

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Oliver M. Krstić

Uloga evolucionih interakcija između intracelularnog endosimbionta (*Wolbachia*) i fitoplazme (*Flavescence dorée*) u promenama komponenti adaptivne vrednosti i pravcima evolucije mitohondrijske DNK u prirodnim populacijama *Dictyophara europaea*

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Oliver M. Krstić

The role of evolutionary interactions between
intracellular endosymbiont (*Wolbachia*) and
phytoplasma (*Flavescence dorée*) on fitness
components and evolution of mitochondrial
DNA in natural populations of
Dictyophara europaea

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentorke:

Prof. dr Biljana Stojković, vanredna profesorka
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Jović, viša naučna saradnica
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
Beograd

Članovi komisije:

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

dr Ivo Toševski, naučni savetnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
Beograd

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za štetočine bilja u Zemunu, u okviru 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).

Veliku zahvalnost dugujem:

Mentorki dr Jeleni Jović na ukazanom poverenju i prilici da naučna istraživanja realizujem na više nego interesantnoj temi. Na angažovanju, posvećenosti, podršci i pre svega strpljenju. Na razvoju kritičkog mišljenja i prenetom znanju.

Mentorki prof. dr Biljani Stojković na podršci, razumevanju i korisnim sugestijama koje su doprinele realizaciji ove doktorske disertacije.

dr Ivi Toševskom na prenetom znanju, nesebičnoj pomoći i podršci u realizaciji ne samo doktorske disertacije već i celokupnog naučnog istraživanja. Na tome što je nepresušni izvor novih ideja i rešavanja metodoloških problema.

prof. dr Željku Tomanoviću na podršci i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu finalne verzije teksta.

Zahvalnost dugujem dr Milani Mitrović na poverenju i podršci i dr Tatjani Cvrković na podršci tokom izrade teze. Zahvaljujem se Andrei Kosovac i Miljani Jakovljević na podršci i pomoći. Hvala svim pomenutim članovima Odseka za štetočine bilja na raznovrsnim diskusijama i prijateljskoj atmosferi.

Hvala dr Sanji Radonjić i dr Snježani Hrnčić na pomoći pri sakupljanju materijala. Hvala i kolegama iz Centra za istraživanja u vinogradarstvu CREA-VIT, Koneljano, Italija (CREA-VIT Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano, Italy) na ustupljenom materijalu.

Veliku zahvalnost dugujem roditeljima i porodici. Hvala na razumevanju, podršci i strpljenju. Disertaciju posvećujem vama.

Uloga evolucionih interakcija između intracelularnog endosimbionta (*Wolbachia*) i fitoplazme (*Flavescence dorée*) u promenama komponenti adaptivne vrednosti i pravcima evolucije mitohondrijske DNK u prirodnim populacijama *Dictyophara europaea*

SAŽETAK:

Dictyophara europaea je široko rasprostranjena i ekonomski značajna cikada koja kao alternativni vektor *Flavescence dorée* (FD) fitoplazme, učestvuje u prenošenju bolesti u vinogradima Evrope. Sprovedena epidemiološka istraživanja su ukazala na postojanje populacija *D. europaea* sa veoma visokom stopom FD-infekcije, *Wolbachia*-inficiranih populacija sa niskom stopom FD-infekcije (DeWo+) i odsustvo *Wolbachia* u populacijama sa visokom stopom FD-infekcije (DeWo-). Ispitivano je nekoliko mogućih uzroka različite stope infekcije vektora: i) populaciono-genetičke karakteristike *D. europaea* i korelacija sa *Wolbachia* infekcijom, ii) efekat *Wolbachia* na komponente adaptivne vrednosti laboratorijske kolonije DeWo+, i iii) stopa inficiranosti prirodnog biljnog rezervoara FD fitoplazme i razlike u genotipovima fitoplazme u nisko- i visoko-inficiranim populacijama. Genotipizacijom mitohondrijskog *COI* gena evidentiran je smanjen genetički diverzitet DeWo+ u poređenju sa DeWo- populacijama i različita evolucija fiksiranih haplotipova. Multilokusnom genotipizacijom *Wolbachia* izolata identifikovan je isti soj, wEur, u svim DeWo+ populacijama. Diverzitet FD fitoplazme nije bio u korelaciji sa različitom stopom inficiranosti vektora. Utvrđeno je da *Wolbachia*-infekcija nema direktan efekta na adaptivnu vrednost *D. europaea*. Podaci iz prirodnih populacija *D. europaea* ukazuju na kompeticiju *Wolbachia* i FD fitoplazme: populacije koje su u niskoj stopi inficirane FD fitoplazmom su *Wolbachia*-inficirane i *vice versa*.

KLJUČNE REČI: epidemiologija, ekologija, FD fitoplazma, *Wolbachia*, koevolutivne interakcije, komponente adaptivne vrednosti, molekularna evolucija, mitohondrijska DNK, *Clematis vitalba*, *Dictyophara europaea*

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Evolucionarna biologija

UDK: [[579.264:[579.881+579.887]:575.82]:595.753(043.3)]

The role of evolutionary interactions between intracellular endosymbiont (*Wolbachia*) and phytoplasma (*Flavescence dorée*) on fitness components and evolution of mitochondrial DNA in natural populations of *Dictyophara europaea*

ABSTRACT:

Dictyophara europaea is widespread planthopper of economic importance, acting as an alternative vector of the *Flavescence dorée* (FD) phytoplasma disease of grapevine in European vineyards. Epidemiological studies have revealed *D. europaea* populations that are heavily FD-infected, as well as populations with low FD-infection rates that are naturally infected with *Wolbachia* (DeWo+), and highly FD-infected populations in the absence of *Wolbachia* (DeWo-). Several possible causes of differences in vector infection rates were examined: i) population genetic characteristics of *D. europaea* and their correlation with *Wolbachia* infection, ii) *Wolbachia* effects on fitness components of DeWo+ laboratory colony, and iii) the rate of reservoir plant FD-infection and differences in FD genotypes harboured by low and high infected vector populations. Genotyping of mitochondrial *COI* loci showed lower genetic diversity level in DeWo+ than in DeWo- populations of and divergent evolution of fixed haplotypes. Multilocus genotyping of *Wolbachia* revealed that all DeWo+ populations were infected with the same strain (i.e. wEur). Genetically diversified FD phytoplasma had no direct influence on vector infection rates. No evidence of direct fitness effects on *D. europaea* was registered with regard to *Wolbachia* infection status. Field data and the observed negative correlation between FD-infection and *Wolbachia*-infection rates, indicate that *Wolbachia* compete with FD phytoplasma within the host insect *D. europaea*.

KEY WORDS: epidemiology, ecology, FD phytoplasma, *Wolbachia*, coevolutionary interactions, components of adaptive value, molecular evolution, mitochondrial DNA, *Clematis vitalba*, *Dictyophara europaea*

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Evolutionary biology

UDC: [[579.264:[579.881+579.887]:575.82]:595.753(043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 <i>Dictyophara europaea</i> (Linnaeus, 1767): prirodni vektor fitoplazmi	3
1.2 Fitoplazme kao biljni patogeni koje prenose insekti vektori	5
1.3 Epidemiološki ciklus i putevi prenošenja <i>Flavescence dorée</i> (FD) fitoplazme ...	10
1.4 Endosimbionti insekata: <i>Wolbachia</i> kao reproduktivni parazit	13
1.5 Insekt-endosimbiont-patogen interakcije	18
2. CILJEVI	22
3. MATERIJAL I METODE	24
3.1 Biologija, ekologija i diverzitet populacija <i>D. europaea</i>	24
3.1.1 Sakupljanje materijala	24
3.1.2 Praćenje dinamike populacija <i>D. europaea</i> i opis lokaliteta	28
3.1.3 Gajenje i praćenje ponašanja <i>D. europaea</i>	29
3.1.4 Morfološke karakteristike stadijuma razvića <i>D. europaea</i>	31
3.2 Molekularne analize <i>D. europaea</i>	33
3.2.1 Ekstrakcija DNK	33
3.2.2 Amplifikacija DNK PCR metodom i sekvenciranje	33
3.2.3 Genealogija gena	36
3.2.4 Filogenetske analize	36
3.2.5 Molekularni diverzitet i analiza molekularne varijanse	36
3.3 Molekularne analize FD fitoplazme	38
3.3.1 Sakupljanje biljnog materijala	38
3.3.2 Ekstrakcija DNK iz biljaka	38
3.3.3 Detekcija fitoplazme	39
3.3.4 Molekularna karakterizacija FD fitoplazme	40
3.4 Molekularne analize <i>Wolbachia</i>	45
3.4.1 Detekcija <i>Wolbachia</i>	45
3.4.2 Molekularna karakterizacija <i>Wolbachia</i>	46
3.5 Eksperimentalne procedure	50
3.5.1 Osnivanje i gajenje <i>Wolbachia</i> -inficiranih (DeWo+) i -neinficiranih (DeWo-) kolonija <i>D. europaea</i>	50
3.5.2 Komponente adaptivne vrednosti DeWo+ i DeWo- kolonija <i>D. europaea</i> ..	51
3.5.3 Eksperimenti prenošenja FD fitoplazme prirodno inficiranim populacijama <i>D. europaea</i>	52

4. REZULTATI.....	54
4.1 Karakteristike biologije <i>D. europaea</i>	54
4.1.1 Populaciona dinamika i asocijacija sa biljkama	54
4.1.2 Reproduktivno ponašanje	55
4.1.3 Aspekti ponašanja i morfologije različitih stadijuma razvića <i>D. europaea</i> ..	57
4.2 Analiza komponenti adaptivne vrednosti DeWo+ i DeWo- kolonija <i>D. europaea</i> pod uticajem infekcije <i>Wolbachia</i>	63
4.2.1 Fekunditet	63
4.2.2 Masa tela.....	64
4.2.3 Dužina života.....	65
4.3 Vektorska sposobnost populacija <i>D. europaea</i>	66
4.4 Prisustvo FD fitoplazme u <i>Clematis vitalba</i>	67
4.5 Prisustvo FD fitoplazme u populacijama <i>D. europaea</i>	67
4.6 Molekularna karakterizacija FD fitoplazme	68
4.6.1 Analiza 16S rRNK gena	69
4.6.2 Analiza <i>rpl22-rps3</i> genskog regiona	69
4.6.3 Analiza <i>secY-map</i> genskog regiona.....	70
4.6.4 Analiza <i>secY</i> gena	70
4.6.5 Molekularna epidemiologija FD fitoplazme	71
4.7 Detekcija i molekularna karakterizacija <i>Wolbachia</i>	72
4.8 Populaciono genetičke analize <i>D. europaea</i>	74
4.8.1 Genealogija gena	74
4.8.2 Filogenetske analize	76
4.8.3 Molekularni diverzitet i analiza molekularne varijanse	79
5. DISKUSIJA.....	85
5.1 Biologija <i>D. europaea</i>	85
5.2 Biološki sistem <i>D. europaea</i> -endosimbiont-patogen	88
5.3 Uticaj tripartitnih interakcija na epidemiologiju i širenje FD fitoplazme	95
6. ZAKLJUČCI	99
7. LITERATURA	101

1. UVOD

Bakterije su sigurno najznačajnija grupa mikroorganizama prisutna u svim delovima ekosfere, a zbog svoje uloge u brojnim procesima od značaja za celokupni život planete, spadaju u grupu organizama koja je poslednjih dvestotine godina u najužem fokusu fundamentalnih istraživanja (Pepper *et al.*, 2009). Iako je njihov uticaj najveći na procese razgradnje ugljenika, azota, fosfora i ostalih hemijskih elemenata koje koriste živi organizmi, postoji širok spektar interakcija koje ove mikroorganizme svrstavaju u štetne ili korisne, bar kada je u pitanju antropogena interpretacija njihovog delovanja (Gyles *et al.*, 2008; Sundh *et al.*, 2012; Murillo *et al.*, 2015).

Bakterije su deo šire ekološke zajednice mikrobiota koje mogu značajno uticati na imunološke, hormonalne i metaboličke homeostaze eukariotskih organizama bilo da su prisutne na njemu ili se nalaze unutar organizma. Interakcije između bakterija i višćelijskih organizama, od najprostijih protista do biljaka i životinja, mogu po svojoj prirodi biti simbiotske, komensalne ili parazitske (patogene). Interesovanje naučne zajednice prema bakterijskim patogenima i dalje dominira poslednjih godina, zbog velikog uticaja koje bakterije imaju na kvalitet ljudskog života, kao i zbog uticaja bakterijskih patogena u procesima vezanim za proizvodnju životnih namirnica životinjskog i biljnog porekla.

Upravo je odnos prema proizvodnji hrane doprineo da se sredinom prošlog veka težište fundamentalnih istraživanja interakcija između biljnih patogena i strateški važnih biljnih kultura, promeni iz osnova. Ovakvoj promeni doprinela su nova saznanja u sferi interakcija biljnih patogena i insekata vektora koji vrše njihovu disperziju, naročito kada su u pitanju obligatne mikrobiote za čije su razviće i disperziju neophodni živi organizmi kao prenosioci (Weintraub & Jones, 2010; Orlovskis *et al.*, 2015; Perilla-Henao & Casteel, 2016). Razvoj molekularnih metoda detekcije i klasifikacije obligatnih bakterija, početkom 90-ih godina prošlog veka, omogućio je preciznu identifikaciju i početak proučavanja veoma važne grupe obligatnih bakterija, biljnih patogena iz grupe fitoplazmi ('*Candidatus Phytoplasma*', klasa Mollicutes) (Lee *et al.*, 1993; 1998; 2000). Otkrićem ovih biljnih bakterija otvoren je potpuno novi front u proučavanju do sada nepoznatih interakcija i epidemiologija koje prate njihovo prisustvo (Hogenhout *et al.*, 2008; Weintraub & Jones, 2010). Iz sličnih razloga, razvoja

naučnih mogućnosti u sagledavanju interakcija obligatnih intracelularnih bakterija i domaćina, rod *Wolbachia* odnosno raznovrsni genotipovi *Wolbachia pipientis* i njima prateći fenotipovi uticaja na domaćina predstavljaju izuzetno intrigirajući subjekt istraživanja evolucione biologije (Werren *et al.*, 2008), ali i primenjenih bioloških nauka poput medicine, poljoprivrede ili biološke kontrole (Zug & Hammerstein, 2015). *Wolbachia* su posebno interesantne sa evolucionog stanovišta zbog svoje karakteristične interakcije sa domaćinom tokom koje kao vertikalno prenosivi endosimbionti ne razvijaju mutualistički već primarno parazitski odnos, isključivo na sopstvenu korist, gde je benefit domaćina samo slučajan, sporedan efekat.

Usled tripartitne interakcije između biljaka, fitofagnih insekata vektora i bakterija koje prenose, istraživanje prirode ovih odnosa je unapred opterećeno uporednim poznavanjem sva tri entiteta koji čine ovaj kompleksni epidemiološki sistem koji je u međusobnoj interakciji koevoluirao (Hogehout *et al.*, 2008; Orlovskis *et al.*, 2015). U slučaju kada je zbog svoje biološke osobenosti, bakterijski entitet obligatni parazit, od posebnog je značaja poznavanje i sagledavanje interakcije između ostalih mikroorganizama koji mogu biti prisutni u biljci i/ili insektu domaćinu. Imajući u vidu da su interakcije između obligatnih bakterija i njihovih domaćina pre svega pokretač njihove koevolucije, očekivani ishod je određeni stepen komensalizma, a svako izmeštanje bakterijskog entiteta izvan ovog stabilnog sistema može dovesti do niza poremećaja koji su najčešće nepovoljni ili fatalni po biljnog domaćina koji nije prirodni domaćin patogena (ekspimiranje simptoma bolesti i uginuće biljke). Shodno tome, interakcije sa ostalim bakterijskim entitetima u trokomponentnom epidemiološko-evolutivnom sistemu mogu značajno uticati na adaptivnu vrednost svakog pojedinačnog učesnika ovog sistema (Zug & Hammerstein, 2015). U cilju sagledavanja ovako kompleksnih interakcija, kao imperativ se nameće dobro poznavanje bioekoloških i molekularno-genetičkih karakteristika svih činilaca koji učestvuju u ovom sistemu. Otkriće endosimbiontske bakterije iz grupe *Wolbachia* u populacijama *D. europaea* nisko- i visoko-inficiranih fitoplazmom *Flavescence dorée* (Krstić *et al.*, 2012) dodatno je ukazalo na još veću kompleksnost interakcija između ove cikade i bakterija koje prate njene populacije.

1.1 *Dictyophara europaea* (Linnaeus, 1767): prirodni vektor fitoplazmi

Cikade ili "cvrčci" (Hemiptera: Auchenorrhyncha) predstavljaju brojnu, široko rasprostranjenu i značajnu grupu fitofagnih insekata koja naseljava različite, mahom kopnene ekosisteme (Nickel, 2003). Po pravilu, radi se o polifagnim insektima prilagođenim da za svoju ishranu i razviće koriste biljne sokove. Auchenorrhyncha su hemimetabolni insekti koji su jasno podeljeni u dve monofiletičke grupe, Cicadomorpha i Fulgoromorpha. Infrared Fulgoromorpha čini 20 familija sa preko 10.000 opisanih vrsta (Holzinger *et al.*, 2003). Po svom izgledu, veličini i morfologiji spadaju u najatraktivnije vrste među cikadama, naročito vrste iz tropskog regiona. Među ovim atraktivnim cikadama posebno se izdvajaju vrste iz familije Dictyopharidae Spinola, 1839, sa preko 750 opisanih vrsta i više od 150 rodova (Song & Liang, 2011).

Rod *Dictyophara* Germar, 1833 (Fulgoromorpha, Dictyopharidae) je ograničen na region Palearktika, sastoji se od otprilike 40 vrsta, koje su prema dužini, debljini i obliku cefaličnog nastavka, podeljene u pet podrodova (Emeljanov, 2003). *Dictyophara europaea* (Linnaeus, 1767) je tipaska vrsta roda, a zajedno sa bliskim vrstama *D. asiatica* Melichar, 1912, *D. lindbergi* Metcalf, 1955 i *D. subsimilis* Linnavuori, 1953 svrstana je u podrod *Dictyophara*. Prema literaturnim podacima, *D. europaea* je polifagna vrsta cikade koja se hrani floemom biljaka. Rasprostranjena je širom zapadnog Palearktika, sa pojedinačnim nalazom u severozapadnoj Kini (Song & Liang, 2008).

Dictyophara europaea je česta vrsta cikade, nalažena u asocijaciji sa različitim vegetacijskim zajednicama, tipom staništa i klimatskim uslovima. Iako česta, podaci o biologiji ove vrste su retki i ograničeni na informacije o rasprostranjenju, karakteristikama staništa i ishrani, odnosno asocijacijama sa različitim biljnim vrstama (Nickel, 2003). U literaturi postoji generalni konsenzus o polifagnom načinu ishrane ove cikade. Na osnovu pregleda dosadašnjih studija i objavljenih podataka o asocijacijama cikada i različitih biljnih zajednica, Holzinger i saradnici navode u svojoj monografiji o cikadama centralne Evrope (Holzinger *et al.*, 2003) da je *D. europaea* u asocijaciji sa višegodišnjim biljkama, travama i žbunastom vegetacijom, dok se prema podacima Bidermana i Nidrinhausa *D. europaea* hrani zeljastim biljkama i travama (Biedermann & Niedringhaus, 2004). Pored ovih opštih podataka, *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) se navodi kao česta biljka na kojoj je frekventno nalažena ova cikada (Melichar, 1912). U skorijim istraživanjima, Lesio i Alma navode da je *D. europaea*

česta cikada u asocijaciji sa biljnim vrstama *Amaranthus retroflexus* L. (Amaranthaceae) i *Urtica dioica* L. (Urticaceae), pri čemu *A. retroflexus* navode kao odgovarajuću biljku domaćina za laboratorijsko gajenje ove cikade (Lessio & Alma, 2008). Međutim, u okviru epidemioloških istraživanja fitoplazmi, Filipini i saradnici su ukazali na prisustvo *D. europaea* u agro-ekosistemima vinograda gde je zabeležena kao brojna na pavitini (*Clematis vitalba* L., Ranunculaceae) (Filippin, 2009a). U pogledu staništa, za *D. europaea* se često navode ruderalna staništa, kserotermne i sunčane padine, prevashodno sa ogoljenim delovima gde ženke polažu jaja u zemlji (Holzinger & Hausl-Hofstätter, 1994; Biedermann & Niedringhaus, 2004). Od dodatnih informacija o biologiji, u literaturi se još mogu naći opšti podaci o tome da ima jednu generaciju godišnje i da prezimljava u stadijumu jajeta (Nickel, 2003; Nickel & Remane, 2002).

Interesovanje za biologiju, asocijacije sa biljkama domaćinima i ponašanje *D. europaea* je u skorije vreme poraslo u naučnoj zajednici usled dokaza o njenoj ulozi u epidemiološkom ciklusu *Flavescence dorée* (FD) fitoplazme (16S rRNA grupa V, podgrupa C), koja izaziva destruktivno oboljenje vinove loze (Filippin *et al.*, 2009a). Bolest vinove loze uzrokovana *Flavescence dorée* fitoplazmom je nanela ozbiljne štete u vinogradarskim regionima prvenstveno Francuske i Italije, a kasnije i Balkana, u kojima je zbog epidemijskog širenja bolesti ugrozila proizvodnju vina (Steffek *et al.*, 2007).

Uloga *D. europaea* u epidemiološkom ciklusu FD fitoplazme je potvrđena nakon eksperimentalnog prenošenja ove fitoplazme sa prirodno inficirane pavitine, *C. vitalba*, na zdrave klijance vinove loze. Multigenaska karakterizacija (engl. *Multi Locus Sequence Typing*, MLST) i genotipizacija je potvrdila isti tip fitoplazme u insektu i testiranim biljkama vinove loze (Filippin *et al.*, 2009a). Pored toga, Filipini i saradnici (Filippin *et al.*, 2009b), a zatim i Cvrković i saradnici (2010), su registrovali u ovoj cikadi prisustvo stolbur fitoplazme (16S rRNA grupa XII podgrupa A, '*Candidatus* *Phytoplasma solani*'), koja izaziva fitoplazmatičnu bolest *Bois noir* na vinovoj lozi. Ova fitoplazma je nativno evropski patogen, registrovana na brojnim biljkama iz porodice Solanaceae (Quaglino *et al.*, 2013) i ugrožava proizvodnju mnogih strateških poljoprivrednih kultura kao što je krompir, kukuruz i vinova loza (Maixner, 1994; Jović *et al.*, 2009; Ember *et al.*, 2011; Mitrović *et al.*, 2016). Pored navedenog, tokom istraživanja epidemiologije bolesti uzrokovane fitoplazmama u vinogradima južne

Srbije (Mitrović *et al.*, 2012), potvrđeno je često prisustvo stolbur fitoplazme u cikadi *D. europaea*, ali i dodatno utvrđeno prisustvo fitoplazme 16SrII-E podgrupe (*Picris hieracioides bushy stunt* fitoplazma, PHBS) koja izaziva simptome žbunave zakržljivosti na vrsti *Picris hieracioides* L. (Asteraceae).

Saznanja o prisutnosti različitih fitoplazmi u *D. europaea*, kao i njena potencijalna vektorska uloga u prenošenju i širenju ovih biljnih patogena, dodatno su usložena otkrićem da ova vrsta cikade može imati neuobičajeno visoku stopu inficiranosti fitoplazmama na populacionom nivou (Krstić *et al.*, 2012). Poznavanje biologije vrste je imperativ za sagledavanje kompleksnih interakcija koje ona ima unutar ekosistema čiji je činilac, naročito kod onih vrsta koje mogu izazvati ekonomske posledice. U slučaju *D. europaea*, metodološki okviri rada sa populacijama ove cikade bili su od posebnog značaja i preduslov za bilo kakva istraživanja, što je direktno ukazalo na potrebu da se prouči do sada nepoznata biologija ove vrste. Sa druge strane, polifagnost i široka rasprostranjenost *D. europaea*, odnosno potencijal za usvajanje, a time i širenje tri različite fitoplazme, kao i očekivana diverzitetna bakterijska flora koja je karakteristična za sve cikade, čine *D. europaea* dobrim model organizmom za proučavanje fundamentalnih i aplikativnih aspekata bioloških sistema u kojima učestvuje.

1.2 Fitoplazme kao biljni patogeni koje prenose insekti vektori

Fitoplazme ('*Candidatus* Phytoplasma', Mollicutes) su obligatni intracelularni patogeni biljaka i insekata vektora. Vode poreklo od gram-pozitivnih bakterija, nemaju ćelijski zid i bliske su spiroplazmama. Ove bakterije su otkrivene 1967. godine od strane japanskih istraživača (Doi *et al.*, 1967) koji su ih tada imenovali *mikoplazmama slični organizmi* (engl. *Mycoplasma Like Organisms* - MLOs), a naziv *fitoplazma* i status vrste kandidata ('*Candidatus* Phytoplasma') su dobile na konferenciji Internacionalne organizacije za mikoplazmologiju (IOM) održanoj 1996. godine na Floridi, USA (Seemüller *et al.*, 1998). Fitoplazme su isključivo intracelularni mikroorganizmi koji u biljkama ostaju uglavnom vezani za floemsko tkivo (Doi *et al.*, 1967; McCoy *et al.*, 1989). Kroz biljku se kreću koristeći pore sitastih ploča, koje dele floemske sitaste cevi. Do razvoja molekularne dijagnostike, fitoplazme su klasifikovane na osnovu bioloških karakteristika, kao što su ispoljavanje simptoma kod obolelih biljaka, krug domaćina i interakcija sa vektorom (Lee *et al.*, 2000). Ove bakterije izazivaju, u više stotina biljnih

vrsta preko 700 oboljenja koja su vrlo često fatalna za biljnog domaćina (Weintraub & Jones, 2010). Dobro poznati i karakteristični simptomi koje fitoplazme uzrokuju kod obolelih biljaka uključuju sledeće: intezivno grananje tkiva u razvoju (veštičja metla; engl. *witches' broom*), filodije (retrogradna metamorfoza cvetnih organa u listove), virescence (zelena obojenost ne zelenih delova cveta), crvenilo listova i stabljike, generalizovano žutilo ili crvenilo, propadanje i zaostajanje rasta inficirane biljke, praćeno nekrozom floemskog tkiva.

Klasifikacija i karakterizacija fitoplazmi se isključivo zasniva na molekularnim metodama analize DNK, jer su simptomi koje one izazivaju na biljkama opšti i zajednički za sve vrste fitoplazmi iako one mogu pripadati različitim i filogenetski udaljenim grupama. Sa druge strane, ista fitoplazma može izazvati različite simptome na različitim biljkama domaćinima, zbog čega su molekularne analize metod izbora za potvrdu prisustva i identiteta fitoplazme, dok su biološki karakteri važni pokazatelji etiologije i epidemiologije bolesti (Lee *et al.*, 2000). Fitoplazme su klasifikovane na osnovu analize sekvenci 16S rRNK gena u 16Sr grupe i podgrupe koje predstavljaju zasebne filogenetske linije ili vrste. Na osnovu 16S rDNK rekonstrukcije filogenetskih odnosa do tada poznatih fitoplazmi, Li i saradnici su izvršili klasifikaciju ovih bakterija koja je i danas u širokoj upotrebi, odnosno prihvaćena od većine istraživača (Lee *et al.*, 1998). Prema ovoj klasifikaciji sve fitoplazme su podeljene na 14 16Sr grupa i 41 podgrupu (Lee *et al.*, 1998). Danas, sa porastom broja dostupnih sekvenci 16S rRNK gena fitoplazmi iz različitih delova sveta, poznato je 33 glavnih grupa fitoplazmi (16SrI-XXXIII) i preko 100 podgrupa (Zhao *et al.*, 2010; Zhao & Davis, 2016) dok je ukupno 37 '*Candidatus Phytoplasma*' vrsta zvanično opisano (Zhao & Davis, 2016).

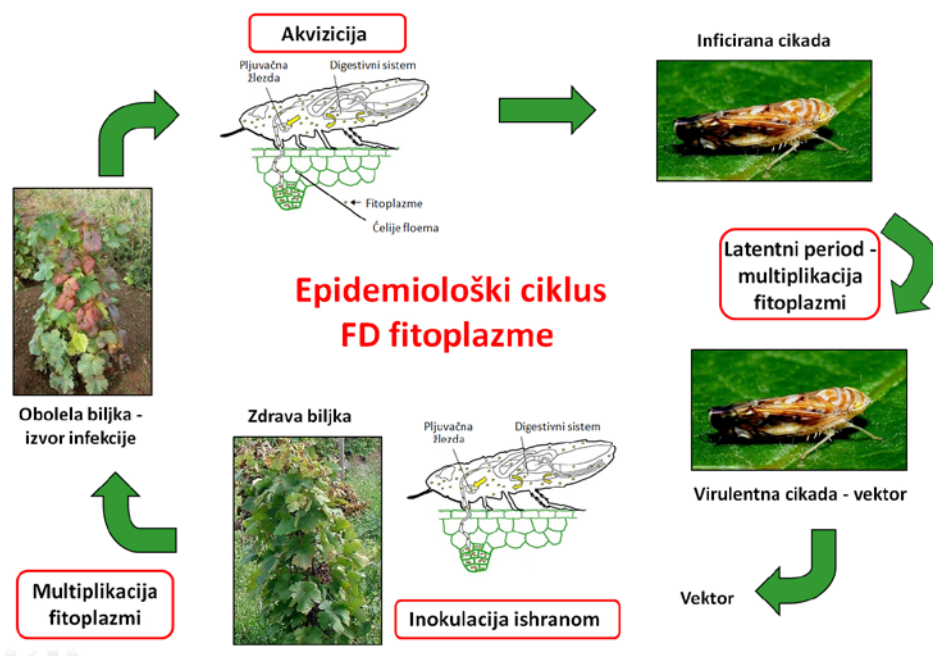
Internacionalni Komitet za Sistematiku Bakterija (engl. *International Committee of Systematic Bacteriology*), podkomitet za Taksonomiju Molikuta (engl. *Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes*) usvojio je 2004. godine kriterijume i definisao preporuke za proceduru opisa vrsta fitoplazmi unutar provizionog roda sa statusom kandidata, tj. '*Candidatus Phytoplasma*' (IRPCM, 2004). Na osnovu ovih preporuka, nova '*Candidatus Phytoplasma*' vrsta se opisuje kada njena sekvenca 16S rRNK gena (u dužini većoj od 1200 bp) ima manje od 97,5% homologije sa sekvencom poznate vrste. Međutim, obzirom da je 16S rRNK gen visoko evoluciono konzervativan region genomske DNK, često se fenotipske odlike organizma, u vidu njegovih bioloških i

ekoloških osobnosti, ne oslikavaju u sekvenci ovog gena. Postoji značajan broj fitoplazmi čije su bio-ekološke karakteristike jasno različite od svih drugih vrsta, a da genomski region 16S rRNK ne oslikava te različitosti (razlika je manja od 2,5%) usled čega su definisani dodatni kriterijumi za opise novih vrsta roda '*Candidatus Phytoplasma*'. Dve vrste fitoplazmi koje dele više od 97,5% sličnosti 16S rRNK sekvence mogu biti opisane kao zasebne vrste ako ispunjavaju sledeća tri kriterijuma: i) da se prenose različitim vektorima, ii) da imaju različite biljke domaćine, i iii) da postoji jasan dokaz molekularnog diverziteta, odnosno različitosti, između njih. Treći kriterijum podrazumeva analize sekvenci drugih konzervativnih gena koji su za date vrste informativniji nego što je to 16S rRNK gen. Među ovim genima najčešće se analizira operon gena ribozomalnih proteina (koji obuhvata gene za *l22* i *s3* ribozomalne proteine), gen koji kodira protein translokazu (*secY* gen), gen faktora elongacije Tu (*tuf* gen) i drugi konzervativni, a ipak dovoljno varijabilni geni da bi ukazali na razlike značajne za nivo vrste (Hodgetts & Dickinson, 2010).

Poznata su tri mehanizma unošenja fitoplazmi u tkivo biljke domaćina: i) vegetativno širenje, kalemljenjem zaraženog biljnog materijala (Boudon-Padieu, 2003), ii) vaskularno povezivanje inficiranih i neinficiranih biljaka parazitskim cvetnicama (*Cuscuta* spp.) (Dale & Kim, 1969), i iii) ishranom inficiranog (virulentnog) insekta vektora na nezaraženim biljkama (Schvester *et al.*, 1961). Najefikasniji je, i u prirodi najčešći, horizontalni mehanizam prenošenja fitoplazmi putem insekata vektora. Takav tip prenošenja je uglavnom perzistentan, jer insekt vektor posle latentnog perioda multiplikacije fitoplazmi nakon akvizicije ostaje infektivan do kraja životnog ciklusa (Weintraub & Jones, 2010) (Slika 1). Zbog toga su fitoplazme fitopatogene bakterije sa jedinstvenom životnom strategijom jer im je za opstanak i širenje u prirodi neophodno aktivno umnožavanje u oba domaćina: biljci i insektu vektoru. Ovakva biologija fitoplazmi uzrokuje usko-specifičnu interakciju i koevolutivnu adaptiranost između bakterije, biljke domaćina i insekta vektora (Hogenhout *et al.*, 2008).

Vektori fitoplazmi su insekti iz reda Hemiptera, podredova Auchenorrhyncha (cikade u širem smislu) i Sternorrhyncha (psile) koji se hrane floemskim sokom biljaka domaćina. U biljkama fitoplazme uglavnom kolonizuju samo floemske elemente, dok u insektima vektorima prvo kolonizuju ćelije digestivnog sistema, a zatim putem hemolimfe dospevaju do drugih organa (Hogenhout *et al.*, 2008). Njihovo prisustvo i

umnožavanje u pljuvačnim žlezdama omogućava inokulaciju bakterija u floemske sudove biljke prilikom ishrane vektora (Slika 1).

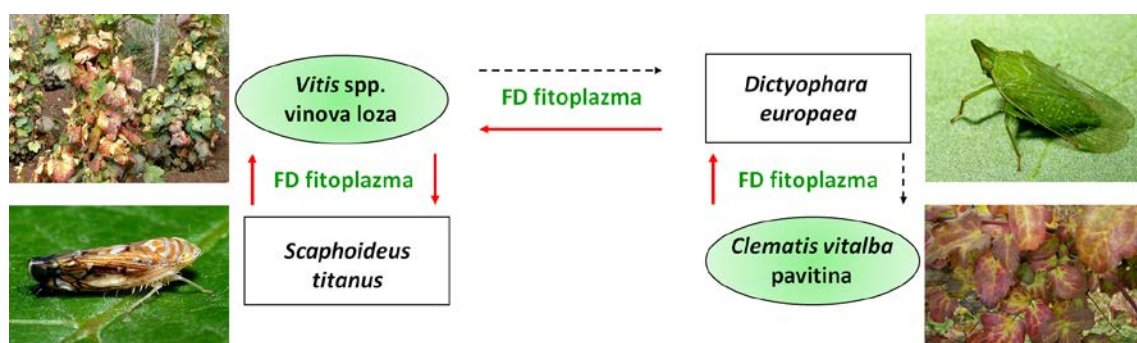


Slika 1. Shematski prikaz zatvorenog epidemiološkog ciklusa *Flavescence dorée* (FD) fitoplazme na vinovoj lozi.

Podaci o uticaju fitoplazmi na adaptivnu vrednost insekata vektora su skromni i različiti, a variraju od negativnih, preko neutralnih do pozitivnih efekata (Christensen *et al.*, 2005). Proces testiranja komponenti adaptivne vrednosti polifagnih insekata je dodatno komplikovan zbog značajnog efekta dostupnosti hrane u prostoru i vremenu, ali i kvaliteta i diverziteta ishrane (Cates, 1981; Chown & Nicolson, 2004). Pomenuti aspekt je veoma bitan za cikade jer njihov glavni izvor ishrane, floem, sadrži samo oko 0.03-1% esencijalnih aminokiselina, značajno niže nego druga biljna tkiva (Awmack & Leather, 2002). Iako oskudni, podaci iz literature ukazuju da uticaj fitoplazmi na performansu vektora zavisi od vrste bakterije, insekata vektora, njihove interakcije i koevolutivne adaptacije (pregled referenci u Hogenhout *et al.*, 2008).

U slučaju kada prisustvo fitoplazme u biljkama izaziva patogeni efekat i kada su u pitanju značajne gajene kulture, širenje bolesti unutar zasada može imati dramatične ekonomske posledice. Jednu od najznačajnijih bolesti vinove loze, *Flavescence dorée*

(FD), izaziva fitoplazma iz 16SrV grupe. Od polovine prošlog veka, u epidemijskim talasima, ova bolest je uništila preko 80% zasada vinograda u Francuskoj (Magarey, 1986), preko 50% vinograda u severnoj Italiji (Belli *et al.*, 2011), a u Srbiji od 2004. godine, uništila je skoro u potpunosti nekoliko značajnih vinogorja, pre svega fruškogorsko, matejevačko i aleksandrovačko (Duduk *et al.*, 2004; Krnjajić *et al.*, 2007; Kuzmanović *et al.*, 2008). Sve dok nisu otkriveni prirodni rezervoari ove fitoplazme, odnosno druge biljne vrste pored vinove loze, u kojima je registrovano prisustvo genotipova srodnih FD fitoplazmi (Angelini *et al.*, 2004; Arnaud *et al.*, 2007; Filippin *et al.*, 2009a), za epidemiološki ciklus ove bolesti se pretpostavljalo da je zatvoren i da uključuje samo cikadu *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 (Constable, 2010) (Slika 1). Saznanja da je FD fitoplazma prisutna asimptomatski u pavitini (*Clematis vitalba*, Ranunculaceae) i u cikadi *D. europaea*, ukazala su da je epidemiologija ove bolesti znatno kompleksnija (Filippin *et al.*, 2009a) (Slika 2). Otkriće potencijalno novog vektora u epidemiologiji FD fitoplazme je od posebnog značaja za sagledavanje i predviđanje interakcija ove fitoplazme u prirodnim staništima i širenje u prirodi. Ovo je posebno važno ako se uzme u obzir da je *D. europaea* relativno česta vrsta u evropskoj fauni, a zbog njene nepoznate biologije, potencijalnu vektorsku ulogu u disperziji FD fitoplazme nije bilo moguće sagledati. Međutim, informacije o njenoj asocijaciji sa prirodno FD-inficiranim biljkama *C. vitalba* koja je čest korov u međama vinograda jugoistočne Evrope (Filippin *et al.*, 2007) i visokom incidencom asimptomatske infekcije ovih biljaka ukazalo je na njihovu važnu ulogu kao izvor inokuluma i rezervoar infekcije (Filippin *et al.*, 2009a).



Slika 2. Shematski prikaz alternativnog puta unosa FD3 (FD-C) fitoplazme u ekosistem vinograda putem cikade *Dictyophara europaea* kao vektora i *Clematis vitalba* kao rezervoara bolesti i izvora inokuluma. Prema Filippini *et al.* (2009a).

Stopa inficiranosti fitoplazmom prirodnih populacija *D. europaea* u severnoj Italiji i Srbiji, područjima koja su do sada detaljno istražena, iznosi oko 3%, što je neuobičajeno nisko za efikasnog vektora (Hogenhout *et al.*, 2008; Filippin *et al.*, 2009a). Preliminarna istraživanja epidemiologije fitoplazme u vinogradima Crne Gore ukazala su da je stopa inficiranosti populacija *D. europaea* značajno viša, preko 60%, praćena visokom efikasnošću prenošenja patogena. Preliminarni podaci o populacionoj genetici vektora (Krstić *et al.*, 2012) ukazali su na neuobičajenu evolutivnu istoriju ove vrste kao i na mogućnost da su drugi endosimbionti/patogeni od značaja u biologiji ove cikade.

1.3 Epidemiološki ciklus i putevi prenošenja *Flavescence dorée* (FD) fitoplazme

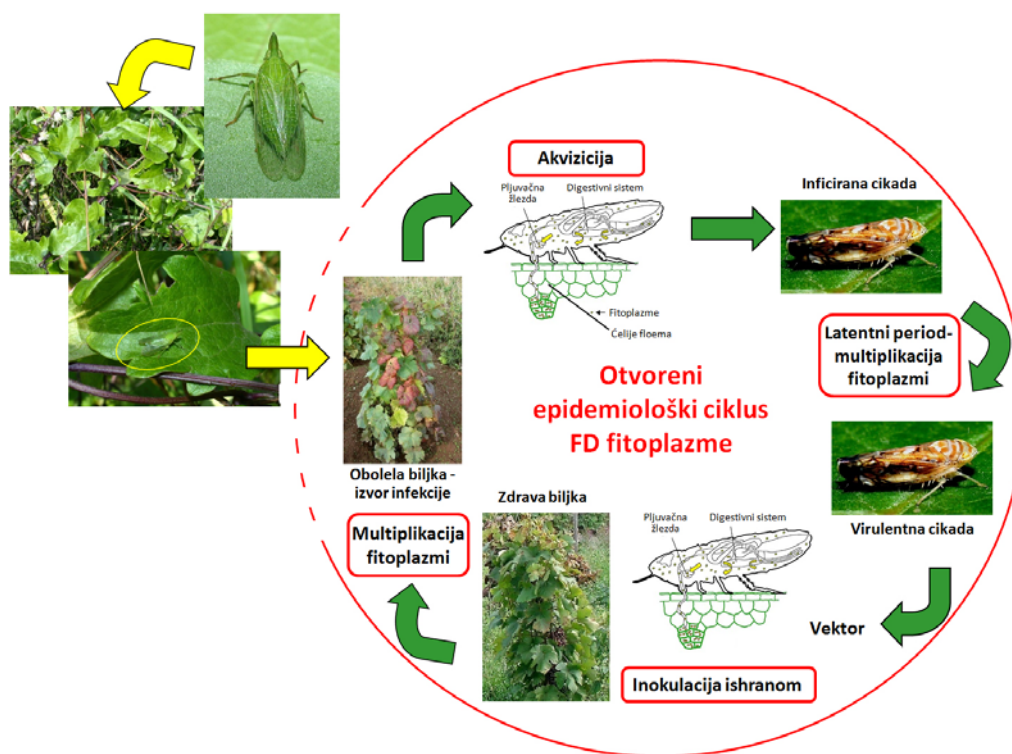
Ranije se smatralo da su distribucija i širenje FD fitoplazme direktno (i jedino) zavisni od biologije i ekologije specifičnog ampelofagnog insekta vektora *Scaphoideus titanus* (Chuche & Thiéry, 2014), zatvorenog epidemiološkog ciklusa prenošenja fitoplazme *in situ* unutar vinograda (Caudwell, 1990), i puteva disperzije i unošenja fitoplazme u vinograd iz okolnih prirodnih rezervoara patogena (Arnaud *et al.*, 2007; Filipin *et al.*, 2009a; Lessio *et al.*, 2016). Cikada *S. titanus* je sredinom prošlog veka slučajno introdukovana iz severne Amerike u Francusku (Bonfils & Schvester, 1960), najverovatnije tokom jednog introdukcijskog događaja (Papura *et al.*, 2012), i od tada se raširila unutar evropskih vinograda lociranih u klimatskoj zoni između 35° i 50° severne geografske širine koja joj omogućava uspešno razviće (Chuche *et al.*, 2015). *Scaphoideus titanus* je danas prisutan od Portugala i Španije na zapadu do Rumunije na istoku, oblasti Champagne na severu Francuske do oblasti Basilicata na jugu Italije (Chuche & Thiéry, 2014). Činjenica da FD fitoplazma nije prisutna u svim vinogradarskim regionima u oblastima u kojima je prisutan *S. titanus* (Jeger *et al.*, 2016) ukazuje na spoljašnji izvor patogena i značaj prirodnih rezervoara FD fitoplazme za širenje bolesti. Države u kojima je prisustvo FD fitoplazme dugogodišnje i gde značajno ugrožava proizvodnju vinove loze i vina su: Francuska, Italija, Španija, Portugal, Slovenija, Srbija, i od nedavno Švajcarska i Hrvatska (Jeger *et al.*, 2016).

Na osnovu analiza nukleotidnih sekvenci 16S rRNK gena i intergenskog prostora između 16S i 23S rRNK utvrđeno je da FD fitoplazmu čine genetički prilično homogeni sojevi, iako je evidentna njihova ekološka i epidemiološka raznovrsnost (Angelini *et al.*, 2001; 2004; Arnaud *et al.*, 2007; Filipin *et al.*, 2009a; Lessio *et al.*,

2016), i da se oni mogu svrstati u dve taksonomske podgrupe: 16SrV-C i -D (Lee *et al.*, 1998; 2004). Međutim, istorijski su utvrđene tri geografski izolovane epidemiološke i epidemijske grupe sojeva, odnosno genotipova, FD fitoplazme koje su imenovane na osnovu primarnog soja prouzrokovača epidemije, a okarakterisane na osnovu varijabilnijih gena koji učestvuju u interakciji fitoplazme sa domaćinom (kao npr. *secY* gen za preprotein translokazu; Angelini *et al.*, 2001): FD70, FD92 (FD-D) i FD-C. Sojevi grupe FD70 i FD-C pripadaju taksonomskoj podgrupi 16SrV-C na osnovu 16S-23S rRNK genskog regiona, dok FD-D sojevi pripadaju 16SrV-D podgrupi (Lee *et al.*, 2004). Naknadnom analizom drugog gena od značaja za epidemiološka ispitivanja, *house-keeping* gena koji kodira metionin aminopeptidazu (*map* gen), potvrđeno je da postoje tri geografske grupacije sojeva (genotipova) FD fitoplazme: FD1 (=FD70=16SrV-C), FD2 (=FD-D=16SrV-D) i FD3 (=FD-C=16SrV-C) (Arnaud *et al.*, 2007). Geografska distribucija ovih genotipova je specifična i delimično preklapajuća, što ukazuje na različite epidemiološke izvore patogena. FD1 genotip je karakterističan za vinogorja zapadnog dela Francuske, dok je u ostalom delu prisutan FD2 genotip i to u približno 80% zaraženih vinograda (Arnaud *et al.*, 2007). U Francuskoj nije prisutan FD3 genotip. U Španiji, Portugalu i Švajcarskoj je detektovano isključivo prisustvo FD2 tipa FD fitoplazme u vinovoj lozi (Foissac & Maixner, 2013; Casati *et al.*, 2017). U Italiji je situacija nešto kompleksnija; sva tri tipa FD fitoplazme su identifikovana, ali je u severozapadnoj Italiji dominantan FD1 genotip, dok je u severoistočnoj dominantan FD3 genotip (Agelini *et al.*, 2001; Arnaud *et al.*, 2007). Nadalje, FD2 i FD3 genotipovi su identifikovani u Hrvatskoj i Sloveniji, ali je u obe zemlje FD3 tip dominantan (Mehle *et al.*, 2011; Plavec *et al.*, 2015). U Srbiji je prisutan isključivo FD3, odnosno FD-C, tip FD fitoplazme (Duduk *et al.*, 2004; Filippin *et al.*, 2009a).

Epidemiološka slika koja prati ovu fitoplazmu ukazuje, međutim na još kompleksniju situaciju. Dugo se smatralo da je epidemiološki ciklus FD fitoplazme "zatvoren" i "monocikličan", tj. da je vinova loza izvor inokuluma i terminalna biljka domaćin patogena, i da se bolest inicira i širi epidemijski (Slika 1; Constable, 2010). *Scaphoideus titanus* je posmatran kao jedini vektor FD fitoplazme, a njegova monofagnost i činjenica da kompletan životni ciklus, od jaja do adulta, ostvaruje na vinovoj lozi objašnjavala je epidemijsko širenje ove bolesti. Međutim, nejasno je bilo na koji način i pored obaveznih mera hemijskog tretiranja insekta vektora dolazi do pojave

novih žarišta FD fitoplazme, koja zatim u slučaju prisutnosti specifičnog vektora *S. titanus* u dovoljnoj brojnosti, prelaze u epidemijsko širenje koje ugrožava cela vinogorja. Tek je sa otkrićem *C. vitalba* kao rezervoara FD3 (FD-C) genotipa FD fitoplazme u Italiji i na Balkanu (Angelini *et al.*, 2004; Filippin *et al.*, 2009a), odnosno *Alnus glutinosa* kao rezervoara FD2 (FD-D) genotipa (poznatog kao *Alder yellows* fitoplazma) u Francuskoj, Italiji (Arnaud *et al.*, 2007) i na Balkanu (Cvrković *et al.*, 2008), utvrđeno da je epidemiološki ciklus otvoren i da se epidemija širi monociklično, ali se začinje policiklično tj. iz spoljašnjeg izvora.



Slika 3. Shematski prikaz otvorenog epidemiološkog ciklusa FD fitoplazme, genotipa FD3 (FD-C) u ekosistemima vinograda jugoistočne Evrope. *Dictyophara europaea* i *Clematis vitalba* imaju značajnu ulogu u inicijaciji ciklusa kao alternativni, autohtoni vektor, odnosno prirodni rezervoar fitoplazme.

Samo je u slučaju epidemiologije FD3 genotipa FD fitoplazme dokazano, molekularno-epidemiološkim mapiranjem i eksperimentalnim prenošenjem, da je

autohtona cikada *Dictyophara europaea* prirodni vektor ovog patogena i da vrši unos fitoplazme iz prirodnog rezervoara *C. vitalba* u zasad vinove loze gde infekciju preuzima amplexiforni, specifični vektor *S. titanus* koji infekciju dalje širi epidemijski (Slika 2 i 3). U slučaju iniciranja epidemije FD2 tipa FD fitoplazme u vinogradima Francuske, na osnovu molekularno-epidemioloških podataka se pretpostavlja, ali bez eksperimentalnih dokaza, da autohtona cikada *Oncopsis alni* prenosi fitoplazmu sa okolnih biljaka *Alnus glutinosa* na čokote vinove loze i tako začinje epidemiju (Arnaud *et al.*, 2007). Nedavno je utvrđeno da postoji i treći potencijalni izvor bolesti i to genotipa FD2, za sada utvrđenog u Italiji i Švajcarskoj, sa svojim pratećim vektorom, cikadom introdukovanom iz Azije *Orientalus ishidae* (Lessio *et al.*, 2016; Casati *et al.*, 2017). Iako je širenje FD fitoplazme evidentno kompleksno i zavisno od geografskih i klimatskih specifičnosti pojedinih regiona, u uslovima Balkana i severoistoka Italije nedvosmisleno je dominantan epidemiološki tip FD3, čije je prirodni rezervoar pavitina (*C. vitalba*), a prirodni vektor koji inicira infekciju *D. europaea* (Angelini *et al.*, 2004; Filippin *et al.*, 2009a).

1.4 Endosimbionti insekata: *Wolbachia* kao reproduktivni parazit

Insekti predstavljaju najdiverzitetniju grupu životinja sa preko milion i dvesta hiljada vrsta, od kojih više od polovine poseduje endosimbiontske bakterije (Buchner, 1965; Douglas, 1998; Baumann *et al.*, 2000). Asocijacija endosimbionata i insekata je po pravilu česta pojava kod onih vrsta koje koriste nutritivno ograničene izvore ishrane, kao što su biljni sokovi, krv kičmenjaka ili drvena masa, pri čemu je njihovo prisustvo neophodno (obligatni endosimbionti) za preživljavanje i normalno razviće domaćina (Kikuchi, 2009). Zbog važnosti u metabolizmu insekata, bakterijski endosimbionti mogu biti prisutni u somatskim i germinativnim ćelijama. Takvi endosimbionti se nazivaju primarnim i predstavljaju rezultat dugoročne asocijacije i koevolucije između bakterija i insekta domaćina. Zbog značaja koji imaju za uspešno razviće insekata, obligatni endosimbionti se prenose vertikalnim, odnosno materinskim putem na potomstvo (Mira & Moran, 2002; Kikuchi, 2009). Nasuprot primarnim endosimbiontima, veliki broj insekata poseduje i fakultativne ili sekundarne endosimbionte. Ove endosimbionte karakteriše neselektivna lokalizacija u telu domaćina, čest horizontalni transfer između organizama i činjenica da nisu neophodni za uspešno preživljavanje i reprodukciju domaćina (Clark *et al.*, 2010). Za sekundarne

endosimbionte se smatra da predstavljaju prelaznu fazu između slobodno živećih, nespecifičnih bakterija i obligatnih mutualista (Kikuchi, 2009). Zbog toga, sveobuhvatnu biologiju vrste insekta je nemoguće proučavati nezavisno od ekološkog konteksta koji čine prateće bakterije (Dillon & Dillon, 2004). Buchner (1965) je podred Auchenorrhyncha opisao kao “gladnim za simbionte” i utvrdio da većina vrsta iz ovog podreda poseduje bar dva endosimbionta, a da kod nekih taj broj ide i do šest. Sa druge strane, Jing i saradnici (2014) su došli do zaključka da je kod insekata koji se hrane floemskim sokovima relativno nizak bakterijski diverzitet u poređenju sa drugim grupama insekata, i da je on sveden na ne više od 10 taksona. Kao razlozi za niski diverzitet se navode ishrana floemom za koji se pretpostavlja da je sterilna sredina bez bakterija, zatim delovanje imunskog sistema same biljke i/ili antagonističke interakcije između samih bakterija (Sugio *et al.*, 2015). Iako nema podataka o broju i vrstama primarnih i sekundarnih endosimbionata koji su prisutni kod vrste *D. europaea*, studija o bakterijskoj flori filogenetski srodnih vrsta iz familije Dictyopharidae (Urban & Cryan, 2012), ukazuje na postojanje bar dva primarna endosimbionta i to: '*Candidatus* Vidania fulgoroideae' i '*Candidatus* Sulcia muelleri'. Oba organizma, zbog uloge u ishrani, odlikuje duga asocijacija sa insektom domaćinom i kodiverzifikacija. *Dictyophara europaea*, kao i brojne druge cikade, za ishranu koristi floem biljaka. Biljni floem je bogat šećerima, ali ne obezbeđuje sve esencijalne aminokiseline insektu domaćinu zbog čega predstavlja suboptimalnu hranu za ove organizme (Douglas, 2003; Chown & Nicolson, 2004). Cikade ovaj problem “rešavaju” prisustvom određenog broja primarnih endosimbionata u telu koji im svojim metabolizmom “dopunjuju” ishranu. Iako nema konkretnih studija o tome, razumna je pretpostavka da su pomenuti primarni endosimbionti prisutni i u telu *D. europaea*. Do sada je od sekundarnih endosimbionata u širem smislu, u telu *D. europaea* potvrđeno samo prisustvo fitoplazmi (Filippin *et al.*, 2007; 2009a; Cvrković *et al.*, 2010; Mitrović *et al.*, 2012). Sa druge strane, kod vrste cikada iz podreda Auchenorrhyncha, koji su dokazani vektori fitoplazmi, otkriveno je prisustvo nekoliko vrsta endosimbionata. Tako je u telu cikade *Scaphoideus titanus*, primarnog vektora FD fitoplazme, dokazano prisustvo endosimbionta *Cardinium* (Sacchi *et al.*, 2008). Prisustvo *Wolbachia* je detektovano u telu cikade koja kao vektor prenosi stolbur fitoplazmu (*Hyalesthes obsoletus*) (Gonella *et al.*, 2011), kao i u cikadi *Hishimonoides sellatifomis*, vektoru MD fitoplazme (*Mulberry duarf* - 16SrI-B)

(Kawakita *et al.*, 2006). U cikadama *Macrosteles striifrons* i *M. sexnotatus*, utvrđeno je prisustvo *Wolbachia* i dve fitoplazme, *Aster Yellows* - AY ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') i *Rice Yellow Dwarf* - RYD fitoplazme ("*Candidatus* Phytoplasma oryzae") (Ishii *et al.*, 2013). *Wolbachia* je između ostalih endosimbionata, označena kao potencijalni kandidat za biološku kontrolu insekata iz podreda Auchenorrhyncha koji kao vektori prenose biljne patogene (Chuche *et al.*, 2017). Biološka kontrola insekata putem *Wolbachia* koristi se kod suzbijanja komaraca, a time i bolesti koje kao vektori prenose (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011).

Wolbachia je kao vrsta otkrivena značajno ranije nego što je njeno prisustvo u telu insekta povezano sa brojnim efektima koje ona izaziva u kontekstu reproduktivne i evolucione biologije domaćina. Naime, Hertig i Wolbach su 1924. godine otkrili intracelularno prisustvo bakterije u telu komarca *Culex pipiens* (French, 1978). Ta bakterija je kasnije nazvana *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). Tek 1971. godine je prisustvo *Wolbachia* u telu insekta povezano sa poremećajem fertiliteta kod nekih vrsta komaraca iz roda *Culex*. Yen i Barr (1971) su ovaj poremećaj nazvali citoplazmatska inkompatibilnost (engl. *cytoplasmic incompatibility* - CI) i dokazali da je upravo *Wolbachia* odgovorna za ovaj fenomen. Danas, nekoliko decenija kasnije, poznato je da je uticaj i odnos koji ovi obligatni intracelularni endosimbionti artropoda i nematoda ostvaruju sa domaćinom veoma raznolik i da se po svom kvalitetu kreće od parazitizma do mutualizma (Werren *et al.*, 2008; Zug & Hammerstein, 2015). Na osnovu multilokusne genotipizacije (MLST) (Baldo *et al.*, 2006), *Wolbachia* je trenutno podeljena na jedanaest supergrupa obeleženih slovima A-F i H-L. Supergrupe A i B su vezane za filum Arthropoda, dok su supergrupe C i D isključivo povezane sa nematodama iz superfamilije Filarioidea (Ros *et al.*, 2009). Supergrupa G je naknadno izostavljena jer je utvrđeno da sojevi unutar ove supergrupe predstavljaju rekombinante između supergrupa A i B (Augustinos *et al.*, 2011). Tipični soj, odnosno soj na osnovu kojeg je prvobitno opisana vrsta *Wolbachia pipientis*, izolovan je iz komarca *Culex pipiens* i svrstan je u supergrupu B. Pretpostavlja se da se supergrupa B odvojila od supergrupe A pre više od 60 miliona godina (Werren, 1997), a da su se supergrupe A i B odvojile od supergrupa C i D pre više od 100 miliona godina (Bandi *et al.*, 1998). Za potrebe bližeg grupisanja i klasifikacije, unutar supergrupa je uvedena podela sojeva na grupe na osnovu sekvenci *wsp* gena (Stouthamer *et al.*, 1999). Ime grupe se sastoji od

prva tri slova imena domaćina iz koga je izolovan određeni soj, a u grupe se svrstavaju sojevi čije sekvence pokazuju identitet veći od 97.5% u odnosu na referentnu sekvencu određenu za svaku grupu. Na ovaj način je u okviru supergrupa A i B identifikovano 10, odnosno 9 grupa (Stouthamer *et al.*, 1999). Zvanično se svi do sada izolovani sojevi formalno svrstavaju u okviru vrste *W. pipientis* i dok pitanje taksonomskog statusa ove bakterije ne dobije finalni epilog većina istraživača konsenzusom u svojim radovima koristi, atipično i manje formalno, samo ime roda *Wolbachia*, bez obzira na pripadnost supergrupi ili grupi (Lo *et al.*, 2007).

Wolbachia pripadaju grupi gram negativnih bakterija klase Alphaproteobacteria (red Rickettsiales) i smatra se da inficiraju preko dve trećine svih vrsta današnjih artropoda (Zug & Hammerstein, 2012). Usled svoje široke rasprostranjenosti, raznovrsnih efekata na reproduktivnu i evolucionu biologiju domaćina i potencijalnih aplikacija u kontroli štetočina i vektora bolesti (Wong *et al.*, 2011), *Wolbachia* su tokom poslednje decenije posebno intenzivno proučavane sa evolucionog, ekološkog i aplikativnog stanovišta (Zug & Hammerstein, 2015). *Wolbachia* se u prirodi primarno prenose vertikalno, sa roditelja na potomstvo unutar populacije domaćina, a šire se horizontalno putem zajedničkih parazita, parazitoida ili trofičkih resursa na druge vrste artropoda. Iako se predominantno prenose vertikalno, što po teoriji uslovljava evoluciju mutualističkog odnosa sa domaćinom (Zug & Hammerstein, 2015), *Wolbachia* manipuliše reproduktivnom biologijom artropodnih domaćina u sopstvenu korist, često uzrokujući značajno smanjenje adaptivne vrednosti domaćina (Werren *et al.*, 2008). Ove manipulacije obuhvataju četiri glavne grupe *Wolbachia*-indukovanih fenotipskih efekata: feminizacija, smrtnost genetičkih mužjaka, indukovana partenogeneza i citoplazmatska inkompatibilnost (CI) (Werren, 1997). Usled materinskog nasleđivanja, *Wolbachia* može da utiče na evoluciju mitohondrijske DNK domaćina favorizovanjem haplotipova sa kojima je u asocijaciji, što za posledicu ima tzv. mitohondrijsko čišćenje, odnosno smanjenje haplotipskog diverziteta.

Efekat *Wolbachia* na pravce evolucije mitohondrijske DNK je višestruk. Zbog načina transmisije *Wolbachia* i time uzrokovanog indirektnog delovanja prirodne selekcije na mtDNK domaćina dolazi do procesa analognog evolutivnom procesu poznatom pod nazivom genetički draft (engl. *genetic draft* ili *genetic hitchhiking*) (Gillespie, 2000; Rokas *et al.*, 2001). Indirektni efekti prirodne selekcije na mtDNK

domaćina podrazumevaju tzv. selektivno čišćenje (engl. *selective sweep*), odnosno povećavanje učestalosti samo onih haplotipova koji su „udruženi” sa *Wolbachia*, tj. nalaze se sa njima u ćelijama, što kao krajnju posledicu ima smanjenje genetičkog diverziteta populacije (Shoemaker *et al.*, 2004, Narita *et al.*, 2006).

Wolbachia može, usled efekta CI, da uzrokuje i reproduktivnu izolaciju između inficiranih i neinficiranih populacija domaćina, čime se povećava selekcionni pritisak ka genetičkoj diferencijaciji populacija, divergenciji i na kraju specijaciji (npr. Engelstädter & Hurst, 2009; Yu *et al.*, 2011). Nasuprot fenotipova *Wolbachia* koji uzrokuju poremećaj u odnosu polova domaćina, CI uzrokuje selekciju ženki (i njihovih mitohondrijskih haplotipova) koje poboljšavaju bakterijsko prenošenje, jer ženke koje nisu inficirane ne ostavljaju potomstvo usled inkompatibilnosti sa inficiranim mužjacima. Smatra se da upravo ovaj *Wolbachia* fenotip, usled ograničenih negativnih efekata na domaćina i postepenog prilagođavanja populacija domaćina, predstavlja najverovatnijeg parazitskog pretka mutualističkog fenotipa infekcije *Wolbachia* (Engelstädter & Hurst, 2009). Savremena istraživanja odnosa *Wolbachia* i artropodnih domaćina su pokazala da *Wolbachia* može imati pozitivan efekat na adaptivnu vrednost domaćina, odnosno da odnos može evoluirati u mutualizam, fakultativnog ili obligatnog tipa (pregled referenci u Zug & Hammerstein, 2015).

Zaštita od patogena predstavlja jedan od efekata prisustva endosimbionta (*Wolbachia*) kada domaćin ostvaruje korist, jer simbiot deluje interferentno na patogena (virus ili bakterija) prisutnog u zajedničkom domaćinu, pri čemu štiti domaćina (Haine, 2008; Brownlie & Johnson, 2009). Pretpostavlja se da efekat zaštite domaćina evoluirao kada je *Wolbachia*, kao vertikalno prenosiv simbiot, u kompeticiji sa horizontalno prenosivim patogenom u istom domaćinu. Iako je u mnogim studijama zabeležen anti-patogeni efekat *Wolbachia* (uglavnom zasnovan na povećanoj rezistentnosti domaćina) mali je broj onih u kojima su testirani efekti *Wolbachia* na adaptivnu vrednost domaćina, odnosno izneti dokazi o *Wolbachia*-posredovanoj zaštiti domaćina koja uključuje anti-patogeni efekat i poboljšanje komponenti životnih istorija domaćina (Hedges *et al.*, 2008; Zélé *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013). Molekularni mehanizmi na kojima počiva *Wolbachia*-posredovan anti-patogeni efekat još uvek su nejasni. Na osnovu dve glavne hipoteze, koje nisu međusobno isključive, *Wolbachia*-uzrokovana interferenca patogena može biti posledica kompeticije sa patogenom za

ograničene resurse domaćina (Moreira *et al.*, 2009; Frentiu *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Osborne *et al.*, 2012) ili ushodnog regulisanja imunskog odgovora domaćina u prisustvu *Wolbachia* (Xi *et al.*, 2008; Kambris *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2012). Međutim, rezultati dosadašnjih analiza anti-patogenog efekta prisustva *Wolbachia* zasnovane su na studijama koje su pratile uticaj *Wolbachia* u domaćinima koji ili prirodno nisu *Wolbachia*-inficirani ili su inficirani drugim sojem *Wolbachia*. Sa druge strane, brojne studije su zasnovane na podacima o anti-patogenom efektu *Wolbachia* na patogene koji prirodno nije u asocijaciji sa domaćinom na kome se efekat testira (Zug & Hammerstein, 2015). Ovo je vrlo značajno sa stanovišta primene rezultata u medicini, s obzirom na to da postoje radovi u kojima je opisana smanjena inficiranost komaraca iz roda *Aedes*, denge virusom, usled prisustva *Wolbachia* (koja je veštački ubačena) u telu komarca (Moreira *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Blagrove *et al.*, 2012; Mousson *et al.*, 2012).

Sa stanovišta fundamentalnih istraživanja, postoji skepticizam ka objektivnom sagledavanju anti-patogenog *Wolbachia*-posredovanog efekta i zaštite domaćina od patogena, usled činjenice da je većina podataka o ovakvom efektu *Wolbachia* dobijena putem transinfekcije, tj. veštačkog ubacivanja *Wolbachia* u telo insekta (Kambris *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Van den Hurk *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013). Naime, ne postoje podaci o efektima prirodnih sojeva *Wolbachia*, koje su u asocijaciji sa prirodnim populacijama vektora *in situ* i bakterijskih patogena koje prenose, izuzev pojedinih istraživanja na komarcima (Zélé *et al.*, 2012).

1.5 Insekt-endosimbiont-patogen interakcije

Kada su u pitanju fitoplazme, floem biljke je jedna od primarnih sredina za preživljavanje i razmnožavanje ovih patogena. Druga sredina koju ova bakterija naseljava i koja joj omogućuje normalan životni ciklus je telo insekta vektora. U telu *D. europaea* do sada su registrovane tri filogenetski različite grupe fitoplazmi (16SrII, 16SrV i 16SrXII) od kojih je za 16SrV grupu i dokazana vektorska uloga ove cikade (Filippin *et al.*, 2009a). Nema puno primera za potencijalne interakcije fitoplazme i *Wolbachia* u prirodnim populacijama insekta vektora. Pomenuti radovi o prisustvu *Wolbachia* u vektorima fitoplazmi *Hishimonoides sellatiformis*, *Hyalesthes obsoletus*,

Macrosteles striifrons i *M. sexnotatus*, odnose se samo na registrovanje prisutnosti bakterija, bez podataka o potencijalnim interakcijama i uticaju endosimbionta.

Sa druge strane, aspekti biologije i ekologije fitoplazmi opsežno su istražene, počev od njihovog genoma, preko efektorskih proteina do interakcije sa insektima i fenotipskih manifestacija (Christensen *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2006; Hougehout *et al.*, 2008; Sugio *et al.*, 2011). Takođe, istraživanja *Wolbachia* su u poslednje dve decenije napredovala, ponajviše zbog širokog repertoara reproduktivnih efekata kojim ova bakterija „manipuliše“ domaćinima (Werren, 1995, 1997; Zug & Hammerstein, 2015), a zatim i potencijalnim antipatogenim efektom i antagonističkim interakcijama sa virusima i bakterijama koje izazivaju bolesti kod čoveka, a kao vektori ih prenose insekti (Hedges *et al.*, 2008; Brownstein *et al.*, 2003). Ostaje nepoznato kako se dva relativno dobro istražena biološka entiteta, kakvi su fitoplazma i *Wolbachia*, ponašaju kada prirodno inficiraju insekta domaćina, i da li rezultanta njihovog odnosa ima (i kakve) efekte na njegovu adaptivnu vrednost.

Direktan pozitivan efekat na adaptivnu vrednost domaćina je, pored fenotipskih efekata i reproduktivne manipulacije, sigurno širenje *Wolbachia* u naredne generacije. Iako postoji neslaganje među evolucionim biologima i različito tumačenje, adaptivna vrednost predstavlja konačan rezultat svih razvojnih i fizioloških procesa realizovanih kod jedinki u datim uslovima sredine. Takođe, ukoliko postoje razlike između jedinki iste populacije u određenim karakteristikama koje utiču na merljive razlike u adaptivnoj vrednosti, onda te karakteristike predstavljaju komponente adaptivne vrednosti, od kojih su osnovne fertilitet (broj potomaka) i vijabilitet (dužina života) (Tucić & Tucić, 2000). Do sada je direktan pozitivan efekat na adaptivnu vrednost domaćina dokazan za *Wolbachia* koje inficiraju nematode iz reda Filariidae (Weeks *et al.*, 2002). Ukoliko se antibiotskim tretmanom odstrani *Wolbachia*, nematode nisu u mogućnosti da produkuju potomstvo. Sa druge strane, direktan negativan efekat je pokazan u slučaju endoparazitskih osica *Trichogramma deion* i *T. pretiosum*, gde su *Wolbachia*-inficirane osice imale smanjen fekunditet u poređenju sa neinficiranom kontrolom (Stouthamer & Luck, 1993). Na promenama u komponentama adaptivne vrednosti se zasnivaju i novije metode kontrole insekata vektora koje su bazirane na dve strategije (Douglas, 2007): i) ometanje po insekta korisnih endosimbionata, koji im obezbeđuju esencijalne materije neophodne za normalno funkcionisanje, i ii) veštačko ubacivanje (transinfekcija) u telo

insekta endosimbionata koji manipulišu reproduktivnim ponašanjem domaćina. Što se tiče prve strategije, u preliminarnoj fazi istraživanja tretiranje insekata antibiotikom rezultovalo je dramatično smanjenom stopom rasta i reprodukcije i umerenim skraćanjem dužine života. S obzirom na to da korišćenje antibiotika nije opcija iz očiglednih razloga, trenutno se traga za alternativnim načinima ometanja funkcionisanja, po insekta korisnih, endosimbionata. Druga strategija je istraženija od prve, pre svega što je u metodološkom smislu pristupačnija za testiranje. Kod vektora koji su prethodno *Wolbachia*-inokulisani izaziva se imunski odgovor insekta i sagledava status patogena u populaciji vektora koji prenosi patogen na čoveka (slučaj komaraca iz roda *Anopheles* i parazita *Plasmodium* kao i vrste *Aedes* koja prenose viruse *Dengue* i *Chickungunya*). Ova strategija podrazumeva korišćenje različitih sojeva *Wolbachia* koji, kao manipulatori reprodukcije mogu u telu insekta vektora da ekspimiraju različiti fenotip (citoplazmatsku inkopatibilnost, feminizaciju ili smrt genetičkih mužjaka) i time utiču na životni ciklus insekata, a zasniva se na pretpostavljenim interakcijama koje negativno utiču na populaciju vektora.

Ako zbog dugotrajnog odnosa koevolucije zanemarimo primarne endosimbionte, sekundarni se u telu insekta susreću sa ograničenim resursima i posledično sa kompeticijom za resurse i širenje kroz tkiva i generacije domaćina (Vautrin *et al.*, 2008). Rezultati mogu da budu kontradiktorni ako se izučavaju prirodno i veštački inficirane populacije insekta domaćina. Tako su Goto i saradnici utvrdili antagonističke interakcije između *Wolbachia* i *Spiroplasma* u veštački inficiranim voćnim mušicama *Drosophila melanogaster* (Goto *et al.*, 2006), dok u prirodno inficiranim mušicama ovim endosimbiontima takva interakcije nije registrovana (Ventura *et al.*, 2012). Bakterije, za koje telo insekta predstavlja prirodno okruženje i stanište, mogu biti uključene u različite tipove interakcija sa drugim bakterijama i te se interakcije mogu nalaziti u rasponu od antagonističkih do mutualističkih, a u slučajevima multiple infekcije svi mikroorganizmi se nalaze u kompeticiji za ograničene resurse domaćina (Vautrin & Vavre, 2009). Sama kompeticija predstavlja evolucionu pritisak koji može dovesti do preterane eksploatacije resursa, što za posledicu može imati nemogućnost održavanja multiple infekcije (Vautrin *et al.*, 2008; Vautrin & Vavre, 2009 i reference unutar rada). Sa druge strane, stabilno održavanje multiple infekcije predstavlja preduslov za evoluciju odnosa dva endosimbionta ka kooperaciji. Stabilno održavanje

multiple infekcije pretpostavlja da se oba endosimbionta vertikalno prenose kroz generacije domaćina (Vautrin *et al.*, 2008). Do sada, nije utvrđena mogućnost zajedničke transmisije *Wolbachia* i fitoplazme, jer se prva prenosi materinski, tj. vertikalno, a druga horizontalno, odnosno svaka generacija insekta *de novo* usvaja fitoplazmu hraneći se zaraženim biljkama.

Postojanje populacija *D. europaea* različitog statusa infekcije bakterijom *Wolbachia*, predstavlja mogućnost da se između prirodno inficiranih i neinficiranih populacija *D. europaea* utvrde moguće interakcije između *Wolbachia* i fitoplazme, a zatim i njihov efekat na populacionu biologiju i molekularnu evoluciju ove cikade kao domaćina u veoma kompleksnom tripartitnom sistemu.

2. CILJEVI

Opšti cilj ove disertacije jeste analiza uticaja *Wolbachia* na populaciono-genetičku dinamiku, komponente adaptivne vrednosti i zaštitu od patogena u prirodnim populacijama prirodnog vektora fitoplazme *Flavescence dorée*, cikade *Dictyophara europaea*. Za sagledavanje ovih interakcija prethodni uslov podrazumeva ispitivanje biologije i ponašanja vektora *D. europaea*, koje je nepoznato, kao i iznalaženje metodologije gajenja insekta u kontrolisanim uslovima. Na osnovu molekularnih ispitivanja genskih markera mitohondrijske i jedarne DNK moguće je proceniti inter- i intra-populacionu varijabilnost domaćina, a utvrđivanjem asocijacija mitotipova sa *Wolbachia* uticaj endosimbionta na evolucione promene domaćina. Karakterizacijom sojeva fitoplazmi u visoko i nisko inficiranim populacijama vektora ispituje se uticaj genotipa patogena na stopu inficiranosti vektora. Konačno, efekat prisustva/odsustva i molekularnih osobenosti soja *Wolbachia* na genetičku strukturu, karakteristike dužine života i potencijalnog fekunditeta insekta vektora, daje odgovor na pitanje da li koevolucioni odnos između *Wolbachia* i domaćina utiče na adaptivnu vrednost *D. europaea* i zaštitu od drugih patogena.

Na osnovu navedenog, specifični ciljevi ove disertacije su:

- Ispitivanje biologije, ponašanja i populacione genetike cikade *Dictyophara europaea*.
- Analiza stepena inficiranosti vektora *D. europaea* fitoplazmom *Flavescence dorée*.
- Ispitivanje molekularnih specifičnosti fitoplazme *Flavescence dorée* u nisko- i visoko-inficiranim populacijama vektora.
- Utvrđivanje prisustva i uticaja *Wolbachia* na genetičku strukturu populacija domaćina, cikade *D. europaea*.
- Ispitivanje prirodnog odnosa endosimbionta *Wolbachia* i cikade *D. europaea* i uticaja ovog odnosa na adaptivnu dinamiku i zaštitu od patogena u populacijama domaćina.

Analize predviđene ciljevima disertacije omogućavaju utvrđivanje karakteristika prirodnog tripartitnog odnosa između insekta vektora (*D. europaea*), horizontalno prenosivog patogena (fitoplazma *Flavescence dorée*) i vertikalno prenosivog endosimbionta (*Wolbachia*), čije je sagledavanje od fundamentalnog značaja za definisanje koevolucijskih simbiotskih odnosa, kao i praktičnog značaja u kontroli bolesti koje se prenose insektima vektorima.

3. MATERIJAL I METODE

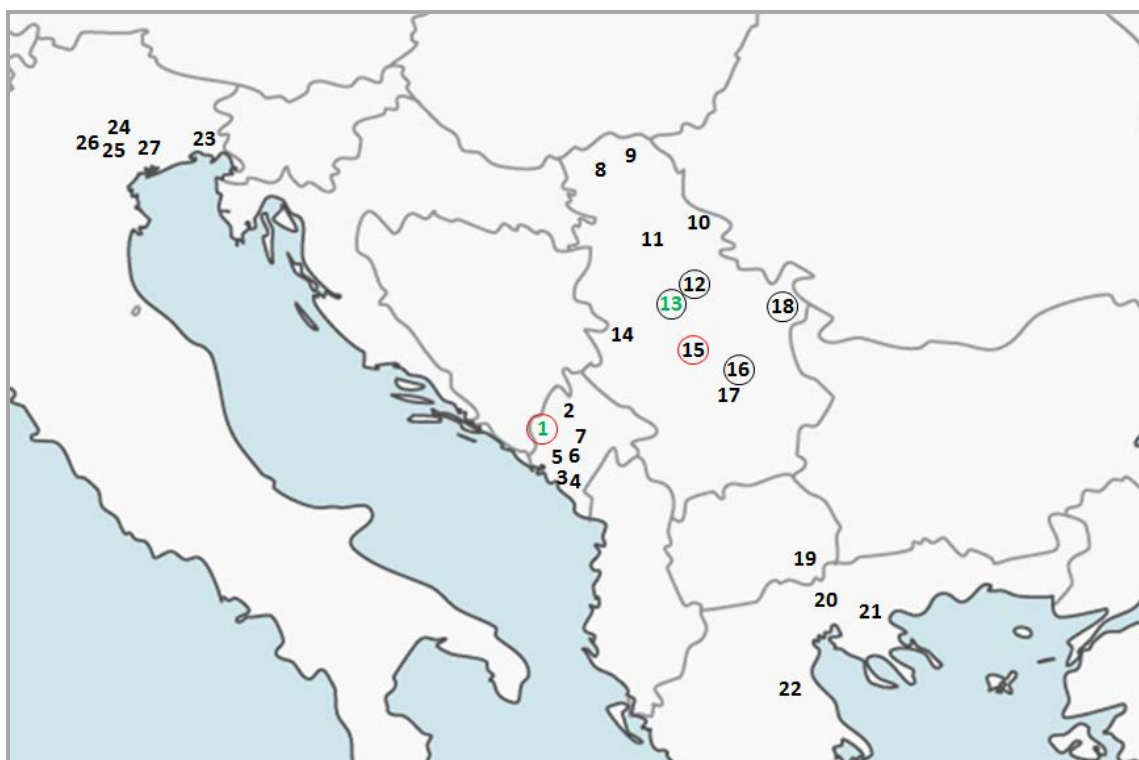
3.1 Biologija, ekologija i diverzitet populacija *D. europaea*

3.1.1 Sakupljanje materijala

Materijal za studiju ispitivanja biologije i ponašanja *D. europaea*, asocijacija sa različitim biljnim vrstama i sezonske dinamike populacija je sakupljan u periodu od 2010. do 2012. godine na odabranim lokalitetima na kojima je prethodno utvrđena značajna brojnost populacija ove cikade. Materijal za populaciono-genetičku studiju *D. europaea* sakupljan je u periodu od 2011. do 2015. godine na teritoriji jugoistočnog Balkana (Srbija, Crna Gora, Makedonija i Grčka) i u periodu 2002-2007. u severnoj Italiji (Filippin *et al.*, 2009), dok su primerci za eksperimentalno gajenje sakupljeni na lokalitetu Topola (GPS: N44 13.714 E20 41.112) tokom celog perioda studije. Morfološka identifikacija sakupljenih primeraka *D. europaea* izvršena je na osnovu opisa koje su predstavili Holcinger i saradnici (Holzinger *et al.*, 2003). Sakupljanje adulta *D. europaea* za praćenje dinamike populacija i asocijacija sa biljnim vrstama vršeno je na četiri lokaliteta u centralnoj, istočnoj i južnoj Srbiji, koji se međusobno razlikuju po tipu staništa, ekspoziciji i biljnim asocijacijama.

Za potrebe gajenja insekata u kontrolisanim uslovima, u cilju praćenja biologije i ponašanja, sakupljanje adulta *D. europaea* je vršeno na dva lokaliteta, od kojih je jedan lociran u Crnoj Gori (Nudo, GPS: N42 40.312 E18 34.559), a jedan u Srbiji (Topola). Na lokaciji Nudo (Tabela 1, Slika 1), adulti su sakupljeni sa kserotermne livade u okolini vinograda. Najzastupljenija biljna vrsta na ovoj lokaciji je bila pavitina *C. vitalba*, a u prethodnim ispitivanjima (Krstić *et al.*, 2012) populacija *D. europaea* je na ovom lokalitetu bila visoko inficirana FD fitoplazmom (preko 60%). Sa drugog lokaliteta (Topola), adulti su za laboratorijsko gajenje sakupljeni pretežno sa žalfije (*S. pratensis*) i pavitine (*C. vitalba*). Za potrebe proučavanja biologije, reproduktivnog ponašanja i statusa cikade tokom perioda rojenja, adulti su sakupljeni tokom 2010. i 2011. godine, od početka jula do kraja septembra. Sakupljeni adulti su zatim stavljeni u dobro ventilisane plastične cilindre i transportovani do laboratorije u poljskim frižiderima na temperaturi od 11-15°C.

Za potrebe istraživanja sposobnosti prenošenja fitoplazme različitih populacija *D. europaea* i uticaja *Wolbachia* na komponente adaptivne vrednosti domaćina korišćena je, pored populacije iz Nuda, i populacija iz Aleksandrovca, gde epidemija FD fitoplazme na vinovoj lozi pezistira od 2004. godine kada je prvi put zabeležena (Duduk *et al.*, 2004; Krnjajić *et al.*, 2007; Fillippin *et al.*, 2009a). Inficiranost *D. europaea* FD fitoplazmom na lokalitetu Aleksandrovac bila je u niskom procentu (oko 3%), dok je *Wolbachia* inficiranost iznosila 90-100%. Na oba lokaliteta sakupljanje insekata je sprovedeno tokom septembra 2011. i 2012. godine, kako bi se osigurao dovoljan broj primeraka za gajenje i eksperimente prenošenja fitoplazme u narednoj godini, nezaraženim jedinkama koje su dobijene u kontrolisanim uslovima. Cikade su uglavnom sakupljane sa pavatine (*C. vitalba*) i divlje žalfije (*S. pratensis*) i transportovane do laboratorije u poljskim frižiderima.



Slika 4. Mapa lokaliteta na kojima je vršeno sakupljanje populacija *Dictyophara europaea*. Crnim krugovima su obeleženi lokaliteti korišćeni za praćenje dinamike populacija; crvenim krugovima su obeleženi lokaliteti korišćeni za proučavanje bakterijskih asocijacija cikade; zelenom bojom su obeleženi lokaliteti korišćeni za gajenje *D. europaea*. Cikade sakupljene sa svih 27 lokaliteta su korišćene za populaciono-genetičke studije. Brojevi lokaliteta odgovaraju spisku u Tabeli 1.

Analiza populaciono-genetičkih parametara diverziteta i evolucije mitohondrijske DNK *D. europaea* sprovedena je sa primercima sakupljenim na području jugoistočnog Balkana. Sakupljanje je vršeno na 22 lokaliteta u Srbiji, Crnoj Gori, Makedoniji i Grčkoj. Adulti *D. europaea* su lovljeni entomološkom mrežom i usnim aspiratorom. Sakupljeno je najmanje po 6 jedinki u svakoj populaciji. Adulti su po sakupljanju stavljeni u plastične tubice 2 ml zapremine (Sarstedt) napunjene sa 96% etanolom, kako bi se sačuvale za naknadne molekularne analize DNK. Izolati genomske DNK primeraka *D. europaea*, sakupljenih sa 5 lokaliteta u severnoj Italiji u periodu između 2002. i 2007. godine u regionu Veneto u kom je zabeležena epidemijaska pojava FD fitoplazme, ustupljeni su za molekularne analize od strane kolega iz Centra za istraživanja u vinogradarstvu CREA-VIT, Koneljano, Italija (CREA-VIT Centro di Ricerca per la Viticoltura, Conegliano, Italy).

Tabela 1. Spisak i opis lokaliteta sakupljanja *D. europaea* korišćenih za bioekološke i populaciono-genetičke studije.

Oznaka lokaliteta	Zemlja porekla	Lokalitet	GPS koordinate	Dominantne biljne vrste	Broj sakupljenih primeraka
1	Crna Gora	Nudo	N42 40.312 E18 34.559	<i>Clematis vitalba</i> , <i>Frangula rupestris</i>	14
2	Crna Gora	Nikšić	N42 51.801 E18 56.186	<i>Crepis foetida</i> , <i>Sinapis arvensis</i> , <i>Capsela bursa pastoris</i> , <i>Thymus serpyllum</i>	7
3	Crna Gora	Sozine	N42 14.055 E19 04.110	<i>Linaria dalmatica</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Dorycnium herbaceum</i> , <i>Kickxia elatine</i>	12
4	Crna Gora	Godinje	N42 13.359 E19 06.519	<i>Vitex agnus-castus</i> , <i>Clematis vitalba</i>	12
5	Crna Gora	Drušići	N42 21.179 E19 05.640	<i>Rubus fruticosus</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Scrophularia canina</i>	6
6	Crna Gora	Podgorica	N42 26.919 E19 12.509	<i>Clematis vitalba</i> , <i>Convolvulus arvensis</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Verbascum nigrum</i>	12
7	Crna Gora	Martinići	N42 32.345 E19 10.586	<i>Crepis foetida</i> , <i>Convolvulus arvensis</i> , <i>Rubus fruticosus</i> , <i>Lotus corniculatus</i>	12
8	Srbija	Bačka Topola	N45 50.893 E19 31.928	<i>Crepis foetida</i> , <i>Convolvulus arvensis</i> , <i>Urtica dioica</i>	6

9	Srbija	Senta	N45 55.881 E20 01.083	<i>Urtica dioica</i>	6
10	Srbija	Sušara	N44 57.428 E21 08.889	<i>Clematis vitalba</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Lathyrus tuberosus</i> , <i>Linum perenne</i> , <i>Erysimum odonatum</i>	10
11	Srbija	Dobanovci	N44 50.891 E20 10.055	<i>Lathyrus tuberosus</i> , <i>Cirsium arvense</i> , <i>Genista tinctoria</i> , <i>Linaria vulgaris</i>	8
12	Srbija	Mladenovac	N44 24.204 E20 44.575	<i>Crepis tectorum</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Medicago arabica</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>Achillea millefolium</i>	7
13	Srbija	Topola	N44 13.714 E20 41.112	<i>Salvia pratensis</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Plantago lanceolata</i> , <i>C. vitalba</i>	10
14	Srbija	Zlatibor	N43 47.260 E19 44.154	<i>Clematis vitalba</i> , <i>Crepis foetida</i> , <i>Dorycnium herbaceum</i> , <i>Silene vulgaris</i> , <i>Alyssum montanum</i>	8
15	Srbija	Aleksandrovac	N43 29.587 E21 05.509	<i>Clematis vitalba</i> , <i>Crepis tectorum</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Medicago arabica</i>	12
16	Srbija	Jasenovik	N43 21.993 E22 01.256	<i>Clematis vitalba</i>	12
17	Srbija	Niš	N43 18.244 E21 59.446	<i>Clematis vitalba</i>	14
18	Srbija	Negotin	N44 16.605 E22 30.595	<i>Rubus</i> sp., <i>Linaria genistifolia</i> , <i>L. vulgaris</i> , <i>Kickxia elatine</i> , <i>Salvia pratensis</i> , <i>Crepis foetida</i>	10
19	Makedonija	Strumica	N41 27.684 E22 42.975	<i>Urtica dioica</i> , <i>Clematis vitalba</i>	10
20	Grčka	Gallikos	N40 51.618 E22 53.461	<i>Vitex agnus castus</i> , <i>Tamarix gallica</i>	6
21	Grčka	Vrasna	N40 41.616 E23 40.397	<i>Vitex agnus castus</i> , <i>Tamarix gallica</i>	7
22	Grčka	Larissa	N39 38.544 E22 16.981	<i>Convolvulus arvensis</i> , <i>Urtica dioica</i>	10
23*	Italija	Gorizia	N45 56.581 E13 34.394	<i>Clematis vitalba</i>	6
24*	Italija	Susegana	N45 50.927 E12 14.851	<i>Clematis vitalba</i>	7
25*	Italija	Villorba	N45 45.033 E12 13.442	<i>Clematis vitalba</i>	14
26*	Italija	Povegliano	N45 45.952 E12 12.546	<i>Clematis vitalba</i>	7
27*	Italija	Olme	N45 41.589 E12 37.002	<i>Clematis vitalba</i>	4

* DNK uzoraka dobijena zahvaljujući Centru za istraživanja u vinogradarstvu (CREA-VIT), Koneljana, Italija.

3.1.2 Praćenje dinamike populacija *D. europaea* i opis lokaliteta

Sezonsko variranje u pojavljivanju i brojnosti adulta *D. europaea* i asocijacije sa različitim biljnim vrstama praćeni su tokom 2011. i 2012. godine na četiri lokaliteta izabrana na osnovu razlika u tipu staništa, ekspoziciji terena i dominantnim biljnim vrstama: Topola, Mladenovac, Negotin i Jasenovik (Tabela 1; Slika 4). Na svakom od lokaliteta sakupljanje je obavljeno duž pet dijagonalnih transekata dužine 30 m, na svakih 15 dana, od početka jula do kraja septembra, koristeći metod košenja entomološkom mrežom i sakupljanje insekata usnim aspiratorom. Nakon prebrojavanja, primerci *D. europaea* su vraćeni na biljke u okviru odgovarajućeg transekta. Brojnost insekata sa svakog pojedinačnog sakupljanja je zabeležena i prikazana sumarno na grafiku za svaki lokalitet, datum sakupljanja i obe ispitivane godine.

Prvi lokalitet se nalazio u okolini Topole u centralnoj Srbiji (Tabela 1; Slika 4), gde su adulti sakupljeni sa zapuštene livade na kojoj dominira vrsta *Salvia pratensis* L. (Lamiaceae) sa otprilike 30% pokrovnosti. *Crepis foetida* L. (Asteraceae) i *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) su druga i treća najzastupljenija biljna vrsta na ovom lokalitetu sa približno 10% zastupljenosti. Pored ovih biljnih vrsta, na livadi je prisutno nekoliko vrsta leguminoza (*Trifolium* sp., *Onobrychis* sp. i *Lathyrus* spp.) kao i različite vrste trava (uglavnom *Hordeum murinum* L. (Poaceae), *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Poaceae), *Festuca* spp., *Agropyron* spp., *Dactylis* spp.).

Drugi lokalitet se nalazio u blizini Mladenovca i predstavlja kserotermnu livadu sa jugozapadnom ekspozicijom (Tabela 1; Slika 4). Najzastupljenija biljna vrsta na ovom lokalitetu je *Crepis tectorum* L. (Asteraceae), koja je pokrivala 60% livade, zatim crvena detelina (*Trifolium pratense* L. (Fabaceae)) sa 20%, dok su *Medicago arabica* (L.) Huds. (Fabaceae), *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) i *A. millefolium* (Asteraceae) bile zastupljene sa 2% u ukupnom vegetacijskom pokrivaču.

Treći lokalitet je bila ruderalna livada jugozapadne ekspozicije u blizini Negotina (Tabela 1; Slika 4) sa raznovrsnom vegetacijom na kojoj su dominirale vrste *Rubus* spp. (Rosaceae), *Linaria genistifolia* (L.) Mill. (Plantaginaceae), *L. vulgaris* Mill. (Plantaginaceae), *Kickxia elatine* (L.) Dumort. (Plantaginaceae), *S. pratensis* (Lamiaceae), *Crepis foetida*, *Knautia arvensis* (L.) Coult. (Caprifoliaceae), *Xanthium italicum* Moretti (Asteraceae), *Xeranthemum annuum* L. (Asteraceae), *Carduus*

acanthoides L., *Centaurea stoebe* L. (Asteraceae), *Althaea officinalis* L. (Malvaceae), *Lepidium campestre* (L.) W.T. Aiton (Brassicaceae), *Lotus corniculatus* L. (Fabaceae), *Dorycnium herbaceum* Vill. (Fabaceae), *Lathyrus tuberosus* L. (Fabaceae), *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) i trave iz rodova *Brachypodium*, *Phleum*, *Ammophila*, *Agrostis*, *Apera*, *Festuca*, *Bromus* i *Poa*.

Četvrti lokalitet je napušteni vinograd u selu Jasenovik u blizini Niša (Tabela 1; Slika 4) koji je korišćen kao lokacija za sagledavanje uticaja žbunaste, višegodišnje vegetacije na sezonsko pomeranje populacije *D. europaea* i to u kontekstu puteva prenošenja FD3 epidemiološkog genotipa FD fitoplazme u vinogradima jugoistočne Evrope. Na ovoj lokaciji je približno 80% biljnog pokrivača činila pavitina, *C. vitalba*, koja predstavlja prirodni rezervoar FD3 fitoplazme i biljnu vrstu na kojoj su prethodno registrovane brojne populacije *D. europaea*. Isti lokalitet je bio značajan zbog realizovane epidemiološke studije prenošenja i širenja FD fitoplazme u Srbiji na kome je prisustvo *D. europaea* praćeno u kontinuitetu od 2005. godine (Filippin *et al.*, 2009a; Mitrović *et al.*, 2012).

3.1.3 Gajenje i praćenje ponašanja *D. europaea*

Za potrebe praćenja biologije i ponašanja adulta *D. europaea* u kontrolisanim uslovima, insekti su gajeni u dva tipa spoljnih kaveza: poljskim kavezima na oglednom polju Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Zemunu (Slika 5) i mobilnim spoljnim kavezima (Slika 6A). Tokom jula 2010. i 2011. godine, skupine od 200 imaga, sakupljenih na nekoliko lokaliteta u okolini Topole, postavljene su u svaki od tri poljska kaveza dimenzija 210 x 210 x 190 cm (Slika 5). U kaveze su prethodno posađeni sejanci *S. pratensis*, *C. foetida*, *P. lanceolata*, *L. vulgaris* i *Agropyron repens* (L.) P. Beauv. (Poaceae) kao hrana za adulte. Ponašanje adulta *D. europaea* je posmatrano jednom nedeljno, u tri vremenska intervala: i) ujutru, između 8 i 9 časova, ii) u podne, između 12 i 13 časova, i iii) popodne između 17 i 18 časova.

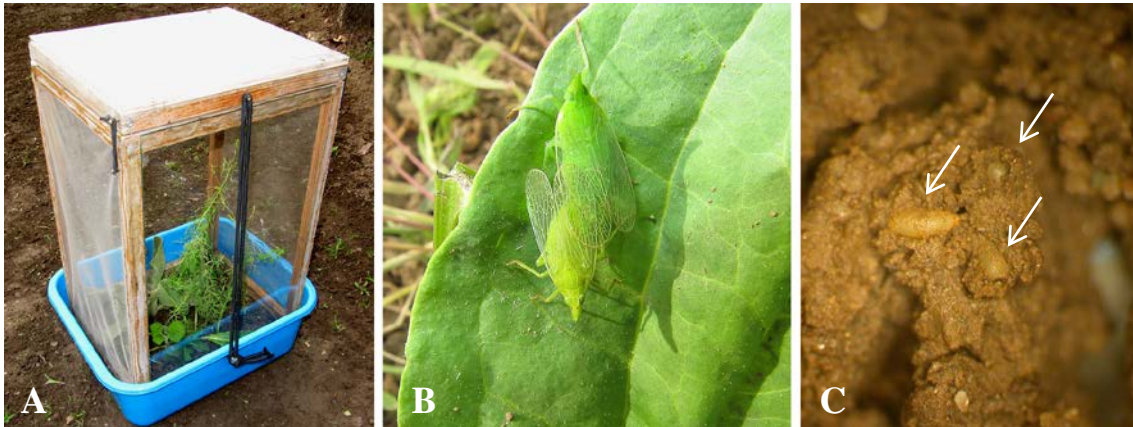
Detaljnije posmatranje ponašanja adulta *D. europaea* sprovedeno je u četiri mobilna kaveza dimenzija 30 x 30 x 45 cm, koji su postavljeni u kontejnere dimenzija 40 x 40 x 16 cm, ispunjene zemljom (Slika 6A). Dve strane mobilnih kaveza bile su prekrivene staklom debljine 3 mm, a preostale mrežastim plantom. Kavezi su posađeni sa sejancima prethodno navedenih biljnih vrsta i držani u spoljnom insektarijumu.

Tokom jula 2010. i 2011. godine u mobilne kaveze je ispušteno po 40 adulta *D. europaee* i tokom naredna tri meseca (do kraja septembra) je detaljno praćeno reproduktivno i ovipozicijsko ponašanje (Slika 6B, C). Kavezi su u spoljašnjim uslovima ostajali do sledećeg proleća. Ponašanje larvi i adulta *D. europaee* praćeno je u obe vrste kaveza.



Slika 5. Izgled poljskih kaveza (210 x 210 x 190 cm) korišćenih za gajenje *D. europaee* na oglednom polju Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Zemunu. Spoljašnji (A) i unutrašnji (B) izgled kaveza.

Za gajenje larvi sakupljana su tzv. *ovipozicijska gnezda* sastavljena od partikula zemlje, u koje su utisnuta jaja, a koje ženka formira na površini zemljišta prilikom ovipozicije (Slika 6C). *Ovipozicijska gnezda* su premeštena iz spoljnih mobilnih kaveza u laboratorijske uslove, u Petri kutije (prečnika 9 cm) na vlažan fiter-papir gde su čuvana od novembra do početka marta, na temperaturi od 4-6°C. Prateći porast spoljašnje temperature, početkom marta jaja su prebaćena na sobnu temperaturu ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), na kojoj su i održavana sve do izleganja prvog larvenog stupnja. Larve prvog larvenog stupnja (L1) stavljene su na ishranu na klijance biljnih vrsta *C. foetida*, *S. pratensis* i *Lolium perenne* L. (Poaceae). Novoizlegle larve su čuvane u Petri kutijama narednih 10 dana. Larveni stupnjevi L2-L3 su prebaćeni u mobilne kaveze sa mladim biljkama *C. foetida*, *S. pratensis*, *P. lanceolata* i *Linaria vulgaris* na dalje gajenje.

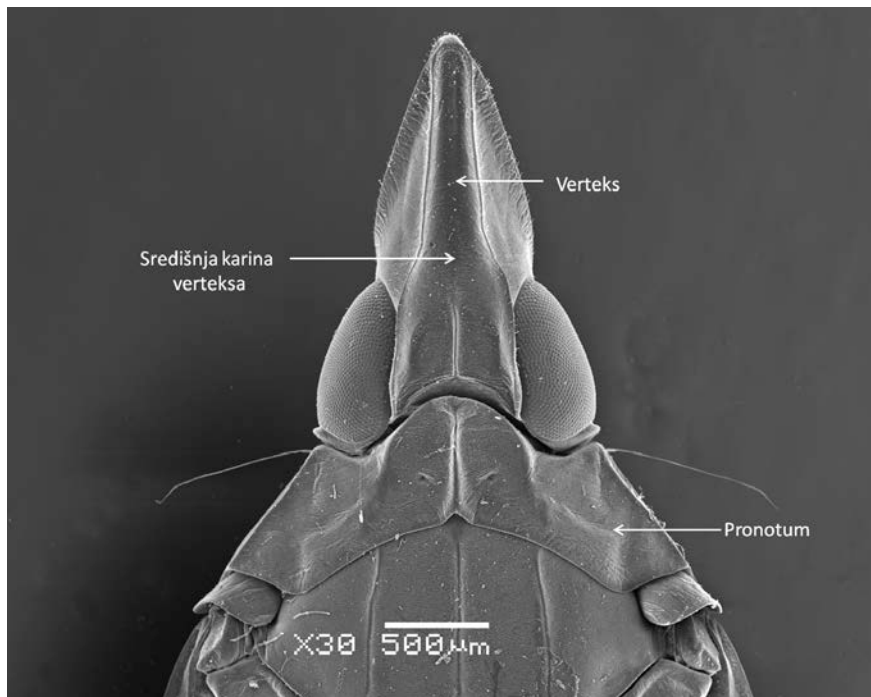


Slika 6. (A) Izgled mobilnog kaveza za gajenje *D. europaea* (30 x 30 x 45 cm), (B) adulti u parenju, i (C) *ovipozicijska gnezda* (strelicama su označena jaja).

3.1.4 Morfološke karakteristike stadijuma razvića *D. europaea*

Nomeklatura morfoloških karaktera korišćena za opise karakteristika stadijuma i stupnjeva razvića *D. europaea* preuzeta je iz studija koje su sproveli Snodgrass, i Holcinger i saradnici (Snodgrass, 1935; Holzinger *et al.* 2003). Procena broja larvenih stupnjeva i njihovo morfološko razlikovanje vršeno je na osnovu karaktera dužine dorzalnog dela glave koji se označava kao verteks (engl. *vertex*). Dužina verteksa predstavlja morfološki karakter koji se intenzivno menja tokom presvlačenja larvi. Dužina verteksa larvi *D. europaea* merena je od vrha glave do pronotuma, prateći liniju središnje karine verteksa (Slika 7).

Tokom gajenja larvi *D. europaea* u kontrolisanim uslovima, larve različite veličine i obojenosti tela su izdvajane usisavanjem pomoću usnog aspiratora i zatim čuvane u plastičnim tubicama zapremine 2 ml sa 96% etanolom, na temperaturi od 4°C. Izdvajanje je vršeno neposredno nakon uočenog presvlačenja. Morfološka merenja su vršena na binokularnoj lupi Leica MS5 na uvećanju od 40 ili 64 puta za prva tri larvena stupnja, i 25 puta odnosno 16 puta za L4, odnosno L5 larve. Određivanje karakteristika pojedinačnih larvenih stupnjeva je vršeno na osnovu rezultata merenja i morfoloških osobnosti sukcesivnih larvenih stupnjeva uočenih tokom gajenja.



Slika 7. Izgled glave i pronotuma *D. europaea* sa dorzalne strane.

Pod pretpostavkom normalne distribucije dužine verteksa svih larvenih stupnjeva, multimodalna distribucija frekvencije je korišćena kao indirektan metod za potvrđivanje broja stupnjeva tokom larvalnog razvića (McClellan & Logan, 1994; Delbac *et al.*, 2010). Dodatno je testirano i Dajerovo pravilo (Dyar, 1890) koje polazi od pretpostavke konstantane stope rasta karakteristika sukcesivnih larvenih stupnjeva, i kao takvo se često koristi u cilju determinacije broja larvenih stupnjeva. Na osnovu istraživanja Hsia i Kao (1987), poređena je opservirana stopa rasta i izračunata stopa rasta, odnosno srednja dužina verteksa stupnja L_i podeljena sa srednjom dužinom verteksa stupnja L_{i-1} . Slike larvenih stupnjeva i kaudalnog dela abdomena ženki sa ventralne strane dobijene su uz pomoć skening elektronskog mikroskopa (JSM 6460 Scanning Electron Microscope - JEOL USA Inc., Peabody, MA, USA).

3.2 Molekularne analize *D. europaea*

3.2.1 Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK iz adultnih primeraka *D. europaea* izvršena je po modifikovanom TES (Tris-EDTA-SDS) protokolu ekstrakcije (Rees *et al.*, 2001; Mahuku, 2004). Ova metoda omogućava da se ekstrahovane ukupne nukleinske kiseline koriste za populaciono genetičke studije insekta, kao i detekciju i multilokusnu genotipizaciju (*Multilocus Sequence Typing* - MLST) i karakterizaciju fitoplazme i *Wolbachia*, a da primerak insekta ostane morfološki očuvan.

Pojedinačni primerci *D. europaea* su punktirani sterilnom iglom u predelu toraksa između drugog i trećeg tergita. Punktirani uzorci su inkubirani na 56°C tokom noći u plastičnoj tubici zapremine 2,0 ml (Sarstedt), u rastvoru sačinjenom od 800 µl TES pufera (20 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) za lizu ćelija i 8 µl proteinaze K koncentracije 187.5 µg/ml (Fermentas). Sledećeg dana proces ekstrakcije je nastavljen. Nakon inkubacije insekt je izdvojen iz rastvora i sačuvan za naknadne morfološke analize, a u rastvor DNK je dodata jednaka zapremina hloroforma (750 µl). Nakon intenzivnog mešanja rastvora, DNK je izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 obrt/min na 4°C. Supernatant je prebačen u novu tubicu zapremine 1.5 ml (Sarstedt) i proces ekstrakcije DNK hloroformom još jednom ponovljen. Izdvojena DNK je zatim iz rastvora istaložena dodavanjem jednake zapremine ledeno-hladnog izopropanola (750 µl) i centrifugiranjem 15 minuta na 12000 obrt/min na 4°C. Istaložena DNK je isprana pomoću 96% etanola, osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru i rastvorena u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6). Ekstrahovana DNK je čuvana na -20°C do analiza. Primerci insekata iz kojih je ekstrahovana DNK čuvani su za dalje morfološke analize u tubicama zapremine 1.5 ml u etanolu na 4°C.

3.2.2 Amplifikacija DNK PCR metodom i sekvenciranje

U cilju ispitivanja genetičke strukture populacija *D. europaea* analizirani su mitohondrijski genski marker *citohrom oksidaza subjednica I (mtCOI)* i jedarni marker – *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)*. Fragment mitohondrijske DNK dužine 580 bp umnožen je uz pomoć prajmera C1-J-2183 i UEA8 (Tabela 2) u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 μ l PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			12.05 μ l
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5 mM MgCl ₂)	2.0 μ l
- MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 μ l
- dNTPs	10 mM	0.4 mM	0.8 μ l
- C1-J-2183	10 μ M	0.7 μ M	1.4 μ l
- UEA8	10 μ M	0.7 μ M	1.4 μ l
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/ μ l	0.375 U/ μ	0.15 μ l
- genomska DNK <i>D.europaea</i>			1.0 μ l

Temperaturni protokol umnožavanja u Eppendorf Mastercycler proS je bio sledeći: inicijalna denaturacija DNK na 94°C u trajanju od 2 min; denaturacija na 94°C u trajanju od 30 s, hibridizacija prajmera na 54°C u trajanju od 60 s, elongacija na 72°C u trajanju od 90 s (37 ciklusa); finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 min.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju mitohondrijskog *COI* i jedarnog *ITS2* genskog regiona za populaciono-genetičke analize *D. europaea*.

Region	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru	Dužina (bp)*	Literatura
<i>mtCOI</i>	C1-J-2183	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	520	Simon <i>et al.</i> , 1994
	UAE8	AAAAATGTTGAGGGAAAAATGTTA		Lunt <i>et al.</i> , 1996
<i>ITS2</i>	ITS2fw	TGTGAACTGCAGGACACATG	528	Collins & Paskewitz, 1996
	ITS2rv	ATGCTTAAATTTAGGGGGTA		

* Dužina fragmenta genskog regiona korišćena za populaciono-genetička poređenja.

Jedarni genski marker *ITS2* koji je lociran unutar ribozomalnog regiona između 5.8S rRNK i 28S rRNK, dužine 528 bp, umnožen je uz pomoć prajmera ITS2fw koji se vezuje za 5.8S region i ITS2rv koji se vezuje za 28S region (Collins & Paskewitz, 1996; Tabela 2). PCR amplifikacija je vršena u 20 μ l zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 μ l PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			14.05 μ l
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5 mM MgCl ₂)	2.0 μ l

- dNTPs	10 mM	0.4 mM	0.8 µl
- C1-J-2183	10 µM	0.5 µM	1.0 µl
- UEA8	10 µM	0.5 µM	1.0 µl
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/µl	0.375 U/µ	0.15 µl
- genomska DNK <i>D.europaea</i>			1.0 µl

PCR amplifikacija je urađena u Eppendorf Mastercycler proS po sledećem temperaturnom protokolu: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 5 min; denaturacija na 94°C u trajanju od 30 s, hibridizacija na 50°C u trajanju od 60 s, elongacija na 68°C u trajanju od 90 s (35 ciklusa); finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 min.

Amplifikovani fragmenti mitohondrijske i jedarne DNK su razdvojeni elektroforetski na 1% agaroznom gelu u TBE puferu (Tris-Borate 90 mM, EDTA 1 mM), obojeni etidijum bromidom i vizualizirani uz pomoć UV transiluminatora. PCR produkti su pre reakcije sekvenciranja prečišćeni od slobodnih prajmera i nukleotida pomoću QIAquick® PCR Purification Kit-a (QIAGEN), prateći uputstva proizvođača. Njihova molekulska težina i količina DNK određena je vizuelnim poređenjem sa DNK markerom 100 bp DNA Ladder Extended (SERVA). Sekvenciranje dobijenih produkata je obavljeno u MacroGen Inc. (Seul, Južna Koreja) na ABI Prism 3700 automatskom sekvenatoru. Amplikoni su sekvencirani u oba smera upotrebom prajmera korišćenih za PCR umnožavanje, naznačenih u Tabeli 2. Dobijene sekvence su obrađene u programu FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>), a poravnanje i kompletiranje sekvenci je izvršeno pomoću Clustal W programa (Thompson *et al.*, 1994), integrisanog unutar softverskog paketa MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011).

Sekvence *mtCOI* i *ITS2* genskih markera, kao i svih analiziranih gena i genskih regiona dobijenih u ovoj studiji, deponovane su u NCBI bazu podataka (engl. *National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nukleotidne sekvence različitih *mtCOI* haplotipova *D. europaea* deponovane su pod pristupnim brojevima (GenBank Accession Numbers) KJ911165- KJ911190, dok su sekvence jedarnih *ITS2* haplotipova *D. europaea* deponovane pod pristupnim brojevima KJ911191- KJ911194.

3.2.3 Genealogija gena

Populaciono-genetičke specifičnosti, intraspecijsko variranje kao i utvrđivanje predačkih (ancestralnih) haplotipova, horizontalnog transfera gena ili postojanja rekurentnih mutacija najbolje se prikazuju i sagledavaju na haplotipskoj mreži. Za razliku od filogenetskih stabala, na haplotipskoj mreži se mogu uočiti aspekti konvergentne i retikulacijske evolucije (Posada & Crandall, 2001; Cassens *et al.*, 2005; Huson & Bryant, 2006). Genealogija gena i vizualizacija haplotipova mtCOI i ITS2 gena urađena je uz pomoć dve metode: statističke parsimonije i *median-joining* metode. Metod statističke parsimonije urađen je u okviru programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) sa limitom poverenja od 95%. *Median-joining* mreža (Bandelt *et al.*, 1999) je dobijena pomoću programa NETWORK verzija 5.0.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com/>) koristeći parameter $\epsilon = 0$.

3.2.4 Filogenetske analize

Rekonstrukcija evolucionog stabla na osnovu mitohondrijskog COI genskog markera urađena je *Neighbour-joining* metodom u okviru programa PAUP* verzija 4.0b10 (Swofford, 2002). Za određivanje modela nukleotidne supstitucije korišćen je program jModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012). Filogenetsko stablo je dobijeno podrškom za topologiju od 500 replikacija (engl. *bootstrap*), a za njegovu vizualizaciju korišćen je program FigTree verzija 1.4 (Rambaut, 2012). Dodatna filogenetska analiza je urađena Bajesovom statistikom implementiranom u program MrBayes v3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Podešavanja su uključivala: dve simultane analize Monte Karlo metodom Markovljevih lanaca (engl. *Markov chain Monte Carlo*, MCMC) od million generacija, uzorkovanje na svakih 100 generacija i odbacivanje 25 % početnih rezultata ("*burn-in*") radi eliminisanja mogućnosti greške. Kvalitativna analiza rezultata i konvergencija Markovljevih lanaca verifikovana je programom Tracer v1.5.0 (Rambaut & Drummond, 2009). Kao i u prethodnoj analizi stablo sa posteriornim verovatnoćama je vizualizirano uz pomoć programa FigTree 1.4 (Rambaut, 2012).

3.2.5 Molekularni diverzitet i analiza molekularne varijanse

Za testiranje asocijacije između mtDNK variranja i različitih hijerarhijskih nivoa haplotipske varijabilnosti, korišćen je F_{ST} indeks (Weir & Cockerham 1984; Weir,

1996) i analiza molekularne varijanse (AMOVA; engl. *Analysis of MOlecular VAriance*) u okviru programa Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). Da bi se utvrdila uloga geografske distribucije, prisustva *Wolbachia* i fitoplazme na struktuiranje genetičke varijabilnosti populacija *D. europaea* urađene su tri zasebne analize na osnovu *COI* gena mitohondrijske DNK. U prvoj analizi testiran je stepen diferencijacije populacija na osnovu geografske podeljenosti. U drugoj analizi testirana je diferencijacija *Wolbachia* inficiranih i neinficiranih populacija *D. europaea*. U trećoj analizi testirana je diferencijacija populacija na osnovu visoke i niske stope inficiranosti FD fitoplazmom. Značajnost odstupanja F_{ST} indeksa je analizirana pomoću 1000 permutacija. Da bi se utvrdila diferenciranost pojedinačnih populacija urađena je analiza međupopulacionog poređenja F_{ST} vrednosti (engl. *population pairwise F_{ST}*). Sama analiza kao i rezultujuće grafičko predstavljanje matriksa poređenja međupopulacione diferenciranosti takođe su urađeni pomoću programa Arlequin 3.5.1.2.

Parametri molekularnog diverziteta (nukleotidni diverzitet (π), haplotipski diverzitet - stepen mitohondrijske DNK varijabilnosti (H_d) i srednja vrednost međusobnih razlika (k)) određeni su na osnovu mitohondrijskog *COI* gena u programu Arlequin. U cilju utvrđivanja delovanja selekcije ili populaciono-demografskih procesa na populacije *D. europaea*, odnosno odstupanja od pretpostavki neutralne evolucije, u pomenutom programu su urađeni i testovi neutralnosti i to: Tadžimin D test (Tajima, 1989) i Fuov F_s test (Fu, 1997). Tadžimin D test je zasnovan na frekvenciji segregacionih varijabilnih mesta i bazira se na odbacivanju nulte hipoteze neutralnog modela nukleotidne varijabilnosti koji predviđa jednakost između prosečnog broja nukleotidnih razlika haplotipova i broja varijabilnih mesta. Fuov F_s test je zasnovan na distribuciji haplotipova i bazira se na poređenju dobijenog broja haplotipova sa brojem haplotipova koji se očekuje u stanju ravnoteže za dobijeni broj nukleotidnih razlika. Za vrednosti D i F_s bi se, prema pretpostavkama neutralne evolucije, očekivalo da budu blizu nule. Pozitivne vrednosti ovih parametara ukazuju na delovanje balansne selekcije ili skorašnje mešanje različitih populacija, dok negativne vrednosti ukazuju na negativnu selekciju, ekspanziju populacija ili selektivno čišćenje (Yu *et al.*, 2011; Shoemaker *et al.*, 2003).

3.3 Molekularne analize FD fitoplazme

3.3.1 Sakupljanje biljnog materijala

Biljke *Clematis vitalba* (pavitine) su uzorkovane u cilju utvrđivanja nivoa inficiranosti prirodnog biljnog rezervoara FD fitoplazme. Pavitina predstavlja zajedničkog domaćina fitoplazme i vektora *D. europaea* (Filippin *et al.*, 2009a), odnosno rezervoar i izvor inokuluma, usled čega nivo inficiranosti pavitine FD fitoplazmom, kao jedan od faktora, utiče na stopu inficiranosti vektora. Sredinom septembra 2011. i 2012. godine biljke pavitine su sakupljane na dva prethodno izabrana i opisana lokaliteta u vinogorjima Crne Gore i Srbije (Nudo i Aleksandrovac) na kojima je frekvenca prirodne inficiranosti *D. europea* bila višestruko različita. Sakupljanje je izvršeno nasumičnim odabirom po 30 asimptomatskih biljaka pavitine po lokalitetu, sa kojih je sakupljeno 5-10 listova sa peteljka. Nakon uzorkovanja, pojedinačni uzorci biljnog materijala su stavljeni u plastične zip-kese, koje su zatim obeležene i prenete do laboratorije u poljskom frižideru, na temperaturi od 8°C do 11°C. Iz lisnog tkiva je izvršena DNK ekstrakcija, a ekstrahovana DNK analizirana na prisustvo FD fitoplazme PCR metodom.

3.3.2 Ekstrakcija DNK iz biljaka

Ekstrakcija DNK iz biljnog materijala vršena je iz centralnog nerva lista i lisne peteljke. Ukupne nukleinske kiseline izolovane su po CTAB (cethyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolu izolacije opisanom od strane Angelini i saradnika (2001).

Lisni nervi i peteljke biljaka pavitine težine 1 g, svakog uzorka zasebno, usitnjene su u avanu sa tučkom pomoću tečnog azota i homogenizovane u 7ml 3% CTAB pufera (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol). Iz ove suspenzije izdvojen je 1 ml, prebačen u plastičnu tubicu zapremine 2 ml (Sarstedt) i inkubiran 20 minuta na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije dodata je jednaka zapremina hloroforma (1 ml), i DNK je izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 obrt/min na ambijentalnoj temperaturi. Supernatant je prebačen u novu tubicu zapremine 1.5 ml i dodata jednaka zapremina ledeno-hladnog izopropanola (750 μl), a zatim je centrifugiranjem od 15 minuta na 11000 obrt/min DNK istaložena na dnu rastvora. Izolovana DNK isprana je 96% etanolom, osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru i rastvorena u 100 μl TE pufera. Ekstrahovana DNK čuvana je na -20°C.

3.3.3 Detekcija fitoplazme

Identifikacija prisustva FD fitoplazme u biljnom materijalu *C. vitalba* i primercima *D. europaea* sakupljenih u prirodi, izvršena je umnožavanjem FD-specifičnog FD9 regiona koji je karakterističan za genom ove fitoplazme (Angelini *et al.*, 2001). FD9 region parcijalno obuhvata gen za sintezu ribozomalnog proteina L15 (*rpl15*) i gen koji kodira protein translokazu (*secY*) i prepoznatljivo je drugačiji kod fitoplazmi 16SV-grupe u odnosu na sve druge do sada opisane fitoplazme (Lee *et al.*, 2004).

FD9 region FD fitoplazme je umnožen po nested PCR proceduri prateći ranije opisane uslove reakcije (Angelini *et al.*, 2001). U direktnoj reakciji korišćeni su FD9f2 i FD9r prajmeri, a u nested reakciji FD9f3 i FD9r2 prajmeri (Daire *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 2001; Tabela 3) koji umnožavaju segment dužine 1150 bp. Umnožavanje DNK u obe reakcije, direktnoj i nested, vršeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 µl PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			13.55 µl
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5 mM MgCl ₂)	2.0 µl
- MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 µl
- dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.6 µl
- FD9f2 (FD9f3)	20 µM	0.75 µM	0.75 µl
- FD9r (FD9r2)	20 µM	0.75 µM	0.75 µl
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/µl	0.375 U/µ	0.15 µl
- genomski DNK <i>D.europaea</i> ili 1:10 razređena DNK <i>C. vitalba</i> , ili 1:50 razređen produkt direktne reakcije amplifikacija			1.0 µl

Da bi se eliminisala mogućnost unakrsne kontaminacije tokom pripreme uzoraka na svakih 10 uzoraka stavljana je jedna negativna kontrola. Negativnu kontrolu je predstavljala dodatna tubica sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 µl uzorka korišćen 1 µl vode (*nuclease-free water*, QIAGEN). Kao pozitivna kontrola reakcije korišćena je DNK 16SrV-C (FD-C) izolata iz prirodno FD-inficirane vinove loze iz Italije (Angelini *et al.*, 2001). Umnožavanje je vršeno po sledećem temperaturnom protokolu za direktnu reakciju: inicijalna denaturacija na 92°C u trajanju od 90 s; denaturacija na 92°C u trajanju od 30 s, hibridizacija prajmera na 46°C u trajanju od 40 s, elongacija na 72°C u trajanju od 90 s (35 ciklusa); finalna elongacija na 72°C u trajanju od 5 min. Temperaturni protokol za nested reakciju se razlikovao u

temperaturi i vremenu datom za hibridizaciju prajmera (47°C u trajanju od 30 s), vremenu elongacije (75 s) i broju ciklusa (39). Nakon reakcija umnožavanja, po 5 µl nested PCR produkta svakog uzorka, uključujući pozitivnu i negativne kontrole, elektroforetski je razdvojeno na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom. Gel je vizualiziran pod UV transiluminatorom i slikan digitalnim fotoaparatom.

3.3.4 Molekularna karakterizacija FD fitoplazme

U cilju sagledavanja uticaja genotipa fitoplazme na epidemiologiju bolesti i različitu prirodnu stopu inficiranosti vektora, izvršena je MLST karakterizacija izolata FD fitoplazme detektovane u uzorcima *C. vitalba* i primercima *D. europaea*, sekvenciranjem četiri genska regiona fitoplazme: i) 16S rDNK, ii) operon gena ribozomalnih proteina L22 i S3 (*rpl22-rps3*), iii) FD9 genski region koji obuhvata *secY* gen za protein translokazu, i iv) *secY-map* genski region koji kodira metionin aminopeptidazu. Geni za ribozomalnu RNK i ribozomalne proteine su odabrani kao konzervativni genski regioni na osnovu kojih se može sagledati filogenetska pripadnost izolata fitoplazme (Lee *et al.*, 2004), dok su varijablina *secY* i *secY-map* genski markeri odabrani zbog njihove informativnosti za praćenje molekularne epidemiologije 16SrV grupe fitoplazmi (Angelini *et al.*, 2001; Arnaud *et al.*, 2007; Filippin *et al.*, 2009a; Jović *et al.*, 2011).

Umnožavanje 16S rRNK gena FD fitoplazme je izvršeno pomoću P1 (Deng & Hiruki, 1991) i P7 (Smart *et al.*, 1996) prajmera u direktnoj reakciji, odnosno P1A i P7A (Lee *et al.*, 2004) u nested reakciji (Tabela 3), prateći prethodno opisane uslove (Lee *et al.*, 2004). PCR umnožavanje u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 µl PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			15.05 µl
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5 mM MgCl ₂)	2.0 µl
- dNTPs	10 mM	0.3 mM	0.6 µl
- P1 (P1A)	20 µM	0.6 µM	0.6 µl
- P7 (P7A)	20 µM	0.6 µM	0.6 µl
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/µl	0.375 U/µ	0.15 µl
- genomska DNK <i>D.europaea</i> ili 1:10 razređena DNK <i>C. vitalba</i> , ili 1:50 razređen produkt direktne reakcije amplifikacije			1.0 µl

Isti temperaturni protokol je primenjen za obe reakcije amplifikacije: inicijalna denaturacija 94°C 90 sekundi; denaturacija 94°C 1 min, hibridizacija 50°C 2 min, elongacija 72°C 3 min (34 ciklusa); finalna elongacija 72°C 10 min. Nakon uspešne sinteze, PCR produkti su prečišćeni po prethodno opisanoj proceduri i sekvencirani (Macrogen Inc., Seul, Južna Koreja) u oba smera upotrebom prajmera korišćenih u nested reakciji umnožavanja, i dodatnih internih prajmera R16F2n (Lee *et al.*, 1998) i 16r758f (Gibb *et al.*, 1995) koji su korišćeni samo za sekvenciranje (Tabela 3). Nukleotidne sekvence različitih genotipova 16Sr RNK gena i geografskog porekla FD fitoplazme su deponovane u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima KJ911207-KJ911209.

Region operona gena ribozomalnih proteina *rpl22-rps3* ukupne dužine približno 1150bp je umnožen pomoću rp(V)F1/rpR1 i rp(V)F1A/rp(V)R1A para prajmera (Lee *et al.*, 2004), prema istim uslovima reakcije PCR smeše i temperaturnog protokola navedenog za 16S rRNK genski marker. Sekvenciranje umnoženog regiona ribozomalnih proteina je izvršeno pomoću prajmera korišćenih za nested PCR (Tabela 3), a sekvence različitih *rpl22-rps3* genotipova i geografskog porekla su deponovane u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima KJ911210- KJ911212.

SecY gen je umnožen po prethodno opisanoj proceduri i protokolu za identifikaciju FD fitoplazme (umnožavanje FD9 regiona), a sekvenciranje je izvršeno u oba smera pomoću prajmera korišćenih za nested reakciju, tj. FD9f3 i FD9r2 (Tabela 3). Nukleotidne sekvence različitih *secY* genotipova FD fitoplazme, različitog geografskog porekla, deponovane su u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima KJ911213-KJ911217.

Region *secY-map* koji obuhvata *house-keeping* gen za metionin aminopeptidazu, umnožen je u nested PCR proceduri korišćenjem prajmera FD9f5/MAPr1 i FD9f6/MAPr2 (Arnaud *et al.*, 2007; Tabela 3). PCR umnožavanje u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 µl PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			13.15 µl
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5 mM MgCl ₂)	2.0 µl
- MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 µl

- dNTPs	10 mM	0.25 mM	0.5 μ l
- FD9f5 (FD9f6)	20 μ M	1.0 μ M	1.0 μ l
- MAPr1 (MAPr2)	20 μ M	1.0 μ M	1.0 μ l
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/ μ l	0.375 U/ μ	0.15 μ l
- genomska DNK <i>D.europaea</i> ili 1:10 razređena DNK <i>C. vitalba</i> , ili 1:50 razređen produkt direktne reakcije amplifikacije			1.0 μ l

Umnožavanje je urađeno po istom temperaturnom protokolu za direktnu i nested reakciju: inicijalna denaturacija 92°C 1 min; denaturacija 92°C 30 s, hibridizacija 52°C 30 s, elongacija 66°C 90 s (35 ciklusa); finalna ekstenzija 66°C 10 min. Reakcije sekvenciranja *secY-map* genskog regiona su izvršene u jednom smeru pomoću zadnjeg (engl. *reverse*) prajmera korišćenog za nested reakciju, tj. MAPr2 (Tabela 3). Nukleotidne sekvence različitih *secY-map* genotipova FD fitoplazme, različitog geografskog porekla, deponovane su u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima KJ911218- KJ911221.

Međusobno poređenje nukleotidnih sekvenci različitih genotipova svakog pojedinačno okarakterisanog genskog markera FD fitoplazme vršeno je pomoću Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) programa integrisanog unutar softverskog paketa MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011). Sekvence 16S rRNK, *rpl22-rps3*, *secY* i *map* genskog regiona su zatim upoređene pomoću BLAST analize (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) sa dostupnim sekvencama referentnih izolata FD i srodnih fitoplazmi u NCBI bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) i utvrđen procenat njihove sličnosti, odnosno srodnosti.

Na osnovu Clustal W i BLAST analize utvrđene su polimorfne nukleotidne pozicije (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) na svakom genskom markeru identifikovanih sojeva FD fitoplazme. SNP pozicije među različitim FD genotipovima koji su u asocijaciji sa različitim populacijama vektora su analizirane za razvijanje RFLP metoda (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) za jednostavno i pouzdano detektovanje epidemiološki značajnih genotipova. Sekvence su eksportovane u *in silico* restrikcionu analizu i analizu obrazaca razdvajanja restrikcionihih fragmenata na virtuelnom gelu u programu pDRAW32, razvijenog od strane AcaClone Software (<http://www.acaclone.com>). U ovom programu je urađena virtuelna digestija sekvenci svih registrovanih genotipova FD fitoplazme. Analiza je pokazala da je samo *rpl22-rps3*

genotipove FD fitoplazme moguće razlikovati pomoću RFLP metode, jer se kod drugih marker gena SNP pozicije nalaze van mesta prepoznavanja poznatih restrikcionih enzima. Na osnovu *in silico* analize je utvrđeno da je restrikcioni enzim *HinfI* (G'ANT_C) (Fermentas) najpogodniji za identifikaciju *rpl22-rps3* genotipova i sa njim je izvršeno proveravanje prisustva različitih genotipova u svim detektovanim sojevima FD fitoplazme.

Digestija rp(V)F1/rp(V)R1 amplikona *rpl22-rps3* marker gena je urađena u ukupnoj zapremini 15 µl RFLP smeše koja je sadržala 1.5 µl 10x pufer za digestiju, 1 U *HinfI* enzima koncentracije 10 U/µl (0.1 µl), 10 µl PCR produkta i 3.4 µl H₂O (*nuclease-free water*, QIAGEN). Digestija je trajala 16 sati na temperaturi od 37°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Produkti digestije su razdvojeni pomoću automatskog sistema za kapilarnu elektroforezu QIAxcel *Advanced* (QIAGEN) upotrebom kertridža *High Resolution Gel Cartridge* (QIAGEN) pod sledećim ulovima separacije: voltaža injektiranja uzorka 5kV, vreme injektiranja uzorka 45 s, voltaža separacije 6kV i vreme separacije 320 s. QX DNA alignment marker 15 bp/5 kb (QIAGEN) je korišćen za poravnanje poređenih fragmenata, a FX174/*HaeIII* QX DNA marker (QIAGEN) je korišćen za poređenje dužine fragmenata.

U cilju dobijanja informacije o međusobnoj varijabilnosti i srodnosti MLST genotipova FD fitoplazme koja je u asocijaciji sa nisko- i visoko-inficiranim populacijama vektora, spojene sekvence (engl. *concatenated sequences*) sva četiri genska markera (16S rRNK, *rpl22-rps3*, *secY* i *map*) su analizirane pomoću metoda statističke parsimonije konstruisanja mreže genotipova u programu TCS v 1.21 (Clement *et al.*, 2000) sa limitom poverenja od 95%.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju genskih regiona za detekciju i MLST karakterizaciju *Flavescence doree* (FD) fitoplazme u *D. europaea* i *C. vitalba*.

Region*	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru	Literatura
16SrRNK (1446bp)	<u>direktni PCR</u>		
	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng & Hiruki, 1991
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart <i>et al.</i> , 1996
	<u>nested PCR</u>		
	P1A	ACGCTGGCGGGCGCGCCTAATAC	Lee <i>et al.</i> , 2004
	P7A	CCTTCATCGGCTCTTAGTGC	Lee <i>et al.</i> , 2004
	<u>reakcija sekvenciranja</u>		
	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	Lee <i>et al.</i> , 1998
	16r758f	GTCTTTACTGACGCTGAGGC	Gibb <i>et al.</i> , 1995
rpl22-rps3 (1078bp)	<u>direktni PCR</u>		
	rp(V)F1	TCGCGGTCATGCAAAAGGCG	Lee <i>et al.</i> , 2004
	rpR1	ACGATATTTAGTTCTTTTTGG	Lee <i>et al.</i> , 2004
	<u>nested PCR</u>		
	rp(V)F1A	AGGCGATAAAAAAGTTTCAAAA	Lee <i>et al.</i> , 2004
	rp(V)R1A	GGCATTAAACATAATATATTATG	Lee <i>et al.</i> , 2004
secY (1116bp)	<u>direktni PCR</u>		
	FD9f2	GCTAAAGGTGATTTAAC	Angelini <i>et al.</i> , 2001
	FD9r	TTTGCTTTCATATCTTGTATCG	Daire <i>et al.</i> , 1997
	<u>nested PCR</u>		
	FD9f3	GGTAGTTTTATATGACAAG	Angelini <i>et al.</i> , 2001
	FD9r2	GACTAGTCCCGCCAAAAG	Angelini <i>et al.</i> , 2001
secY-map (674bp)	<u>direktni PCR</u>		
	FD9f5	CAAAAATTACTTTTGGCGGGAC	Arnaud <i>et al.</i> , 2007
	MAPr1	TGCTCAAATGAGCGCTTAAAC	Arnaud <i>et al.</i> , 2007
	<u>nested PCR</u>		
	FD9f6	GTCGCTTTAGAATCGACACA	Arnaud <i>et al.</i> , 2007
	MAPr2	TCGGAAGTAACAGCAGTCCA	Arnaud <i>et al.</i> , 2007

* Dužina fragmenta genskog regiona korišćena za MLST poređenja diverziteta sojeva FD fitoplazme.

3.4 Molekularne analize *Wolbachia*

3.4.1 Detekcija *Wolbachia*

Primeri *D. europaea* sakupljeni za populaciono-genetičku studiju, kao i primeri korišćeni u eksperimentalnim procedurama testiranja komponenti adaptivne vrednosti, analizirani su na prisustvo *Wolbachia*. Za inicijalnu detekciju korišćena je PCR metoda sa prajmerima *ftsZunif* i *ftsZunir* (Lo *et al.*, 2002; Tabela 4) koji su se pokazali kao najosetljiviji za detekciju *Wolbachia*, a koji specifično umnožavaju *ftsZ* gen koji kodira protein sa ulogom u ćelijskoj deobi (engl. *cell division protein*). Umnožavanje fragmenata *ftsZ* gena vršeno je u 20 μ l zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 μ l PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			11.65 μ l
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5mM MgCl ₂)	2.0 μ l
- MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2.0 μ l
- dNTPs	10 mM	0.8 mM	1.6 μ l
- <i>ftsZunif</i>	10 μ M	0.4 μ M	0.8 μ l
- <i>ftsZunir</i>	10 μ M	0.4 μ M	0.8 μ l
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/ μ l	0.375 U/ μ	0.15 μ l
- genomska DNK <i>D.europaea</i>			1.0 μ l

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 (*nuclease-free water*, QIAGEN). Kao pozitivna kontrola reakcije korišćena je DNK vrste *Microplontus millefolii* (Curculionidae) prirodno inficirane sa *Wolbachia* (Gassmann *et al.*, 2011).

Temperaturni protokol je bio sledeći: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 min; denaturacija na 95°C u trajanju od 30 s, hibridizacija na 56°C u trajanju od 60 s, elongacija na 72°C u trajanju od 90 s (37 ciklusa); finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 min. Da bi se utvrdilo prisustvo *Wolbachia* i procenila količina sintetisanog produkta, posle završenog umnožavanja, 5 μ l PCR produkta svakog uzorka, uključujući pozitivnu i negativne kontrole, elektroforetski je razdvojeno na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom. Gel je vizualiziran pod UV transiluminatorom i slikan digitalnim fotoaparatom.

3.4.2 Molekularna karakterizacija *Wolbachia*

Za sve primerke *D. europaea* u kojima je utvrđeno prisustvo *Wolbachia* urađena je standardna multilokusna (Multilocus Sequence Typing - MLST) karakterizacija PCR metodom sa prajmerima specifičnim za pet genskih regiona: i) *gatB* gen koji kodira protein aspartil/glutamil-tRНК(Gln) amidotransferazu, subjedinicu B, ii) *coxA* gen koji kodira citohrom c oksidazu, subjedinicu I, iii) *hcpA* gen za konzervativan hipotetički protein, iv) *ftsZ* gen za protein koji učestvuje u ćelijskoj deobi, i v) *fbpA* gen koji kodira fruktoza-bisfosfat aldolazu (Baldo *et al.*, 2006). Pored ovih pet gena, dodatna karakterizacija je urađena na osnovu visoko varijabilnog *wsp* gena koji kodira *Wolbachia* površinski protein (engl. *Wolbachia surface protein, wsp*) čija je upotreba u karakterizaciji *Wolbachia* analogna upotrebi antigena u serotipizaciji patogenih bakterija (Baldo *et al.*, 2005). Umnožavanje fragmenata navedenih šest genskih regiona za MLST karakterizaciju *Wolbachia* je vršeno pod istim uslovima reakcije, sa prajmerima specifičnim za dati region (Tabela 4), u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja:

	Koncentracija u stoku	Finalna koncentracija u PCR smeši	Količine za 20 µl PCR smeše
- H ₂ O (<i>nuclease-free water</i>)			10.85µl
- KapaBiosystems pufer A +Mg	10x	1x (1.5 mM MgCl ₂)	2.0 µl
- MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.2 µl
- dNTPs	10 mM	0.4 mM	0.8 µl
- <i>gatB_F1/coxA_F1/hcpA_F1/ ftsZ_F1/fbpA_F1/wsp_F1</i>	10 µM	1.0 µM	2.0 µl
- <i>gatB_R1/coxA_R1/hcpA_R1/ ftsZ_R1/fbpA_R1/wsp_R1</i>	10 µM	1.0 µM	2.0 µl
- KAPA <i>Taq</i> polimeraza	5 U/µl	0.375 U/µ	0.15 µl
- genomska DNK <i>D.europaea</i>			1.0 µl

Temperaturni protokol umnožavanja je bio isti za svih šest genskih regiona: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 min; denaturacija na 94°C u trajanju od 30 s, hibridizacija prajmera na 54°C u trajanju od 1 min, elongacija na 72°C u trajanju od 90 s (37 ciklusa); finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 min. PCR produkti su pre sekvenciranja prečišćeni, a reakcije sekvenciranja su izvršene u oba smera pomoću prajmera korišćenih za umnožavanje (Tabela 4). Sekvence su zatim obrađene u programu FinchTV v.1.4.0, a poravnanje i kompletiranje sekvenci je izvršeno uz pomoć metoda Clustal W u okviru MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011).

Nukleotidne sekvence *Wolbachia* genotipova različitog geografskog porekla za svaki MLST genski region (lokus) i *wsp* gen su deponovane u NCBI banku gena pod pristupnim brojevima: KJ911201-2 (*gatB*), KJ911195-6 (*coxA*), KJ911203-4 (*hcpA*), KJ911199-200 (*ftsZ*), KJ911197-8 (*fbpA*) i KJ911205-6 (*wsp*) (Tabela 5). Informacije o alelima MLST lokusa i *wsp* gena genotipa *Wolbachia* su deponovane u bazu podataka PubMLST *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/wolbachia>) pod identifikacionim brojem: ID 1595. Tip sekvence *Wolbachia* genotipa je okarakterisan poređenjem sa svim do sada deponovanim sojevima, prema "PubMLST *Wolbachia* MLST database", a na osnovu alelskog broja svakog od pet pojedinačnih MLST lokusa, *wsp* alelskog broja i broja svakog od četiri hipervarijabilna regiona *wsp* lokusa (HVR1-4).

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju genskih regiona za detekciju i MLST karakterizaciju *Wolbachia*.

Region	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru	Dužina (bp)*	Literatura
<i>gatB</i>	gatB_F1	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	471	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	gatB_R1	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA		Baldo <i>et al.</i> , 2006
<i>coxA</i>	coxA_F1	TTGGRGCRATYAACTTTATAG	487	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	coxA_R1	CTAAAGACTTTKACRCCAGT		Baldo <i>et al.</i> , 2006
<i>hcpA</i>	hcpA_F1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	515	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	hcpA_R1	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG		Baldo <i>et al.</i> , 2006
<i>ftsZ</i>	ftsZunif	GGYAARGGTGCRGCAGAAGA	737	Lo <i>et al.</i> , 2002
	ftsZunir	ATCRATRCCAGTTGCAAG		Lo <i>et al.</i> , 2002
	ftsZ_F1	ATYATGGARCATATAAARGATAG	524	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	ftsZ_R1	TCRAGYAATGGATTRGATAT		Baldo <i>et al.</i> , 2006
<i>fbpA</i>	fbpA_F1	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	509	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	fbpA_R1	CCRCCAGARAAAAYACTATTC		Baldo <i>et al.</i> , 2006
<i>wsp</i>	wsp_F1	GTCCAATARSTGATGARGAAAC	603	Baldo <i>et al.</i> , 2005
	wsp_R1	CYGCACCAAYAGYRCTRTRAAA		Baldo <i>et al.</i> , 2005

* Dužina fragmenta genskog regiona korišćena za identifikaciju *Wolbachia* genotipa.

Tabela 5. Pristupni brojevi i poreklo sekvenci analiziranih genskih markera *D. europaea*, FD fitoplazme i *Wolbachia* koji su deponovani u NCBI bazi podataka.

NCBI pristupni broj	Organizam	Genski region	Haplotip/ Genotip	Domaćin	Geografsko poreklo#
KJ911165	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H1	-	SRB
KJ911166	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H2	-	SRB
KJ911167	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H3	-	SRB, MNE
KJ911168	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H4	-	MNE, MK, GR
KJ911169	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H5	-	MNE
KJ911170	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H6	-	MNE, MK, GR
KJ911171	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H7	-	MNE
KJ911172	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H8	-	MNE, MK, GR
KJ911173	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H9	-	MNE
KJ911174	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H10	-	MNE
KJ911175	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H11	-	MNE
KJ911176	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H12	-	SRB
KJ911177	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H13	-	MNE, GR
KJ911178	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H14	-	MNE
KJ911179	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H15	-	MNE
KJ911180	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H16	-	MNE
KJ911181	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H17	-	MNE
KJ911182	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H18	-	IT
KJ911183	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H19	-	IT
KJ911184	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H20	-	IT
KJ911185	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H21	-	SRB
KJ911186	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H22	-	MK, GR
KJ911187	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H23	-	SRB
KJ911188	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H24	-	GR
KJ911189	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H25	-	GR
KJ911190	<i>D. europaea</i>	<i>mtCOI</i>	H26	-	GR
KJ911191	<i>D. europaea</i>	<i>ITS2</i>	h1	-	SRB, MNE ,IT , MK, GR
KJ911192	<i>D. europaea</i>	<i>ITS2</i>	h2	-	SRB
KJ911193	<i>D. europaea</i>	<i>ITS2</i>	h3	-	MNE
KJ911194	<i>D. europaea</i>	<i>ITS2</i>	h4	-	SRB, IT

KJ911195	<i>Wolbachia</i>	<i>coxA</i>	14*	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911196	<i>Wolbachia</i>	<i>coxA</i>	14*	<i>D. europaea</i>	IT
KJ911197	<i>Wolbachia</i>	<i>fbpA</i>	4*	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911198	<i>Wolbachia</i>	<i>fbpA</i>	4*	<i>D. europaea</i>	IT
KJ911199	<i>Wolbachia</i>	<i>ftsZ</i>	177*	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911200	<i>Wolbachia</i>	<i>ftsZ</i>	177*	<i>D. europaea</i>	IT
KJ911201	<i>Wolbachia</i>	<i>gatB</i>	4*	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911202	<i>Wolbachia</i>	<i>gatB</i>	4*	<i>D. europaea</i>	IT
KJ911203	<i>Wolbachia</i>	<i>hcpA</i>	40*	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911204	<i>Wolbachia</i>	<i>hcpA</i>	40*	<i>D. europaea</i>	IT
KJ911205	<i>Wolbachia</i>	<i>wsp</i>	61*	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911206	<i>Wolbachia</i>	<i>wsp</i>	61*	<i>D. europaea</i>	IT
KJ911207	FD fitoplazma	16SrRNK	genotip 1	<i>D. europaea</i>	SRB
KJ911208	FD fitoplazma	16SrRNK	genotip 1	<i>C. vitalba</i> <i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911209	FD fitoplazma	16SrRNK	genotip 2	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911210	FD fitoplazma	<i>rpl22-rps3</i>	genotip 1	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	SRB
KJ911211	FD fitoplazma	<i>rpl22-rps3</i>	genotip 1	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911212	FD fitoplazma	<i>rpl22-rps3</i>	genotip 2	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911213	FD fitoplazma	<i>secY</i>	genotip 1	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	SRB
KJ911214	FD fitoplazma	<i>secY</i>	genotip 1	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911215	FD fitoplazma	<i>secY</i>	genotip 2	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911216	FD fitoplazma	<i>secY</i>	genotip 3	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911217	FD fitoplazma	<i>secY</i>	genotip 4	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911218	FD fitoplazma	<i>secY-map</i>	genotip 1	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	SRB
KJ911219	FD fitoplazma	<i>secY-map</i>	genotip 1	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE
KJ911220	FD fitoplazma	<i>secY-map</i>	genotip 2	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	SRB
KJ911221	FD fitoplazma	<i>secY-map</i>	genotip 3	<i>D. europaea</i> <i>C. vitalba</i>	MNE

SRB - Srbija; MNE - Crna Gora; MK - Makedonija; GR - Grčka; IT - Italija.

*Aleški profili prema *Wolbachia* MLST bazi podataka (<http://pubmlst.org/wolbachia>).

3.5 Eksperimentalne procedure

3.5.1 Osnivanje i gajenje *Wolbachia*-inficiranih (DeWo+) i -neinficiranih (DeWo-) kolonija *D. europaea*

Za potrebe osnivanja *Wolbachia*-inficiranih i -neinficiranih kolonija *D. europaea* (DeWo+ i DeWo-) u cilju testiranja uticaja infekcije *Wolbachia* na komponente adaptivne vrednosti domaćina sakupljene su jedinke iz prirodno inficiranih i neinficiranih populacija sa dva prethodno praćena i detaljno proučavana lokaliteta. Prvi lokalitet se nalazio u okolinu sela Nudo u zapadnoj Crnoj Gori, u blizini granice sa Bosnom i Hercegovinom, lociran na približno 300 m nadomorske visine u Grahovsko-Nudolskom podregionu (Tabela 1). Na ovom lokalietu je prisustvo FD fitoplazme u *C. vitalba* i prisustvo *Scaphoideus titanus* na vinovoj lozi praćeno od 2008. godine (Radonjić *et al.*, 2012), a populacije *D. europaea* su bile visoko inficirane FD fitoplazmom (>60%) i *Wolbachia*-neinficirane. Drugi lokalitet se nalazio u okolini Aleksandrovca u centralnoj Srbiji gde je epidemija FD fitoplazme praćena od 2004. godine (Duduk *et al.*, 2004; Krnjajić *et al.*, 2007; Fillippin *et al.*, 2009a). Populacije vektora *D. europaea* su na ovom lokalitetu bile inficirane FD fitoplazmom u veoma niskom procentu (oko 3%; Filippin *et al.*, 2009a), i inficirane sa *Wolbachia*. Primerci iz obe populacije su sakupljeni u više prilika tokom septembra 2011. godine, u cilju obezbeđivanja dovoljnog broja adulta za začetak laboratorijskih kolonija. Sakupljanje jedinki i transport do laboratorije je vršen po prethodno opisanoj proceduri.

Wolbachia-inficirane i -neinficirane kolonije *D. europaea* su gajene odvojeno, prema statusu infekcije, u po dva poljska kaveza (210 × 210 × 190 cm) za svaku koloniju. Skupine od po 200 adulta *D. europaea* sakupljene na prethodno opisanim lokalitetima su stavljene u svaki od četiri kaveza. Na početku formiranja kolonija 50 adulta po lokaciji testirano je na prisustvo/odsustvo *Wolbachia* PCR umnožavanjem *ftsZ* gena. Insekti su gajeni na sledećim biljnim vrstama: *Crepis foetida*, *Salvia pratensis*, *Plantago lanceolata*, *Linaria vulgaris* i *Agropyron repens*. Sve biljke korišćene za osnivanje kolonije i kasnije za eksperimente uticaja na komponente adaptivne vrednosti, su gajene iz semena kako bi se izbegao mogući transfer fitoplazme i/ili *Wolbachia*. Ponašanje adulta je praćeno na dnevnom nivou, a posebno ponašanje tokom ovipozicije i događaji uginuća jedinki. Početkom novembra, nakon uginuća adulta, iz svakog

kaveza su sakupljana tzv. *ovipozicijska gnezda* (oko 150 *gnezda* sa 400-450 jaja po kavezu) koja su zatim prebačena u laboratoriju na prezimljavanje u kontrolisanim uslovima, prema prethodno opisanoj proceduri. Početkom marta naredne godine, simulirajući porast spoljašnje temperature, jaja dobijena od DeWo+ i DeWo- ženki su preneti sa temperature prezimljavanja (4-6°C) na sobnu temperaturu (23±1°C) gde su čuvana do izleganja. Tek izlegle larve su čuvane na mladim sejancima dok nisu dostigle L3 stupanj. Larve su početkom juna prenete u mobilne spoljne kaveze (30 x 30 x 45 cm), pripremljene po prethodno opisanoj proceduri. Unutar svakog od kaveza je stavljeno po 50 larvi *D. europaea*. Ukupno je formirano 10 kaveza DeWo+ i 10 kaveza DeWo- larvi za gajenje kolonija. Od sredine juna je zabeležena eklozija adulta u kavezima, a do početka jula su svi primerci prešli u adultni stadijum. Kavezi su nakon ovog perioda držani u spoljnom insektarijumu. Gajenje kolonija i testovi uticaja *Wolbachia* na komponente adaptivne vrednosti domaćina su sprovedeni tokom 2012. i 2013. godine.

3.5.2 Komponente adaptivne vrednosti DeWo+ i DeWo- kolonija *D. europaea*

Za testiranje efekta prisustva *Wolbachia* na osobine životne istorije *D. europaea* korišćeni su mali mobilni kavezi (30 x 30 x 45 cm). Testirane su odgajene populacije koje su prirodno *Wolbachia* inficirane (Aleksandrovac, Srbija) i poređene sa neinficiranom populacijom koja je služila kao kontrola (Nudo, Crna Gora).

Sagledavanje fekunditeta ženki *D. europaea* izvršeno je na uzorku od 40 jedinki iz obe populacije. Uz pomoć staklenog usnog aspiratora i binokularne lupe Leica MZ75 adulti iz svake populacije su početkom avgusta razdvojeni po polovima i prebačeni u dva mobilna kaveza sa odgovarajućim biljkama za ishranu. Radi utvrđivanja početka ovipozicije, inspekcija kaveza sa insektima je vršena jedanput dnevno. Disekcije ženki je izvršena krajem avgusta, nakon što je u kavezima primećeno prvo polaganje jaja odnosno pošto su prvi put primećena oštećenja na krilima ženki. Prilikom disekcije, brojana su potpuno formirana jaja. Svi testirani primerci su provereni na prisustvo *Wolbachia* PCR amplifikacijom *ftsZ* gena po prethodno opisanom protokolu.

Testiranje uticaja *Wolbachia*-infekcije na masu tela adulta *D. europaea* urađeno je sa po 100 jedinki po populaciji. Jedinke su uz pomoć staklenog usnog aspiratora i stereomikroskopa odvojene po polovima kako bi se osiguralo testiranje jednakog broja

mužjaka i ženki. Adulti su zatim usnim aspiratorom prebačeni u mobilne kaveze sa odgovarajućim biljkama za ishranu, gde je svakog dana u 17 časova vršena inspekcija vijabilnosti jedinki. Krajem avgusta, po 40 živih mužjaka i ženki je usisano usnim aspiratorom, a zatim je svaki pojedinačni primerak stavljen u tubicu od 2 ml i izmeren na elektronskoj vagi (Shimadzu BL220H). Obzirom na male težine adulta i variranja u težini tubica, pre svakog merenja je vaga tarirana praznom tubicom od 2 ml u kojoj je zatim izvršeno merenje primerka. Svi testirani primerci su provereni na prisustvo *Wolbachia* PCR amplifikacijom *ftsZ* gena.

Dužina života je beležena za adulte oba pola DeWo+ i DeWo- kolonija i to za po 100 jedinki po populaciji (50 mužjaka i 50 ženki) u zasebnim mobilnim kavezima. Kada su početkom jula jedinke u kavezima za gajenje prešle u stadijum adulta, dužina života je merena u danima. Svi adulti koji su eklozirali istog dana prebačeni su u zaseban mobilni kavez i tretirani kao kohorta iste starosti. Primerci oba pola su držani zajedno u kavezima. Do polovine avgusta, odnosno do početka kopulacija, inspekcija je vršena u intervalima od dva dana. Nakon uočenih kopulacija inspekcija je vršena jednom dnevno, pri čemu su mrtvi adulti uklanjani iz kaveza. Svaka uginula jedinka je stavljena u tubicu sa alkoholom i zabeležen je datum uginuća i pol jedinke. Test je završen krajem oktobra nakon uginuća poslednje jedinke. Po završetku testa, svi primerci su provereni na prisustvo *Wolbachia* PCR amplifikacijom *ftsZ* gena.

Osnovni parametri deskriptivne statistike i analiza varijanse osobina životne istorije izračunati su u okviru softverskog paketa STATISTICA (StatSoft, 1997). Dodatno je za rezultate testiranja dužine života urađena Kaplan-Mejerova analiza preživljavanja, za koju je ulazni podatak bio broj živih jedinki svakog dana. Log-rank test je korišćen za testiranje značajnosti razlika u rezultujućim krivama preživljavanja. Obe analize su urađene korišćenjem online programskog paketa OASIS (engl. *Online Application for Survival analysis*, <https://sbi.postech.ac.kr/oasis/surv/>) (Yang *et al.*, 2011).

3.5.3 Eksperimenti prenošenja FD fitoplazme prirodno inficiranim populacijama *D. europaea*

U cilju potvrđivanja vektorske sposobnosti populacija *D. europaea* koje su prirodno visoko inficirane FD fitoplazmom, izvedeni su eksperimenti prenošenja fitoplazme na

sejance vinove loze. Adulti *D. europaea* sakupljeni su metodom košenja entomološkom mrežom uz pomoć usnog aspiratora tokom jula 2011. godine na lokalitetima u okolini Nuda u Crnoj Gori. Sakupljene cikade stavljane su u plastične cilindre dimenzije 10 x 30 cm u kojima su se nalazile biljke vinove loze, sorta Plovdina, odgajene iz semena u laboratorijskim uslovima. Ukupno 10 biljaka vinove loze je bile izloženo ishrani *D. europaea* u trajanju od 48h. Skupine od po 12 primeraka prirodno FD-inficiranih cikada stavljene su u dvodelni plastični cilindar (10 x 30 cm). Donji deo cilindra je predstavljao saksiju sa biljkom, a gornji, mobilni deo cilindra, je bio prekriven gazom. Insekti i eksperimentalne biljke su transpostovani do laboratorije u mobilnom električnom frižideru na temperaturi od 15°C. Po prispeću, eksperimentalne biljke su držane u klima komori na temperaturi 24±1°C (16/8 časova dan/noć period). Test je urađen u 10 ponavljanja, a kontrolu je predstavljalo šest biljaka vinove loze odgajenih iz semena koje nisu bile izložene ishrani *D. europaea*. Preživljavanje insekata praćeno je na svakih 8h i uginuli primerci su odmah stavljani u tubice zapremine 2 ml sa 96% etanolom na -20°C. Posle 48h svi preživeli primerci *D. europaea* su pomoću usnog aspiratora sklonjeni sa biljaka i stavljani u 96% etanol na -20°C. Insekti su individualno analizirani na prisustvo FD fitoplazme. Eksperimentalne biljke su dalje čuvane u klima komori na temperaturnom režimu 24±1°C (16/8h dan/noć period) i praćena je pojava simptoma infekcije fitoplazmom. Tri meseca od postavke eksperimenta obavljeno je uzorkovanje listova svih test biljaka i kontrolnih biljaka koje su zatim PCR analizirane na prisustvo FD fitoplazme umnožavanjem FD9 genskog regiona.

4. REZULTATI

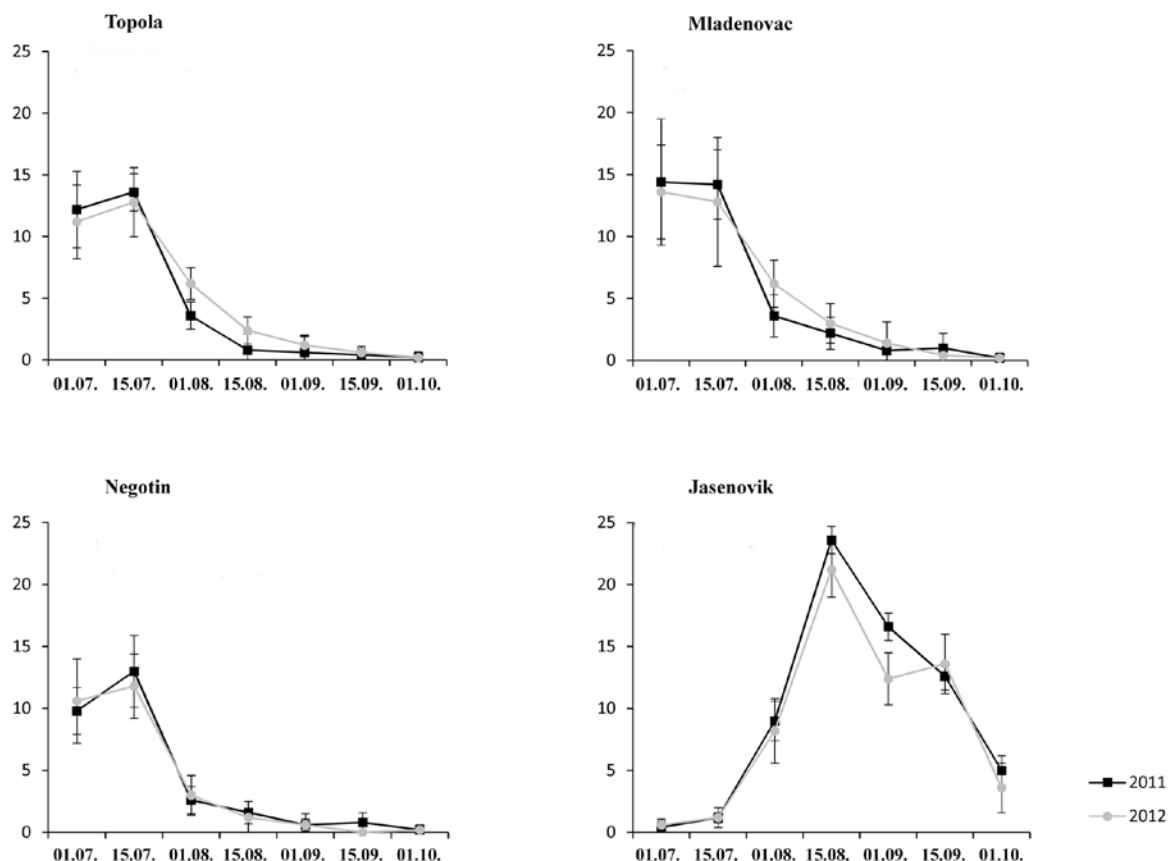
4.1 Karakteristike biologije *D. europaea*

Prikazani rezultati istraživanja biologije i ekologije vrste cikade *D. europaea* predstavljaju podatke dobijene nakon sprovedenih višegodišnjih observacija u poljskim, kontrolisano-poljskim i laboratorijskim uslovima.

4.1.1 Populaciona dinamika i asocijacija sa biljkama

Vremenska dinamika i sezonsko pojavljivanje adulta *D. europaea* praćeno je polju tokom 2011. i 2012. godine. Dinamika adulta i asocijacija sa biljkama je praćena u periodu od jula do oktobra, na lokalitetima sa različitim vegetacijskim sklopom. Tokom jula nije uočena značajna razlika u brojnosti adulta na istraživanim lokalitetima (Slika 8) ili duž transekta istih. Na ovim lokalitetima je brojnost adulta značajno opadala tokom avgusta, kada je svega nekoliko primeraka moglo biti skupljeno po lokalitetu. Opadanje brojnosti se poklapalo sa sušenjem zeljastih biljaka koje su činile biljni pokrivač tokom jula meseca. Dodatnim istraživanjem ovih lokaliteta tokom avgusta i septembra, utvrđeno je da se adulti *D. europaea* sakupljaju (tj. u agregaciji su) na biljkama koje su bolje adaptirane na sušu (npr. *S. pratensis*) ili se pomeraju ka žbunastim biljkama u okolini livade. Na svim lokalitetima je utvrđeno da je *Clematis vitalba* biljka izbora za ovu cikadu na kraju vegetacijskog perioda, krajem avgusta i početkom septembra.

Na četvrtom lokalitetu Jasenovik, gde je *C. vitalba* dominantna biljna vrsta, utvrđena je nešto drugačija vremenska dinamika adulta (Slika 8), potvrđujući prethodno zapažanje o agregaciji ove vrste na žbunaste biljke na kraju leta. Do početka avgusta, svega nekoliko primeraka *D. europaea* je sakupljeno; nasuprot tome vrhunac brojnosti je zabeležen sredinom avgusta i početkom septembra. Takođe, u poređenju sa prethodna tri lokaliteta, ukupan broj uhvaćenih jedinki je bio veći, pogotovo u vreme vrhunca brojnosti populacije. Iz prethodno navedenog se može zaključiti da ovo nije posledica preferentnosti *D. europaea* ka vrsti *C. vitalba*, već posledica sušenja zeljaste vegetacije.

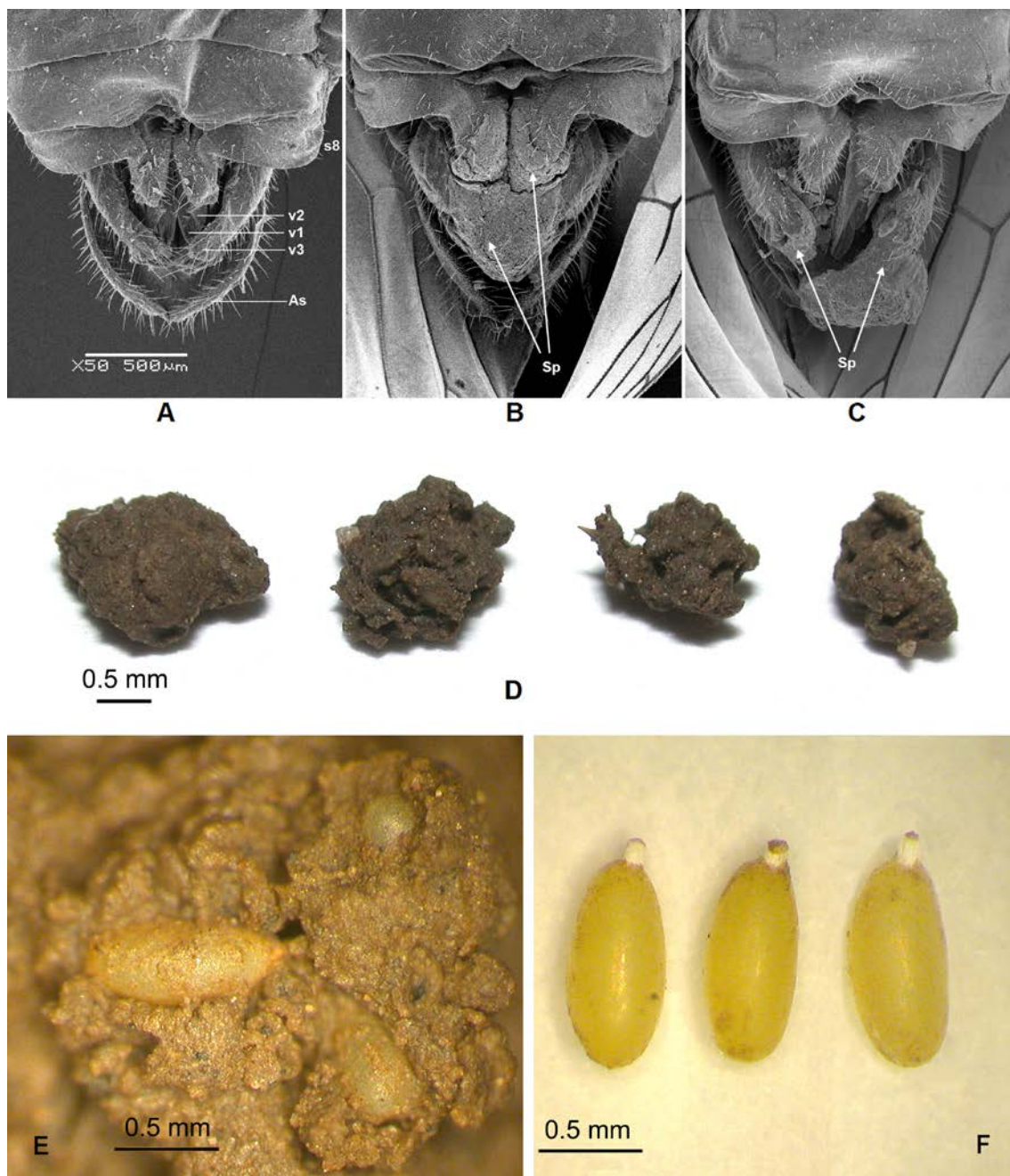


Slika 8. Sezonska dinamika adulta *D.europaea* praćena na 4 lokaliteta u periodu od jula do oktobra 2011. i 2012. godine.

4.1.2 Reproaktivno ponašanje

Ukupno je zabeleženo 69 kopulacija u poljskim kavezima i 18 kopulacija u mobilnim poljskim kavezima. Kopulacije su primećene tokom avgusta u podnevnim časovima. Smrtnost jedinki u kavezima, tokom jula ili u prvoj polovini avgusta, nije zabeležena. Smrtnost je, od sredine avgusta, polako rasla i to mužjaka koji su pre toga, verovatno, učestvovali u kopulaciji. U kavezima u polju, do sredine septembra su svi mužjaci uginuli. Isti trend je primećen na sva četiri lokaliteta.

Ponašanje *D. europaea* prilikom polaganja jaja je proučavano u kontrolisanim uslovima. Prvo polaganje jaja je zabeleženo tokom zadnje nedelje avgusta i to u obe praćene godine. Pre samog akta polaganja, ženke su veći deo vremena provodile na površini zemlje, što je za posledicu imalo evidentnu iskrzanost krajeva krila.



Slika 9. Genitalni segment ženke, ovipozicijska gnezda i jaja cikade *D. europaea* A) Ventralni izgled zadnjeg dela abdomena ženke sa strukturama genitalnog aparata uključenim u proces ovipozicije: s8 – osmi sternit; v1 – prva valvula; v2 – druga valvula; v3 – treća valvula; as – analni segment. B) i C) Analni segment ženke ventralno sa zalepljenim delovima zemlje. D) Izgled ovipozicijskih gnezda u kojima su položena jaja. E) Pozicija jaja unutar ovipozicijskih gnezda. F) Izgled jaja izvađenih iz ovipozicijskih gnezda.

Neposredno pre polaganja jaja, koje se dešava na površini zemlje, ženke su sakupljale sitne delove zemlje sa površine lepeći ih za zadnji deo abdomena, praveći lepljivo blato. Kao posledica ove aktivnosti, čestice blata ispunjavaju prostor između analnog segmenta i 3. valvule koji okružuje otvor legalice (Slika 9A, B, C). Uz pomoć analnog segmenta i 3. valvule, ženke mešaju čestice blata praveći nepravilne strukture prečnika do 4 mm. Ženke polažu dva do četiri jaja unutar takve strukture od blata, koja se zatim odvaja od ženke i pada na površinu zemlje (Slika 9D, E, F).

D. europaea prezimljava u stadijumu jajeta. Pojavljivanje prvih L1 larvi, u kavezima u poljskim uslovima, zabeleženo je sredinom maja meseca. Ovaj podatak takođe važi i za jaja sakupljena iz mobilnih kaveza koja su prebačena na gajenje u laboratorijskim uslovima. Iz četiri mobilna kaveza, postavljenih 2010. godine, tokom maja 2011. godine ispililo se 560 larvi. Sve larve su sakupljene za morfološke analize. Na istraženim lokalitetima u Srbiji primećeno je da su adulti bili parazitirani osicama koje pripadaju fam. Dryinidae (Hymenoptera). Ukupno je registrovano 9 parazitiranih primeraka od 560 pregledanih adulta (1.6%). Na osnovu molekularne identifikacije vrste parazitoida u asocijaciji sa *D. europaea*, utvrđena je divergentnost od 22-28% u poređenju sa javno dostupnim sekvencama. Zbog ograničenog broja vrsta i/ili sekvenci u bazama BOLD (<http://www.boldsystems.org/index.php/databases>) i NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), kao i zbog divergentnosti od preko 20%, identifikacija je bila moguća jedino do nivoa familije.

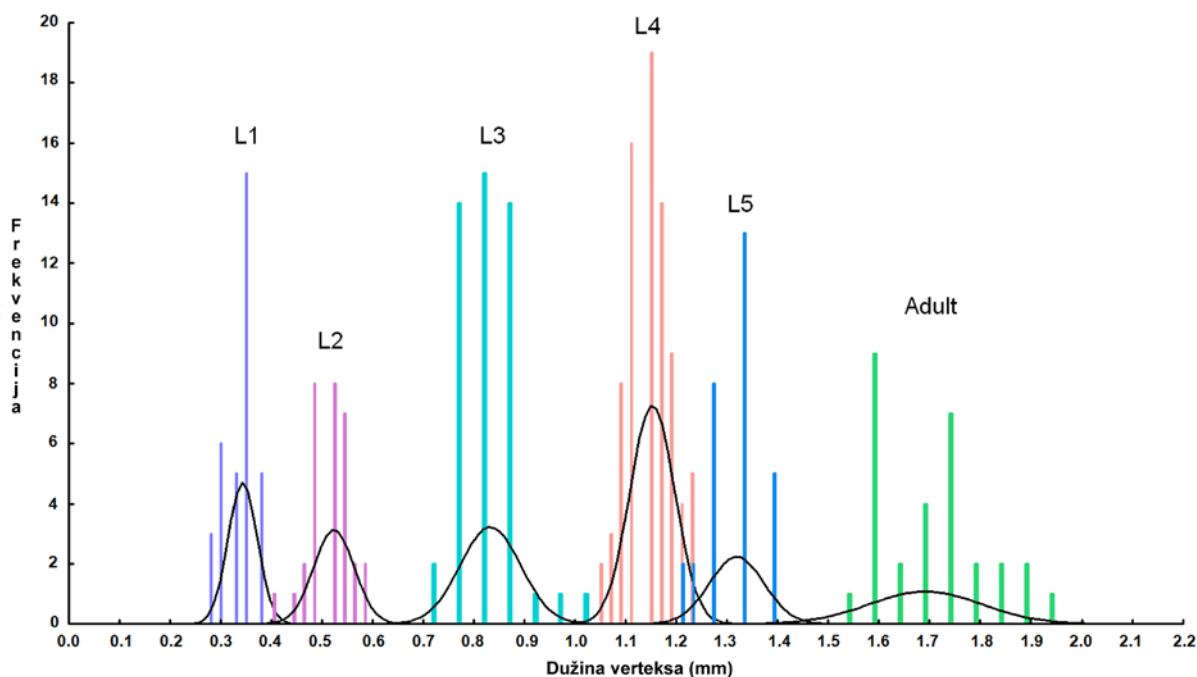
4.1.3 Aspekti ponašanja i morfologije različitih stadijuma razvića *D. europaea*

Na osnovu dužine verteksa (Slika 10) i morfoloških karakteristika (Slika 11; Tabela 6) determinisano je pet larvenih stupnjeva. Prva dva stupnja su determinisana vizuelno tj. sve ispiljene larve iz jajeta su L1 a sve presvučene L1 larve su predstavljale L2 stupanj. Takođe, samo presvučene larve su korišćene za morfološke analize kasnijih stupnjeva. Ukupno 223 larve i 30 odrasle jedinice (15 ženki i 15 mužjaka) su korišćeni za proučavanje morfologije i merenje dužine tela i verteksa.

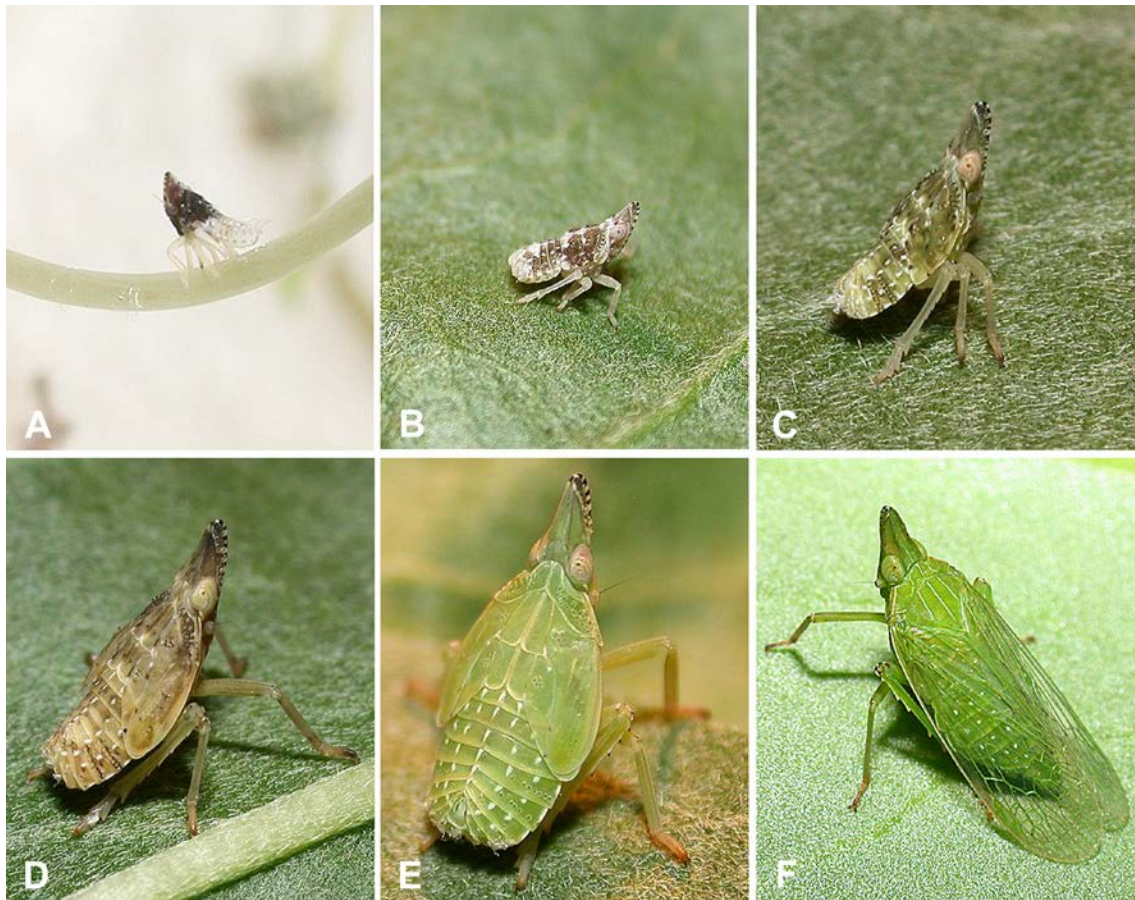
Jaja (Slika 9F) - izdužena, ovalna, žućkasto-zelena sa providnim horionom, dužine 0.93 ± 0.05 mm (u rasponu od 0.88–1.02, izmereno=25 primeraka), širine 0.42 ± 0.01 mm (u rasponu od 0.40–0.45, izmereno=25 primeraka). Vršni deo jaja je biserno

bele boje sa grupom kratkih nastavaka dužine 0.12 ± 0.02 mm (u rasponu od 0.07–0.17mm).

Larva prvog stupnja (L1) (Slike 11A i 12A) - srednja dužina verteksa iznosi 0.34 ± 0.03 mm (u rasponu od 0.29–0.38, izmereno=34 primerka), dužina tela uključujući cefalični nastavak iznosi 1.12 ± 0.09 mm (u rasponu od 0.94–1.25, izmereno=34 primerka). L1 larve su dvobojne, glava i toraks su braon-crne boje, abdomen je biserno bele boje, skoro providan. Verteks i frons su tamno braon-crne boje sa crnim i biserno belim tačkama između središnje i bočne karine fronsa. Pronotum je dorzalno sa jednim redom senzornih rupica. Noge su bele boje. Neposredno nakon početka hranjenja tj. aktivacije, L1 larve izlučuju voštane ekskreme na zadnem delu tela. One su nepokretne, ne menjaju poziciju tokom hranjenja i nakon tri do četiri dana, na sobnoj temperaturi (23 ± 1 °C), se presvuku u L2 larvu.



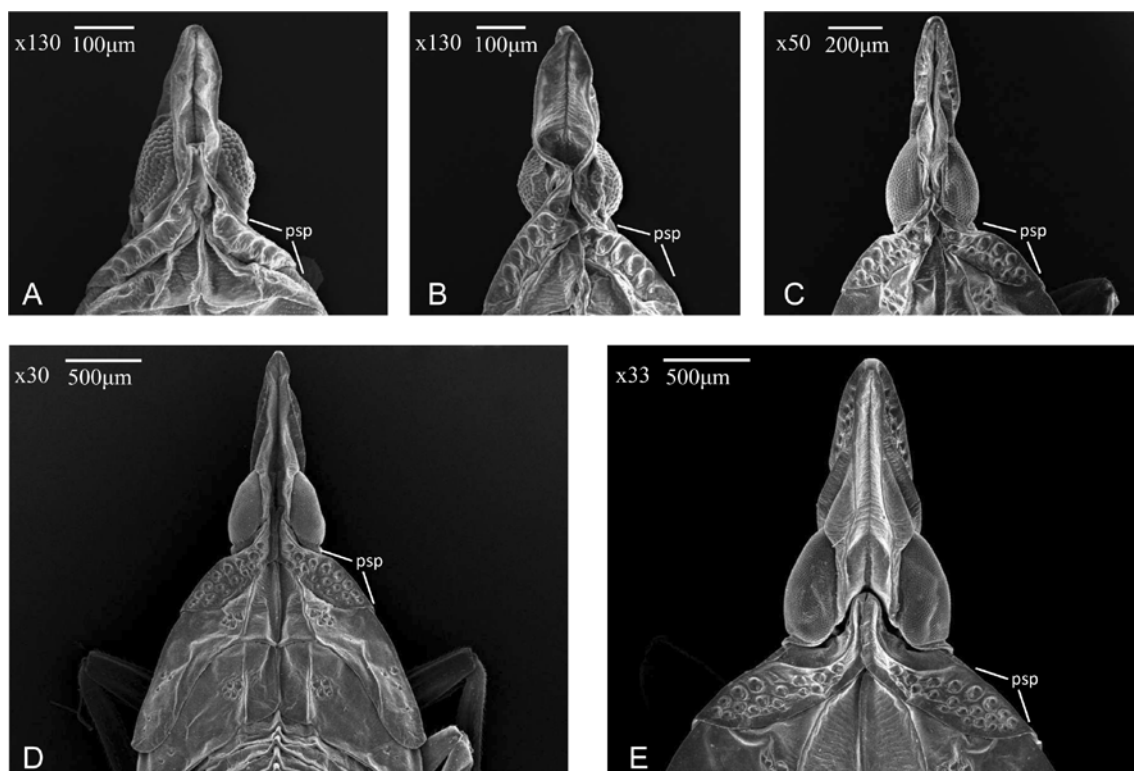
Slika 10. Multimodalna distribucija frekvencije izmerene dužine verteksa larvenih stupnjeva i adulta *D. europaea*.



Slika 11. Izgled larvenih stupnjeva i adulta *D. europaea*. A-E) L1-L5 larve, F) Adult.

Larva drugog stupnja (L2) (Slike 11B i 12B) - srednja dužina verteksa iznosi 0.52 ± 0.04 mm (u rasponu od 0.40–0.59, izmeren=31 primerak), dužina tela uključujući cefalični nastavak iznosi 2.60 ± 0.19 mm (u rasponu od 2.02–2.98, izmeren=31 primerak). L2 larve su višebojne, najčešće je osnovna boja glave i toraksa sivo-zelena, dok su neki primerci svetlije ili tamnije braon boje. Osnovna boja abdomena je biserno bela sa obojenim tačkama po sredini i bočno a dorzalno sa pet redova belih tačaka. Verteks i frons su sivo-zelene boje sa crnim i belim tačkama između središnje i bočne karine fronsa. Dorzalno se na pronotumu nalazi jedan red od 7 senzornih rupica. Noge su zelenkasto-bele boje. L2 larve su takođe nepokretne i nakon pet do šest dana, na sobnoj temperaturi (23 ± 1 °C), se presvuku u L3 larvu.

Larva trećeg stupnja (L3) (Slike 11C i 12C) - srednja dužina verteksa iznosi 0.83 ± 0.06 mm (u rasponu od 0.71–1.02, izmereno=48 primeraka), dužina tela uključujući cefalični nastavak iznosi 3.63 ± 0.31 mm (u rasponu od 2.42–4.50 izmereno=48 primeraka). L3 larve su višebojne, najčešće je osnovna boja glave i toraksa maslinasto zelena sa retkim beličastim mrljama. Abdomen je nešto svetlije boje sa pet redova belih tačaka dorzalno postavljenih. Verteks i frons su maslinasto zelene boje sa crnim i belim tačkama između središnje i bočne karine fronsa. Dorzalno se na pronotumu nalaze dva reda senzornih rupica. Noge su svetlo zelene boje. L3 larve su pokretne i tokom hranjenja se najčešće nalaze na bazalnim delovima biljke. Nakon šest do osam dana, na sobnoj temperaturi, se presvuku u L4 larvu.



Slika 12. Senzorne jamice na pronotumu (engl. *pronotal sensory pits (psp)*) larvenih stupnjeva *Dictyophara europaea*. (A) Larva prvog stupnja - L1, (B) Larva drugog stupnja - L2, (C) Larva trećeg stupnja - L3 (D) Larva četvrtog stupnja - L4, (E) Larva petog stupnja - L5.

Larva četvrtog stupnja (L4) (Slike 11D i 12D) - srednja dužina verteksa iznosi 1.15 ± 0.04 (u rasponu od 1.04–1.24, izmereno=80 primeraka), dužina tela uključujući

cefalični nastavak iznosi 5.19 ± 0.32 mm (u rasponu od 4.53–5.98, izmereno=80 primeraka). L3 larve su višebrojne, vrlo često zelene ili maslinasto zelene boje sa svetlo braon nijansama, dok su neki primerci svetlo braon boje, tamno braon ili crvenkato-braon boje. Abdomen je nešto svetlije boje sa četiri reda belih tačaka dorzalno postavljenih. Frons je sa crnim i belim tačkama između središnje i bočne karine. Dorzalno se na pronotumu nalaze tri reda senzornih rupica. Noge su svetlo zelene boje. L4 larve su aktivnije i često menjaju položaj prilikom hranjenja. Nakon sedam do deset dana, na sobnoj temperaturi, se presvuku u L5 larvu.

Larva petog stupnja (L5) (Slike 11E i 12E) - srednja dužina verteksa iznosi 1.31 ± 0.05 mm (u rasponu od 1.21–1.39, izmereno=30 primeraka), dužina tela uključujući cefalični nastavak iznosi 6.23 ± 0.47 mm (u rasponu od 5.41–7.11, izmereno=30 primeraka). L5 larve su obično zelene boje. Abdomen je sa pet redova belih tačaka dorzalno postavljenih. Frons je sa crnim i belim tačkama između središnje i bočne karine. Dorzalno se na pronotumu nalaze tri ili četiri reda senzornih rupica. Noge su blede zelene boje, tarzusi su žućkasto-braon boje. L5 larve su vrlo aktivne i često menjaju biljke tokom hranjenja. Nakon osam do dvanaest dana, na sobnoj temperaturi, se presvuku u adulta.

Kod svakog larvenog stupnja dužina verteksa se povećavala srednjom stopom od 1.41, što je izračunato na osnovu Dajerovog pravila (Dyar's rule) (Tabela 6). Iako je originalno namenjen za determinisanje larvenih stupnjeva kod leptira (Lepidoptera), Dajerovo pravilo se, kod *D. europaea*, može primeniti zbog toga što izračunate vrednosti dužine verteksa ulaze u raspon izmerenih vrednosti. Stopa rasta dužine verteksa kasnijih larvenih stupnjeva se kod *D. europaea* smanjuje, za razliku od Dajerovog pravila, što može biti uzrokovano brojnim sredinskim faktorima (Klingenberg & Zimmermann, 1992; Hunt & Chapman, 2001).

Multimodalna distribucija frekvencije (Slika 10) je potvrdila dva zapažanja: i) da *D. europaea* ima 5 larvenih stupnjeva i ii) da postoji preklapanje u dužini verteksa između stupnjeva L4 i L5. Odnosno, veće L4 larve i manje L5 larve mogu imati identičnu dužinu verteksa. Međutim, zbog jasne razlike u obojenosti tela i morfološkim karakteristikama pogrešna identifikacija ova dva stupnja nije moguća (Tabela 7).

Tabela 6. Dužina verteksa larvenih stupnjeva *D. europaea* i procenjena dužina verteksa izračunata prema Dajerovom pravilu.

Larveni stupanj	Broj pregledanih larvi	Srednja dužina verteksa ± SD (mm)	Raspon dužine verteksa (mm)	Dobijena stopa rasta ¹	Srednja vrednost dobijenih stopa rasta	Izračunata dužina verteksa (mm) ²
L1	34	0.34±0.03	0.29-0.38			0.34
L2	31	0.52±0.04	0.40-0.59	1.53		0.48
L3	48	0.83±0.06	0.71-1.02	1.59	1.41	0.68
L4	80	1.15±0.04	1.04-1.24	1.38		0.96
L5	30	1.31±0.05	1.21-1.39	1.14		1.35

¹ Dužina verteksa stupnja L_i/dužina verteksa stupnja L_{i-1};

² Dužina verteksa L_{i+1} = L_i pomnožena srednjom vrednošću dobijenih stopa rasta (1.41).

Tabela 7. Ključne karakteristike za odvajanje larvenih stupnjeva *D. europaea*.

Larveni stupanj	Srednja dužina verteksa ± SD /raspon (mm)	Srednja dužina tela ± SD /raspon (mm)	Obojenost tela	Broj redova senzornih jamica na pronotumu	Pokretljivost larvenog stupnja
L1	0.34 ± 0.03/ 0.29–0.38	1.12 ± 0.09/ 0.94–1.25	dvobojna	1	ne
L2	0.52 ± 0.04/ 0.40–0.59	2.60 ± 0.19/ 0.94–1.25	višebojna	1	ne
L3	0.83 ± 0.06/ 0.71–1.02	3.63 ± 0.31/ 2.42–4.5	višebojna	2	srednje
L4	1.15 ± 0.04/ 1.04–1.24	5.19 ± 0.32/ 4.53–5.98	višebojna	3	srednje
L5	1.31 ± 0.05/ 1.21–1.39	6.23 ± 0.47/ 5.41–7.11	jednobojna (zelene boje)	3 (4)	veoma

Adult (Slika 11F) - srednja dužina verteksa adulta iznosi 1.68 ± 0.11 mm (u rasponu od 1.51–1.92, izmereno ukupno 30 primeraka), dužina tela uključujući cefalični nastavak iznosi 9.25 ± 1.03 mm (u rasponu od 7.5–12.1, ukupno je izmereno 30 primeraka). Srednja dužina tela mužjaka iznosi 8.49 ± 0.44 mm (u rasponu od 7.5–9.1, ukupno je izmereno 15 primeraka) dok je srednja dužina tela ženki 10.0 ± 0.88 mm (u rasponu 9.0–12.1, ukupno je izmereno 15 primeraka). Osnovna boja tela je zelena. Fastigijum je sa nekoliko belih tačaka. Cefalični nastavak je blago zakrivljen nagore, duplo duži od pronotuma. Verteks je relativno širok sa zakrivljenim bočnim marginama, i savija se prema očima. Središnja karina verteksa je bele boje, pliće postavljena u vršnom delu i jasno vidljiva u bazalnom delu. Središnja i bočna karina pronotuma i mezonotuma su jasno vidljive i bele boje. Abdomen je sa šest redova belih tačaka dorzalno postavljenih. Krila su glatka i transparentna, duža od abdomena. Noge su svetlo zelene boje. Distalni kraj tibija prednjih nogu i tarzomere su braon boje. Tibije zadnjih nogu imaju 7 apikalno postavljenih trnova koji su pri vrhu crne boje. Prve i druge tarzomere imaju 16 odnosno 20 apikalno postavljenih trnova koji su pri vrhu crne boje. Adulti su vrlo aktivni tokom dana i često menjaju položaj i biljke tokom hranjenja. Kod *D. europaea* nije utvrđena preferencijalna ishrana određenim biljkama čime je potvrđena njena polifagnošć.

Cikada *D. europaea* je univoltna vrsta koja prezimljava u stadijumu jajeta. Prve larve se javljaju početkom maja a adulti početkom juna meseca. Adulti su vrlo aktivni i često menjaju biljke na kojima se hrane. Nakon kopuliranja, koje se dešava tokom avgusta meseca, počinje uginjavanje mužjaka. Ženke nakon kopuliranja polažu jaja na zemlji, što za rezultat ima mehaničke povrede tj. iskrznost krila. Ženke žive duže, što dokazano eksperimentalnim putem kao i observacijama o njihovoj prisutnosti u poljskim kavezima sve do kraja oktobra meseca.

4.2 Analiza komponenti adaptivne vrednosti DeWo+ i DeWo- kolonija *D. europaea* pod uticajem infekcije *Wolbachia*

4.2.1 Fekunditet

Disekcija ženki izvršena je nakon što je inspekcijom utvrđeno prvo polaganje jaja. Ukupno je disekovano 76 ženki, po 38 iz odgajenih populacija iz Nuda (DeWo-) i Aleksandrovcu (DeWo+). Prosečan broj jaja disekovanih ženki poreklom iz

Aleksandrovca iznosio je 46 ± 6.49 , u rasponu od 36-58 jaja (Tabela 8). Vrednosti fekunditeta ženki poreklom iz Nuda bile su u rasponu od 31-68 jaja sa prosečnom vrednošću od 43.08 ± 9.54 . Analiza varijanse nije pokazala značajno variranje u prosečnim vrednostima fekunditeta između dve analizirane populacije ($F=2.433$, $P=0.123$).

Tabela 8. Rezultati testiranja fekunditeta, mase tela, i dužine života *Wolbachia* inficirane (DeWo+) i neinficirane populacije (DeWo-) *Dictyophara europaea*.

Parametar	Populacija	DeWo+		DeWo-		
		Pol	Ženke	Mužjaci	Ženke	Mužjaci
Fekunditet \pm SD			46 ± 6.49	/	43.08 ± 9.54	/
Masa tela \pm SD			0.02511 ± 0.0038	0.015763 ± 0.002	0.02611 ± 0.0037	0.016237 ± 0.002
Dužina života \pm SD			84.58 ± 7.84	51.98 ± 9.79	85.02 ± 8.97	54.32 ± 9.01

4.2.2 Masa tela

Za potrebe testiranja uticaja inficiranosti *Wolbachia* na masu tela izmereno je 160 primeraka *D. europaea*, i to po 40 primeraka oba pola po populaciji. Rezultati merenja mase tela su prikazani u Tabeli 8. Prosečna masa mužjaka poreklom iz Aleksandrovca iznosila je $0.01576g \pm 0.002$ (u rasponu od 0.011-0.022). Za mužjake poreklom iz Nuda prosečna masa tela iznosila je 0.016234 ± 0.002 i kretala se u rasponu od 0.01g do 0.02g. Rezultati analize varijanse su pokazali da nema značajne razlike u masi tela kada se porede ženke poreklom iz dve analizirane populacije ($F=0.999$, $P=0.32$). Poređenje mase tela ženki iz obe populacije takođe nije bilo statistički značajno ($F=1.327$, $P=0.253$). Prosečna masa tela iznosila je $0.02511g \pm 0.0038$ (u rasponu od 0.018-0.032) za analizirane ženke poreklom iz Aleksandrovca i $0.02611g \pm 0.0037$ (u rasponu od 0.019-0.036) za ženke poreklom iz Nuda.

4.2.3 Dužina života

Dužina života primeraka *D. europaea* analizirana je u periodu od sredine jula do početka oktobra kada je poslednji primerak uginuo. Analizirano 50 primeraka po polu i populaciji. Dužina života mužjaka i ženki je zasebno analizirana. Prosečna dužina života mužjaka poreklom iz Aleksandrovca iznosila je 51.98 dana (u rasponu od 35-68 dana), dok je prosečna dužina života mužjaka poreklom iz Nuda iznosila 54.32 dana (u rasponu od 34-66 dana) (Tabela 8). Ženke su u proseku živele duže; prosečna dužina života ženki poreklom iz Aleksandrovca iznosila je 84.58 dana (u rasponu od 67-96 dana) a ženki poreklom iz Nuda 85.02 (u rasponu od 66-97 dana). Analiza varijanse je pokazala da kada se porede dve populacije, nema značajne razlike u masi tela mužjaka ($F=1.547$, $P=0.217$) ni masi tela ženki ($F=0.0683$, $P=0.79$). Takođe, prema rezultatima analize varijanse, dužina života mužjaka i ženki nije pokazala statistički značajno variranje kada se porede dve populacije različitog statusa po pitanju *Wolbachia* inficiranosti (Tabela 9).

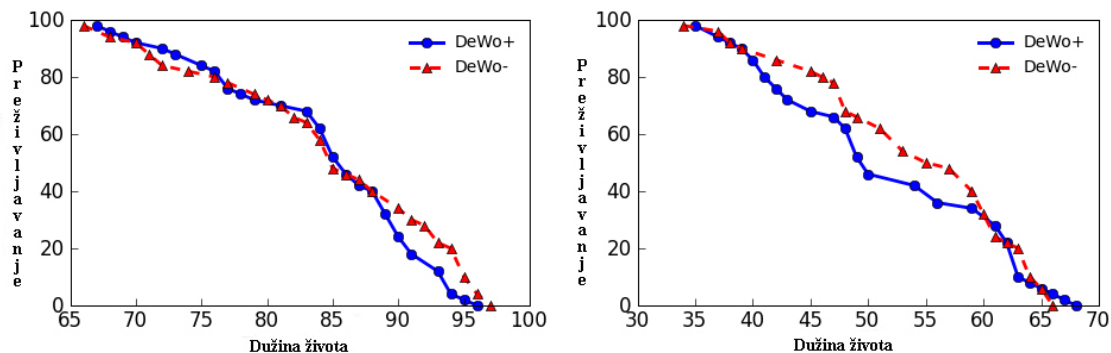
Tabela 9. Analiza varijanse osobina životne istorije *Wolbachia* inficirane (DeWo+) i neinficirane populacije (DeWo-) *Dictyophara europaea*.

Parametar	ANOVA	
	F _(df)	P
Fekunditet	2.433 ₍₇₄₎	0.123
Masa tela ♀	1.327 ₍₇₄₎	0.253
Masa tela ♂	0.999 ₍₇₄₎	0.321
Dužina života ♀	0.0683 ₍₉₈₎	0.794
Dužina života ♂	1.547 ₍₉₈₎	0.217

F – odnos; df – stepeni slobode (u zagradi); P – statistička značajnost

Za rezultate dužine života je urađena i Kaplan-Mejerova analiza preživljavanja (Slika 13). Prema rezultatima long-rank testa značajnosti, nema razlika u krivama preživljavanja mužjaka ($P=0.594$), ni ženki poreklom iz dve analizirane populacije

($P=0.168$) (Tabela 9). Takođe, hi-kvadrat test je potvrdio da nema statističke značajnosti u krivama preživljavanja ženki ($X^2 = 1.9$) i mužjaka ($X^2 = 0.28$).



Slika 13. Kaplan-Majerova kriva preživljavanja ženki (gornji grafik) i mužjaka (donji grafik) poreklom iz *Wolbachia* inficiranih (DeWo+) i neinficiranih populacija (DeWo-) *Dictyophara europaea*.

Tabela 10. Statistička značajnost poređenja krivi preživljavanja ženki i mužjaka poreklom iz *Wolbachia* inficiranih (DeWo+) i neinficiranih populacija (DeWo-) *Dictyophara europaea*.

Poređenje	Pol	Statistička značajnost		
		Hi-kvadrat test	Long-rank test	
		X^2	P	P
DeWo+ i DeWo-	♀	1.9	0.168	0.168
	♂	0.28	0.594	0.594

* Statistički testovi urađeni u *on-line* programskom paketu OASIS (<https://sbi.postech.ac.kr/oasis/surv/>)

4.3 Vektorska sposobnost populacija *D. europaea*

Sposobnost vrste *D. europaea* u prenošenju FD fitoplazme praćena je u testovima sa prirodno inficiranim populacijama *D. europaea* iz Crne Gore (Nudo). Rezultati testa su pokazali su da je ova vrsta cikade efikasan vektor fitoplazme. Četiri nedelje nakon izlaganja vinove loze cikadama, sve biljke su bile ekstrahovane i analizirane PCR metodom sa prajmerima specifičnim za FD9 region. Sve analizirane eksperimentalne biljke vinove loze su bile pozitivne na prisustvo FD fitoplazme. Takođe, nijedna vinova loza korišćena kao kontrola nije pokazala prisustvo fitoplazme. Biljke vinove loze su

pokazale crvenilo i uvijenost listova, simptome tipične za inficiranost fitoplazmom. Rezultati detekcije su pokazali da je od 104 analizirana primerka cikade poreklom iz Nuda, 74 bilo inficirano fitoplazmom (61.67%).

4.4 Prisustvo FD fitoplazme u *Clematis vitalba*

Pavitina (*C. vitalba*) predstavlja biljni rezervoar FD fitoplazme i kao takva ima značajnu ulogu u epidemiološkom ciklusu bolesti. Tokom 2011. i 2012. godine, slučajnim odabirom, uzorkovane su asimptomatske biljke na lokalitetima Aleksandrovac i Nudo. Nakon ekstrakcije, prisustvo fitoplazme u biljnim uzorcima je dokazano PCR amplifikacijom FD9 regiona. Na lokalitetu Aleksandrovac, od ukupno 60 analiziranih biljaka prisustvo FD fitoplazme utvrđeno u 19 uzoraka (31.67%) (Tabela 11). Od ukupno 60 sakupljenih uzoraka tokom dve godine uzorkovanja na lokalitetu Nudo, FD fitoplazma je detektovana u 20 primeraka (33.33%) (Tabela 12).

Tabela 11. Inficiranost FD fitoplazmom primeraka *D. europaea* i *C. vitalba* na lokalitetu Aleksandrovac u Srbiji.

Lokalitet	Aleksandrovac			
	<i>Dictyophara europaea</i>		<i>Clematis vitalba</i>	
	Broj pozitivnih / analizirano	Procenat pozitivnih primeraka	Broj pozitivnih / analizirano	Procenat pozitivnih primeraka
Godina				
2005-2007*	5/136	3.7%	8/14	57.1%
Sep-2009	2/72	2.8%	na	/
Sep-2011	3/100	3.0%	9/30	30.0%
Sep-2012	1/32	3.1%	10/30	33.3%

* Podaci prema Filipin *et al.* (2009a); na, nije analizirano.

4.5 Prisustvo FD fitoplazme u populacijama *D. europaea*

Inficiranost FD fitoplazmom prirodnih populacija *D. europaea* praćena je u periodu od 2005-2012. na lokalitetu Aleksandrovac i u periodu od 2008-2013. na lokalitetu Nudo. Oba lokaliteta su izabrana zbog višestruke razlike u s opi infekcije FD fitoplazmom, zbog čega su insekti sakupljeni za gajenje i eksperimente prenošenja fitoplazme. Detekcija fitoplazme je urađena PCR amplifikacijom FD9 regiona. Prirodna inficiranost

FD fitoplazmom primeraka *D.europaea* na lokalitetu Aleksandrovac je bila predmet studije Filipini i saradnika u kojoj je za period od 2005-2007 godine utvrđena stopa infekcije od 3.7% (5/136) (Filippini *et al.*, 2009a). Kasnija istraživanja ovog lokaliteta u okviru doktorske disertacije su pokazala da je od 72 analizirana primerka, FD fitoplazma 2009. godine detektovana u 2 primerka (2.8%). Tokom 2011. i 2012. godine, u 4 primerka je detektovana FD fitoplazma od ukupno 132 analizirana primerka (3,03%). Nasuprot tome, na lokalitetu Nudo je zabeležena konstatno visoka stopa inficiranosti primeraka *D. europaea* FD fitoplazmom. Stopa inficiranosti na ovom lokalitetu, u periodu od 2008-2013. godine, kretala se od 62.1% do 66.6% (Tabela 12).

Tabela 12. Inficiranost FD fitoplazmom primeraka *D. europaea* i *C. vitalba* na lokalitetu Nudo u Crnoj Gori.

Mesec- Godina	Lokalitet		Nudo	
	<i>Dictyophara europaea</i>		<i>Clematis vitalba</i>	
	Broj pozitivnih / analizirano	Procenat pozitivnih primeraka	Broj pozitivnih / analizirano	Procenat pozitivnih primeraka
Sep-2008	28/44	63.6%	na	/
Aug-2009	23/37	62.2%	na	/
Aug-2010	26/40	65.0%	na	/
Avg-2011	14/21	66.6%	na	/
Sep-2011	65/100	65.0%	9/30	30.0%
Sep-2012	28/42	66.6%	11/30	36.7%
Sep-2013	18/29	62.1%	na	/

na, nije analizirano.

4.6 Molekularna karakterizacija FD fitoplazme

Molekularna karakterizacija FD fitoplazme sprovedena je analizom genskog regiona 16S rRNK, i *rpl22-rps3*, *secY*, *secY-map* gena. Analizama su obuhvaćeni izolati FD fitoplazme iz asimptomatske pavitine i primeraka *D. europaea*. Na osnovu ovih analiza

ispitane su razlike u molekularnim karakteristikama FD fitoplazme u različitim populacijama vektora *D. europaea*.

4.6.1 Analiza 16S rRNK gena

Metodom sekvenciranja analiziran je genski region 16S rRNK uzoraka FD fitoplazme poreklom iz pavitine i primeraka *D. europaea*. Sekvencirano je 1682 bp 16S rRNK gena i 16S-23S međugenskog regiona stolbur fitoplazme. Dobijene nukleotidne sekvence obuhvataju 1528 bp 16S rRNK gena i 154 bp 16S-23S međugenskog regiona. Poređenje redosleda nukleotida izolata u CLUSTAL W programu pokazalo je prisutnost dva različita genotipa, obeleženih brojevima 1 i 2. Oba genotipa su pojedinačno analizirana u BLAST servisu NCBI baze. Rezultati BLAST analize genotipa 1, prisutnog u Srbiji (pristupni broj u NCBI bazi podataka - KJ911207) i Crnoj Gori (KJ911208), sa dostupnim sekvencama u bazi podataka pokazali su maksimalni identitet od 100% sa sekvencom FD fitoplazme FD-C (AY197645) i FD70 iz Francuske (AF176319). Sekvenca genotipa 1 je takođe pokazala 100% identiteta sa sekvencama izolata Alder yellows fitoplazme (AY) iz južne Italije (Y16387), izolatima AY fitoplazme SW54 (KP238297) i SW17 (KP238295) iz Nemačke i izolatom PI2 iz Srbije (KP238289). Drugi genotip, genotip 2 (KJ911209) je detektovan samo u Crnoj Gori. Ovaj genotip je na 1133 bp pokazivao jednu nukleotidnu razliku u odnosu na genotip 1 i njemu identične sekvence. Na osnovu *in silico* restrikcione analize fragmenta 16S rRNK gena, na virtuelnom agaroznom gelu nije utvrđena restrikciona endonukleaza koja bi razlikovala dva detektovana genotipa.

4.6.2 Analiza rpl22-rps3 genskog regiona

Metoda sekvenciranja je takođe korišćena za analizu regiona operona gena ribozomalnih proteina (*rp*). Poređenje izolata u CLUSTAL W programu je pokazalo postojanje dva različita genotipa, genotipa 1 prisutnog u Srbiji (KJ911210) i Crnoj Gori (KJ911211) i genotipa 2, dominantno prisutnog samo u Crnoj Gori (KJ911212). BLAST analiza sa dostupnim sekvencama u bazi podataka pokazala je maksimalni identitet od 100%, genotipa 1 i izolata FD fitoplazme iz vinove loze FD57 (Kuzmanović *et al.*, 2008). Genotip 2 (KJ911212) se u odnosu na genotip 1, razlikovao na 55bp *rps3* gena što za posledicu ima zamenu glutaminske kiseline lizinom u aminokiselinskoj sekvenci. Na osnovu *in silico* restrikcione analize fragmenta *rpl22-rps3* gena, na virtuelnom

agaroznom gelu utvrđeno je *HinfI* restrikciono mesto na osnovu kojeg je moguće razlikovanje dva detektovana genotipa (Slika 14B).

4.6.3 Analiza *secY-map* genskog regiona

Gen koji kodira metionin aminopeptidazu, *secY-map*, analiziran je metodom sekvenciranja. CLUSTAL W analizom utvrđeno je postojanje 3 genotipa. Genotip 1 koji je prisutan u Srbiji (KJ911218) i Crnoj Gori (KJ911219), BLAST analizom je pokazao 100% identitet sa sekvencom izolata Vv-SI257 (FN811141) iz Italije i izolata Loza37 (LT221946) poreklom iz Srbije. Genotip 2 (KJ911220) ovog genskog regiona je registrovan samo u Srbiji i u odnosu na genotip 1 ima jednu nukleotidnu promenu na 159bp ovog gena. Genotip 3 (KJ911221), registrovan je samo u Crnoj Gori i takođe pokazuje jednu nukleotidnu promenu u odnosu na genotip 1 i njemu identične isolate.

4.6.4 Analiza *secY* gena

FD9 region, koji obuhvata gen za ribozomalni protein *l15* (*rpl15* gen) i gen koji kodira protein translokazu (*SecY* gen), analiziran je metodom sekvenciranja. Ovaj genski region se pokazao kao najvarijabilniji i poređenjem sekvenci izolata u CLUSTAL W programu detektovano je četiri različita genotipa. Genotip 1, prisutan u Srbiji (KJ911213) i Crnoj Gori (KJ911214), je BLAST analizom pokazao 100% identiteta sa izolatima iz Srbije: De-NI10 (FJ648470), CL-NI23 (FJ648489), FD57 (EF581170) i izolatom Vv-NI10 (FJ648468) poreklom iz Italije. Genotip 2 (KJ911215) je detektovan samo u Crnoj Gori i pokazao je 100% identiteta sa izolatom fitoplazme CL-TV33 izolovane iz *C. vitalba* iz Italije (FJ648473), izolatom 308 (KJ792779) poreklom iz vinove loze koji je detektovan u Hrvatskoj, izolatom fitoplazme CL-SLO169 (FJ648487) detektovanog u *C. vitalba* iz Slovenije i izolatu Oi-369 (KT371525) detektovanom u cikadi *Oriethus ishidae* iz Švajcarske. U Crnoj Gori je detektovan i genotip 3 (KJ911216), koji je BLAST analizom pokazao maksimalni identitet sa izolatom 4 (KP274909) poreklom iz *C. vitalba* u Hrvatskoj i izolatu 63 (KR350641), detektovanom u cikadi *Oriethus ishidae* iz Švajcarske. Genotip 4 je takođe detektovan samo u Crnoj Gori (KJ911217) i analiza je pokazala 100% identiteta sa izolatima CL-TV42 (FJ648474) i CL-TV33 (FJ648473) koji su poreklom iz Italije a izolovani iz *C. vitalba*.

Prisustvo svih multilokusnih genotipova FD fitoplazme je identifikovano i u vektoru *D. europaea* i u biljnom rezervoaru *C. vitalba*, potvrđujući njihovu epidemiološku povezanost. Odnosi genotipova su prikazani mrežom dobijenom statističkom parsimonijom (Slika 14C), gde se uočava njihova srodnost i odsustvo segregacije na osnovu biljke domaćina ili geografskog regiona porekla. Epidemiološka slika FD fitoplazme je na području Crne Gore i Srbije dodatno komplikovana kada se uporede i genotipovi FD-srodnih fitoplazmi poreklom iz drugih prirodnih biljnih rezervoara, *Alnus glutinosa* i *A. incana* (Alder yellows fitoplazma, AldY), identifikovanih na području Crne Gore i Srbije (KC188998-KC189001). Stopa inficiranosti *Alnus* spp. je visoka, a prisustvo asimptomatsko, što ih čini pogodnim rezervoarom bolesti. Poredeći *map* genotipove AldY fitoplazme uočava se filogenetska srodnost sa genotipovima vezanim za *C. vitalba* i *D. europaea* od kojih se razlikuje 1.4-2.1% genetske distance.

4.7 Detekcija i molekularna karakterizacija *Wolbachia*

Od ukupno 249 analiziranih primeraka, *Wolbachia* je detektovana u 93 primeraka (37.3%). Nijedan primerak iz Crne Gore i grupe Makedonija/Grčka nije bio pozitivan na prisustvo ovog endosimbionta. Nasuprot tome, šest od jedanaest populacija iz Srbije je *Wolbachia* inficirano, što predstavlja 53% svih testiranih primeraka iz Srbije (55 od 103 analiziranih). Takođe, rezultati detekcije su pokazali da su svi primerci iz italijanskih populacija *Wolbachia* inficirani (38 od 38 analiziranih). Za sve primerke za koje je PCR metodom detekcije sa prajmerima specifičnim za *ftsZ* gen utvrđeno prisustvo *Wolbachia*, urađena je multilokusna (MLST) karakterizacija. MLST analiza je pokazala da su svi primerci inficirani identičnim sojem *Wolbachia*. Poređenjem sekvenci svih analiziranih gena sa bazom podataka MLST (<http://pubmlst.org/wolbachia>) dobijeni su alelski profili prikazani u Tabeli 13.

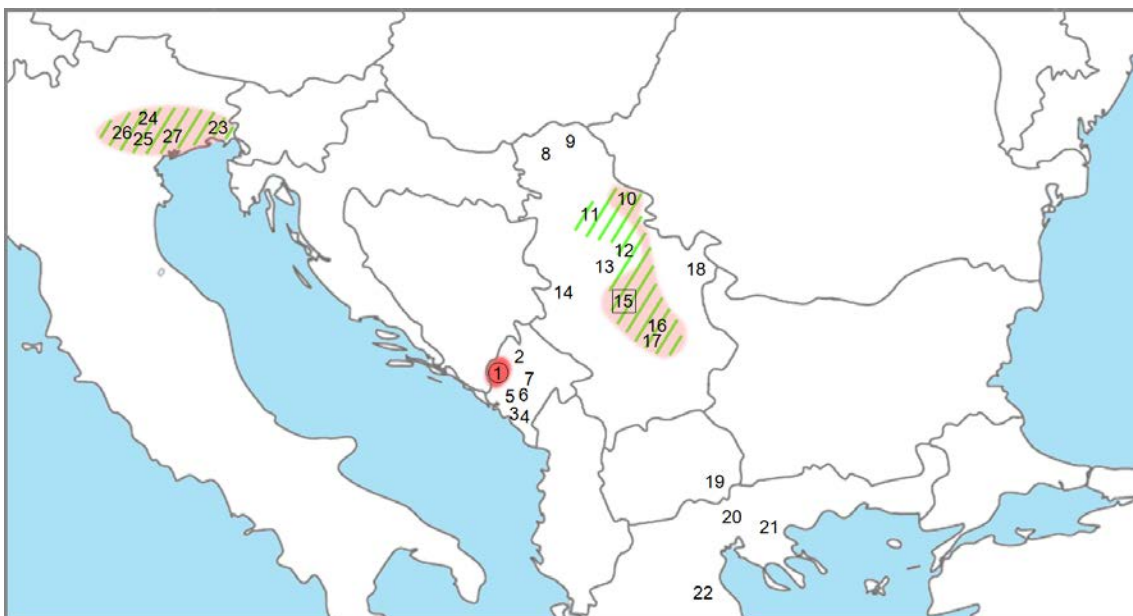
Tabela 13. Alelski profili *Wolbachia* detektovani u ovoj studiji, označeni prema PubMLST *Wolbachia* MLST bazi podataka*

ST	Naziv soja	Geni									
		MLST					<i>wsp</i>				
		<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4
422	Deur_B_wEur	4	14	40	177	4	61	18	16	23	16

* (<http://pubmlst.org/wolbachia>)

Uporednom analizom sekvenci *ftsZ* gena iz ove studije i sekvencama *Wolbachia* iz drugih organizama deponovanih u MLST bazi podataka, utvrđeno je da *Wolbachia* izolovana iz primeraka *D. europaea* pripada supergrupi B.

Na osnovu ovih profila deponovane su informacije o soju *Wolbachia* izolovanom u primercima *D. europaea*, pod imenom Deur_B_wEur. Izolovanom soju je dodeljen identifikacioni broj 1595 i tip soja ST-422. Soj izolovan iz *D. europaea* pokazuje najveću sličnost sa sojevima izolovanim iz tri vrste leptira koji pripadaju različitim familijama, *Colias erate poliographus*, *Carcharodus alceae* i *Fabriciana adippe*. *Wolbachia* izolovana iz *D. europaea* sa pomenutim organizmima deli identitet na četiri od šest gena, uključujući i najvarijabilniji među njima *wsp*.



Slika 15. Mapa *Wolbachia* i FD fitoplazma inficiranih populacija *D. europaea*. Šrafurom zelene boje su obeležene *Wolbachia* inficirane populacije. Crvenom bojom su obeležene populacije inficirane FD fitoplazmom. Intenzitet crvene boje je u korelaciji sa intenzitetom infekcije.

Analiza prisustva FD fitoplazme i *Wolbachia* infekcije u 27 populacija *D. europaea* omogućila je geografsko mapiranje i vizualizaciju inficiranih populacija na teritoriji šireg područja Balkana i severne Italije (Slika 15). Na teritoriji Srbije analizirano je 11 populacija, od kojih je u četiri detektovana i *Wolbachia* i FD fitoplazma infekcija (Sušara, Aleksandrovac, Jasenovik i Niš), u dve populacije je registrovana samo *Wolbachia* infekcija (Dobanovci, Mladenovac), dok ostale populacije nisu bile

inficirane. Na teritoriji Crne Gore je registrovana populacija sa izrazito visokom stopom inficiranosti FD fitoplazmom, dok ni u jednoj populaciji iz Crne Gore nije detektovana *Wolbachia*. Sve analizirane populacije iz Italije su bile *Wolbachia* i FD fitoplazma inficirane. U populacijama *D. europaea* iz Makedonije i Grčke nije registrovano prisustvo ni endosimbionta ni patogena.

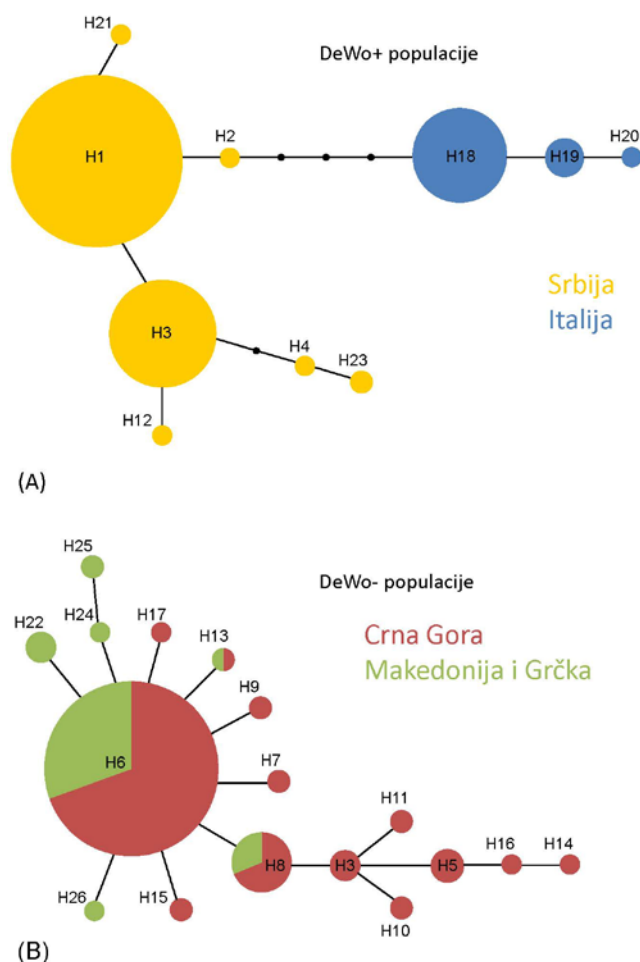
4.8 Populaciono genetičke analize *D. europaea*

4.8.1 Genealogija gena

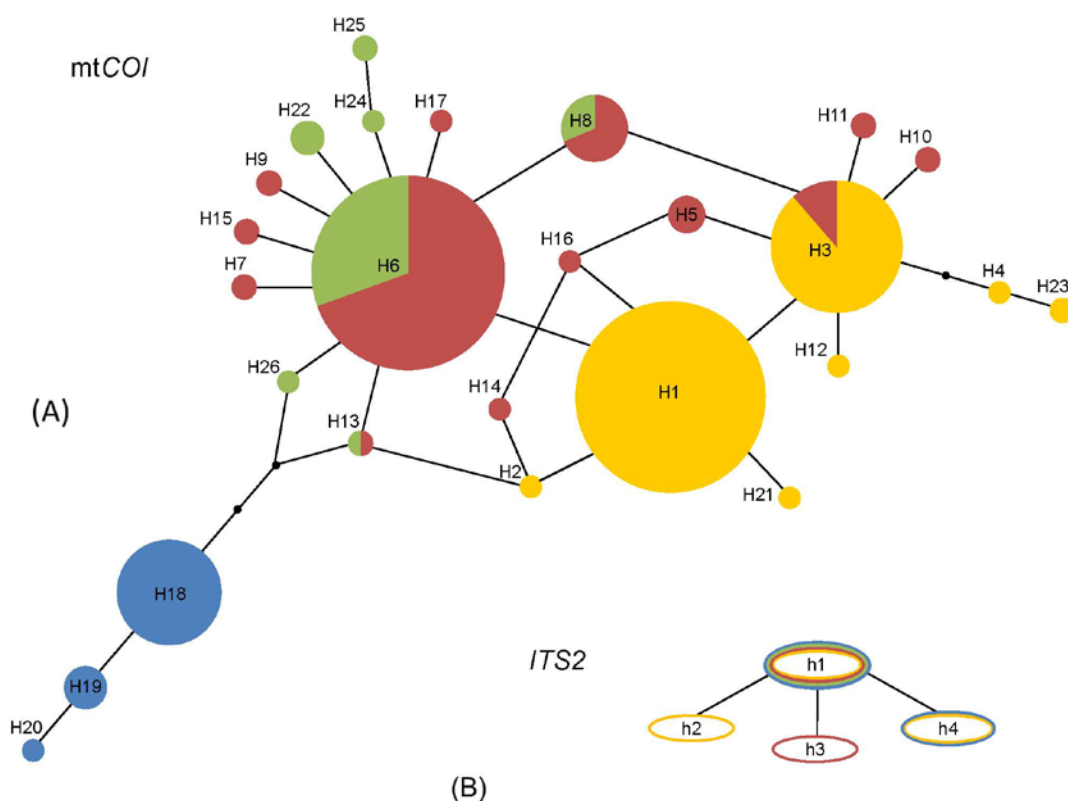
Za vizualizaciju odnosa među haplotipovima urađene su haplotipske mreže korišćenjem metode statističke parsimonije i median-joining metode (Slika 16 i 17). Po statističkoj parsimoniji, centralno postavljeni ili tzv. ancestralni haplotip je H6, koji je najčešći haplotip u Crnoj Gori a takođe prisutan u grupi Makedonija/Grčka, sa frekvencijom od 26,1%. Od ancestralnog haplotipa zvezdasto (engl. *star-like*) se odvajaju pojedinačni haplotipovi, dok ostali pokazuju složenije veze, od kojih i 5 dvosmislenih konekcija ili retikulacija. U četiri retikulacijske konekcije su uključeni haplotipovi H1 i H3 iz Srbije sa haplotipovima iz Crne Gore. Navedeno je posebno interesantno imajući u vidu činjenicu da su haplotipovi H1 i H3 u Srbiji jedini koji su u asocijaciji sa *Wolbachia*. Sa druge strane, kada se odvojeno analiziraju *Wolbachia* inficirane (DeWo+) i neinficirane populacije (DeWo-), retikulacijske konekcije izostaju na haplotipskoj mreži (Slika 16). Od geografski izdvojenih populacija jedino se haplotipovi iz Italije jasno izdvajaju (H18, H19 i H20). Obzirom na to da je veličina krugova kojima su obeleženi haplotipovi direktno proporcionalna učestalosti haplotipova, jasno se vidi dominantnost *Wolbachia* inficiranih haplotipova u Srbiji (H1, H3).

Haplotipska mreža dobijena Median-joining metodom je potvrdila odnose između haplotipova dobijene metodom statističke parsimonije. Takođe mreža je pokazala iste pozicije na kojima se nalaze nedostajući haplotipovi. Median-joining metoda koja informacije o haplotipovima pretvara u binarne podatke odnosno predstavlja haplotipove kao 0 ili 1 vektore, nema mogućnost prepoznavanja retikulacija *per se* (Posada & Crandall, 2001). Međutim, za iste pozicije retikulacijskih konekcija koje je identifikovala metoda statističke parsimonije, Median-joining metoda je pokazala kao dvosmislene konekcije za koje program nije mogao da utvrdi redosled događanja.

U finalnom poravnanju sekvenci dužina ITS2 gena je iznosila 528 bp. Karakteristično za jedarni genski marker, ITS2 region je pokazao malu varijabilnost i ukupno je detektovano četiri haplotipa (h1-h4) sa međusobnim razlikama na tri nukleotidne pozicije. Haplotipska mreža *ITS2* genskog markera dobijena statističkom parsimonijom i Median-joining metodom je bila identična i pokazala je da je kao centralni haplotip je postavljen h1, haplotip sa najvećom frekvencijom i prisutan u svim regionima (Slika 17B). Od njega su izvedeni haplotip h2 koji je prisutan samo u Srbiji, haplotip h3 koji je prisutan samo u Crnoj Gori i haplotip h4 koji je prisutan u Srbiji i Italiji. Ovo ukazuje da je rezolucija jedarnog *ITS2* markera niža u poređenju sa mitohondrijskim *COI* koji je pokazao jasnu geografsku separaciju Italijanskih i Balkanskih haplotipova.



Slika 16. Haplotipske mreže haplotipova poreklom iz A) *Wolbachia* inficiranih populacija (DeWo+) i B) *Wolbachia* inficiranih populacija (DeWo-).



Slika 17. Haplotipska mreža detektovanih haplotipova *D. europaea* na osnovu A) mitohondijskog *COI* genskog markera i B) jedarnog *ITS2* genskog markera.

4.8.2 Filogenetske analize

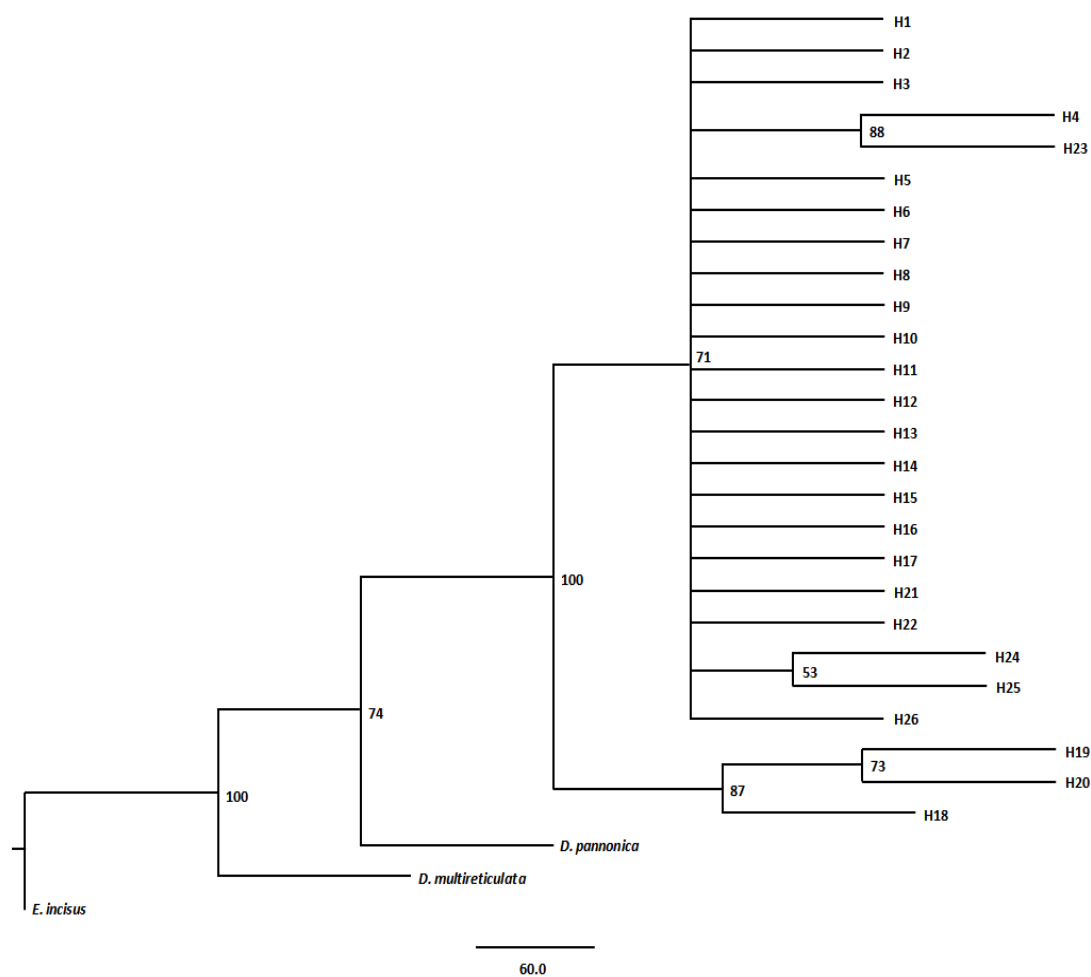
U finalnom poravnanju sekvenci, dužina analiziranog *mtCOI* fragmenta iznosila je 520 bp. Ukupno je detektovano 26 haplotipova, sa prosečnom distancom od 0.7% (0.2-2.1%). Detektovano je 20 polimorfnih nukleotidnih pozicija (3.85%), od čega 13 informativnih za parsimoniju. Od ukupno 173 kodona za aminokiseline, na dva kodona (81 i 82) je zbog nesinonimnih promena došlo do zamene aminokiseline i to na:

- i) poziciji 81 – gde je kod haplotipova H18, H19, H20 i H26 registrovan kodon za metionin dok je kod ostalih haplotipova kodon za serin;
- ii) poziciji 82 – gde je kod haplotipova H3, H4, H5, H8, H10, H11, H12 registrovan kodon za alanin, kod haplotipa H23 je kodon za valin a kod ostalih haplotipova je kodon za treonin.

Rekonstrukcija filogenetskog stabla sekvenciranih primeraka izvršena je korišćenjem HKY modela nukleotidne supstitucije uz pretpostavljenu proporciju invarijabilnih mesta (+I). Ovaj model uključuje nekoliko parametara koji omogućuju realističniju simulaciju evolucije nukleotidnih sekvenci. Takođe, ovaj model omogućava različite frekvencije pojedinačnih baza i njihovu zasebnu stopu zamena, kao i različitu stopu transverzija i tranzicija (Hasegawa *et al.*, 1985).

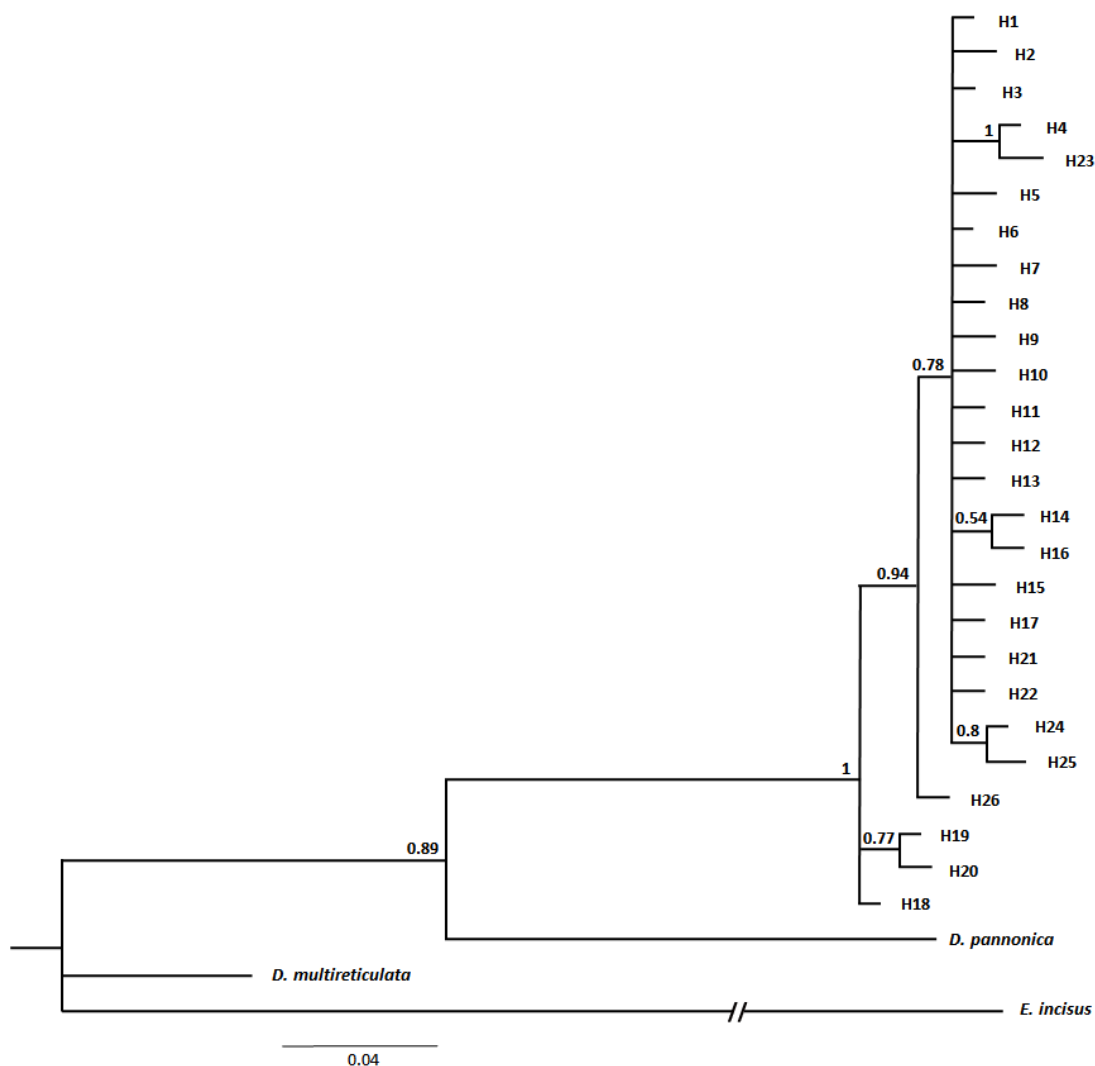
Dve metode su korišćene za rekonstrukciju filogenije: *Neighbor-joining* metoda i Bajesova statistika. Procenat grupisanja sekvenci *Neighbor-joining* metodom u okviru programa PAUP, dobijen je preko "*bootstrap*" testa u 500 replikacija i prikazan je na nivou čvorišta grana. Radi boljeg grupisanja sekvenci i bolje rezolucije stabla, za potrebe rekostrukcije filogenetskih stabala korišćene su dve filogenetski srodne vrste cikadi *D. europaea*: *Dictyophara pannonica* i *D. multireticulata*, kao i filogenetski udaljenija vrsta *Euscelis incisus*, cikada koja pripada podredu Cicadomorpha u okviru infrareda Auchenorrhyncha. Navedene vrste iz roda *Dictyophara* su sa velikom "*bootstrap*" podrškom izdvojene u odnosu na vrstu *D. europaea*. To je i očekivano, obzirom na to da sve tri vrste *Dictyophara* pripadaju različitim podrodovima (Emeljanov, 2003). Zanimljivo je da je vrsta *D. multireticulata* morfološki vrlo slična vrsti *D. europaea* ali filogenetski manje srodna u odnosu na *D. pannonica* koja je morfološki značajno različita od vrste *D. europaea*.

Topologija filogenetskog stabla sekvenciranih haplotipova na mitohondrijskom genskom markeru, potvrdila je odnose između haplotipova dobijene haplotipskim mrežama. Takođe se jasno izdvajaju haplotipovi iz Italije u zasebnu granu sa podrškom od 100% (Slika 18). Ovo odvajanje potiče od geografske izdvojenosti populacija iz severne Italije. U okviru grane kojoj pripadaju haplotipovi iz Italije se dalje odvajaju haplotipovi H19 i H20 od haplotipa H18, sa "*bootstrap*" podrškom od 87%. Ostali haplotipovi poreklom iz Srbije, Crne Gore, Makedonije i Grčke su sa podrškom od 71% grupisani u jedinstvenu granu. U okviru navedene grane dalje se se izdvajaju haplotipovi iz Grčke (H24 i H25) sa podrškom od 53% i haplotipovi iz severne Srbije (H4 i H23) sa podrškom od 88%.



Slika 18. Rekonstrukcija filogenetskog stabla u odnosu na registrovane haplotipove *D. europaea* primenom *Neighbor-Joining* metode u okviru programa PAUP.

Isti model nukleotidne supstitucije je korišćen za rekonstrukciju filogenetskog stabla dobijenu programom MrBayes. Rezultujuće stablo je dobijeno posle dve analize od million generacija. Umesto "*bootstrap*" analize, program MrBayes kao rezultat koristi distribuciju posteriorne verovatnoće odnosno verovatnoću dobijanja istog stabla u odnosu na broj analiziranih uzorka. Slično *Neighbor-joining* stablu, haplotipovi iz Italije su odvojeni u zasebnu granu sa maksimalnom posteriornom verovatnoćom (Slika 19). Topologija ovako dobijenog stabla se razlikuje od *Neighbor-joining* stabla jedino u izdvajanju u zasebnu granu haplotipa iz Grčke (H26) sa posteriornom verovatnoćom od 0.94, kao i izdvajanju haplotipova H14 i H16 poreklom iz Crne Gore, sa verovatnoćom od 0.54.



Slika 19. Rekonstrukcija filogenetskog stabla u odnosu na registrovane haplotipove *D. europaea* primenom Bajesove statistike u okviru programa MrBayes.

4.8.3 Molekularni diverzitet i analiza molekularne varijanse

Testovi neutralnosti rađeni su sa populacijama grupisanim po geografskoj pripadnosti kao i za sve populacije grupisane u okviru vrste *D. europaea*. Rezultati testova neutralnosti prikazani su u Tabeli 14. U Tadžiminom *D* testu su dobijene negativne vrednosti za sve grupe ali nijedna vrednost nije značajno različita od nule. Rezultati Fuovog *F_s* testa takođe pokazuju negativne vrednosti za sve analizirane grupe. Značajno različite vrednosti od nule dobijene su za sve populacije grupisane u okviru vrste *D.*

europaea ($F_s = -10.9246$, $P < 0.02$), kao i za grupisane populacije iz Crne Gore ($F_s = -6.6329$, $P < 0.02$) i populacije u okviru grupe Makedonija/Grčka ($F_s = -2.8101$, $P < 0.05$).

Tabela 14. Testovi neutralnosti *D. europaea* i regionalno grupisanih populacija.

Populacija (broj primeraka)	Testovi neutralnosti (značajnost)	
	D^1	F_s^2
<i>D. europaea</i> (249)	-0.7275 ($P > 0.1$)	-10.9246 ($P < 0.02^{**}$)
Crna Gora (75)	-0.8056 ($P > 0.1$)	-6.6329 ($P < 0.02^{**}$)
Srbija (103)	-1.0276 ($P > 0.1$)	-2.1527 ($P > 0.1$)
Italija (38)	-0.2096 ($P > 0.1$)	-0.1163 ($P > 0.1$)
Makedonija/Grčka (33)	-1.0166 ($P > 0.1$)	-2.8101 ($P < 0.05^*$)

¹Tadžimin D test; ²Fuov F_s test

Rezultati analize parametara molekularnog diverziteta su prikazani u Tabeli 15. Ako se posmatraju geografski podeljene populacije, najveći haplotipski diverzitet je registrovan u Crnoj Gori (0.675) i Makedoniji i Grčkoj (0.671). Za populacije iz Srbije je registrovan manji haplotipski diverzitet (0.551) dok je najmanji registrovan za populacije iz Italije (0.383). Isti trend razlika pokazuju i nukleotidni diverzitet (π) i srednja vrednost međusobnih razlika (k). Vrednosti parametra π se kreću u rasponu od 0.00245 i 0.00181 za Crnu Goru i Makedoniju/Grčku do 0.00142 za Srbiju, dok je najniža vrednost zabeležena za populacije iz Italije (0.00082). Najniže vrednosti parametra k su registrovane za populacije iz Italije (0.424) i Srbije (0.739), nešto više za Makedoniju/Grčku (0.939) dok je najviša vrednost zabeležena za Crnu Goru (1.273).

Tabela 15. Parametri molekularnog diverziteta *Dictyophara europaea* i regionalno grupisanih populacija.

Populacija (broj primeraka)	Parametri molekularnog diverziteta				
	n	S	Hd	π	k
<i>D. europaea</i> (249)	26	20	0.843	0.00455	2.371
Crna Gora (75)	13	9	0.675	0.00245	1.273
Srbija (103)	7	7	0.551	0.00142	0.739
Italija (38)	3	2	0.383	0.00082	0.424
Makedonija/Grčka (33)	7	6	0.671	0.00181	0.939

n, broj haplotipova; S, segregaciona mesta; Hd, haplotpski diverzitet; π , nukleotidni diverzitet; k, srednja vrednost međusobnih razlika

Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je pokazala da 70.5% ukupnog mtDNK variranja potiče od geografske podeljenosti, odnosno da je variranje na međupopulacionom nivou odgovorno za značajnu diferencijaciju između populacija ($F_{ST} = 0.752$, $P < 0.001$) (Tabela 16). Kada je kao uzrok variranja testirana *Wolbachia* inficiranost, dobijeno je da 18.8% variranja potiče od grupisanja populacija na *Wolbachia* inficirane i neinficirane populacije ($F_{CT} = 0.188$, $P < 0.05$), dok je najveći procenat variranja 53.3% uočen je na nivou razlika unutar ovako definisanih grupa. Dobijena vrednost za međupopulaciono variranje (F_{ST}) iznosila je 0.721 ($P < 0.001$). U trećem testu su populacije bile grupisane na osnovu stope infekcije FD fitoplazmom (visoko i nisko). Slično kao u prethodnoj podeli, međugrupno variranje je bilo nisko ali značajno ($F_{CT} = 0.172$, $P < 0.05$). Takođe, međupopulaciono variranje je imalo značajnog udela u ukupnom variranju ($F_{ST} = 0.726$, $P < 0.001$), dok je 53.3% ukupnog variranja poticalo od razlika unutar ovako definisanih grupa.

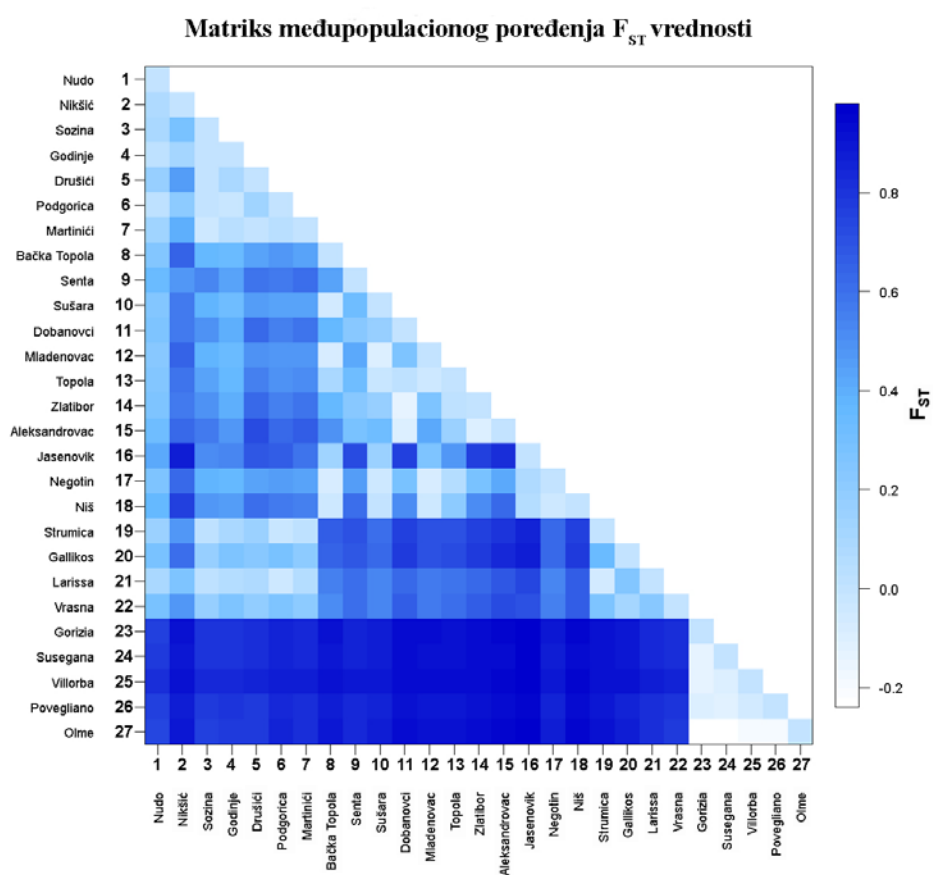
Tabela 16. Hijerarhijska analiza molekularne varijanse (AMOVA) populacija *D. europaea* zasnovana na mitohondrijskoj DNK.

Grupisanje	Izvor variranja	df	Procenat variranja (%)	Interpopulacioni indeksi fiksacije	
				F_{CT}	F_{ST}
Geografija	Između grupa	3	70.47	0.70472***	0.75161***
	Unutar grupa	23	4.69		
	Između populacija	222	24.84		
Infekcija – <i>Wolbachia</i>	Između grupa	1	18.79	0.18788*	0.72115***
	Unutar grupa	25	53.33		
	Između populacija	222	27.88		
Infekcija – FD fitoplazma	Između grupa	1	17.20	0.17203*	0.72551***
	Unutar grupa	24	55.35		
	Između populacija	216	27.45		

Značajnost indeksa fiksacije: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

Za pojedinačne populacije urađena je analiza međupopulacionog poređenja F_{ST} vrednosti. Ovaj tip analize utvrđuje stepen međusobnog diferenciranja svake od 27 populacija. Rezultati analize prikazani su tabelarno (Tabela 17) i grafički u vidu matriksa (Slika 20). Tamnije nijanse plave boje na matriksu ukazuju na veći stepen genetičkog diferenciranja i obrnuto. Ukupno je poređeno 27 uzorkovanih populacija i dobijena je značajnost u diferenciranju u 78.1% poređenja. Očekivano, kada su poređene populacije u okviru geografskih regiona nivo diferenciranosti je bio nizak i bez značajnosti. Takođe, na matriksu poređenja se jasno uočava diferenciranost populacija koje pripadaju različitim regionima. Tako populacije poreklom iz severne Italije, koje se i filogenetski odvajaju od ostalih, pokazuju najveći stepen diferenciranosti u poređenju sa ostalim populacijama, što je na matriksu prikazano intenzivnom plavom bojom. Obrnuta situacija je kada se porede populacije iz Italije međusobno, njihova diferenciranost je označena belom bojom (nema diferenciranosti) ili svetlijim nijansama plave boje (mali stepen diferenciranosti). Regionalno gledano,

najveći stepen diferenciranosti su pomenute populacije iz Italije pokazale u odnosu na populacije iz Srbije (91.3%) i populacije iz Crne Gore (82.5%). Crnogorske populacije su pokazale prosečnu diferenciranost od 48.8% u odnosu na populacije iz Srbije i 18.7% u odnosu na populacije iz grupe Makedonija/Grčka. Populacije iz Srbije su u odnosu na grupu Makedonija/Grčka pokazale srednju vrednost diferenciranosti od 67.1%. Iako regionalno grupisane populacije pokazuju sličan stepen homogenosti kada se međusobno porede, izdvajaju se populacije iz Srbije. Posebno je interesantno poređenje dve *Wolbachia* inficirane populacije iz Jasenovika i Aleksandrovca. Međupopulaciono variranje između njih iznosi 81.8%, obe su *Wolbachia* inficirane ali je *Wolbachia* dominantno u asocijaciji sa različitim haplotipovima: u populaciji Jasenovik sa H1 a u populaciji Aleksandrovac sa H3.



Slika 20. Matriks međupopulacionog poređenja F_{ST} vrednosti 27 populacija *D. europaea*

Tabela 17. Rezultati međupopulacionog poređenja F_{ST} vrednosti i nivo značajnosti između 27 populacija *Dictyophara europaea*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	/	ns	*	ns	*	ns	**	**	***	**	***	*	***	*	***	***	*	***	*	*	ns	**	***	***	***	***	***
2	0.069	/	*	ns	***	ns	***	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***	***	*	***	*	***	***	***	***	***	***
3	0.093	0.276	/	ns	ns	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	ns	ns	***	***	***	***	***
4	0.019	0.120	-0.002	/	ns	ns	ns	**	**	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	ns	ns	ns	***	***	***	***	***
5	0.168	0.464	0.006	0.094	/	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	ns	ns	*	***	***	***	***	***
6	0.025	0.215	0.00	-0.012	0.129	/	ns	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	**	ns	***	***	***	***	***	***
7	0.135	0.401	-0.043	0.031	-0.003	0.028	/	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	*	ns	*	***	***	***	***	***
8	0.247	0.650	0.356	0.336	0.440	0.467	0.435	/	**	ns	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	***	*	***	***	***	***	***	***	***
9	0.346	0.472	0.526	0.440	0.580	0.563	0.606	0.433	/	***	ns	***	***	ns	ns	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***	***	***
10	0.242	0.565	0.375	0.329	0.452	0.437	0.440	-0.054	0.331	/	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***
11	0.255	0.579	0.496	0.390	0.632	0.553	0.597	0.355	0.222	0.178	/	ns	ns	ns	ns	***	ns	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
12	0.232	0.653	0.381	0.335	0.495	0.478	0.468	-0.087	0.412	-0.103	0.256	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***
13	0.237	0.586	0.435	0.353	0.555	0.491	0.521	0.091	0.331	-0.016	0.012	-0.035	/	ns	ns	*	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***
14	0.255	0.579	0.496	0.390	0.632	0.553	0.597	0.355	0.222	0.178	-0.143	0.256	0.012	/	ns	***	ns	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
15	0.330	0.634	0.574	0.470	0.714	0.622	0.666	0.502	0.278	0.313	-0.092	0.415	0.149	-0.092	/	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
16	0.423	0.878	0.513	0.524	0.677	0.662	0.597	0.124	0.718	0.160	0.766	0.271	0.476	0.766	0.818	/	ns	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***
17	0.271	0.618	0.376	0.354	0.435	0.461	0.444	-0.070	0.446	-0.040	0.293	-0.086	0.063	0.293	0.425	0.078	/	ns	***	***	***	***	***	***	***	***	***
18	0.359	0.770	0.474	0.457	0.602	0.579	0.546	-0.046	0.610	0.002	0.512	-0.048	0.198	0.512	0.618	0.061	0.037	/	***	***	***	***	***	***	***	***	***
19	0.143	0.474	0.008	0.090	0.153	-0.015	0.020	0.674	0.700	0.613	0.765	0.704	0.696	0.765	0.808	0.865	0.635	0.764	/	*	ns	***	***	***	***	***	***
20	0.280	0.610	0.166	0.269	0.229	0.290	0.205	0.655	0.686	0.620	0.777	0.701	0.714	0.777	0.827	0.867	0.635	0.775	0.343	/	*	ns	***	***	***	***	***
21	0.095	0.258	0.019	0.046	0.074	-0.033	0.049	0.547	0.600	0.524	0.629	0.568	0.582	0.629	0.692	0.734	0.539	0.662	-0.054	0.250	/	***	***	***	***	***	***
22	0.276	0.476	0.175	0.256	0.179	0.260	0.200	0.520	0.610	0.539	0.656	0.563	0.611	0.656	0.727	0.705	0.546	0.662	0.259	0.113	0.221	/	***	***	***	***	***
23	0.770	0.910	0.792	0.803	0.816	0.864	0.842	0.909	0.865	0.882	0.934	0.925	0.916	0.934	0.948	0.980	0.888	0.947	0.920	0.900	0.844	0.811	/	ns	ns	ns	ns
24	0.773	0.900	0.793	0.804	0.811	0.859	0.840	0.890	0.864	0.878	0.925	0.915	0.910	0.925	0.940	0.968	0.883	0.939	0.910	0.889	0.839	0.811	-0.137	/	ns	ns	ns
25	0.814	0.917	0.832	0.840	0.854	0.881	0.866	0.919	0.899	0.900	0.935	0.927	0.923	0.935	0.945	0.962	0.903	0.942	0.919	0.908	0.867	0.855	-0.127	-0.104	/	ns	ns
26	0.762	0.877	0.778	0.789	0.782	0.842	0.823	0.875	0.846	0.861	0.906	0.892	0.892	0.906	0.925	0.950	0.865	0.923	0.887	0.860	0.818	0.789	-0.103	-0.123	-0.059	/	ns
27	0.748	0.896	0.770	0.781	0.782	0.849	0.825	0.892	0.838	0.867	0.925	0.913	0.906	0.925	0.943	0.979	0.874	0.942	0.912	0.882	0.824	0.779	-0.236	-0.240	-0.187	-0.197	/

Značajnost (iznad dijagonale): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns = nije značajno

Brojevi odgovaraju populacijama opisanim u Tabeli 1.

5. DISKUSIJA

5.1 Biologija *D. europaea*

Podaci o biološkim osobenostima određenog insekta, naročito insekta uključenog u epidemiološki ciklus ekonomski značajne fitoplazme, predstavljaju polaznu tačku u procesu razumevanja njegovih interakcija sa sredinom.

Cikada *Dictyophara europaea* pripada fam. Dictyopharidae. Ova familija je jedna od najvećih u okviru infrareda Fulgoromorpha i sastoji se od preko 750 vrsta opisanih u više od 150 redova (Song & Liang, 2011). Biologija cikada iz ove familije je slabo proučena i ograničena na nekoliko vrsta iz Palearktika (Melichar, 1912; Holzinger & Hausl-Hofstätter, 1994; Nickel & Remane, 2002; Holzinger *et al.*, 2003; Nickel, 2003; Lessio & Alma, 2008; D'Urso & Mifsud, 2012; Burrows, 2014), zatim vrsta iz Nearktika (Wilson & McPherson, 1981; Wilson & Wheeler, 1992, 2005; McPherson & Wilson, 1995; Liang & Wilson, 2002) i jedne vrste iz Neotropске oblasti (Hernández *et al.*, 2011; Remes Lenicov *et al.*, 2012). U slučaju *D. europaea*, jedino su Lesio i Alma proučavali polifagnost ove vrste i ustanovili asocijaciju adulta i larvi sa biljkama *Amaranthus retroflexus* i *Urtica dioica* (Lessio & Alma, 2008). Treba napomenuti da je ova studija bila ograničena na ekosisteme vinograda u severnoj Italiji gde je ranije utvrđena asocijacija *D. europaea* sa biljkom *Clematis vitalba* (Filippin *et al.*, 2009a). Upravo je pretpostavljena polifagnost *D. europaea* predstavljala prvu prepreku u istraživanjima ove cikade u kontrolisanim poljskim uslovima. Obzirom na to da se polifagni insekti ne hrane svakom biljnom vrstom sa kojom ostvare kontakt i da u kontrolisanim uslovima mogu da se hrane biljkama koje u prirodnim uslovima ne bi koristili za ishranu (Bernays & Chapman, 2007), bilo je potrebno višegodišnje istraživanje prirodnih staništa kao i vremenski zahtevno testiranje različitih kombinacija biljaka u poljskim kavezima, kako bi se došlo do stabilne metodologije za gajenje ove cikade u kontrolisanim uslovima. Stabilni metodološki okvir gajenja omogućava dobijanje velikog broja odraslih jedinki za eksperimente a zatim i validno zaključivanje o bioekološkim osobenostima *D. europaea*. Efikasno gajenje ove cikade u kontrolisanim uslovima postignuto je korišćenjem pet biljnih vrsta u okviru familija Lamiaceae, Plantaginaceae, Asteraceae i Poaceae.

Od drugih aspekata biologije cikada iz familije Dictyopharidae, ponašanje prilikom ovipozicije je do detalja istraženo samo za Neotropsku vrstu *Taosa longula* Remes Lenicov, 2010, koja je u asocijaciji sa vodenim zumbulom (*Eichhornia crassipes*, Pontederiaceae). U procesu ovipozicije, *T. longula* koristi prvu valvulu koja sadrži sklerotizovane i nazubljene strukture za probijanje biljnog tkiva, neposredno pre samog polaganja jaja. Sa mnogo manje detalja su Vilson i Mekferson izvestili o ovipoziciji vrste *Nersia florens* Stål, 1862, u laboratorijskim uslovima (Wilson & McPherson, 1981). U literaturi su informacije o ovipoziciji *D. europaea* takođe bile predstavljene bez mnogo detalja i uglavnom opšteg karaktera. Nickel navodi da *D. europaea* polaže jaja u zemlji (Nickel, 2003), dok se Emeljanov, i kasnije Vilson i saradnici bave generalizovanim tipom legalice kod cikada iz familije Dictyopharidae (Emeljanov, 1987; Wilson *et al.*, 1994). Navedena grupa autora navodi da legalica pripadnika fam. Dictyopharidae odgovara legalici fulgoridnog tipa i da služi za “grabuljanje i čišćenje zemlje da bi se zatim položila jaja”, dok Nickel opisuje legalicu Dictyopharidae kao “legalicu za grabuljanje i gnječenje” (Nickel, 2003).

Opsežna istraživanja populacija *D. europaea* u prirodnim ekosistemima kao i primena različitih metoda gajenja u poljskim i kontrolisanim uslovima, omogućili su upoznavanje morfoloških i bioekoloških osobenosti svih razvojnih stadijuma ove cikade. Rezultati istraživanja biologije *D. europaea* u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na složeno ponašanje prilikom ovipozicije. Ženke počinju da polažu jaja krajem avgusta i to na zemlji što postaje evidentno po mehničkim povredama krila, odnosno iskrzanosti krajeva krila. Jaja su sakrivena i izmešana sa česticama zemlje (*ovipozicijska gnezda*), omogućujući njihovu optimalnu zaštitu. Mortalitet jaja predstavlja važan faktor u populacionoj biologiji cikada (Denno & Roderick, 1990), pa stoga *ovipozicijska gnezda* predstavljaju vid zaštite jaja od sredinskih uticaja, a istovremeno predstavljaju i vid kamuflaže čime ih štite od predatora. Disekcijom je registrovano prosečno 41-46 jaja po ženki, a u svakom *ovipozicijskom gnezdu* se nalaze položena 2-4 jaja, što predstavlja 10-23 mogućih *ovipozicijskih gnezda* po svakoj ženki. Ovakva reproduktivna strategija predstavlja način smanjivanja rizika od gubitka potomstva i povećanja verovatnoće preživljavanja (Prestidge, 1982), čime se reproduktivna strategija *D. europaea* može svrstati u tzv. *bet-hedging* strategiju (Olofsson *et al.*, 2009) Sam termin *bet-hedging* označava smanjenje ili ograničavanje rizika, odnosno gubitka, i

često se koristi u ekonomiji. U biologiji, *bet-hedging* strategija predstavlja način na koji jedinke optimizuju svoju uspešnost u varijabilnoj i nepredvidivoj sredini što za rezultat ima dugoročno povećanje uspešnosti organizma (Olofsson *et al.*, 2009).

Slično ostalim vrstama koje pripadaju fam. Dictyopharidae, preadultno razviće *D. europaea* se odvija u pet larvenih stupnjeva. Larveni stupnjevi pokazuju razlike u obojenosti tela, i to tako da obojenost larvi prvog stupnja (L1) i petog stupnja (L5) pokazuje stabilni obrazac obojenosti tj. L1 su dvobojne a L5 zelene boje. Larve stupnjeva L2, L3 i L4 pokazuju izrazitu varijabilnost u obojenosti tela. Karakteri koji jasno odvajaju larvene stupnjeve su dužina verteksa i broj redova senzornih jamica na pronotumu (Tabela 6). Larve se zatim razlikuju i po pokretljivosti; larve L1 i L2 stupnja nisu pokretljive, a pokretljivost larvi raste u kasnijim larvenim stupnjevima što je posebno važno, obzirom na polifagnost ove vrste cikade. Adulti su vrlo pokretljivi, često menjaju biljke i imaju sposobnost da prelete značajne distance (Burrows, 2014). Pokretljivost adultnog stadijuma razvića omogućuje da *D. europaea* pokazuje prostornu i vremensku dinamiku tokom perioda intenzivnog letenja, kao i sezonsku agregaciju na kraju vegetacionog perioda, i to na biljkama koje su bolje adaptirane na uslove suše. Sa aplikativnog stanovišta, posebno je interesantna agregacija na pavitini, *C. vitalba*. Obzirom na to da je ova biljka prirodni rezervoar FD fitoplazme (Angelini *et al.*, 2004; Filippin *et al.*, 2009a), agregacija adulta *D. europaea* na navedenoj biljci predstavlja posebno interesantnu činjenicu sa epidemiološkog stanovišta. Takođe, period letenja i aktivnosti adultnog stadijuma su prilično dugi i mogu trajati i do četiri meseca (od kraja juna do početka/kraja oktobra). Takav period aktivnosti adulta kao i polifagnost omogućuju da vrsta *D. europaea* bude široko rasprostranjena kao i da naseljava različite tipove staništa.

Rasprostranjenost *D. europaea* u Evropi, njena polifagnost, dug period letenja i agregacija na prirodnom rezervoaru FD fitoplazme, predstavljaju ključne karakteristike zbog čega je ova cikada značajna. Prethodno navedeno je posebno važno zbog trenutne epidemiološke situacije u pogledu epidemijskog prisustva FD fitoplazme. Naime, osim u Srbiji, FD fitoplazma je prisutna u evropskim zemljama sa viševjekovnom tradicijom gajenja vinove loze i proizvodnje vina (Španija, Portugalija, Francuska, Italija, Austrija, Mađarska, Slovenija, Hrvatska, Švajcarska) i pokazuje znake daljeg širenja u Evropi (Jeger *et al.*, 2016). *Scaphoideus titanus*, kao primarni vektor FD fitoplazme je egzotična

i invazivna vrsta, koja je takođe široko rasprostranjena u Evropi. Druga invazivna vrsta cikade poreklom iz istočnog Palearktika, *Oriethus ishidae*, označena kao mogući faktor u širenju FD fitoplazme je trenutno u ekspanziji u Evropi (Lessio *et al.*, 2016; Casati *et al.*, 2017). U takvim okolnostima, poznavanje svih bioekoloških i populaciono-genetičkih aspekata vektora, a posebno vektora autohtonog porekla kakva je *D. europaea*, predstavlja značajnu informaciju za fundamentalna i aplikativa istraživanja.

5.2 Biološki sistem *D. europaea*-endosimbiont-patogen

Polazna osnova ove doktorske teze bilo je otkriće dve geografski izolovane populacije *D. europaea* sa značajnim razlikama u pogledu prisustva patogena (FD fitoplazma) i endosimbionta (*Wolbachia*). Između pomenutih populacija je utvrđena sledeća korelacija: populacija *D. europaea* iz Aleksandrovca (Srbija) je *Wolbachia* inficirana u visokom procentu dok je inficiranost FD fitoplazmom registrovana u niskom procentu. Sa druge strane, populacija ove cikade iz Crne Gore (lokacija Nudo) nije *Wolbachia*-inficirana, dok je inficiranost FD fitoplazmom registrovana u visokom procentu koji je bio skoro dvadeset puta veći nego u populaciji iz Aleksandrovca. Fokus sprovedenih istraživanja u okviru ove disertacije je bio utvrđivanje uticaja prisustva/odsustva bakterija (endosimbionta i patogena) na komponente adaptivne vrednosti populacija *D. europaea* i uticaj bakterija i njihovih interakcija na populacionu genetiku ove cikade. Za razliku od teorije holobionta koja predviđa da se insekt sa svojim mikroorganizmima posmatra kao superorganizam i kao jedinstvena jedinica na koju selekcija deluje (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Douglas & Werren, 2016), metod istraživanja u ovoj disertaciji je uključivao karakterizaciju svakog činioca u ovom tripartitnom sistemu kako bi se sagledale moguće antagonističke interakcije između mikroorganizama kao i priroda odnosa između insekta domaćina i mikroorganizama (Douglas & Werren, 2016).

Rezultati istraživanja pokazuju da su primerci *D. europaea* poreklom iz *Wolbachia*-inficiranih DeWo+ (Aleksandrovac) i *Wolbachia*-neinficiranih DeWo- (Nudo) populacija podjednako efikasni u prenošenju FD fitoplazme. Obzirom na to da su u testovima prirodnog prenošenja sve biljke vinove loze pokazale prisustvo fitoplazme, možemo da zaključimo da primećena višestruka razlika u stopi inficiranosti FD fitoplazmom ovih populacija ne utiče na njihovu vektorsku sposobnost.

Karakterizacija FD fitoplazme detektovane u primercima iz ovih populacija kao i biljnog materijala sa ova dva lokaliteta, ukazuje na postojanje novih kao i prethodno opisanih genotipova iz Srbije, Italije, Švajcarske i Hrvatske, gde je epidemija FD fitoplazme zabeležena u proteklih nekoliko decenija (Angelini *et al.*, 2001; Kuzmanović *et al.*, 2008; Plavec *et al.*, 2015; Trivellone *et al.*, 2016). Takođe, interesantna je identičnost detektovanih genotipova u okviru 16S rRNK i *secY* genskih markera, sa genotipovima izolovanim iz biljaka roda *Alnus* i cikade *Orientalis ishidae* (Holz *et al.*, 2016; Trivellone *et al.*, 2016). To ukazuje najpre na otvorenost i ukrštenost epidemioloških puteva FD fitoplazme a time i njihovu kompleksnost na teritoriji Evrope. Od detektovanih genotipova fitoplazme na oba istraživana lokaliteta, multilokusni genotip G1 je najčešći i široko rasprostranjen. Osim pomenutog genotipa samo u Srbiji je detektovan genotip G2, dok su u Crnoj Gori registrovani još i genotipovi G3, G4 i G5 (Slika 14). Obzirom na to da su razlike u genotipovima na nivou tačkastih mutacija kao i da je genotip G1 dominantno prisutan u obe populacije kako u insektima tako i u biljkama, kvantitativna razlika u inficiranosti FD fitoplazmom između dve populacije, nije uzrokovana kvalitativnim razlikama detektovane fitoplazme. Takođe, analiza sakupljenih primeraka sa svih 27 lokaliteta, a zatim detekcija i MLST karakterizacija *Wolbachia*, jasno ukazuju da je *Wolbachia* prisutna u populacijama *D. europaea* u Srbiji i Italiji (DeWo+ populacije), dok inficiranost nije zabeležena u populacijama iz Crne Gore, Makedonije i Grčke (DeWo- populacije). Takođe, geografski izolovane populacije iz Srbije i Italije su inficirane identičnim sojem *Wolbachia* (wEur). Svi registrovani haplotipovi iz Italije (H18, H19 i H20) su bili *Wolbachia* inficirani, dok je u Srbiji *Wolbachia* detektovana u dva najčešća haplotipa (H1 i H3), sa ukupnom zastupljenošću u populaciji od 94.2% (97 od 103 analizirana primerka).

Mreža detektovanih haplotipova na *COI* mitohondrijskom genskom markeru pokazuje jasnu izdvojenost i unikatnost haplotipova iz severne Italije, dok ostali haplotipovi pokazuju izvesnu geografsku struktuiranost ali i poseduju zajedničke haplotipove, što ukazuje na povezanost tih populacija i postojanje, bar u nekom vremenskom intervalu, protoka gena između njih. Haplotipska mreža, osim geografske struktuiranosti pokazuje i postojanje pet tzv. dvosmislenih konekcija ili retikulacija (Slika 17). Retikulacije izostaju na haplotipskim mrežama na kojima se zasebno

prikazuju *Wolbachia* inficirani i neinficirani haplotipovi (Slika 16). Takve konekcije su najčešće uzrokovane mikroevolucijom lokalnih populacija koja uključuje genetičku diferencijaciju, ili homoplazijom uzrokovanom rekurentnim odnosno povratnim mutacijama i rekombinacijama (Legendre & Makarenkov, 2002; Nielsen & Beaumont, 2009). Na haplotipskoj mreži je takođe uočljiv i veći diverzitet haplotipova u regionima bez *Wolbachia* a obzirom na to da veličina krugova na haplotipskoj mreži odgovara frekvenciji haplotipova, primetna je visoka frekvencija haplotipova koji su u asocijaciji sa *Wolbachia*, ukazujući na obrazac mitohondrijskog čišćenja koji je često prisutan kod insekata čije su populacije *Wolbachia*-inficirane (Jiggins, 2003; Raychoudhury *et al.*, 2010; Jackel *et al.*, 2013). Na osnovu informacija dobijenih filogenetskim analizama detektovanih haplotipova uz pomoć Bajesove statistike i *Neighbor-joining* metode, takođe je primetno izdvajanje haplotipova iz Italije, dok su ostali haplotipovi grupisani sa velikom podrškom u jednu granu (Slike 17 i 18).

Na nivou populacija su evidentne manje vrednosti parametara molekularnog diverziteta tj. haplotipskog i nukleotidnog diverziteta u DeWo+ populacijama (Tabela 15). Takav rezultat je karakterističan za efekat *Wolbachia* na prirodne populacije insekta domaćina (Hurst & Jiggins, 2005; Yu *et al.*, 2011). Takođe, obzirom na to da *Wolbachia* svojim prisustvom u populaciji insekta može da uzrokuje indirektno delovanje prirodne selekcije na mtDNK domaćina, odnosno da dovede do genetičkog drafta (engl. *genetic draft* ili *genetic hitchhiking*) (Gillespie, 2000; Rokas *et al.*, 2001), očekivano bi bilo da se u testovima neutralnosti vidi trag „delovanja“ *Wolbachia* u populaciji. Međutim, nijedna od regionalno grupisanih populacija nije imala značajnu vrednost Tadžiminog *D* testa (Tabela 14). Takođe, suprotno od očekivanog, Fuovim *F_s* testom su dobijene značajne i negativne vrednosti samo za populacije koje nisu bile *Wolbachia* inficirane. Ovakav rezultat se može objasniti dvojako: 1) u smislu delovanja selekcije u prisustvu *Wolbachia*, odnosno da nije prošlo dovoljno vremena od „ulaska“ *Wolbachia* u populaciju da bi se efekti na obrasce diverziteta registrovali testovima neutralnosti (Keller *et al.*, 2004); 2) demografskim parametrima, tj. značajne negativne vrednosti, pogotovo Fuovog *F_s* testa koji je posebno senzitivan na demografske parametre (Fu, 1997; Schneider & Excoffier, 1999), ukazuju da je populaciona ekspanzija oblikovala obrazac diverziteta na mitohondrijskoj DNK. Rezultati analize molekularne varijanse potvrđuju da je geografska izolovanost u visokom procentu

uticala na mtDNK variranje ali i da diferencijalno stanje po pitanju *Wolbachia* inficiranosti kao i stope inficiranosti FD fitoplazmom ne utiču u visokom procentu na mtDNK variranje (Tabela 16). Međupopulaciono poređenje F_{ST} vrednosti potvrđuje diferenciranost regionalno grupisanih populacija kao i to da je najveći stepen diferenciranosti između populacija iz Srbije, Crne Gore i Italije (Tabela 17; Slika 20).

Detektovana asocijacija *Wolbachia* sa dva dominantna haplotipa u Srbiji (H1 i H3) i tri haplotipa u Italiji (H18, H19, H20) je u direktnoj vezi sa uočenim niskim nivom haplotipskog diverziteta u DeWo+ populacijama. Ako uzmemo u obzir postojanje protoka gena i materinsko nasleđivanje *Wolbachia*, očekivano bi bilo da čest haplotip u Srbiji i Crnoj Gori, kakav je H3, bude *Wolbachia*-inficiran. To međutim nije slučaj, jer je haplotip H3 *Wolbachia*-inficiran samo u Srbiji ali ne i u Crnoj Gori. Sa druge strane, iako dominantni i isključivo povezani sa *Wolbachia* nisu svi primerci koji nose haplotipove H1 i H3 u Srbiji *Wolbachia*-inficirani. Za ovakvu distribuciju infekcije takođe može da bude “zaslužna” *Wolbachia*. Usled potencijalne nesavršene transmisije *Wolbachia* kroz generacije, posledično bi celokupno potomstvo inficirane ženke posedovalo haplotip koji je u asocijaciji sa infekcijom ali ne bi nužno bilo i inficirano (Johnstone & Hurst, 1996; Yu *et al.*, 2011).

U cilju osiguranja što bolje transmisije kroz generacije domaćina, prisutnost *Wolbachia* može da dovede do direktnog pozitivnog efekta na adaptivnu vrednost domaćina u odsustvu reproduktivnih manipulacija, ili da izazove reproduktivne manipulacije bez obzira na pozitivan ili negativan uticaj na adaptivnu vrednost domaćina (Zug & Hammerstein, 2015). Iako je testiranje uticaja na komponente adaptivne vrednosti polifagnih insekata kompleksan zadatak zbog značajnog efekta dostupnosti hrane u prostoru i vremenu, kao i kvaliteta i diverziteta ishrane (Cates, 1981; Chown & Nicolson, 2004), testiran je uticaj *Wolbachia* na fekunditet, masu tela i dužinu života primeraka *D. europaea* poreklom iz DeWo+ i DeWo- kolonija gajenih u kontrolisanim poljskim uslovima. Rezultati ukazuju da nema značajnog variranja u pomenutim komponentama adaptivne vrednosti i da u slučaju populacija *D. europaea*, drugi mehanizmi omogućuju širenje *Wolbachia*. Ti drugi mehanizmi predstavljaju reproduktivne manipulacije kao glavne pokretače širenja i održavanja *Wolbachia* u populaciji domaćina (Zug & Hammerstein, 2015). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da feminizacija, partenogeneza ili ubijanje genetičkih mužjaka nisu

odgovorni mehanizmi za širenje *Wolbachia*, obzirom na to da tokom višegodišnjeg istraživanja i sakupljanja primeraka *D. europaea*, nije utvrđen poremećaj odnosa polova što bi predstavljalo direktan indikator pomenutih reproduktivnih manipulacija. Za dokazivanje citoplazmatske inkompatibilnosti postoji utvrđena eksperimentalna procedura koja nije bila fokus istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, međutim, detektovana asocijacija *Wolbachia* sa određenim haplotipovima, smanjen haplotipski diverzitet i mtDNK variranje zajedno predstavljaju posledicu citoplazmatske inkompatibilnosti (Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008; Zug & Hammerstein, 2015).

Wolbachia može imati i indirektni efekat na adaptivnu vrednost domaćina, stupajući u interakcije sa drugim mikroorganizmima koji naseljavaju telo insekta. Najpoznatiji primer takve interakcije *Wolbachia* predstavlja antipatogena zaštita, za koju se pretpostavlja da se zasniva na nekoliko mehanizama: direktno ometanje replikacije patogena, stimulacija imunskog sistema domaćina ili kompeticija sa drugim mikroorganizmima za ograničene resurse domaćina (Brownlie & Johnson, 2009; Hedges *et al.*, 2008; Jaenike *et al.*, 2010; Haine, 2008). Korisne ili primarne endosimbionte odlikuje dug period koadaptacije i koevolucije sa domaćinom i širenje kroz generacije putem specijaliziranih ćelija i organela (Bennett & Moran, 2013), sa druge strane sekundarni endosimbionti mogu biti suočeni sa ograničenim resursima u telu domaćina odnosno mogu biti u kompeticiji za resurse i međugeneracijsko širenje (Vautrin *et al.*, 2008). Rezultati istraživanja ovakvih interakcija mogu biti kontradiktorni ukoliko je domaćin inficiran endosimbiontima prirodno ili veštački. Tako je utvrđeno da *Wolbachia* i *Spiroplasma* pokazuju antagonizam u interakciji u telu voćne mušice *D. melanogaster* kada je ona veštački zaražena pomenutim endosimbiontima (Goto *et al.*, 2006). Međutim, u prirodno inficiranim populacijama *D. melanogaster* takve interakcije nisu utvrđene (Ventura *et al.*, 2012).

Da bi se sagledala priroda interakcija između patogena (FD fitoplazma) i endosimbionta (*Wolbachia*), istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su bila fokusirana na prirodne asocijacije populacija *D. europaea* sa patogenom i endosimbiontom. Prema teoriji, stabilno održavanje multiplih infekcija predstavlja preduslov za evoluciju odnosa endosimbionata prema kooperaciji. Ključna karakterisitka za stabilnost multiplih infekcija predstavlja zajedničko širenje endosimbionata kroz generacije domaćina (Vautrin *et al.*, 2008). U slučaju *D. europaea*,

Wolbachia se kroz generacije domaćina prenosi materinski (vertikalno), dok se FD fitoplazma ne prenosi na potomstvo pa tako svaka generacija insekata usvaja fitoplazmu *de novo* hraneći se zaraženim biljkama (tj. prenosi se horizontalno). U ovakvom tripartitnom sistemu, izostanak zajedničke međugeneracijske transmisije kao i vremenski ograničena unutargeneracijska multipla infekcija, predstavljaju ograničavajuće faktore za evoluciju interakcije *Wolbachia* i FD fitoplazme ka kooperaciji (Ventura *et al.*, 2012). To dalje znači da kompeticija i antagonističke interakcije oblikuju odnos ova dva mikroorganizma u telu *D. europaea*. Prostor za kompeticiju je veliki, obzirom na to da su osim u polnim ćelijama, *Wolbachia* i fitoplazma registrovane u koegzistenciji u skoro svim ostalim tkivima i organima insekata (Kawakita *et al.*, 2000; Gonella *et al.*, 2011). U situaciji kada dva suprostavljena organizma (patogen/parazit) zauzimaju i koriste sličnu ili istu ekološku nišu u telu domaćina, pretpostavke modela kompeticije predviđaju da je ishod konflikta nepovoljan po organizam koji kasnije inficira domaćina (de Roode *et al.*, 2005). U sistemu *D. europaea*-bakterije, organizam koji kasnije inficira domaćina je, zbog načina usvajanja i prenošenja, FD fitoplazma.

Epidemiološki i evolutivni modeli tripartitnih asocijacija insekta-patogena-*Wolbachia* razvijeni su za potrebe biološke kontrole patogena ili parazita koje insekti prenose. Oni se, u poslednje vreme sve više, oslanjaju na antagonističku interakciju endosimbionta i patogena, odnosno na sposobnost *Wolbachia* da smanji brojnost patogena (Vavre & Charlat, 2012). Modeli predviđaju da širenje *Wolbachia* i citoplazmatska inkompatibilnost (CI) utiču na dinamiku patogena. U početnoj fazi interakcija, ukoliko je patogen visoko virulentan, zaštita koju pruža *Wolbachia* u kombinaciji sa CI uzrokuju širenje *Wolbachia* i potencijalno potpunu eliminaciju patogena iz populacije. Ukoliko patogen nije u velikoj brojnosti ili nije visoko virulentan, CI je dovoljna da dovede do održavanja patogena u niskoj brojnosti, odnosno do situacije epidemiološkog ekvilibrijuma (Vavre & Charlat, 2012 i reference unutar rada). Sistem *D. europaea*-*Wolbachia*-FD fitoplazma odgovara modelu ekološkog ekvilibrijuma jer se u *Wolbachia* inficiranim populacijama (Srbiji i Italiji) inficiranost FD fitoplazmom održava u niskom procentu. Ovakav nalaz predstavlja dobru polaznu osnovu za dodatna istraživanja, posebno zbog toga što su ovi modeli opšteg karaktera, koji se ne mogu u potpunosti primeniti zbog kompleksnosti prirodnih

asocijacija insekata sa patogenima i endosimbiontima, kao i zbog populaciono-genetičkih aspekata samih insekata (npr. struktuiranosti populacija i njihove individualne dinamike).

Dalja istraživanja su potrebna da bi se eksperimentalno utvrdio mehanizam održavanja *Wolbachia* u populacijama *D. europaea*, kao i mehanizam inicijalnog usvajanja. Tokom istraživanja u okviru ove doktorske disertacije utvrđene su posledice CI, koji čini osnovni mehanizam širenja *Wolbachia* u populaciji domaćina (Zug & Hammerstein, 2015). Istraživanja su takođe pokazala da je wEur soj *Wolbachia* prisutan u geografski izolovanim populacijama *D. europaea* u Srbiji i Italiji. Naime, zbog horizontalnog načina inficiranja domaćina, očekivano je da srodne vrste (ili populacije iste vrste) usvajaju različite sojeve *Wolbachia* i obrnuto (Werren *et al.*, 1995; Vavre *et al.*, 1999). Isti soj *Wolbachia* u dve različite populacije (Srbija i Italija) koje se filogeografski klastriraju sa značajnom podrškom koja je veća od 70%, ukazuje na isto poreklo izvora *Wolbachia* infekcije. Horizontalni transfer *Wolbachia* je moguć putem biljke kao izvora hrane (Sintupachee *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016) međutim, još uvek nema dovoljno literaturnih podataka koji bi ukazali da je ovakav horizontalni transfer dominantan način prenošenja *Wolbachia* na insekte. Mogući izvori infekcije mogu biti parazitoidi iz familije Dryinidae koji su u asocijaciji sa vrstama iz roda *Dictyophara* (Guglielmino *et al.*, 2014). U tom slučaju transfer *Wolbachia* na jedinku se opisuje mehanizmom u literaturi poznatim kao “dirty needle” transfer (Houck *et al.*, 1991; Hughes *et al.*, 2004).

Realizovana istraživanja prirodnih asocijacija pre svega ukazuju na dramatično različitu stopu inficiranosti FD fitoplazmom primeraka *D. europaea* poreklom iz DeWo+ i DeWo- populacija. Treba naglasiti da nije registrovana razlika u stopi inficiranosti prirodnog rezervoara FD fitoplazme (*C. vitalba*), koja je po pravilu bila visoka (Tabele 11 i 12). Imajući u vidu da je prisustvo izvora infekcije bilo manje ili više konstantno za istraživane populacije, velika razlika u akviziciji FD fitoplazme od strane adulta *D. europaea* ukazuje na snažne kompeticijske odnose koje imaju ove dve bakterije. Niska stopa inficiranosti FD fitoplazmom populacije iz Srbije (2.8-3.7%) i populacija iz severne Italije (3.8%) je oko 20 puta manja u odnosu na populaciju iz Crne Gore (62.1-66.6%), gde nije registrovano prisustvo *Wolbachia*.

5.3 Uticaj tripartitnih interakcija na epidemiologiju i širenje FD fitoplazme

Pored činjenice da su istraživanja prirodnih interakcija fitoplazmi sa vektorima i biljkama domaćinima malobrojna u literaturi, ona su dodatno ograničena fokusom posmatranja, jer su uglavnom epidemiološki orijentisana (npr. Arnaud *et al.*, 2007; Filippin *et al.*, 2009a; Jović *et al.*, 2009; Casati *et al.*, 2017). Preciznije, većina istraživanja je orijentisana na uticaj tripartitnih interakcija prvenstveno na puteve transmisije fitoplazme kao patogena, na biljne kulture od ekonomskog značaja. Sa druge strane, kada su primenjena istraživanja *Wolbachia* u pitanju, uglavnom je predmet istraživanja bakterijski uticaj na regulaciju populacija insekata, i to onih koji su poznati kao vektori zaraznih bolesti u oblasti medicine (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011). Zbog toga se većina studija bavi efektima koje *Wolbachia* ima na evoluciju i populacionu genetiku i dinamiku vektora. U osnovi ovakvog dominantnog pristupa, u fokusu je direktni efekat koji *Wolbachia*, preko indukovanih reproduktivnih manipulacija, ostvaruje na populacije insekata od značaja u epidemiologiji humanih bolesti. U *in vitro* istraživanjima, koja uključuju transinfekciju vektora, utvrđen je direktan uticaj *Wolbachia* na patogene u smislu inhibicije odnosno smanjenja titra patogena u pljuvačnim žlezdama (Mousson *et al.*, 2012; Blagrove *et al.*, 2012). Slično tome, prirodna infekcija wEur soja *Wolbachia* u populacijama *D. europaea* nije usmerena u pravcu ispoljavanja fenotipova koji su direktno povezani sa smanjenjem brojnosti populacije ove cikade ili uticaja na komponente adaptivne vrednosti. Ovim je uticaj *Wolbachia* na *D. europaea* bez većeg značaja u smislu populacione dinamike tj. regulisanja gustine populacije ove cikade.

Otkriće asocijacije *D. europaea* i wEur soja *Wolbachia*, ukazalo je na potpuno novu mogućnost upotrebe endosimbionata u integralnoj kontroli patogena iz grupe fitoplazmi. Sa ekonomskog stanovišta, u ovakvom tripartitnom sistemu je FD fitoplazma od prioritetnog značaja jer je poznata kao jedan od najmalicioznijih patogena koji su prisutni na vinovoj lozi (Jeger *et al.*, 2016). Stoga je bilo kakav biotički uticaj na fitoplazmu kao patogena obligatne prirode od izuzetnog aplikativnog značaja. U literaturi nije zabeležen primer endosimbionta koji u međusobnim trofičkim odnosima inhibiraju biljni patogen koji se prenosi vektorom. Fitoplazme kao obligatne bakterije primarno naseljavaju biljke i sa svojim primarnim domaćinom su koevoluirale ka komensalnom odnosu, bez ispoljavanja patogenih dejstava (npr. Jović *et al.*, 2011). Do

širenja fitoplazme unutar ekosistema dolazi putem insekata vektora koji su kao medijum sposobni da podrže preživljavanje i umnožavanje fitoplazme unutar svojih organa i da zatim efikasno izvrše prenošenje na susedne biljke. Specifičnost ovog procesa se zasniva na visokim zahtevima fitoplazme u pogledu svoje vijabilnosti kada se nalazi u različitim medijumima, zatim floemskom sadržaju biljke ili ekstracelularnom sadržaju vektora (Christensen *et al.*, 2005). Zbog toga se ovakav vid prenošenja zasniva na koevoluciji i adaptaciji, pri čemu je sistem vektor-patogen izuzetno specifičan i često sveden na samo jednu vrstu vektora koja specifično prenosi jednu vrstu fitoplazme (Weintraub & Beanland, 2006). Izlazak iz sistema komensalizma sa autentičnim biljnim domaćinom i prelazak u na drugu biljnu vrstu je najčešće fatalan po fitoplazmu. Sa druge strane, u slučaju da fitoplazma u novom domaćinu održi vijabilnost, prelazak je najčešće fatalan po novog biljnog domaćina (Christensen *et al.*, 2005).

Kada je u pitanju specifičnost medijuma za očuvanje vijabilnosti FD fitoplazme, rezultati jasno ukazuju da su *C. vitalba* i *D. europaea* pogodni domaćini ove fitoplazme. Više od 30 godina, *C. vitalba* i *D. europaea* nisu bili prepoznati kao značajni faktori u epidemiologiji bolesti koju na vinovoj lozi izaziva FD fitoplazma. Tek je otkriće FD-C fitoplazme u *C. vitalba* (Angelini *et al.*, 2004; Filippin *et al.*, 2007) i njenog vektora *D. europaea* ukazalo na značaj ovog sistema u epidemiologiji FD fitoplazme na širem evropskom prostoru (Filippin *et al.*, 2009a). Takođe, dodatni doprinos proučavanju epidemiološkog ciklusa FD fitoplazme na širem evropskom prostoru daje i utvrđivanje novih biljnih rezervoara kakve su biljke iz roda *Alnus* (Arnaud *et al.*, 2007; Cvrković *et al.*, 2008; Radonjić *et al.*, 2013) kao i karakterizacija detektovanih fitoplazmi. Stopa inficiranosti joha *Alder yellows* fitoplazmom (AldY), kao alternativnim izvorom FD fitoplazme, u Evropi iznosi 60-80%, bez ispoljavanja simptoma (Jeger *et al.*, 2016). FD fitoplazma je u pomenutim biljkama registrovana u Francuskoj, Italiji i Srbiji (Arnaud *et al.*, 2007; Cvrković *et al.*, 2008), a zatim i u Crnoj Gori (Radonjić *et al.*, 2013). U Crnoj Gori su u *A. glutinosa* detektovani *secY-map* genotipovi koji pokazuju filogenetsku srodnost sa epidemiološki značajnim FD1 i FD2 genotipovima (Radonjić *et al.*, 2013) dok je u *C. vitalba* prisutan epidemiološki FD3 genotip. Genotip FD1 je karakterističan za vinogorja zapadnog dela Francuske i severozapadne Italije, dok je genotip FD2 prisutan u većem delu Francuske, zatim u Španiji, Portugalu, Švajcarskoj, Hrvatskoj i Sloveniji (Arnaud *et al.*, 2007). Dodatno, genotip izolovan iz vrste *A. incana* pokazuje

filogenetsku srodnost sa genotipovima 16SrV-C fitoplazme detektovane u vinovoj lozi u Nemačkoj. Navedeno ukazuje na dodatno preklapanje geografske distribucije genotipova a takođe i na ukrštanje alternativnih ciklusa FD fitoplazme na teritoriji Evrope. Naime, u epidemiološkom ciklusu bolesti *Flavescence dorée* koju izaziva FD fitoplazma, najznačajnija karika intenzivnog širenja bolesti u vinogradima nije *D. europaea* ili drugi alternativni vektori, već introdukovana cikada severnoameričkog porekla *S. titanus*, koja kao monofagna vrsta kompletira celokupno razviće na vinovoj lozi. Alternativni vektori su značajni sa aspekta iniciranja epidemiološkog ciklusa, ali je za epidemijsku pojavu bolesti odgovoran *S. titanus* kao specifičan ampelofagni vektor.

Postoji jasna interakcija i bliska povezanost između cikada *D. europaea* i *S. titanus* u odnosu na epidemiologiju FD fitoplazme. Identičnost fitoplazme u *C. vitalba* i vinovoj lozi, koja je dokazana detaljnom karakterizacijom, nedvosmisleno ukazuje da je poreklo patogena u vinovoj lozi iz prirodnog rezervoara (*C. vitalba*) (Filippin *et al.*, 2009). Sa druge strane, vinova loza nije preferentna biljka za ishranu *D. europaea* već je ova cikada koristi kao jednu od alternativnih biljaka u kasno leto i tokom jeseni kada je pokrovna vegetacija u fazi sušenja. Dakle, na sličan način kako je pokazano i za biljku *C. vitalba* (Krstić *et al.*, 2016). Zbog agregacije adulta *D. europaea* na *C. vitalba*, koja često okružuje vinograde, inficirani adulti ove cikade mogu tokom kratkih migracija da koriste vinovu lozu kao alternativnu biljku za kratkoročnu ishranu. Zbog toga se unošenje FD fitoplazme unutar vinograda suštinski može okarakterisati kao pojedinačni incident. Međutim, tako zaražena biljka vinove loze predstavlja izvor inokuluma adultima cikade *S. titanus* za akviziciju FD fitoplazme. Za razliku od *D. europaea*, *S. titanus* je monofag na vinovoj lozi i izuzetno efikasan vektor za prenošenje fitoplazme unutar zasada vinove loze, što za posledicu ima eksponencijalno uvećanje broja zaraženih biljaka vinove. Stopa inficiranosti FD fitoplazme cikade *S. titanus* zavisi od broja zaraženih čokota vinove loze unutar zasada i ona varira od 12-45% (Krnjajic *et al.*, 2007), čime je verovatnoća daljeg prenošenja patogena na susedne zasade vinove loze visoka. Izuzetna vektorska efikasnost cikade *S. titanus* je u osnovi epidemijskih pojava FD fitoplazme sa velikim ekonomskim štetama imajući u vidu da se posledice odražavaju podjednako na vinogradarstvo i proizvodnju vina. Poslednjih pedesetak godina, u svim zemljama koje su pogođene multiplim epidemijama *Flavescence dorée*

pokrenuti su brojni istraživački projekti u cilju redukcije šteta koje vinogradarstvu pravi bolest izazvana FD fitoplazmom (Jeger *et al.*, 2016).

Konačno, realizovana istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji ukazala su da u interakciji unutar prirodnih sistema u kojima cirkulišu FD fitoplazma, njena biljka domaćin i vektor *D. europaea* postoje faktori koji dovode do pada stope inficiranosti FD fitoplazme u populaciji vektora. Na osnovu rezultata ove studije, pad inficiranosti FD fitoplazme u vektoru je u direktnoj korelaciji sa prisustvom *Wolbachia*. U širem smislu, realizovana istraživanja ovih interakcija otvaraju mogućnost kontrole ovih štetnih patogena van tradicionalnih načina, koji pre svega podrazumevaju kontrolu brojnosti vektora, a koji do sada, u praksi nisu dali zadovoljavajuće rezultate (Jeger *et al.*, 2016). Nasuprot tome, uvođenje odgovarajućeg soja endosimbiontske bakterije iz grupe *Wolbachia* unutar trofičkih sistema gde je insekt vektor glavna karika u disperziji patogena, može postati osnova za održivu kontrolu biljnih bolesti izazvanih fitoplazmama ispod ekonomskog praga štetnosti.

6. ZAKLJUČCI

Proučavanje biologije cikade *D. europaea* i analiza prirodno inficiranih populacija ekonomski značajnim biljnim patogenom (FD fitoplazma) i endosimbiontom (*Wolbachia*), njihovih interakcija i efekata na komponente adaptivne vrednosti i evoluciju domaćina doveli su do sledećih zaključaka:

- *D. europaea* je hemimetabolna, univoltna vrsta cikade sa kompleksnim ponašanjem tokom ovipozicije, ima pet larvenih stupnjeva i prezimljava u stadijumu jajeta.
- *D. europaea* pokazuje prostornu i vremensku dinamiku tokom perioda intenzivnog letenja, kao i sezonsku agregaciju na biljci *C. vitalba* koja predstavlja prirodni rezervoar FD fitoplazme.
- Izrazita polifagnost *D. europaea*, dug period letenja i mogućnost za naseljavanje različitih staništa predstavljaju epidemiološki rizik za usvajanje i širenje FD fitoplazme kao i drugih vrsta fitoplazmi.
- Geneologija mitohondrijskog *COI* genskog markera populacija *D. europaea* inficiranih sa *Wolbachia* (DeWo+) pokazuje prisustvo retikulacija, kao posledicu mikroevolucije lokalnih populacija i genetičke diferencijacije, u odnosu na populacije koje nisu *Wolbachia*-inficirane (DeWo-).
- Filogenetska analiza populacija *D. europaea* pokazuje geografsko razdvajanje populacija iz severne Italije i šireg područja Balkana u dve grupe sa značajnom podrškom.
- *Wolbachia*-inficirane populacije *D. europaea* imaju smanjene vrednosti parametara molekularnog diverziteta u poređenju sa neinficiranim populacijama, što predstavlja indirektni pokazatelj efekta citoplazmatske inkompatibilnosti (CI) u osnovi širenja *Wolbachia*.
- U DeWo+ populacijama nije registrovan poremećaj odnosa polova što ukazuje da reproduktivne manipulacije (feminizacija, partenogeneza i ubistvo genetičkih mužjaka) nisu odgovorne za širenje *Wolbachia* u inficiranim populacijama.

- Prisustvo *Wolbachia* u populacijama *D. europaea* nije uticalo na promene u komponentama adaptivne vrednosti domaćina, što ukazuje da direktni efekti na adaptivnu vrednost domaćina nisu u osnovi mehanizma širenja *Wolbachia* unutar populacija ovog vektora.
- Isti soj *Wolbachia* (wEur) prisutan u geografski udaljenim populacijama iz Srbije i Italije ukazuje na zajednički izvor *Wolbachia* infekcije.
- Višestruka razlika u inficiranosti FD fitoplazmom DeWo+ i DeWo- populacija nije uticala na razlike u vektorskoj sposobnosti adulta.
- MLST genotipizacijom je detektovano pet genotipova FD fitoplazme u primercima *D. europaea* i *C. vitalba* na lokalitetima visoke i niske infekcije vektora u Srbiji i Crnoj Gori, od kojih je multilokusni genotip G1 dominantno prisutan u obe populacije.
- Niska stopa inficiranosti FD fitoplazmom populacija iz Srbije i severne Italije i oko 20 puta veća inficiranost populacije iz Crne Gore nije u korelaciji sa konstatno visokom stopom inficiranosti prirodnog rezervoara *C. vitalba* na oba lokaliteta. Navedeno ukazuje da kvantitativna razlika u inficiranosti između DeWo+ i DeWo- populacija nije uzrokovana kvalitativnim razlikama detektovane fitoplazme, ni razlikama u prirodnom biljnom rezervoaru.
- Višestruka razlika u inficiranosti FD fitoplazmom populacija vektora je u direktnoj korelaciji sa prisustvom *Wolbachia* i ukazuje na kompeticiju endosimbionta (*Wolbachia*) i patogena (FD fitoplazme) u telu vektora *D. europaea*.
- Uvođenje odgovarajućeg soja endosimbiontske bakterije iz grupe *Wolbachia* u populacije vektora patogena može doprineti razvoju novih i alternativnih strategija integralne zaštite u cilju održive kontrole biljnih bolesti izazvanih fitoplazmama.

7. LITERATURA

- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E. (2001) *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder phytoplasma. *Vitis*, **40**, 79–86.
- 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**, 4001–4010.
- Augustinos A.A., Santos-Garcia D., Dionyssopoulou E., Moreira M., Papapanagiotou A., Scarvelakis M., Doudoumis V., Ramos S., Aguiar A.F., Borges P.A., Khadem M. (2011) Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PloS One*, **6**(12), p.e28695.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S.A., Radek A.J., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., Hogenhout, S.A. (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, **188**(10), 3682-3696.
- Baldo L., Hotopp J.C.D., Jolley K.A., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Maiden M.C., Tettelin H., Werren J.H. (2006) Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(11), 7098–7110.
- Baldo L., Lo N., Werren J.H. (2005) Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology*, **187**(15), 5406–5418.
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.

- Baumann P., Moran N.A., Baumann L. (2006) Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology*, 403–438.
- Bandi C., Anderson T. J., Genchi C., Blaxter M.L. (1998) Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **265**(1413), 2407–2413.
- Belli G., Fortusini A., Bianco P., Torresin G., Carraro S., Pizzoli, L. (1997) Grapevine flavescence doree and other yellows of grapes. Flavescenza dorata e altri giallumi della vite. *L'Informatore Agrario*, **53**(19).
- Bennett G.M., Moran N.A. (2013) Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. *Genome Biology and Evolution*, **5**(9), 1675-1688.
- Bernays E.A., Chapman R.F. (2007) Host-plant selection by phytophagous insects (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Bian G., Xu Y., Lu P., Xie Y., Xi Z. (2010) The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, **6**, e1000833.
- Biedermann R., Niedringhaus R. (2004) *Die Zikaden Deutschlands - Bestimmungstabellen für alle Arten*. Scheessel, Germany: WABV Fründ.
- Blagrove M.S.C., Arias-Goeta C., Failloux A.-B., Sinkins S.P. (2012) *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 255–260.
- Bonfils J., Schvester D. (1960) Les cicadelles (Homoptera Auchenorrhyncha) dans leurs rapports avec la vigne dans le Sud-Ouest de la France. *Annales des Epiphyties*, **11**(3), 325–336.
- Boudon-Padiou E. (2003) The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. In *Extended abstracts of the 14th Meeting of ICVG, Locorotondo*. pp. 47–53.
- Brownlie J.C., Johnson K.N. (2009) Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiology*, **17**, 348–354.

- Brownstein J.S., Hett E., O'Neill S.L. (2003) The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, **84**(1), 24–29.
- Büchner P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience. Inc., New York.
- Burrows, M. (2014) Jumping mechanisms in dictyopharid planthoppers (Hemiptera, Dictyopharidae). *Journal of Experimental Biology*, **217**, 402–413.
- Casati P., Jermini M., Quaglino F., Corbani G., Schaerer S., Passera A., Bianco P.A., Rigamonti I.E. (2017) New insights on Flavescence dorée phytoplasma ecology in the vineyard agro-ecosystem in southern Switzerland. *Annals of Applied Biology* doi:10.1111/aab.12359
- Cassens I., Mardulyn P., Milinkovitch M.C. (2005) Evaluating intraspecific “network” construction methods using simulated sequence data: do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach? *Systematic Biology*, **54**(3), 363–372.
- Cates R.G. (1981) Host plant predictability and the feeding patterns of monophagous, oligophagous, and polyphagous insect herbivores. *Oecologia*, **48**(3), 319–326.
- Caudwell A. (1990) Epidemiology and characterization of *Flavescence dorée* (FD) and other grapevine yellows. *Agronomie*, **10**, 655–663.
- Chown S.L., Nicolson S. (2004) Insect physiological ecology: mechanisms and patterns. Oxford University Press.
- 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., Auricau-Bouvery N., Danet J.L., Thiéry D. (2017) Use the insiders: could insect facultative symbionts control vector-borne plant diseases? *Journal of Pest Science*, **90**, 1–18.
- Chuche J., Desvignes E., Bonnard O., Thiéry D. (2015) Phenological synchrony between *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae) hatchings and grapevine bud break: Could this explain the insect's expansion? *Bulletin of Entomological Research*, **105**(1), 82–91.

- Chuche J., Thiéry D. (2014) Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, **34**(2), 381–403.
- Clark E.L., Karley A.J., Hubbard S.F. (2010) Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? *Protoplasma*, **244**(1-4), 25–51.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657–1659.
- Collins F.H., Paskewitz S.M. (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, **5**(1), 1–9.
- Constable F. (2010) Phytoplasmas epidemiology: grapevines as a model. In: Weintraub GP, Jones P, eds. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 188–212.
- 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., Jović J., Mitrović M., Petrović A., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. (2010) Diversity of Auchenorrhyncha species and potential “bois noir” vectors in Serbian vineyards. In Abstract Book of the Combined COST Meeting of Work Groups 1–4, 1–2 February 2010, Sitges, Spain, COST Action FA0807, pp. 46-46. Eds A. Bertaccini, A. Lavina and E. Torres.
- Daire X., Clair D., Reinert W., Boudon-Padieu E. (1997) Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 507–514.
- Dale J.L., Kim K.S. (1969) Mycoplasma-like bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathology*, **59**(11), 1765–1766.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9**(8), 772–772.

- Delbac L., Lecharpentier P., Thiery D. (2010) Larval instars determination for the European grapevine moth (Lepidoptera: Tortricidae) based on the frequency distribution of head-capsule widths. *Crop Protection*, **29**, 623–630.
- Deng S., Hiruki C. (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, **14**, 53–61.
- Denno R.F., Roderick G.K. (1990) Population biology of planthoppers. *Annual Review of Entomology*, **35**, 489–520.
- de Roode J.C., Helinski M.E., Anwar M.A., Read A.F. (2005) Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *The American Naturalist*, **166**(5), 531-542.
- Dillon R.J., Dillon V.M. (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*, **49**(1), 71–92.
- Doi Y., Teranaka, M., Yora K., Asuyama H. (1967) Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Japanese Journal of Phytopathology*, **33**(4), 259–266.
- Douglas A.E. (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annual Review of Entomology*, **43**(1), 17–37.
- Douglas A.E. (2003) The nutritional physiology of aphids. *Advances in Insect Physiology*, **31**, 73-140.
- Douglas A.E. (2007) Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends in Biotechnology*, **25**(8), 338–342.
- Douglas A.E., Werren J.H. (2016) Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio*, **7**(2), pp.e02099-15.
- Dyar H.G. (1890) The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche: A Journal of Entomology*, **5**, 420–422.
- 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.

- D'Urso V., Mifsud D. (2012) A preliminary account of the Auchenorrhyncha of the Maltese Islands (Hemiptera). *Bulletin of the Entomological Society of Malta*, **5**, 57–72.
- Ember I., Acs Z., Munyaneza J.E., Crosslin J.M., Kolber M. (2011) Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *European Journal of Plant Pathology*, **130**(3), 367–377.
- Emeljanov A.F. (1987) The phylogeny of the Cicadina (Homoptera, Cicadina) based on comparative morphological data. *Trudy Vsesoyuznogo Entomologicheskogo Obshchestva*, **69**, 19–109.
- Emeljanov A.F. (2003) The subgeneric division of the genus *Dictyophara* Germar, 1833 (Homoptera: Dictyopharidae). *Russian Entomological Journal*, **12**, 357–358.
- Engelstädter J., Hurst G.D. (2009) The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 127–149.
- Excoffier L., Lischer H.E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**(3), 564–567.
- Filippin L., Jović J., Forte V., Cvrković T., Toševski I., Borgo M., Angelini E. (2007) Occurrence and diversity of phytoplasmas detected in clematis and their relationships with grapevine 'flavescence doree' phytoplasmas. *Bulletin of Insectology*, **60**, 327–328.
- Filippin L., Jović J., Cvrković T., Forte V., Clair D., Toševski I., Boudon-Padieu E., Borgo M., Angelini E. (2009a) 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**, 826–837.
- Filippin L., Tonon E., Forte V., Zottini M., Santovito G., Borgo M., Angelini E. (2009b) Genetic polymorphism of stolbur phytoplasma in grapevine, wild plants and insects. In Extended Abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, *Le Progres Agricole et Viticole*, 139–140.

- Foissac X., Maixner M. (2013) Spread of grapevine phytoplasma diseases. In *New Perspectives in Phytoplasma Disease Management. Book of Abstracts of COST Action FA0807 Workshop, 22 March 2013, Barcelona, Spain.* Eds E. Torres, A. Lavina, W. Jarausch and A. Bertaccini.
- French W.L. (1978) Genetic and phenogenetic studies on the dynamic nature of the cytoplasmic inheritance system in *Culex pipiens*. *Genetics*, **88**(3), 447–455.
- Frentiu F.D., Robinson J., Young P.R., McGraw E.A., O'Neill S.L. (2010) *Wolbachia*-mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. *PLoS One*, **5**, e13398.
- Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Gassmann A., Schwann A., Mosyakin A., Wolf V., Jović J., Toševski I. (2011) Biological control of common tansy, *Tanacetum vulgare*. Annual Report 2010, CABI, pp. 43.
- 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.
- Gillespie J.H. (2000) Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model. *Genetics*, **155**(2), 909–919.
- Gonella E., Negri I., Marzorati M., Mandrioli M., Sacchi L., Pajoro M., Crotti E., Rizzi A., Clementi E., Tedeschi R., Bandi C. (2011) Bacterial endosymbiont localization in *Hyalesthes obsoletus*, the insect vector of Bois noir in *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(4), 1423–1435.
- Goto S., Anbutsu H., Fukatsu T. (2006) Asymmetrical interactions between *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts coexisting in the same insect host. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(7), 4805–4810.
- Guglielmino A., Parise G., Bückle C. (2014) Description of larval instars of *Dryinus tarraconensis* Marshall, 1868 and *Gonatopus baeticus* (Ceballos, 1927) (Hymenoptera: Chrysidoidea: Dryinidae), parasitoids of the genus *Dictyophara*

- Germar (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Dictyopharidae). *Zootaxa*, **4032**(1), 42–54.
- Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. (2008) Pathogenesis of bacterial infections in animals. John Wiley & Sons.
- Haine E.R. (2008) Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **275**, 353–361.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T.A. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **22**(2), 160-174.
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S.L., Johnson, K.N. (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, **322**(5902), 702-702.
- Hernández M.C., Sacco J., Cabrera G. (2011) Biology and host preference of the planthopper *Taosa longula* (Hemiptera: Dictyopharidae), a candidate for biocontrol of water hyacinth. *Biocontrol Science and Technology*, **21**, 1079–1090.
- Hertig M. (1936) The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, **28**(04), 453–486.
- Hodgetts J., Dickinson M. (2010) Phytoplasma Phylogeny and Detection Based on Genes other than 16S rRNA. In: Weintraub GP, Jones P, eds. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors*. 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**, 403–423.
- Holz S., Duduk B., Büttner C., Kube M. (2016) Genetic variability of Alder yellows phytoplasma in *Alnus glutinosa* in its natural Spreewald habitat. *Forest Pathology*, **46**(1), 11-21.
- Holzinger W.E., Hausl-Hofstätter U. (1994) Zur bisher bekannten Verbreitung der Zikaden *Dictyophara europaea*, *Gargara genistae* und *Stictocephala bisonia* in

- der Steiermark mit einem Nachweis von *S. bisonia* aus Kärnten. *Mitt. Abt. Zool. Landesmus. Joanneum Graz*, **48**, 65–67.
- Holzinger W.E., Kammerlander I., Nickel H. (2003) *The Auchenorrhyncha of Central Europe, Fulgoromorpha, Cicadomorpha Excl. Cicadellidae*. Leiden, The Netherlands: Brill Academic Publishers.
- Houck M.A., Clark J.B., Peterson K.R., Kidwell M.G. (1991) Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science*, **253**, 1125–1128.
- Hsia W.T., Kao S.S. (1987) Application of head width measurements for instar determination of corn earworm larvae. *Plant Protection Bulletin*, **29**, 277–282.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**(8), 754–755.
- Hughes D.P., Pamilo P., Kathirithamby J. (2004) Horizontal transmission of *Wolbachia* by strepsipteran endoparasites? A response to Noda et al., 2001. *Molecular Ecology*, **13**, 507–509.
- Hunt G., Chapman R.E. (2001) Evaluating hypotheses of instar-grouping in arthropods: a maximum likelihood approach. *Paleobiology*, **27**, 466–484.
- Hurst G.D., Jiggins F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **272**(1572), 1525–1534.
- Huson D.H., Bryant D. (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, **23**(2), 254–267.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (2004) ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243–1255.
- Ishii Y., Matsuura Y., Kakizawa S., Nikoh N., Fukatsu T. (2013) Diversity of bacterial endosymbionts associated with *Macrostelus* leafhoppers vectoring phytopathogenic phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(16), 5013–5022.

- Iturbe-Ormaetxe I., Walker T., LO'Neill S. (2011) *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, **12**(6), 508–518.
- Jaenike J., Unckless R., Cockburn S.N., Boelio L.M., Perlman S.J. (2010) Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science*, **329**(5988), 212-215.
- Jäckel R., Mora D., Dobler S. (2013) Evidence for selective sweeps by *Wolbachia* infections: phylogeny of *Altica* leaf beetles and their reproductive parasites. *Molecular Ecology*, **22**(16), 4241–4255.
- Jeger M., Bragard C., Caffier D., Candresse T., Chatzivassiliou E., Dehnen-Schmutz K., Gilioli G., JaquesMiret J.A., MacLeod A., Navajas Navarro M., Niere B., Parnell S., Potting R., Rafoss T., Urek G., Rossi V., Van Bruggen A., Van Der Werf W., West J., Winter S., Bosco D., Foissac X., Strauss G., Hollo G., Mosbach-Schulz O., Grégoire J-C. (2016) Scientific opinion on the risk to plant health of *Flavescence dorée* for the EU territory. *EFSA Journal*, **14**(12), 4603, 83 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4603.
- Jiggins F.M. (2003) Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics*, **164**(1), 5–12.
- Jing X., Wong A.C.N., Chaston J.M., Colvin J., McKenzie C.L., Douglas A.E. (2014) The bacterial communities in plant phloem-sap-feeding insects. *Molecular Ecology*, **23**(6), 1433–1444.
- Johnstone R.A., Hurst G.D. (1996) Maternally inherited male-killing microorganisms may confound interpretation of mitochondrial DNA variability. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**(4), 453–470.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Petrović A., Redinbaugh M. G., Pratt R.C., Hogenhout S.A., Toševski I. (2009) 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. (2011) Multigene sequence data and genetic diversity among ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ strains infecting *Ulmus* spp. in Serbia. *Plant Pathology*, **60**, 356–368.

- Kambris Z., Cook P.E., Phuc H.K., Sinkins S.P. (2009) Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, **326**, 134–136.
- 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 sellatiformis*. *Phytopathology*, **90**(8), 909–914.
- Keller G.P., Windsor D.M., Saucedo J.M., Werren J.H. (2004) Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle, *Chelymorpha alternans* Boh.(Chrysomelidae, Cassidinae). *Molecular Ecology*, **13**(8), 2405–2420.
- Kikuchi Y. (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and Environments*, **24**(3), 195–204.
- Klingenberg C.P., Zimmermann M. (1992) Dyar's rule and multivariate allometric growth in nine species of waterstriders (Heteroptera: Gerridae). *Journal of Zoology*, **227**, 453–464.
- 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., Toševski I., Jović J. (2012) Population genetics of a planthopper *Dictyophara europaea* and its interaction with *Flavescence dorée* phytoplasma. The Second Symposium of Population and Evolutionary Genetics - PEG2012, Belgrade, Serbia, 9-12 May 2012, Book of Abstracts, pp. 77.
- Krstić O., Cvrković T., Mitrović M., Toševski I., Jović J. (2016) *Dictyophara europaea* (Hemiptera: Fulgoromorpha: Dictyopharidae): description of immatures, biology and host plant associations. *Bulletin of Entomological Research*, **106**(3), 395–405.
- 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.
- Lee I.M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000) Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*, **54**(1), 221–255.
- Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 1153–1169.
- Lee I.M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E. (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, **83**(8), 834–842.
- Lee I.M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. (2004) 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**, 337–347.
- Legendre P., Makarenkov V. (2002) Reconstruction of biogeographic and evolutionary networks using reticulograms. *Systematic Biology*, **51**(2), 199–216.
- Lessio F., Alma A. (2008) Host plants and seasonal presence of *Dictyophara europaea* in the vineyard agro-ecosystem. *Bulletin of Insectology*, **61**, 199–200.
- Lessio F., Picciau L., Gonella E., Mandrioli M., Tota F., Alma A. (2016) The mosaic leafhopper *Orientus ishidae*: host plants, spatial distribution, infectivity, and transmission of 16SrV phytoplasmas to vines. *Bulletin of Insectology*, **69**(2), 277–289.
- Li S.J., Ahmed M.Z., Lv N., Shi P.Q., Wang X.M., Huang J.L., Qiu B.L. (2016) Plant-mediated horizontal transmission of Wolbachia between whiteflies. *The ISME Journal*, doi: 10.1038/ismej.2016.164
- Liang A.P., Wilson M.R. (2002) Wax-secreting, cuticular structures in nymphs of *Scolops abnormis* Ball (Hemiptera: Fulgoromorpha: Dictyopharidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, **75**, 132–137.

- Lo N., Casiraghi M., Salati E., Bazzocchi C., Bandi C. (2002) How many *Wolbachia* supergroups exist? *Molecular Biology and Evolution*, **19**(3), 341–346.
- Lo N., Paraskevopoulos C., Bourtzis K., O'Neill S.L., Werren J.H., Bordenstein S.R., Bandi C. (2007) Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**(3), 654–657.
- Lu P., Bian G., Pan X., Xi Z. (2012) *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1754.
- Lunt D.H., Zhang D.X., Szymura J.M., Hewlitt O.M. (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, **5**(3), 153–165.
- Magarey P.A. (1986) Grapevine yellows—etiology, epidemiology and diagnosis. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **7**(2), 90–100.
- Maixner M. (1994) *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, **33**, 103–104.
- 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.
- McClellan Q.C., Logan J.A. (1994) Instar determination for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) based on the frequency distribution of head capsule widths. *Environmental Entomology* **23**, 248–253.
- McCoy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen A., Chiykowski L.N., Cousin M.T., Dale J.L., de Leeuw G.T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R.C., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemuler E. (1989) Plant diseases associated with mucoplasma-like organisms. In: The mycoplasmas, vol. 5. Spiroplasma, Acholeplasma and Mycoplasmas of plants and arthropods. Whitcomb RF, Tully JG (eds). Academic Press, London New York, pp 545-640.

- McPherson K.R., Wilson S.W. (1995) Life history and descriptions of immatures of the dictyopharid planthopper *Phylloscelis pallescens* (Homoptera: Fulgoroidea). *Journal of the New York Entomological Society*, 170–179.
- Mehle N., Rupar M., Seljak G., Ravnikar M., Dermastia M. (2011) Molecular diversity of ‘flavescence dorée’ phytoplasma strains in Slovenia. *Bulletin of Insectology*, **64**, 29–30.
- Melichar L. (1912) Monographie der Dictyophorinen (Homoptera). Abhandlungen der K. K. Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien 7(1): 1–221, pls. 1–5.
- Mira A., Moran N.A. (2002) Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology*, **44**(2), 137–143.
- 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.
- 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**, 647–660.
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., Hedges L.M., Rocha B.C., Hall-Mendelin S., Day A., Riegler M., Hugo L.E., Johnson K.N., Kay B.H., McGraw E.A., van den Hurk A.F., Ryan P.A., O'Neill S.L. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, **139**, 1268–1278.
- Mousson L., Zouache K., Arias-Goeta C., Raquin V., Mavingui P., Failloux A.-B. (2012) The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1989.

- Murillo J., Vinatzer B., Jackson R., Arnold D. (2015) Bacteria-plant interactions: advanced research and future trends. Caister Academic Press
- Narita S., Nomura M., Kato Y., Fukatsu T. (2006) Genetic structure of sibling butterfly species affected by *Wolbachia* infection sweep: evolutionary and biogeographical implications. *Molecular Ecology*, **15**(4), 1095–1108.
- Nickel H. (2003) The leafhoppers and planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Publ.
- Nickel H., Remane R. (2002) Artenliste der Zikaden Deutschlands, mit Angaben zu Nährpflanzen, Lebenszyklen und Verbreitung (Hemiptera, Fulgoromorpha et Cicadomorpha). *Cicadina*, **5**, 27–64.
- Nielsen R., Beaumont M.A. (2009) Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology*, **18**(6), 1034–1047.
- Olofsson H., Ripa J., Jonzén N. (2009) Bet-hedging as an evolutionary game: the trade-off between egg size and number. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **276**, 2963–2969.
- 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.
- Osborne S.E., Iturbe-Ormaetxe I., Brownlie J.C., O’Neill S.L., Johnson K.N. (2012) Antiviral protection and the importance of *Wolbachia* density and tissue tropism in *Drosophila simulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 6922–6929.
- Pan X., Zhou G., Wu J., Bian G., Lu P., Raikhel A.S., Xi Z. (2012) *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E23–E31.
- Papura D., Burban C., Van Helden M., Giresse X., Nusillard B., Guillemaud T., Kerdelhué C. (2012) Microsatellite and mitochondrial data provide evidence for

- a single major introduction for the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* in Europe. *PLoS One*, **7**(5), e36882.
- Pepper I.L., Gerba C.P., Gentry T., Maier R.M. (2009) Environmental microbiology, 2nd ed Academic Press, San Diego, CA.
- Perilla-Henao L.M., Casteel C.L. (2016) Vector-borne bacterial plant pathogens: interactions with hemipteran insects and plants. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1163.
- Plavec J., Križanac I., Budinščak Ž., Škorić D., Musić M.Š. (2015) A case study of FD and BN phytoplasma variability in Croatia: multigene sequence analysis approach. *European Journal of Plant Pathology*, **142**(3), 591–601.
- Posada D., Crandall K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**(1), 37-45.
- Prestidge R.A. (1982) Instar duration, adult consumption, oviposition and nitrogen utilization efficiencies of leafhoppers feeding on different quality food (Auchenorrhyncha: Homoptera). *Ecological Entomology*, **7**, 91–101.
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P.A., Wei W., Davis R.E. (2013) ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **63**, 2879–2894.
- Radonjić S., Hrnčić S., Krstić O., Cvrković T., Mitrović M., Jović J. Toševski I. (2013) First report of Alder Yellows phytoplasma infecting common and grey Alder (*Alnus glutinosa* and *A. incana*) in Montenegro. *Plant Disease*, **97**(5), 686–686.
- Radonjić S., Hrnčić S., Krstić O., Toševski I., Jović J. (2012) Presence and distribution of *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) in the vineyards of Montenegro. International Symposium: Current Trends in Plant Protection Proceedings, 25 – 28th Septembar 2012, 506–510. UDK: 643.8-275(497.16).
- Rambaut A. (2012) FigTree, version 1.4. 2. University of Edinburgh, Edinburgh.
- Rambaut A., Drummond A.J. (2009) Tracer, version 1.5, MCMC trace analysis package.

- Raychoudhury R., Grillenberger B.K., Gadau J., Bijlsma R., de Zande L., Werren J.H., Beukeboom L.W. (2010) Phylogeography of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera) indicates a mitochondrial–*Wolbachia* sweep in North America. *Heredity*, **104**(3), 318–326.
- Rees D.J., Emerson B.C., Oromí 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**, 427–434.
- Remes Lenicov A.M., Hernández M.C., Brentassi M.E., Defea B. (2012) Descriptions of immatures of the South American plant hopper, *Taosa (C.) longula*. *Journal of Insect Science*, **12**, 142.
- Rokas A., Atkinson R.J., Brown G.S., West S.A., Stone G.N. (2001) Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia* selective sweep?. *Heredity*, **87**(3), 294–304.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**(12), 1572–1574.
- Ros V.I., Fleming V.M., Feil E.J., Breeuwer J.A. (2009) How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(4), 1036–1043.
- Sacchi L., Genchi M., Clementi E., Bigliardi E., Avanzati A.M., Pajoro M., Negri I., Marzorati M., Gonella E., Alma A., Daffonchio D. (2008) Multiple symbiosis in the leafhopper *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae): details of transovarial transmission of *Cardinium* sp. and yeast-like endosymbionts. *Tissue and Cell*, **40**(4), 231–242.
- Schneider S., Excoffier L. (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**(3), 1079–1089.
- 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.

- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M. (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, **80**(1), 3–26.
- Shoemaker D.D., Dyer K.A., Ahrens M., McAbee K., Jaenike J. (2004) Decreased diversity but increased substitution rate in host mtDNA as a consequence of *Wolbachia* endosymbiont infection. *Genetics*, **168**(4), 2049–2058.
- Shoemaker D.D., Keller G., Ross, K.G. (2003) Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation in two fire ant species. *Molecular Ecology*, **12**(7), 1757–1771.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**(6), 651–701.
- Sintupachee S., Milne J.R., Poonchaisri S., Baimai V., Kittayapong P. (2006) Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial Ecology*, **51**(3), 294–301.
- Smart C.D., Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K.H., Seemüller E., Kirckpatrick B.C. (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1988–1993.
- Snodgrass R.E. (1935) Principles of insect morphology. MacGraw-Hill, New York.
- Song, Z. S., Liang, A. P. (2008). The Palaearctic planthopper genus *Dictyophara* Germar, 1833 (Hemiptera: Fulgoroidea: Dictyopharidae) in China. *Annales Zoologici*, **58**(3), 537–549
- Song Z.S., Liang A. P. (2011) Two new genera and two new species of Oriental dictyopharid planthoppers (Hemiptera: Fulgoromorpha: Dictyopharidae) from Sri Lanka and southern India. *Zootaxa*, **2740**, 24–34.
- Steffek R., Reisenzein H., Zeisner N. (2007) Analysis of the pest risk from grapevine *Flavescence dorée* phytoplasma to Austrian viticulture. *EPPO Bulletin*, **37**, 191–203.

- Stouthamer R., Breeuwer J.A., Hurst G.D. (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, **53**(1), 71–102.
- Stouthamer R., Luck R.F. (1993) Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **67**(2), 183–192.
- Sugio A., Dubreuil G., Giron D., Simon J.C. (2015) Plant–insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, **66**(2), 467–478.
- Sugio A., MacLean A.M., Grieve V.M., Hogenhout S.A. (2011) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(48), 1254–1263.
- Sundh I., Wilcks A., Goettel M. (2012) Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment: safety assessment and regulation. CABI, 360pp.
- Swofford D.L. (2002) Paup*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation. *Genetics*, **123**, 585–595.
- 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**, 2731–2739.
- 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.
- Trivellone V., Filippin L., Narduzzi-Wicht B., Angelini E. (2016) A regional-scale survey to define the known and potential vectors of grapevine yellow phytoplasmas in vineyards South of Swiss Alps. *European Journal of Plant Pathology*, **145**(4), 915–927.

- Tucić N., Tucić B. (2000) Prirodna selekcija i adaptacije. NNK International, Beograd, Srbija.
- Urban J.M., Cryan J.R. (2012) Two ancient bacterial endosymbionts have coevolved with the planthoppers (Insecta: Hemiptera: Fulgoroidea). *BMC Evolutionary Biology*, **12**(1), 87.
- Van den Hurk A.F., Hall-Mendelin S., Pyke A.T., Frentiu F.D., McElroy K., Day A., Higgs S., O'Neill S.L. (2012) Impact of *Wolbachia* on infection with Chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1892.
- Vavre F., Fleury F., Lepetit D., Fouillet P., Boulétreau M. (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, **16**(12), 1711–1723.
- Vautrin E., Genieys S., Charles S., Vavre F. (2008) Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modeling approach. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**(1), 145–161.
- Vautrin E., Vavre F. (2009) Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology*, **17**(3), 95–99.
- Ventura I.M., Martins A.B., Lyra M.L., Andrade C.A., Carvalho K.A., Klaczko L.B. (2012) *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster* populations: prevalence, male-killing, molecular identification, and no association with *Wolbachia*. *Microbial Ecology*, **64**(3), 794–801.
- Walker T., Johnson P.H., Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Frentiu F.D., McMeniman C.J., Leong Y.S., Dong Y., Axford J., Kriesner P., Lloyd A.L., Ritchie S.A., O'Neill S.L., Hoffmann A.A. (2011) The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, **476**, 450–453.
- Weeks A.R., Reynolds K.T., Hoffmann A.A. (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology & Evolution*, **17**(6), 257–262.
- Weintraub P.G., Beanland L. (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, **51**, 91–111.

- Weintraub P.G., Jones P. (2010) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts, and vectors*. ISBN 978-1-84593-530-6, Wallingford, UK: CAB International, 331 pp.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**(6), 1358–1370.
- Weir B.S. (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Werren J.H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, **42**, 587–609.
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, **6**(10), 741–751.
- Werren J.H., Zhang W., Guo L.R. (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **261**(1360), 55–63.
- Wilson S.W., McPherson J.E. (1981) Notes on the biology of *Nersia florens* (Homoptera: Fulgoroidea: Dictyopharidae) with descriptions of eggs, first, second, and fifth instars. *The Great Lakes Entomologist*, **14**, 45–48.
- Wilson S.W., Mitter C., Denno R.F., Wilson M.R. (1994) Evolutionary patterns of host plant use by delphacid planthoppers and their relatives. in: *Planthoppers: Their ecology and management*. Ed. by Denno RF, Perfect JR, Springer US, 7–113.
- Wilson S.W., Wheeler AG. (1992) Host plant and descriptions of nymphs of the planthopper *Rhabdocephala brunnea* (Homoptera: Fulgoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **85**, 258–264.
- Wilson S.W., Wheeler AG. (2005) An African grass, *Eragrostis curvula* (Poaceae), planted in the southern United States recruits rarely collected native planthoppers (Hemiptera: Fulgoroidea: Dictyopharidae, Fulgoridae). *Journal New York Entomological Society*, **113**, 174–204.
- Wong Z.S., Hedges L.M., Brownlie J.C., Johnson, K.N. (2011) *Wolbachia*-mediated antibacterial protection and immune gene regulation in *Drosophila*. *PLoS One*, **6**(9), e25430.

- Xi Z., Gavotte L., Xie Y., Dobson S.L. (2008) Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. *BMC Genomics*, **9**, 1.
- Yang J.S., Nam H.J., Seo M., Han S.K., Choi Y., Nam H.G., Lee S.J., Kim S. (2011) OASIS: online application for the survival analysis of lifespan assays performed in aging research. *PLoS ONE*, **6**(8), p.e23525.
- Ye Y.H., Woolfit M., Rancés E., O'Neill S.L., McGraw E.A. (2013) *Wolbachia*-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7**, e2362.
- Yen J.H., Barr A.R. (1971) New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, **232**, 657–658.
- Yu M.Z., Zhang K.J., Xue X.F., Hong X.Y. (2011) Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation and evolution in natural populations of *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Molecular Biology*, **20**(3), 311–321.
- Zélé F., Nicot A., Duron O., Rivero A. (2012) Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. *Journal of Evolutionary Biology*, **25**, 1243–1252.
- 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.
- 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 GP, Jones P, eds. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 64–92.
- Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**(5), 723-735.

Zug R., Hammerstein P. (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS ONE*, 7(6), p.e38544.

Zug R., Hammerstein P. (2015) Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biological Reviews*, **90**(1), 89–111.

BIOGRAFIJA AUTORA

Oliver Krstić je rođen 13. oktobra 1979. godine u Vranju. Nakon završene osnovne škole i gimnazije u Vranju, školske 1998/1999 godine upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biologija. Diplomirao je 2008. godine sa prosečnom ocenom 8.21 i odbranjenim diplomskim radom pod nazivom „Analiza preadultnih komponenti adaptivne vrednosti kod populacija pasuljevog žiška (*Acanthoscelides obtectus* Say) selekcionisanih za malu i veliku gustinu larvi“ pod mentorstvom prof. dr Nikole Tucića. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je 2008. godine upisao doktorske studije na smeru Biologija, modul Evolucionarna biologija.

Od 2008. godine Oliver kao istraživač volontira u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za štetočine bilja u Zemunu. U institutu je zaposlen od 2012. godine 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“.

U periodu od 2010. do 2017. godine, Oliver Krstić je učestvovao u realizaciji pet međunarodnih projekata bilateralne saradnje, a zatim i SCOPES Joint research projects, projekta finansiranog od strane Swiss National Science Foundation (*Epidemiology and management strategy of stolbur phytoplasma in agroecosystems*).

Oblast naučnog interesovanja Olivera Krstića je populaciona biologija vektora fitoplazmi i drugih organizama od značaja za poljoprivrednu proizvodnju i biološku kontrolu kao i izučavanje interakcija fitoplazmi, endosimbionata i insekata domaćina.

Publikovao je 26 radova, od čega 17 u naučnim časopisima međunarodnog značaja.

Изјава о ауторству

Потписани Оливер Крстић

број уписа Б3603/2009

Изјављујем

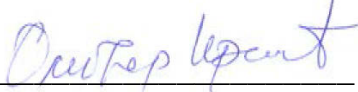
да је докторска дисертација под насловом

Улога еволуционих интеракција између интрацелуларног ендосимбионта (*Wolbachia*) и фитоплазме (*Flavescence dorée*) у променама компоненти адаптивне вредности и правцима еволуције митохондријске ДНК у природним популацијама *Dictyophara europaea*

- 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, 26.05.2017.



Оливер Крстић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора

Оливер Крстић

Број уписа

Б3603/2009

Студијски програм

Биологија

Наслов рада

Улога еволуционих интеракција између интрацелуларног ендосимбионта (*Wolbachia*) и фитоплазме (*Flavescence dorée*) у променама компоненти адаптивне вредности и правцима еволуције митохондријске ДНК у природним популацијама *Dictyophara europaea*

Менторке

проф. др Биљана Стојковић

др Јелена Јовић

Потписани Оливер Крстић

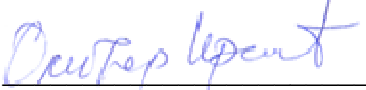
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

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, 26.05.2017.



Изјава о коришћењу

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

Улога еволуционих интеракција између интрацелуларног ендосимбионта (*Wolbachia*) и фитоплазме (*Flavescence dorée*) у променама компоненти адаптивне вредности и правцима еволуције митохондријске ДНК у природним популацијама *Dictyophara europaea*

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

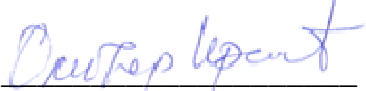
5. Ауторство – без прераде

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, 26.05.2017.



1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.