjić, S., Hrnčić, S., Krstić, O., Toševski, I. & Jović, J. (2016). Molecular tracing of the transmission routes of bois noir in Mediterranean vineyards of Montenegro and experimental evidence for the epidemiological role of *Vitex agnus-castus* (Lamiaceae) and associated *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Plant Pathology*, 65(2), 285-298.
- Kosovac, A., Johannesen, J., Krstić, O., Mitrović, M., Cvrković, T., Toševski, I. & Jović, J. (2018). Widespread plant specialization in the polyphagous planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae), a major vector of stolbur phytoplasma: evidence of cryptic speciation. *PloS one*, 13(5), e0196969.
- Kosovac, A., Jakovljević, M., Krstić, O., Cvrković, T., Mitrović, M., Toševski, I. & Jović, J. (2019). Role of plant-specialized *Hyalesthes obsoletus* associated with *Convolvulus arvensis* and *Crepis foetida* in the transmission of 'Candidatus Phytoplasma solani'-inflicted bois noir disease of grapevine in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 153(1), 183–195.
- Krnjajić, S., Mitrović, M., Cvrković, T., Jović, J., Petrović, A., Forte, V., Angelini, E. & Toševski, I. (2007). Occurrence and distribution of *Scaphoideus titanus* Ball - multiple outbreaks of *Flavescence dorée* in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 197–198.
- Krstić, O., Cvrković, T., Mitrović, M., Radonjić, S., Hrnčić, S., Toševski, I. & Jović, J. (2018). *Wolbachia* infection in natural populations of *Dictyophara europaea*, an alternative vector of grapevine *Flavescence dorée* phytoplasma: effects and interactions. *Annals of Applied Biology*, 172(1), 47–64.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.



- Kunze, L. (1959). Die funktionsanatomischen Grundlagen der Kopulation der Zwergzikaden, untersucht an *Euscelis plebejus* (FALL.) und einigen Typhlocybinen (Homoptera Auchenorrhyncha). *Deutsche Entomologische Zeitschrift (N.F.)*, 6(IV), 322 – 387.
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ermacora, P., Ferrini, F., Starović, M., Tošić, M., Carraro, L. & Osler, R. (2008) Incidence and molecular characterization of *Flavescence dorée* and stolbur phytoplasmas in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. *Vitis*, 47(2), 105–111.
- Kuzmanović, S., Starović, M., Pavlović, S., Gavrilović, V., Aleksić, G., Stojanović, S. & Jošić, D. (2011). Detection of stolbur phytoplasma on blackberry - a new natural host in Serbia. *Genetika*, 43(3), 559–568.
- Landi, F., Prandini, A., Paltrinieri, S., Mori, N. & Bertaccini, A. (2007). Detection of different types of phytoplasmas in stone fruit orchards in northern Italy. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 163.
- Langer, M., Darimont, H. & Maixner, M. (2003). Control of phytoplasma vectors in organic viticulture. *IOBC wprs Bulletin*, 26(8), 197-202.
- Langer, M. & Maixner, M. (2004). Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43(4), 191-199.
- Lee, I.-M., Gundersen, D. E., Hammond, R. W. & Davis, R. E. (1994). Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84(6), 559-566.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. & Bertaccini, A. (1998a). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88(12), 1359–1366.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E. & Bartoszyk, I. M. (1998b). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1153-1169.
- Lee, I.-M., Davis, R. E. & Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 221-255.



- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., Bottner, K. D., Marcone, C. & Seemüller, E. (2004a). 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1037–1048.
- Lee, I.-M., Martini, M., Marcone, C. & Zhu, S. F. (2004b). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 337-347.
- Lee, I.-M., Zhao, Y. & Bottner, K. D. (2006). *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 87-91.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Davis, R. E. & Harrison, N. A. (2010). Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 2887-2897.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K. D., Zhao, Y., Bertaccini, A. & Davis, R. E. (2012). Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches'-broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9), 2279-2285.
- Lee, I.-M., Polashock, J., Bottner-Parker, K. D., Bagadia, P. G., Rodriguez-Saona, C., Zhao, Y. & Davis, R. E. (2014). New subgroup 16SrIII-Y phytoplasmas associated with false-blossom diseased cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) plants and with known and potential insect vectors in New Jersey. *European Journal of Plant Pathology*, 139(2), 399-406.
- Lim, P. O. & Sears, B. B. (1992). Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2606-2611.
- Maczey, N., Masters, G. J., Hollier, J. A., Mortimer, S. R. & Brown, V. K. (2005). Community associations of chalk grassland leafhoppers (Hemiptera:



- Auchenorrhyncha): conclusions for habitat conservation. *Journal of Insect Conservation*, 9(4), 281–298.
- Magarey, P. A. (1986). Grapevine yellows—etiology, epidemiology and diagnosis. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 7(2), 90–100.
- Mahuku, G. S. (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 71–81.
- Malembic-Maher, S., Salar, P., Vergnes, D. & Foissac, X. (2007). Detection and diversity of “*flavescence dorée*”-related phytoplasmas in alders surrounding infected vineyards in Aquitaine (France). *Bulletin of Insectology*, 60(2), 329–330.
- Malembic-Maher, S., Salar, P., Filippin, L., Carle, P., Angelini, E. & Foissac, X. (2011). Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), 2129–2134.
- Marchi, G., Cinelli, T., Rizzo, D., Stefani, L., Goti, E., Della Bartola, M., Luvisi, A., Panattoni, A. & Materazzi, A. (2015). Occurrence of different phytoplasma infections in wild herbaceous dicots growing in vineyards affected by bois noir in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 54(3), 504-515.
- Marcone, C., Ragozzino, A. & Seemüller, E. (1997). Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental, and forage crops in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 79, 211-217.
- Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A. J. & Osler, R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 2037-2051.
- Martini, M., Marcone, C., Mitrović, J., Maixner, M., Delić, D., Myrta, A., Ermacora, P., Bertaccini, A. & Duduk, B. (2012a). ‘*Candidatus Phytoplasma convolvuli*’, a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), 2910–2915.



- Martini, M., Ermacora, P., Moruzzi, S., Loi, N. & Osler, R. (2012b). Molecular characterization of phytoplasma strains associated with epidemics of chicory phyllody. *Journal of Plant Pathology*, 94(4) (Supplement).
- Martini, A., Delić, D., Liefting & Montano, H. (2018). Phytoplasma infecting vegetable, pulse and oil crops. In Rao, G. P., Bertaccini, A., Fiore, N. & Liefting L. W. (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I* (pp. 1-29). Singapore: Springer.
- Mazzoni, V., Cosci, F., Lucchi, A. & Santini, L. (2001). Leafhoppers and planthoppers vectors in Ligurian and Tuscan vineyards. *IOBC wprs Bulletin*, 24(7), 263–266.
- Medić Pap, S., Gvozdanić Varga, J., Červenski, J., Stepanović, J., Rekanović, E., Stepanović, M. & Duduk, B. (2018). First Report of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ Infecting Parsnip in Serbia. *Plant Disease*, 102(5), 1026–1026.
- Mehle, N., Ravnikar, M., Seljak, G., Knapic, V. & Dermastia, M. (2011). The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(2), 65-76.
- Mitrović, J., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Bertaccini, A. & Duduk, B. (2011). Occurrence of two ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’-related phytoplasmas in poplar trees in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 57–58.
- Mitrović, M., Jović, J., Cvrković, T., Krstić, O., Trkulja, N. & Toševski, I. (2012). Characterisation of a 16SrII phytoplasma strain associated with bushy stunt of hawkweed oxtongue (*Picris hieracioides*) in south-eastern Serbia and the role of the leafhopper *Neoliturus fenestratus* (Deltocephalinae) as a natural vector. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), 647–660.
- Mitrović, J., Pavlovlć, S. & Duduk, B. (2013). Survey and multigene characterization of stolbur phytoplasmas on various plant species in Serbia. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(3), 434–441.
- Mitrović, M., Cvrković, T., Jović, J., Krstić, O., Jakovljević, M., Kosovac, A. & Toševski, I. (2015a). First Report of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ Infecting Garden Bean *Phaseolus vulgaris* in Serbia. *Plant Disease*, 99(4), 551–551.
- Mitrović, J., Smiljković, M., Seemüller, E., Reinhardt, R., Hüttel, B., Büttner, C., Bertaccini, A., Kube, M. & Duduk, B. (2015b). Differentiation of ‘*Candidatus Phytoplasma cynodontis*’ based on 16S rRNA and groEL genes and



- identification of a new subgroup, 16SrXIV-C. *Plant Disease*, 99(11), 1578–1583.
- Mitrović, M., Jakovljević, M., Jović, J., Krstić, O., Kosovac, A., Trivellone, V., Jermini, M., Toševski, I. & Cvrković, T. (2016). 'Candidatus Phytoplasma solani' genotypes associated with potato stolbur in Serbia and the role of *Hyalesthes obsoletus* and *Reptalus panzeri* (Hemiptera, Cixiidae) as natural vectors. *European Journal of Plant Pathology*, 144(3), 619–630.
- Miyazaki, A., Shigaki, T., Koinuma, H., Iwabuchi, N., Rauka, G. B., Kembu, A., Saul, J., Watanabe, K., Nijo, T., Maejima, K. & Yamaji, Y. (2018). 'Candidatus Phytoplasma noviguineense', a novel taxon associated with Bogia coconut syndrome and banana wilt disease on the island of New Guinea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 170–175.
- Müller, H. J. (1954). Der Saisondimorphismus bei Zikaden der Gattung *Euscelis* Brulle' (Homoptera Auchenorrhyncha). *Beitrage zur Entomologie*, 4, 1 – 56.
- Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X. & Romanazzi, G. (2010). Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2049–2059.
- Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X. & Romanazzi, G. (2013). Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. Corrigendum. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 631–633.
- Naderali, N., Nejat, N., Vadamalai, G., Davis, R. E., Wei, W., Harrison, N. A., Kong, L., Kadir, J., Tan, Y.-H. & Zhao, Y. (2017). 'Candidatus Phytoplasma wodyetiae', a new taxon associated with yellow decline disease of foxtail palm (*Wodyetia bifurcata*) in Malaysia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(10), 3765–3772.
- Nagaich, B. B., Puri, B. K., Sinha, R. C., Dhingra, M. K. & Bhardwaj, V. P. (2008). Mycoplasma-like organisms in plants affected with purple top-roll, marginal flavescence and witches' broom diseases of potatoes. *Journal of Phytopathology*, 81(3), 273–379.



- Nei, M. & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.
- Nickel, H. (2003). The leafhoppers and planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Publishers.
- Orlovskis, Z., Canale, M. C., Thole, V., Pecher, P., Lopes, J. R. & Hogenhout, S. A. (2015). Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. *Current Opinion in Insect Science*, 9, 16–23.
- Orságová, H., Březíková, M. & Schlesingerova, G. (2011). Presence of phytoplasmas in hemipterans in Czech vineyards. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 119–120.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. & Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36(1), 27–29.
- Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraishi, T., Yamaji, Y. & Namba, S. (2011). Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS ONE*, 6(8), e23242.
- Padovan, A. C., Gibb, K. S., Bertaccini, A., Vibio, M., Bonfiglioli, R. E., Magarey, P. A. & Sears, B. B. (1995). Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(1), 25-31.
- Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Alma, A., Orosz, A., Bertaccini, A. & Kolber, M. (2004). Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis*, 43(4), 201–203.
- Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Popović, T., Aleksić, G., Dražić, S. & Jošić, D. (2011). *Echinacea purpurea*-a host of 16SrXII-A phytoplasma group in Serbia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(1), 35–39.
- Pavlović, S., Jošić, D., Starović, M., Stojanović, S., Aleksić, G., Stojšin, V. & Radanović, D. (2012a). The first Stolbur Phytoplasma occurrence on two St.



- Johns Worth species (*Hypericum perforatum* L. and *Hypericum barbatum* L.) in Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 906–911.
- Pavlović, S., Pljevljakušić, D., Starović, M., Stojanović, S. & Jošić, D. (2012b). First report of 16SrIII-B phytoplasma subgroup associated with virescence of *Arnica montana* in Serbia. *Plant Disease*, 96(11), 1691–1691.
- Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Aleksić, G., Kojić, S., Zdravković, M. & Jošić, D. (2014a). The first report of stolbur phytoplasma associated with phyllody of *Calendula officinalis* in Serbia. *Plant Disease*, 98(8), 1152–1152.
- Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S. D., Kojić, S., Marinković, J. & Jošić, D. (2014b). First report of stolbur phytoplasma affecting *Cichorium intybus* in Serbia. *Plant Disease*, 98(6), 839–839.
- Pérez-López, E., Luna-Rodríguez, M., Olivier, C. Y. & Dumonceaux, T. J. (2016). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 492-513.
- Posnette, A. & Ellenberger, C. (1963). Further studies of green petal and other leafhopper-transmitted viruses infecting strawberry and clover. *Annals of Applied Biology*, 51(1), 69–83.
- Purcell, A. H. (1982). Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1), 397 - 417.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W. & Davis, R. E. (2013). ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(8), 2879-2894.
- Ramaswamy, M., Nair, S., Soumya, V. P. & Thomas, G. V. (2013). Phylogenetic analysis identifies a ‘*Candidatus* Phytoplasma oryzae’-related strain associated with yellow leaf disease of areca palm (*Areca catechu* L.) in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(4), 1376-1382.
- Rančić, D., Paltrinieri, S., Toševski, I., Petanović, R., Stevanović, B. & Bertaccini, A. (2005). First report of multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense* and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. *Plant Pathology*, 54(4), 561–561.



- Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094–1156.
- Rees, D. J., Emerson, B. C., Oromi, P. & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the Nesotes (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Molecular Ecology*, 10(2), 427-434.
- Riolo, P., Isidoro, N., Nicoletti, L., Riga, F., Nardi, S. & Marozzi, F. A. (2006). Potential leafhopper and planthopper vectors of phytoplasmas in wine vineyards of the Marche region (central Italy). *IOBC wprs Bulletin*, 29(11), 193.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C. & Seemüller, E. (1993). Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Microbiology*, 139(3), 519-527.
- Schneider, B. & Gibb, K. S. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor *Tu* gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143(10), 3381-3389.
- Schvester, D., Carle, P. & Moutous, G. (1961). Sur la transmission de la *Flavescence dorée* des vignes par une cicadelle. *C. R. Acad. Agric. Française*, 47, 1021–1024.
- Schvester, D., Carle, P. & Moutous, G. (1963). Transmission de la *flavescence dorée* de la vigne par *Scaphoideus littoralis* Ball. *Annales des Épiphyties*, 14, 175-198.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. & Göschl, M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80, 3-26.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E. & Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2988-2993.
- Srivastava, S., Singh, V., Gupta, P. S., Sinha, O. K. & Baitha, A. (2006). Nested PCR assay for detection of sugarcane grassy shoot phytoplasma in the leafhopper vector *Deltocephalus vulgaris*: a first report. *Plant Pathology*, 55(1), 25-28.



- Staniulis, J. B., Davis, R. E., Jomantiene, R., Kalvelyte, A. & Dally, E. L. (2000). Single and mixed phytoplasma infections in phyllody-and dwarf-diseased clover plants in Lithuania. *Plant Disease*, 84(10), 1061-1066.
- Starović, M., Kuzmanović, S., Gavrilović, V., Aleksić, G., Popović, T., Stojanović, S. & Jošić, D. (2012). Detection and Identification of Two Phytoplasmas (16SrIII-B and 16SrXII-A) From Alfalfa (*Medicago sativa*) in Serbia. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12), 758–760.
- Starović, M., Kojić, S., Kuzmanović, S. T., Stojanović, S. D., Pavlović, S. & Jošić, D. (2013). First Report of Blueberry Reddening Disease in Serbia Associated with 16SrXII-A (Stolbur) Phytoplasma. *Plant Disease*, 97(12), 1653–1653.
- StatSoft, Inc. Tulsa (1996). STATISTICA Software., version 5.1.
- Strübing, H. & Drosopoulos, S. (2006). Photoperiodism, morphology and acoustic behaviour in the leafhopper genus, *Euscelis*. In Drosopoulos, S. & Claridge M. F.(Eds.), *Insect Sounds and Communication* (pp. 255-262). CRC–Taylor & Francis, Boca Raton.
- Sugio, A. & Hogenhout, S. A. (2012). The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15(3), 247–254.
- Šafařová, D., Válová, P., Flidr, P., Navrátil, M., Bertaccini, A. & Maini, S. (2011). Molecular identification of 16SrIII and 16SrXII phytoplasma groups in *Chenopodium album* in Czech Republic. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 85– 86.
- Šafařová, D., Zemánek, T., Válová, P. & Navrátil, M. (2016). ‘*Candidatus* Phytoplasma *cirsii*’, a novel taxon from creeping thistle [*Cirsium arvense* (L.) Scop.]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(4), 1745-1753.
- Šafařová, D., Lauterer, P., Starý, M., Válová, P. & Navrátil, M. (2018). Insight into epidemiological importance of phytoplasma vectors in vineyards in South Moravia, Czech Republic. *Plant Protection Science*, 54(4), 234-239.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.



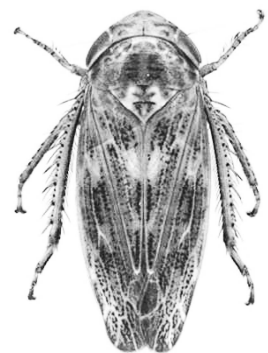
- Tanasković, S. & Carraro, L. (2003). Pojava fitoplazme evropskog žutila koštičavog voća na kajsiji i šljivi u Srbiji. VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24–28. novembar, 2003. *Book of Abstracts*, 89.
- Tedeschi, R., Picciau, L., Quaglino, F., Abou-Jawdah, Y., Molino Lova, M., Jawhari, M., Casati, P., Cominetti, A., Choueiri, E., Abdul-Nour, H. & Bianco, P. A. (2015). A cixiid survey for natural potential vectors of ‘*Candidatus Phytoplasma phoenicium*’ in Lebanon and preliminary transmission trials. *Annals of Applied Biology*, 166(3), 372-388.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & 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(22), 4673–4680.
- Tomkins, M., Kliot, A., Marée, A. F. & Hogenhout, S. A. (2018). A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 39-48.
- Trkulja, N., Ivanović, Ž., Pfaf Dolovac, E., Dolovac, N., Živković, S., Jović, J. & Mitrović, M. (2011). Stolbur phytoplasma infection of kale crops (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement), 81–82.
- Valenta, V., Musil, M. & Mišiga, S. (1961). Investigations on European Yellowings-type Viruses I. The Stolbur Virus. *Journal of Phytopathology*, 42(1), 1-38.
- Valiunas, D., Samuitiene, M., Rasomavicius, V., Navalinskiene, M., Staniulis, J. & Davis, R. E. (2007). Subgroup 16SrIII-F phytoplasma strains in an invasive plant, *Heracleum sosnowskyi*, and an ornamental, *Dictamnus albus*. *Journal of Plant Pathology*, 89, 137–140.
- Valiunas, D., Jomantiene, R., Ivanauskas, A., Abraitis, R., Staniene, G., Zhao, Y. & Davis, R. E. (2009). First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania. *Plant Disease*, 93(5), 550-550.
- Verdin, E., Salar, P., Danet, J.L., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Zammar, S., Gelie, B., Bove, J.M. & Garnier, M. (2003). ‘*Candidatus Phytoplasma phoenicium*’ sp.



- nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 833-838.
- Viswanathan, R., Chinnaraja, C., Karuppaiah, R., Ganesh Kumar, V., Jenshi Rooba, J. & P. Malathi. (2011). Genetic diversity of sugarcane grassy shoot (SCGS)-phytoplasmas causing grassy shoot disease in India. *Sugar Tech*, 13(3), 220.
- Wei, W., Davis, R. E., Lee, I.-M. & Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1855–1867.
- Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R. E., Suo, X. & Zhao, Y. (2008). Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(10), 2368-2377.
- Weintraub, P. G. & Beanland, L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51, 91–111.
- Weintraub, P. G., Trivellone, V. & Krüger, K. (2019). The Biology and Ecology of Leafhopper Transmission of Phytoplasmas. In Bertaccini, A., Weintraub, P.G., Rao, G. P. & Mori, N. (Eds.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-II* (pp. 27-51). Singapore: Springer.
- White, D. T., Blackall, L. L., Scott, P. T. & Walsh, K. B. (1998). Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ and a new taxon, ‘*Candidatus Phytoplasma australasia*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 941-951.
- Wilson, R. M. & Weintraub, G. P. (2007). An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 177-178.
- Zahniser, J. N. & Dietrich, C. H. (2010). Phylogeny of the leafhopper subfamily Deltocephalinae (Hemiptera: Cicadellidae) based on molecular and morphological data with a revised family-group classification. *Systematic Entomology*, 35(3), 489-511.



- Zahniser, J. N. & Dietrich, C. (2013). A review of the tribes of Deltocephalinae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). *European Journal of Taxonomy*, 45.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X. & Davis, R. E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 10), 2582.
- Zhao, Y., Wei, W., Davis, R. E. & Lee, I.-M. (2010). Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. In Weintraub, P. G. & Jones, P. (Eds.), *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vector* (pp. 64-92). Wallingford, United Kingdom: CABI.
- Zhao, Y. & Davis, R. E. (2016). Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 2121–2123.
- Zreik, L., Carle, P., BOV, J. M. & Garnier, M. (1995). Characterization of the Mycoplasma-like Organism Associated with Witches'-Broom Disease of Lime and Proposition of a *Candidatus* Taxon for the Organism, "*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3), 449-453.



PRILOZI



8. PRILOZI

Tabela 1. Lista do sada zabeleženih sojeva fitoplazmi u Srbiji, u asocijaciji sa različitim biljnim i/ili insekatskim domaćinima (vektor ili nosilac), na osnovu 16S rRNK grupe/podgrupe i odgovarajuće ‘*Ca. Phytoplasma*’ vrste.

16Sr grupa fitoplazme	Trivajalno ime izolata (akronim)	‘ <i>Ca. Phytoplasma</i> ’ vrsta	Biljka i/ili insekt domaćin u Srbiji	Reference
16SrI-A	<i>Aster yellows witches’- broom</i> (AY-WB)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’-srodni soj	šargarepa, topola, <i>Anaceratagallia laevis</i> , <i>Psammotettix confinis</i> , <i>Ophiola decumana</i>	Duduk i sar., 2008b Drobnjaković i sar., 2010 Mitrović i sar., 2011
16SrI-B	<i>Aster yellows</i> (AY)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’	šargarepa, brokoli, <i>Psammotettix alienus</i> , <i>Anaceratagallia ribauti</i>	Duduk i sar., 2007; 2008b Jović i sar., 2009b Mitrović i sar., 2012
16SrI-C	<i>Clover phyllody</i> (CPh)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’- srodni soj	<i>Mocydia crocea</i> , <i>Psammotettix alienus</i> , <i>Psammotettix confinis</i> , <i>Errastunus ocellaris</i> , <i>Jassargus obtusivalvis</i> , <i>Mocuellus collinus</i>	Jović i sar., 2009b Drobnjaković i sar., 2010 Mitrović i sar., 2012
16SrI-P	<i>Witches’- broom disease</i> crne topole (PopWB)	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’- srodni soj	topola	Mitrović i sar., 2011
16SrII-E	<i>Picris hieracioides bushy stunt</i> (PHBS)	‘ <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ’- srodni soj	<i>Picris hieracioides</i> , <i>Neoliturus fenestratus</i> , <i>Dictyophara europaea</i>	Mitrović i sar., 2012
16SrIII-B	<i>Multiple inflorescence disease</i> na biljci <i>Cirsium arvense</i>	‘ <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ’- srodni soj	<i>Cirsium arvense</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Arnica montana</i>	Rančić i sar., 2005 Pavlović i sar., 2012b Starović i sar., 2012
16SrV-A	<i>Elm yellows</i> (EY)	‘ <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ’- srodni soj	<i>Ulmus minor</i> , <i>Ulmus</i>	Jović i sar., 2008; 2010



16Sr grupa fitoplazme	Trivajalno ime izolata (akronim)	'Ca. Phytoplasma' vrsta	Biljka i/ili insekt domaćin u Srbiji	Reference
16SrV-C	<i>Flavescence dorée</i> (FD-C) <i>Alder yellows</i> (AldY)	*	<i>laevis</i> , <i>Hyalesthes luteipes</i> grapevine, <i>Clematis vitalba</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Scaphoideus titanus</i> , <i>Dictyophara europaea</i>	Duduk i sar., 2004 Cvrković i sar., 2008 Filipin i sar., 2009
16SrX-A	<i>Apple proliferation</i> (AP)	'Ca. Phytoplasma mali'	jabuka	Duduk i sar., 2008a
16SrX-B	<i>European stone fruit yellows</i> (ESFY)	'Ca. Phytoplasma prunorum'	kajsija	Tanasković i Carraro, 2003
16SrX-C	<i>Pear decline</i> (PD)	'Ca. Phytoplasma pyri'	kruška	Duduk i sar., 2005
16SrXII-A	" <i>Stolbur</i> " (STOL11)	'Ca. Phytoplasma solani'	vinova loza, kukuruz, krompir, paradajz, paprika, celer, kelj, pasulj, duvan, šargarepa, peršun, valerijana, paštrnak, borovnica, kupina, <i>Convolvulus arvensis</i> , <i>Urtica dioica</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Sorghum halepense</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Erigeron annuus</i> , <i>Picris hieracioides</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Dianthus barbatus</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Oenothera biennis</i> , <i>Cichorium intybus</i> , <i>Saponaria officinalis</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Hypericum barbatum</i> , <i>Plantago major</i> ,	Aleksić i sar., 1967 Duduk i sar., 2004 Jović i sar., 2009b Drobnjaković i sar., 2010 Cvrković i sar., 2011 Ivanović i sar., 2011 Kuzmanović i sar., 2011 Trkulja i sar., 2011 Pavlović i sar., 2011; 2012a; 2014a; 2014b Starović i sar., 2012; 2013 Mitrović i sar., 2012; 2013; 2015a; 2016 Jošić i sar., 2012; 2013; 2015



16Sr grupa fitoplazme	Trivajalno ime izolata (akronim)	'Ca. Phytoplasma' vrsta	Biljka i/ili insekt domaćin u Srbiji	Reference
			<i>Echinacea purpurea</i> , <i>Hyalesthes obsoletus</i> , <i>Reptalus panzeri</i> , <i>Reptalus quinquecostatus</i> , <i>Dictyophara europaea</i> , <i>Anaceratagallia laevis</i> , <i>Anaceratagallia ribauti</i> , <i>Anaceratagallia venosa</i> , <i>Psammotettix alienus</i> , <i>Psammotettix confinis</i> , <i>Psammotettix striatus</i>	Kosovac i sar., 2013; 2019 Adamović i sar., 2014 Medić Pap i sar., 2018
16SrXII-H	<i>Bindweed yellows</i> (BY-S57/11)	'Ca. Phytoplasma convolvuli'	<i>Convolvulus arvensis</i>	Martini i sar., 2012a
16SrXIV-C	<i>Bermuda grass white leaf</i> (RS304/13)	'Ca. Phytoplasma cynodontis'- srodni soj	<i>Cynodon dactylon</i>	Mitrović i sar., 2015b
16SrXX-A	<i>Rhamnus witches'- broom</i>	'Ca. Phytoplasma rhamni'	<i>Rhamnus cathartica</i>	Jović i sar., 2011

* Ne mogu se formalno opisati ovi sojevi fitoplazmi kao zasebni taksoni jer u njihovim 16S rRNK genskim sekvencama ne postoje zajednični oligonukleotidi specifični za vrstu (Malembic-Maher i sar., 2011).



Tabela 2. Lista fitoplazmi na osnovu 16S rRNK grupe/podgrupe, biljka domaćin ili eksperimentalna biljka pronađena u asocijaciji sa *E. incisus* (Kirschbaum) (=plebejus Fallén) kao potencijalnim ili dokazanim vektorom u Evropi.

16Sr grupa fitoplazmi /pogrupa	Asocijacija sa oboljenjem, trivijalno ime fitoplazme	Biljka domaćin ili eksperimentalna biljka	Status vektora i geografsko poreklo	Referenca
16SrI-B	<i>Chrysanthemum yellows phytoplasma</i> (CY)	<i>Chrysanthemum frutescens</i> , <i>C. carinatum</i> i <i>Vitis vinifera</i>	prirodni ili eksperimentalni vektor, Italija	Conti i sar., 1988 Alma i sar., 2001
16SrI-C	<i>Clover phyllody</i> , <i>Strawberry green petal disease</i>	bela detelina	prirodni ili eksperimentalni vektor, Engleska	Frazier i Posnette, 1957 Posnette i Ellenberger, 1963 Brčák, 1979
16SrI-F	<i>Aster yellows phytoplasma</i>	vinova loza, korovi između redova vinove loze	potencijalni vektor, Češka	Orságová i sar., 2011
16SrIII-P	<i>Dandelion virescence phytoplasma</i>	<i>Taraxacum</i> spp.	potencijalni vektor, Litvanija	Ivanauskas i sar., 2014
16SrIII-P, 16SrIII-O	<i>Potato phytoplasma</i>	zasad krompira	potencijalni vektor, Rusija	Girsova i sar., 2016
16SrV-D	<i>Flavescence dorée phytoplasma</i>	vinova loza	eksperimentalni vektor na veštačkoj podlozi, Francuska	Bressan i sar., 2006
16SrVI	<i>Clover witches'-broom</i>	bela detelina	prirodni vektor, Engleska	Posnette i Ellenberger, 1963
16SrXII-A	<i>Stolbur</i>	biljke u zasadima krompira, bela detelina, vinova loza	prirodno inficiran potencijalni vektor, Češka, Francuska, Slovenija	Valenta i sar., 1961 Posnette i Ellenberger, 1963 Fos i sar., 1992 Mehle i sar., 2011 Šafářová i sar., 2018



Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih za identifikaciju i karakterizaciju fitoplazmi u asocijaciji sa vrstom *E. insicus*.

Gen	16S rRNK grupa fitoplazme	Naziv prajmera	5'-3' sekvenca prajmera	
16S rRNK	16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrIX, 16SrXI, 16SrXII	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	
		P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	
		R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	
		R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	
		P1A	ACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC	
		P7A	CCTTCATCGGCTCTTAGTGC	
		16s758f	GTCTTTACTGACGCTGAGGC	
		M23Sr	TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG	
		16SrIII	R16(III)F2	AAGAGTGGAAAACTCCC
			R16(III)R1	TCCGAAGTGGAGATTGA
		16SrV	R16(V)F1	TTAAAAGACCTTCTTCGG
			R16(V)R1	TTCAATCCGTAAGACTACC
16SrI	rpF1	GGACATAAGTTAGGTGAATTT		
	rpR1	ACGATATTTAGTTCTTTTTGG		
	rp(I)F1A	TTTTCCCCTACACGTAACAT		
	rp(I)R1A	GTTCTTTTTGGCATTAAACAT		
16SrII	rpF1C	ATGGTDGGDCAYAARTTAGG		
	rp(I)R1A	GTTCTTTTTGGCATTAAACAT		
	rp(II)F1	GCTCTTACTCGTAAAYATGTAGT		
	rp(II)R2	ATTTTTAACTTCCGTTTTTAC		
16SrIII	rpL2F3	WCCTTGGGGYAAAAAAGCTC		
	rp(I)R1A	GTTCTTTTTGGCATTAAACAT		
	rp(III)F1	TTAGAGAAGGCATTAAAC		
	rp(III)R1	CTCTTTCCCATCTAGGACG		
16SrIX	rpF1	GGACATAAGTTAGGTGAATTT		
	rpR1	ACGATATTTAGTTCTTTTTGG		
	rpF1C	ATGGTDGGDCAYAARTTAGG		
	rp(I)R1A	GTTCTTTTTGGCATTAAACAT		
16SrXII	rp(IX)F2	GCACAAGCTATTTAATGTTTACACCC		
	rp(IX)R2	CAAAGGGACTAAACCTAAAG		
	rpStolF	CGTACAAAATAATCGGGAGA		
	rpStolR	CGAAACAAAAGGTTTACGAG		
secY	16SrI	rpStolF2	AAACTTGGTCACGTAGTCC	
		L15F1A(I)	CTTCTGGTAAAGGACATAAAGG	
		MapR1A(I)	GTTCTTCGTGCAAAGATGTACC	
		AYsecYF1	CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGG	
	16SrIII	AYsecYR1	CAGAAGCTTGAGTGCCTTTACC	
		L15F1A(III)	CTTCTGGTAAAGGACATAAAGG	
		MapR1A(III)	GGTTCTTCGTGCAATTGCAAACC	
		SecYF2(III)	TGAAGGYGGACAAATCCCT	
16SrIX	SecYR1(III)	GACCTGCTTTTCTCATTATAGC		
	L15F1	CCTGGTAGTGGYAMTGGWAAAAC		
	MapR1	ATTARRAATATARGGYTCTTCRTG		
	L15F2(IX)	TTCAAAGAATTCCTAAAAGAGG		



Gen	16S rRNK grupa fitoplazme	Naziv prajmera	5'-3' sekvenca prajmera
		MapR2(IX)	GTACAACTGCTTCGTTTACAGA
		secYR1(IX)	CCCACTATAATTTAAAAGACT
		secYR2(IX)	TAGTATAATAAAGAATAGGGAT
		PosecF1	TCTGCTTTGCCTTTGCCTTT
	16SrXII	PosecR1	ATTAGTAAACTAGTTCCTCC
		PosecF3	GGATTGATAGATGCTGCCCC
		PosecR3	GCCCCTATAACGGTGATTTTGA
		Tuf1f	CACATTGACCACGGTAAAAC
<i>tuf</i>	16SrXII	Tuf1r	CCACCTTCACGAATAGAGAAC
		TufAYf	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA
		TufAYr	CGTTGTCACCTGGCATTACC
		StoIH10F1	AGGTTGTAAAATCTTTTATGT
<i>vmp1</i>	16SrXII	StoIH10R1	GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC
		TYPH10F	AACG TTCATCAACAATCAGTC
		TYPH10R	CACTTCTTTCAGGCAACTTC
		StampF	GTAGGTTTTGGATGTTTTAAG
<i>stamp</i>	16SrXII	StampR0	AAATAAAAGAACAAGTATAGACGA
		StampF1	TTCTTTAAACACACCAAGAC
		StampR1	AAGCCAGAATTTAATCTAGC



Tabela 4. 16S rRNK sekvence referentnih sojeva '*Ca. Phytoplasma*' vrsta korišćenih za filogenetsku rekonstrukciju.

'<i>Ca. Phytoplasma</i>' vrsta	Referentni soj (akronim)	Klasifikacija 16Sr grupa/ podgrupa	Pristupni brojevi u Banci gena
' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '	OAY	16SrI-B	M30790
' <i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i> '	THP	16SrI-Y	AY787136
' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> '	WBDL	16SrII-B	U15442
' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' <i>rrnA</i>	PX11Ct1	16SrIII-A	JQ044393
' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' <i>rrnB</i>	-	-	JQ044392
' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> '*	LY	16SrIV-A	U18747
' <i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> '*	LD	16SrIV-C	X80117
' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '	EY1	16SrV-A	AY197655
' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> '	JWB-G1	16SrV-B	AB052876
' <i>Ca. Phytoplasma rubi</i> '	RuS	16SrV-E	AY197648
' <i>Ca. Phytoplasma balanitae</i> '	BltWB	16SrV-F	AB689678
' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '	CP	16SrVI-A	AY390261
' <i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i> '	PassWB-Br3	16SrVI-I	GU292081
' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	AshY1	16SrVII-A	AF092209
' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> '	LfWB	16SrVIII-A	AF248956
' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '	A4	16SrIX-B	AF515636
' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	AP15	16SrX-A	AJ542541
' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	PD1	16SrX-C	AJ542543
' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	SpaWB	16SrX-D	X92869
' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	ESFY-G1	16SrX-B	AJ542544
' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '	RYD-Th	16SrXI-A	AB052873
' <i>Ca. Phytoplasma cirsii</i> '	CirYS	16SrXI-E	KR869146
' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '	STOL11	16SrXII-A	AF248959
' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '	AUSGY	16SrXII-B	L76865
' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '	JHP	16SrXII-D	AB010425
' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> '	StrawY	16SrXII-E	DQ086423
' <i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i> '	BY-S57/11	16SrXII-H	JN833705
' <i>Ca. Phytoplasma hispanicum</i> '	MPV	16SrXIII-A	AF248960
' <i>Ca. Phytoplasma meliae</i> '	ChTY-Mo3	16SrXIII-G	KU850940
' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '	BGWL-C1	16SrXIV-A	AJ550984
' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '	HibWB26	16SrXV-A	AF147708
' <i>Ca. Phytoplasma graminis</i> '	SCYLP	16SrXVI-A	AY725228
' <i>Ca. Phytoplasma caricae</i> '	PAY	16SrXVII-A	AY725234
' <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> '	APPTW12-NE	16SrXVIII-A	DQ174122
' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '	CnWB	16SrXIX-A	AB054986
' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '	BWB	16SrXX-A	X76431
' <i>Ca. Phytoplasma pini</i> '	Pin127S	16SrXXI-A	AJ632155
' <i>Ca. Phytoplasma palmicola</i> '	LYDM-178	16SXXII	KF751387



'Ca. Phytoplasma' vrsta	Referentni soj (akronim)	Klasifikacija 16Sr grupa/ podgrupa	Pristupni brojevi u Banci gena
Buckland valley grapevine yellows phytoplasma*	BVGY	16SrXXIII-A	AY083605
Sorghum bunchy shoot phytoplasma*	-	16SrXXIV-A	AF509322
Weeping tea witches'-broom phytoplasma*	-	16SrXXV-A	AF521672
Sugarcane phytoplasma D3T1*	-	16SrXXVI-A	AJ539179
Sugarcane phytoplasma D3T2*	-	16SrXXVII-A	AJ539180
Derbid phytoplasma*	-	16SrXXVIII-A	AY744945
'Ca. Phytoplasma omanense'	IM-1	16SXXXIX-A	EF666051
'Ca. Phytoplasma tamaricis'	SCWB1	16SrXXX-A	FJ432664
'Ca. Phytoplasma costaricanum'	SoyST1c1	16SrXXXI-A	HQ225630
'Ca. Phytoplasma malaysianum'	MaPV	16SrXXXII-A	EU371934
'Ca. Phytoplasma allocasuarinae'	AlloY	16SrXXXIII-A	AY135523
'Ca. Phytoplasma wodyetiae'	FPYD Bangi-2	16SrXXXVI-A	KC844879
'Ca. Phytoplasma noviquineense'	BCS-Bo	16SrIV-srodna, nova grupa	LC228755

* Slučajno citirane ili predložene nove vrste.



Tabela 5. 16S rRNK sekvence referentnih sojeva podgrupa 16Sr grupa I, II, III, IX, XI i XII korišćene za detaljniju filogenetsku rekonstrukciju unutar grupe.

Referentne 16Sr podgrupe		
Klasifikacija 16Sr grupa/podgrupa	Soj (akronim)*	Pristupni brojevi u Banci gena
16SrI-A	Tomato big bud (BB)/[Aster yellows witches' - broom (AY-WB)]	AY180955
16SrI-B	Onion yellows (OAY)/[Aster yellows (AY)]	M30790
16SrI-C	Clover phyllody (KVG)/[Clover phyllody (CPh)]	AY265218
16SrI-D	Paulownia witches' - broom (PaWB)	AY265206
16SrI-E	Blueberry stunt (BBS3)	AY265213
16SrI-F	Leafhopper borne (CVB)	AY265212
16SrI-K	Strawberry witches' - broom (STRAWB2)	U96616
16SrI-L	Aster yellows (AV2192)	AY180957
16SrI-M	Aster yellows (AVUT)	AY265209
16SrI-N	<i>Opomoea obscura</i> witches' - broom (IOWB)	AY265205
16SrI-O	Soybean purple stem (SPS)	AF268405
16SrI-P	Potato Purple Top-RU (Rus103-2)/[Witches' - broom disease of black poplar (AY-WB)]	EU333397
16SrI-Q	Cherry little leaf (ChLL)	AY034089
16SrI-R	Strawberry phylloid fruit (StrawPhF)	AY102275
16SrI-Y	'Hoja de perejil' (THP)	AY787136
16SrII-A	Peanut witches' - broom (PnWB)	L33765
16SrII-B	Lime witches' - broom (WBDL)	U15442
16SrII-C	Faba bean phyllody (FBP)	X83432
16SrII-D	Papaya yellow crinkle (PpYC)	Y10097
#16SrII-E	<i>Picris echioides</i> phyllody (PEP)	Y16393
16SrII-E	[<i>Picris hieracioides</i> bushy stunt (PHBS)]	JQ743505
16SrII-E	Italian alfalfa witches' - broom (IAWB)	EF193356
#16SrIII-A_rnA	Peach X-disease (PX11Ct1)	JQ044393
16SrIII-A_rnB	Peach X-disease (PX11Ct1)	JQ044392
#16SrIII-B	Clover yellow edge (CYE)	AF173558



Referentne 16Sr podgrupe

Klasifikacija 16Sr grupa/podgrupa	Soj (akronim)*	Pristupni brojevi u Banci gena
16SrIII-B	[<i>Cirsium arvense</i> multiple inflorescence disease (CMI-Ei)]	KP663643
16SrIII-C	Pecan bunch (PB1)	FJ376626
16SrIII-D	Goldenrod yellows (GRI)	FJ376627
16SrIII-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228
16SrIII-F	Milkweed yellows (MWI)	AF510724
16SrIII-G_rnA	Walnut witches' - broom (WWB)	AF190226
16SrIII-H	Poinsettia branch - inducing (PoiBI)	AF190223
16SrIII-I	Virginia grapevine yellows (VGY)	AF060875
16SrIII-J	Eggplant giant calyx (EB01-Br03)	HM589212
16SrIII-K	Strawberry leafy fruit (SLF)	AF274876
16SrIII-M	Potato purple top (PPT-MT117)	FJ226074
16SrIII-N	Potato purple top (PPT-AK6)	FJ376629
16SrIII-Q	Black raspberry witches' - broom (BRWB)	AF302841
16SrIII-R_rnA	<i>Cirsium</i> white leaf (CirWL)	AF373105
16SrIII-U	Eggplant giant calyx (EB02-Br06)	HM589213
16SrIII-V	Passion fruit witches' - broom (PassWB Br4)	GU292082
16SrIII-W	Heterothalamus little leaf (HetLL)	KC412029
16SrIII-X	Conyza witches' - broom (ConWBB)	KC412027
16SrIX-A	Pigeon pea witches' - broom (PPWB)	AF248957
16SrIX-B	Almond witches' - broom (AIWB)	AF515636
16SrIX-C	<i>Picris echioides</i> yellows (PEY)	Y16389
16SrIX-D	Echinops witches' - broom (EchinWB)	GU902973
16SrIX-E	Juniperus witches' broom (JunWB)	GQ925918
#16SrIX-F	Almond and stone fruit witches' - broom (N27-2)	HQ407532
16SrIX-F	Honduran <i>Gliricidia</i> little leaf (GLL-Hon)	AF361017
16SrIX-G	Almond and stone fruit witches' - broom (A1-1)	HQ407514
16SrIX-H	Sarson phyllody (SAR)	KU892213
16SrXI-A	Rice yellow dwarf (RYD)	AB052873
16SrXI-B	Sugarcane white leaf (SCWL)	X76432
16SrXI-C	Leafhopper-borne (BVK)	X76429



Referentne 16Sr podgrupe

Klasifikacija 16Sr grupa/podgrupa	Soj (akronim)*	Pristupni brojevi u Banci gena
16SrXI-D	Sugarcane white leaf (BS3)	KR020685
16SrXI-E	Cirsium phytoplasma (CirYS)	KR869146
16SrXI-F	Sugarcane grassy shoot (SC-Phy004)	HF586636
#16SrXII-A	Stolbur (STOL11)	AF248959
16SrXII-A	[Stolbur (STOL)]	X76427
16SrXII-B	Australian grapevine yellows (AUSGY)	L76865
16SrXII-C	Strawberry lethal yellows (StrawLY)	AJ243045
16SrXII-D	Japanese hydrangea phyllody (JHP)	AB010425
16SrXII-E	Yellows diseased strawberry (StrawY)	DQ086423
16SrXII-F	“Nois noir” (BN-Op30)	EU836652
16SrXII-G	“Nois noir” (BN-Fc3)	EU836647
16SrXII-H	[Bindweed yellows (BY-S57/11)]	JN833705

* Izolati fitoplazmi detektovani u Srbiji su dati u uglastim zagradama;

Referentni izolati 16Sr podgrupa korišćeni za izračunavanje RFLP koeficijenta sličnosti i p-distanci.



BIOGRAFIJA

Miljana Jakovljević je rođena 6.6.1988. godine u Jagodini. Nakon osnovne škole u Ribaru i gimnazije u Jagodini, školske 2007/2008 upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biologija. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8.89. Iste godine upisuje master akademske studije, smer Biologija, modul Biologija, podmodul Morfologija, sistematika i filogenija zooloških taksona. Završava ih 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.64 i odbranjenim master radom “Evaluacija taksonomskog statusa vrsta podroda *Bombus* s.str. (Hymenoptera, Apidae) na centralnom Balkanu primenom geometrijske morfometrije oblika krila” pod mentorstvom prof. dr Ljubiše Stanisavljevića. Na istom fakultetu 2012. godine upisuje doktorske akademske studije, smer Biologija, modul Morfologija, sistematika i filogenija životinja, podmodul Entomologija.

Od 2013. do 2015. godine prima Nacionalnu stipendiju za doktorske akademske studije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Od 2015. je zaposlena u Odseku za štetočine bilja Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu kao istraživač-saradnik u okviru nacionalnog projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III43001-„Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“, podprojekat „Diverzitet i dinamika biljnih patogena i njihovih insekatskih vektora u agroekosistemima Srbije“.

2018. godine dobija nagradu za najboljeg doktoranda Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu.

Do sada je učestvovala u realizaciji ukupno pet međunarodnih projekata.

Oblasti naučnog interesovanja su interakcija fitoplazmi i insekata vektora kao i molekularna sistematika, populaciona biologija i filogenija insekata.

Publikovala je 24 naučna rada i saopštenja od kojih je 9 objavljeno u međunarodnim časopisima. Hiršov indeks je $h=3$.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Миљана Јаковљевић

број индекса Б3002/2012

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мултипотентност цикаде *Euscelis incisus* (Hemiptera, Cicadellidae,
Deltosephalinae) у преношењу и епидемиологији фитоплазми ('*Candidatus*
Phytoplasma')

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____ .2019.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Миљана Јаковљевић

Број индекса Б3002/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада Мултипотентност цикаде *Euscelis incisus* (Hemiptera, Cicadellidae, Deltocephalinae) у преношењу и епидемиологији фитоплазми ('*Candidatus Phytoplasma*')

Ментор проф. др Жељко Томановић, др Татјана Цврковић

Потписани/а Миљана Јаковљевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____ 2019.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Мултипотентност цикаде *Euscelis incisus* (Hemiptera, Cicadellidae, Deltocerphalinae) у преношењу и епидемиологији фитоплазми (*Candidatus Phytoplasma*)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима


5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____ 2019.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.