

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

mr Biljana Atanasova

**FAUNA CIKADA (HEMIPTERA:  
AUCHENORRHYNCHA) U VINOGRADIMA  
MAKEDONIJE I NJIHOVA ULOGA U  
EPIDEMIOLOGIJI 'CANDIDATUS  
PHYTOPLASMA SOLANI'**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

MSci Biljana Atanasova

**FAUNA OF CICADAS (HEMIPTERA:  
AUCHENORRHYNCHA) IN THE  
VINEYARDS OF MACEDONIA AND THEIR  
ROLE IN THE EPIDEMIOLOGY OF  
'*CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI*'**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

MENTORI:

---

dr Željko Tomanović  
redovni profesor Biološkog fakulteta u Beogradu

---

dr Tatjana Cvrković  
naučni saradnik Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu

ČLAN KOMISIJE:

---

dr Ivo Toševski  
naučni savetnik Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu

Datum odbrane:

---

## Zahvalnica

*Ovom prilikom, želela bih izraziti svoju zahvalnost svima koji su vlastitim naučnim saznanjima, korisnim sugestijama i moralnom podrškom, pridoneli oformljenju ovoga rada.*

*Posebnu zahvalnost htela bih izraziti mom mentor, dr Tatjani Cvrković, čija nesebična posvećenost i korisne sugestije su mi u mnogome pomogle u toku istraživanja i izrade disertacije.*

*Takođe, zahvalna sam i mentoru, Prof. dr Željku Tomanoviću, za dragocene savete i ideje u toku mog rada na disertaciji.*

*Dr Ivo Toševski, hvala Vam! Ne mogu na bolji način da Vam odam priznanje za moja naučna dostignuća.*

*Dr Toševski je samo jedan od stručne ekipe Odseka za štetočine bilja, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, kojima ne mogu da se ne zahvalim: Jelena Jović, Milana Mitrović, Miljana Jakovljević, Oliver Krstić i Andrea Kosovac.*

*Ja radim na Poljoprivrednom fakultetu, kao jednom od fakulteta na Univerzitetu Goce Delčev u Štipu. Mnogo ih je kojima treba da izrazim moju zahvalnost. Od svih njih ću izdvojiti Prof. dr Dušana Spasova, koji je profesor entomologije i moj profesor.*

*U mom radu to što najviše nedostaje je vreme, koje uzimam od moje dece, mog suprugu ali i od moje mame. Zahvaljujem i njima tako što im posvećujem ovu moju skromnu tvorbu.*

*Biljana Atanasova*

# FAUNA CIKADA (HEMIPTERA: AUCHENORRHYNCHA) U VINOGRADIMA MAKEDONIJE I NJIHOVA ULOGA U EPIDEMIOLOGIJI 'CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI'

## Rezime

Bois noir (BN), oboljenje koje izaziva stolbur fitoplazma, nanosi velike štete u vinogradarskim regionima širom Evro-mediteranskog basena. Tokom 2012. i 2013. godine preduzeta su epidemiološka istraživanja za određivanje potencijalnih insekata vektora i najvažnijih biljaka rezervoara BN fitoplazme u makedonskim vinogradima, u jugoistočnom delu zemlje. Istraživanjem diverziteta vrsta iz podreda Auchenorrhyncha utvrđeno je prisustvo 27 vrsta cikada u okviru 6 familija. Ukupno je registrovana 21 vrsta familije Cicadellidae, 2 vrste familije Cixiidae i po jedan predstavnik familija Aphrophoridae, Delphacidae, Dactylopharidae i Issidae. Tokom istraživanja utvrđena je izrazita učestalost glavnog vektora stolbur fitoplazme, cikade *Hyalesthes obsoletus*, dok drugi dokumentovani vektor BN, *Reptalus panzeri*, nije zabeležen u makedonskim vinogradima. Molekularna karakterizacija 'Candidatus Phytoplasma solani' u analiziranom materijalu vršena je analizom genskih regiona *tuf*, *stamp* i *vmp1* gena, RFLP metodom i sekvenciranjem. Cilj karakterizacije je da se stekne detaljan uvid u molekularnu raznolikost izolata stolbur fitoplazme povezanih sa vinovom lozom, potencijalnim biljkama rezervoarima (*Urtica dioica* i *Convolvulus arvensis*) i jedinkama *H. obsoletus* sakupljenim na ovim biljkama. Ukupno je analizirano 91 izolat stolbur fitoplazme među kojima je identifikovano 3 *tuf*, 5 *vmp1* i 11 različitih *stamp* genotipova. Na osnovu sveobuhvatne *tuf/vmp1/stamp* genotipizacije utvrđeno je ukupno 12 genotipova stolbur fitoplazme. Najveći diverzitet genotipova je identifikovan među izolatima iz *H. obsoletus* sakupljenim na *U. dioica*, od kojih je najčešće bio prisutan genotip *tuf-ab/V18/M1* (43%). *Tuf-b/V2-TA/STOL* genotip je utvrđen u 33% prirodno inficiranih biljaka vinove loze. Dva genotipa stolbur fitoplazme povezana su sa *U. dioica*: *tuf-ab/V18/M1* (60%) i *tuf-a/V3/M4* (40%), dok je samo jedan genotip (*tuf-b/V2-TA/Rqg50*) povezan sa *C. arvensis*.

**Ključne reči:** žutila vinove loze, Bois noir, molekularna epidemiologija, *Hyalesthes obsoletus*, varijabilnost *stamp* gena, stolbur fitoplazma.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Morfologija, sistematika i filogenija životinja

**UDK broj:** 575.22 : [579.887 : 634.8](497.7)(043.3)

# FAUNA OF CICADAS (HEMIPTERA: AUCHENORRHYNCHA) IN THE VINEYARDS OF MACEDONIA AND THEIR ROLE IN THE EPIDEMIOLOGY OF 'CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI'

## Abstract

*Bois noir* (BN), induced by stolbur phytoplasma, is an important grapevine yellows disease that causes severe damage in viticultural regions throughout the Euro-Mediterranean basin. Epidemiological survey to determine potential insect vectors and the main reservoir plants of BN phytoplasma in Macedonian vineyards was undertaken between 2012 and 2013 in southeastern part of the country. The study of the species diversity from the suborder Auchenorrhyncha revealed the presence of 27 species, belonging to 6 families. The most numerous was family Cicadellidae with 21 species, followed by family Cixiidae with 2 species, Aphrophoridae, Delphacidae, Dactylopharidae and Issidae with only one species recorded. Our study revealed the high abundance of the principal vector of stolbur phytoplasma, the planthopper *Hyalesthes obsoletus*, while the second documented vector of BN, *Reptalus panzeri*, was not recorded in Macedonian vineyards. A molecular characterization performed by sequence and/or RFLP typing of *tuf*, *vmp1* and *stamp* genes, was used to gain detailed insight into the molecular diversity of the stolbur phytoplasma isolates associated with grapevine, tentative reservoir plants (*Urtica dioica* and *Convolvulus arvensis*) and *H. obsoletus* associated with them. Among 91 stolbur isolates detected in diverse plant and insect hosts 3 *tuf*, 5 *vmp1* and 11 distinct *stamp* genotypes were identified. Overall, twelve comprehensive genotypes of stolbur phytoplasma were detected according to *tuf/vmp1/stamp* genotyping. The highest diversity of genotypes was detected among the isolates from *H. obsoletus* associated with *U. dioica*, of which the most frequent genotype was *tuf-ab/V18/M1* (43%). *Tuf-b/V2-TA/STOL* comprehensive genotype was found in 33% of naturally infected grapevines. Two stolbur phytoplasma genotypes were associated with *U. dioica*: (i) *tuf-ab/V18/M1* (60%) and *tuf-a/V3/M4* (40%), while only one genotype (*tuf-b/V2-TA/Rqg50*) was associated with *C. arvensis*.

**Keywords:** grapevine yellows, Bois noir, molecular epidemiology, *Hyalesthes obsoletus*, *stamp* variability, stolbur phytoplasma.

**Scientific field:** Biology

**Special scientific field:** Morphology, systematic and phylogeny of animals

**UDK :** 575.22 : [579.887 : 634.8](497.7)(043.3)



## Sadržaj

1. Uvod.....	2
1.1. Cikade (Hemiptera: Auchenorrhyncha) .....	4
1.1.1. Morfologija, biologija i ekologija cicada.....	4
1.1.2. Istraženost cikada vinove loze .....	7
1.2. Fitoplazme – identifikacija, molekularna karakterizacija i filogenija.....	8
1.2.1. Fitoplazmatske bolesti vinove loze, sa osvrtom na ‘Ca. Phytoplasma solani’ ..	12
1.3. Uloga insekata vektora i biljaka rezervoara fitoplazmi u epidemiologiji bolesti.....	15
2. Ciljevi istraživanja.....	17
3. Materijal i metode .....	18
3.1. Istraživanja diverziteta cikada na vinovoj lozi i utrini oko vinograda.....	18
3.2. Ispitivanje prisustva fitoplazmi u sakupljenim cikadama .....	19
3.3. Ispitivanje prisustva ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’ u vinovoj lozi.....	19
3.4. Ispitivanje prisustva fitoplazmi u korovskim biljkama.....	19
3.5. Molekularna detekcija i karakterizacija fitoplazmi.....	20
3.5.1. Ekstrakcija DNK.....	20
3.5.2. Utvrđivanje prisustva fitoplazmi PCR/RFLP analizom 16S rRNK .....	22
3.5.3. Detekcija ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’ .....	23
3.5.4. Molekularna karakterizacija izolata ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’ .....	24
4. Rezultati .....	30
4.1. Diverzitet cikada na vinovoj lozi i utrini oko vinograda u regionu Strumice .....	30
4.1.1. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Hamzali .....	42
4.1.2. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Dobrošinci .....	43
4.1.3. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Gradošorci .....	43
4.1.4. Vrste cikada i njihova brojnost na lokalitetu Dobrejci .....	44
4.1.5. Vrste cikada i njihova brojnost na lokalitetu Petralinci.....	45
4.2. Prisustvo fitoplazmi u populacijama cikada .....	46
4.2.1. Prisustvo ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’ u cikadama.....	48
4.3. Prisustvo ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’ u vinovoj lozi .....	50
4.4. Prisustvo stolbur fitoplazme u korovskim biljkama.....	51
4.5. Molekularna karakterizacija stolbur fitoplazme.....	51
4.5.1. Analiza <i>tuf</i> gena .....	52
4.5.2. Analiza <i>vmp1</i> gena.....	53
4.5.3. Analiza <i>stamp</i> gena.....	54
4.5.4. Sveobuhvatna karakterizacija na osnovu <i>tuf/vmp1/stamp</i> gena.....	58
5. Diskusija.....	60
6. Zaključak.....	70
7. Literatura .....	75

## 1. Uvod

U Makedoniji postoji duga tradicija gajenja vinove loze i proizvodnje vina. Prema poslednjem popisu poljoprivrede, iz 2007. godine (Statistički godišnjak Republike Makedonije, 2007), vinova loza se gaji na površini od 17.160,42 ha sa godišnjom proizvodnjom od 210 000 tona. Najveći deo plodova obrađuje se u vino, ali se takođe koristi za ishranu, kao stono grožđe, sušeno voće ili prerađeno u sokove.

Vinova loza je izložena napadima mnogih štetočina i bolesti koje utiču na smanjenje prinosa. U poslednjih petnaest godina, u Makedoniji je primećena pojava i širenje simptoma na vinovoj lozi koji se ispoljavaju u vidu žutila i crvenila listova, da bi kasnije dolazilo do nekroze listova i sušenja celih biljaka. Ispoljavanje ovakvih promena na vinovoj lozi ranije se pripisivalo različitim faktorima ili nepoznatim bolestima (Hewitt and Bovey, 1979; Bovey and Martelli, 1992; Martelli, 2003), a zahvaljujući savremenom razvoju nauke i tehnike, posebno otkriću i usavršavanju metoda molekularne biologije (pre svega PCR - Polymerase Chain Reaction), utvrđeno je da ovakve promene na vinovoj lozi izazvaju fitoplazme.

Fitoplazme su floemski ograničeni organizmi, koje se prenose putem kalemljenja, parazitskih cvetnica i insekata vektora. Insekti vektori fitoplazmi pripadaju redu Hemiptera i to su u najvećem broju cikade iz familija Cicadellidae, Cixiidae i Delphacidae, kao i nekoliko vrsta psila (familija Psyllidae) (Weintraub and Beanland, 2006).

Prvi podaci o prisustvu fitoplazmi na teritoriji Makedonije datiraju iz 2003. godine, kada je utvrđeno prisustvo Bois noir fitoplazme u vinovoj lozi (Šeruga *et al.*, 2003).

Bois noir (BN) je ekonomski značajno oboljenje vinove loze, prouzrokovano stolbur fitoplazmom iz 16SrXII-A podgrupe, koja je nedavno opisana kao '*Candidatus Phytoplasma solani*' (Quaglino *et al.* 2013). Bolest je široko rasprostranjena širom Evrope, na području Mediterana i na Bliskom istoku i izaziva ozbiljne ekonomske gubitke u proizvodnji vinove loze (Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014).

Stolbur fitoplazma izaziva značajne štete na vinovoj lozi i različitim gajenim biljkama od ekonomskog značaja, uključujući krompir, kukuruz, šećernu repu i druge (Gatineau *et al.* 2002; Jović *et al.* 2009; 2011). Potvrđeni vektori stolbur fitoplazme na vinovoj lozi su polifagne cikade kserotermičkih staništa, *Hyalesthes obsoletus* i *Reptalus*

*panzeri*, koje pripadaju porodici Cixiidae (Maixner 1994; Cvrković *et al.* 2014). Poznato je da i druge vrste, kao što su *Reptalus quinquecostatus* i *Anaceratagallia ribauti*, također mogu da prenesu stolbur fitoplazmu na eksperimentalne biljke ili na veštački hranljivi medijum, ali njihova sposobnost da prenose patogene na vinovu lozu još nije dokazana (Pinzauti *et al.* 2008; Riedle-Bauer *et al.* 2008; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014).

Epidemiologija fitoplazmatskih bolesti determinisana je interakcijom između vektora i patogena i njihovih zajedničkih domaćina. Epidemiologija BN povezana je sa infekcijom domaćina među korovskim biljkama, koje su primarni izvor hrane za cikade, a ujedno su i rezervoari patogena (Johannsen *et al.* 2012).

Prvi podaci o prisustvu BN fitoplazme u više vinogorskih reiona u Makedoniji datiraju iz 2003. godine (Šeruga *et al.*, 2003), a daljim istraživanjima utvrđeno je da su različite sorte vinove loze zaražene ovom fitoplazmom i da je procenat inficiranih biljaka u vinogradu u konstantnom porastu tokom godina (Kostadinovska *et al.* 2014). Sa druge strane, veoma malo je rađeno na diverzitetu cikada koje su prisutne na teritoriji Makedonije. U poslednjih nekoliko godina analiziran je kvalitativan i kvantitativan sastav cikada na vinovoj lozi u Makedoniji (Atanasova *et al.* 2010, 2013). Ipak, nedostaju informacije o diverzitetu cikada u vinogradima zaraženim stolbur fitoplazmom i njihovoj okolini, potencijalnim insektima vektorima i biljkama domaćinima koje su uključene u epidemiološke cikluse BN fitoplazme u vinogradima Makedonije.

## 1.1. Cikade (Hemiptera: Auchenorrhyncha)

### 1.1.1. Morfologija, biologija i ekologija cicada

Cikade (Hemiptera: Auchenorrhyncha) su herbivorni insekti koji pripadaju redu Hemiptera, podredu Auchenorrhyncha. Zahvaljujući velikim gustinama populacija koje ostvaruju i izraženom diverzitetu vrsta, cikade predstavljaju jednu od najdominantnijih grupa herbivora i važnu komponentu terestričnih životinjskih zajednica. S jedne strane, one konzumiraju biljne asimilate i njihovu biomasu, a sa druge strane važan su izvor hrane za predatore i parazitoide (Nickel *et al.*, 2002). Cikade se hrane usisavnjem biljnih sokova iz tkiva domaćina. Većina vrsta hrani se sokom floema, ali neke krupnije vrste (*Cicadella viridis*, Aphrophoridae), hrane se sokom ksilema. Takođe, brojne vrste prenose biljne patogene, kao što su bakterije, virusi i fitoplazme, a neke od njih su značajne kao štetočine žitarica (Nickel *et al.*, 2002). Ipak, u većini zemalja zapadne i centralne Evrope, direktna oštećenja gajenih biljaka od ishrane cikada su ograničena, a uloga cikada u funkcionisanju ekosistema je diskretna, jer se hrane biljnim sokom, a ne biljnom biomasom (Nickel *et al.*, 2003). Međutim, njihov značaj ne treba potcenjivati, jer one moraju da troše velike količine soka biljaka da bi dobile adekvatne količine hranljivih materija. Sa druge strane, hraneći se biljnim sokovima one prouzrokuju direktna oštećenja biljnog tkiva, isanjem sokova i izlučivanjem produkata metabolizma. Na taj način utiču na smanjenje rasta i fiziološke kondicije napadnute biljke. Biljke ostećuju i tokom polaganje jaja u biljno tkivo. Ali, smatra se da najznačajnije štete koje pričinjavaju cikade na biljkama, je njihova sposobnost da kao vektori prenose biljne patogene: viruse, bakterije i fitoplazme.

Interakcije ove grupe insekata sa biljnim domaćinima su veoma važne. Cikade koriste biljke ne samo kao izvor hrane, nego i kao mesto za parenje i ovipoziciju, kao sklonište i kao sredstvo komunikacije (Holzinger *et al.*, 2003). Kao rezultat njihovog visokog stepena specijalizacije u odnosu na biljku domaćina, i njihove sposobnosti da prenose biljne patogene, mogu da promene konkurentske odnose između biljaka domaćina, što zauzvrat može da utiče na sastav i strukturu biljnih zajednica.

Podred Auchenorrhyncha pripada redu Hemiptera, zajedno sa još tri podreda: Heteroptera, Sternorrhyncha i Coleorrhyncha. Podred Auchenorrhyncha obuhvata dve

grupe: Fulgoromorpha i Cicadomorpha (Biederman & Niedringhaus, 2004). Zajedničko za sve vrste je to da formiraju jasne zvukove ili vibracije kao oblik komunikacije.

Infrared Fulgoromorpha (planthoppers, spitzkopfzikaden), predstavlja veliku grupu fitofagnih insekata koji su rasprostranjeni širom sveta. Uglavnom se nalaze u tropskim oblastima, iako su neke vrste prilagođene za život u pustinjama i suvim oblastima, kao i u izrazito hladnim područjima severne Aljaske. Infrared Fulgoromorpha obuhvata oko 10.000 opisanih vrsta, svrstanih u 20 familija (Holzinger *et al.*, 2003), među kojima su neke od najznačajnijih štetočina gajenih biljaka u svetu. Vrste familije Cixiidae i Delphacidae su najznačajnije sa stanovišta prenošenja patogena (virusa, bakterija i fitoplazmi) koji prouzrokuju ozbiljne štete na različitim kulturama.

Infrared Cicadomorpha (leafhoppers, rundkopfzikaden) sadrži oko 30.000 opisanih vrsta širom sveta, grupisanih u tri nadfamilije: Cicadoidea, Cercopoidea i Membracoidea (Holzinger *et al.*, 2003). Brojne vrste su značajne štetočine različitih useva, a predstavnici familije Cicadellidae su najpoznatiji kao vektori biljnih virusa, spiroplazmi i fitoplazmi.

Identifikacija cikada vrši se na osnovu spoljnih morfoloških karakteristika, ali kao najznačajniji taksonomski karakter služi genitalni aparat mužjaka. Cikade su sitni insekti čija dužina tela ne prelazi 10 mm. Uglavnom imaju karakterističnu boju i šare na telu, koje se posebno zapažaju kada se insekti gledaju pomoću optičkih pomagala (lupa, binokular). Usni aparat je prilagođen za bodenje i sisanje. Donja usna je izdužena u vidu rilice, člankovita je i lučno savijena, i u njoj su smešteni igličasti stileti koji predstavljaju preobražene gornje i donje vilice. Gornja usna pokriva samo osnovu donje usne. Maksilarne i labijalne palpe su potpuno redukovane. Rilica se nalazi na zadnjem ventralnom delu glavene kapsule. Antene imaju dva izražena bazalna segmenta i končastim vrhom, a stopala su tročlana (Reemane & Wachmann, 1993; Richards & Davies, 1977). Cikade imaju dva para krila, koja su krovoliko postavljena. Kod većeg broja vrsta zapažena je razlika u veličini krila. U okviru jedne populacije mogu se javiti makropterne i brahipterne forme. Timpanalni organ smešten je u prva dva abdominalna segmenta. Timpanalni mišići nalaze se u unutrašnjosti apodema, na prvom i drugom sternitu i drugom i trećem tergitu. Oblik i veličina ovih apodema varira, i kod nekih grupa mogu se koristiti kao dijagnostički karakteri.

Na osnovu morfoloških karakteristika imaga, podred Auchenorrhyncha podeljen je na dva infrareda: Fulgoromorpha (Archaeorrhyncha) i Cicadomorpha (Clypeorrhyncha).

Osnovne karakteristike ovih podreda su:

Fulgoromorpha:

- pipci se nalaze ventralno do složenih očiju;
- drugi antenalni segment (pedicellus) je uvećan i nosi bradavičaste senzile;
- prisustvo tengula u formi jastučića, u osnovi prednjih krila kod većine vrsta;
- prisustvo Y – nerva kod većine vrsta, odnosno oba nerva koji se spajaju na klavusu prednjeg krila formiraju slovo Y;
- kukovi srednjeg para nogu su izduženi, udaljeni jedan od drugog.

Cicadomorpha:

- imaju uvećan klipeus;
- drugi antenalni segment (pedicellus) je mali bez istaknutih senzila;
- flagellum je čekinjast;
- odsustvuju tegule na prednjim krilima;
- kukovi prednjih nogu su zaobljeni do pljosnati i pripijeni su jedan do drugog.

Cikade su hemimetabolni insekti čije larve izgledaju kao manje, beskrilne verzije odraslih insekata. Obično, oni prolaze kroz pet larvenih stupnjeva, svaki progresivno veći od prethodnog. Jaja polažu direktno u tkivo biljke, neposredno ispod površine lista, ispod kore stabla ili u zemlju. Razvoj larvi traje od nekoliko nedelja do nekoliko godina, što zavisi od same vrste i vremenskih prilika. Broj generacija u toku jedne godine je različit kod različitih vrsta i zavisi od nadmorske visine, ekspozicije terena i klimatskih karakteristika (Biedermann i Niedringhaus, 2004). Životni ciklus cikada najviše zavisi od perioda prezimljavanja u uslovima nepovoljnih zima, u umerenim klimatskim regionima. Prezimljavaju u svim razvojnim stadijumima, ali najčešće u stadijumu jaja i larvi (Biedermann i Niedringhaus, 2004).

### 1.1.2. Istraženost cikada vinove loze

Sva dosadašnja istraživanja o cikadama odnose se na proučavanje njihovog sastava na različitim staništima, na određenoj teritoriji. Do otkrića vektorske uloge cikada u prenošenju fitoplazmi, postojali su oskudni podaci o fauni cikada na vinovoj lozi. Poslednjih godina istraživanja o cikadama usmerena su na proučavanje njihovog diverziteta na vinovoj lozi, načina života i kruga domaćina, sa ciljem da se utvrdi njihova uloga u prenošenju fitoplazmi na vinovoj lozi.

U zavisnosti od načina ishrane, cikade na vinovoj lozi mogu se podeliti na tri grupe: obligatne (celokupno razviće se odvija na vinovoj lozi), fakultativne (pored vinove loze za svoje razviće mogu da koriste i druge biljke) i slučajne vrste (na vinovoj lozi žive samo u određenom razvojnom stadijumu, najčešće kao imaga). Među fakultativnim vrstama, koje nanose direktne štete, značajna je zelena lozina cikada (*Empoasca vitis* Goethe). Prezimljava kao imago na četinarima, a u proleće prelazi na vinovu lozu gde vrši ovipoziciju. Najčešći simptomi koje prouzrukuje kod biljaka sisanjem biljnih sokova su: promena boje lisnih nervava, kovrdžanje listova, žutilo ili crvenilo listova, nekroza i povremeno opadanje listova (Alma, 2002).

U grupi fakultativnih vrsta koje prouzrukuju indirektna oštećenja vinove loze, produkcijom velike količine medne rose nalazi se vrsta *Metcalfa pruinosa* Say. Ova cikada je polifag, čije larve i imaga koloniziraju biljke više od 50 familija. Medna rosa koju proizvodi predstavlja povoljnu sredinu za razviće gljiva čađavica, čime se smanjuje asimilaciona površina listova, koji se pre vremena suše i opadaju (Mihajlović, 2007).

Najznačajnija oštećenja na vinovoj lozi pričinjavaju vrste koje su vektori fitoplazmi. Vrsta *Hyalesthes obsoletus* Signoret spada u grupu slučajnih vrsta na vinovoj lozi. Njeni primarni domaćini su kopriva (*Urtica dioica*) i poponac (*Convolvulus arvensis*), gde prezimljava u stadijumu larve. Imaga se javljaju početkom jula i aktivna su do kraja avgusta i početkom septembra. U tom periodu mogu se sresti na vinovoj lozi gde se hrane listovima i prouzrukuju indirektno štete prenoseći stolbur fitoplazmu, koja na vinovoj lozi prouzrokuje bolest "crno drvo" ili Bois noir (Maixner, 1994).

Vrsta *Scaphoideus titanus* Ball je monofag na vinovoj lozi i nanosi samo indirektnu štetu prenošenjem fitoplazme *Flavescence dorée*, koja prouzrokuje pojavu zlatastog žutila vinove loze (Alma, 2002).

U zemljama koje okružuju Republiku Makedoniju utvrđeno je koje su najzastupljenije vrste cikada u vinogradima zaraženim stolbur fitoplazmom, kao i prisustvo stolbur fitoplazme u nekoliko vrsta cikada: *Hyaletthes obsoletus* Signoret, 1865, *Reptalus panzeri* (Low, 1833), *Reptalus quinquecostatus* Dufour, 1833 i *Dyctiophara europaea* (Linnaeus, 1767), (Palermo *et al.*, 2004; Cvrković *et al.*, 2011, Trivellone *et al.*, 2005).

Veoma malo je rađeno na diverzitetu cikada koje su prisutne na teritoriji Makedonije. U poslednjih 10 godina istraživane su cikade – muzikante iz fam. Cicadidae (Gogala *et al.*, 2005), koje nisu registrovane kao štetocine gajenih biljaka. Analiza kvantitativnog i kvalitativnog sastava cikada na vinovoj lozi u Makedoniji sačinjena je od strane Atanasove *et al.* (2010, 2013), ali nije proučavana njihova uloga u epidemiologiji fitoplazmi.

## **1.2. Fitoplazme – identifikacija, molekularna karakterizacija i filogenija**

Fitoplazme, ranije poznate kao "Mycoplasma-like organisms", ili MLOs, su specijalizovane bakterije koje su obligatni paraziti floemskih sudova biljaka domaćina i unutrašnjih organa nekoliko vrsta insekata. Predstavljaju pleomorfne organizme bez ćelijskog zida, koje karakteriše prečnik od 300 do 500 nm i veoma mali genom (680 – 1 600 kb).

Fitoplazme su uzročnici biljnih bolesti nekoliko stotina biljnih vrsta iz 98 familija, uključujući povrće i voće, ukrasno bilje i različite drvenaste biljke. Kao patogeni mogu da izazovu izrazito značajne gubitke prinosa. One su obligatni simbionti biljaka i insekata, za čije širenje u prirodi su potrebna oba domaćina. U biljkama ostaju ograničene na floemsko tkivo i šire se u biljci kroz pore sitastih ploča koje razdvajaju floemske sitaste cevi. U telo insekata fitoplazme dospevaju ishranom floemskim sokom inficirane biljke. Kada nasele digestivni trakt prodiru u hemolimfu insekata i odatle do svih tkiva i organa, među kojima su i pljuvačne žlezde, gde mogu da se nađu u velikom broju unutar ćelija ali i u intracelularnom prostoru. Prilikom ishrane, vektor unosi fitoplazme u floemsko tkivo biljke



putem pljuvačke. Vreme između inicijalne akvizicije fitoplazmi od strane insekta vektora tokom hranjenja na inficiranoj biljci i mogućnosti insekta da unese fitoplazmu u zdravu biljku, odnosno postane vektorski sposoban, naziva se latentni period. Dužina latentnog perioda varira u zavisnosti od vrste fitoplazme i insekta i kreće se od 7 do 80 dana (Moya-Raygoza and Nault, 1998; Murrall *et al.*, 1996). Kod biljaka simptomi infekcije fitoplazmama mogu da se razviju već posle 7 dana od njihovog unosa u biljku (inokulacije), ali do ispoljavanja može proći i mnogo duži vremenski period (6-24 meseca) u zavisnosti od vrste fitoplazme i biljke domaćina.

Uobičajeni simptomi koje izazivaju fitoplazme su filodije, stanje u kome biljka proizvodi listove umesto cvetova. Žutilo ili crvenilo lišća biljaka, kao jedan od najčešćih simptoma vezanih za prisustvo ovih organizama, izazvano je modifikacijom u sintezi ugljenih hidrata. Smatra se da fitoplazme sprečavaju fotosintezu biljaka tako što inhibiraju biosintezu hlorofila i karotenoida (Hogenhout *et al.*, 2008). Biljke zaražene fitoplazmama mogu pokazivati simptome virescencija – abnormalno prisustvo hlorofila u cvetovima kao rezultat gubitka pigmenta u ćelijama latica (Lee *et al.*, 2000). Ponekad se na biljkama zaraženim fitoplazmama mogu pojaviti simptomi “veštičjih metli” – proliferacija grana, kao rezultat promene normalnog rasta koju izaziva infekcija, sterilni cvetovi, nekroza floemskog tkiva, izumiranje grančica ili drvenastog dela biljke. Sve te promene dovode do potpunog propadanja biljaka (Hogenhout *et al.*, 2008).

Fitoplazme su otkrivene 1967. godine od strane japanskih istraživača (Doi *et al.*, 1967) koji su ih nazvali „mikoplazmama slični organizmi” (*mycoplasma-like organisms*, MLOs), a današnji naziv su dobile na Internacionalnoj konferenciji sistematizacije bakterija održanoj 1996. godine na Floridi, USA (Seemüller *et al.*, 1998).

Nova era u istraživanju fitoplazmi počela je 90-tih godina, uvođenjem metoda zasnovanih na DNK analizama, prateći razvoj procedure za ekstrakciju fitoplazmatske DNK iz zaraženih biljaka ili insekata (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Lee and Davis, 1988; Sears *et al.*, 1989; Kollar *et al.*, 1990).

Fitoplazme se ne mogu gajiti u čistoj kulturi, pa je teško dobiti podatke o genotipovima, a većina njihovih fenotipskih osobina nisu primenjive za njihovu klasifikaciju. Zbog toga su fitoplazme dugo bile opisivane i diferencirane na osnovu

simptoma koje ispoljavaju kod obolelih biljaka, kao i na osnovu kruga domaćina i interakcija sa vektorom.

U cilju rešavanja prepreka u taksonomiji fitoplazmi, 2004. godine, Internacionalni Komitet za Sistematiku Bakterija (engl. International Committee of Systematic Bacteriology), podkomitet za taksonomiju molikuta (engl. subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes) definisao je preporuke za opise novih vrsta fitoplazmi (Murray and Schleifer, 1994; Murray and Stackebrandt, 1995) i predložio da se fitoplazme klasifikuju unutar novog roda sa statusom „kandidata”- „*Candidatus* (Ca.) Phytoplasma” (IRPCM, 2004; Firrao *et al.*, 2005). Na osnovu ovih preporuka nova *Candidatus* vrsta se opisuje kada njena 16S rRNK sekvenca (duža od 1200 bp) ima manje od 97,5% identičnosti sa bilo kojom prethodno opisanom *Candidatus* vrstom. Visoko konzervativna priroda 16S rRNK gena, ne dozvoljava uvek precizno razdvajanje fitoplazmi čije su biološko-ekološke karakteristike jasno različite, pa su zbog toga definisani i dodatni kriterijumi za opise novih „*Candidatus*” vrsta. Dve vrste fitoplazmi koje dele više od 97,5% sličnosti 16S rRNK sekvence mogu biti definisane 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 između njih. Tokom poslednje decenije, epidemiološke studije su pokazale da su različiti sojevi fitoplazmi, koji su blisko povezani na osnovu analize 16S rRNK gena, uključeni u slične bolesti povezane sa različitim sortama useva u različitim geografskim regionima (Hogenhout i Musić, 2010). Za kontrolu bolesti, treba poznavati vezu između različitih sojeva fitoplazmi i njihove jedinstvene ekološke niše.

Klasifikacija fitoplazmi se najčešće vrši na osnovu 16S rRNK gena, jer on istovremeno poseduje i konzervativne i dovoljno varijabilne genske regione (Weisburg *et al.*, 1991). Kada je 16S rRNK region amplifikovan PCR metodom, RFLP analize su mogle po prvi put da se koriste za sveobuhvatnu klasifikaciju fitoplazmi na molekularnom nivou (Seemüller *et al.*, 1998). Ovaj region se koristi kao univerzalni filogenetski marker za klasifikaciju većine grupa prokariota. Analizom sekvenci 16S rRNK gena, sve poznate fitoplazme klasifikovane su u 16Sr grupe i podgrupe koje predstavljaju zasebne filogenetske linije fitoplazmi. 16S gen je pogodan za karakterizaciju svih fitoplazmi, ali

zbog svoje konzervativnosti često nije dovoljno informativan i ne prikazuje sve biološke osobnosti analiziranog organizma, zbog čega se pored njega često analiziraju i drugi geni.

Analize sekvenci još jednog konzervativnog regiona između 16S i 23S rRNK gena, pokazuju veoma sličnu klasifikacionu šemu kao rezultati dobijeni 16S rRNK analizom. Iako se prostor između 16S i 23S manje koristi u filogenetskim analizama, to je pogodan region, jer je kraći od 16S rRNK regiona (220-250 bp naspram 1530 bp) i zbog toga ga je lakše sekvencirati. Ovaj region je prisutan kod svih fitoplazmi i manje je konzervativan od 16S rRNK regiona. Iz ovog razloga, moguće je dobiti detaljnije razlike između fitoplazmatskih grupa (Seemüller *et al.*, 1998).

*Tuf* gen, koji kodira factor elongacije (EF-Tu), je visoko konzervativni gen koji se, takođe, koristi za diferencijaciju i klasifikaciju fitoplazmi. Schneider *et al.*, 1997, dizajnirali su prajmere koji se mogu koristiti za amplifikaciju *tuf* genske sekvence kod većine grupa fitoplazmi (Langer and Maixner, 2004). Ribozomalni proteinski geni (*rpl22-rps3*) su varijabilniji nego 16S rRNA gen što znatno povećava kvalitet opisivanja raznih sojeva fitoplazmi. Studije za diferencijaciju fitoplazmi pokazale su da su analizom *rp* genskih sekvenci u okviru 16Sr podgrupe identifikovani sojevi fitoplazmi koji nisu bili identifikovani analizom 16S rRNK genskih sekvenci (Martini *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004). *SecY* i *secA* geni koji kodiraju protein translokazu, takođe predstavljaju dobre molekularne markere koji se koriste za karakterizaciju fitoplazmi (Hodgetts *et al.*, 2008). Drugi geni fitoplazmi koji se koriste za klasifikaciju su imunodominanti membranski protein (IMP), varijabilni membranski protein Vmp1 (Weintraub and Jones, 2010). Folatni geni (*folP* i *folK*) (Davis *et al.*, 2003), NusA (Shao *et al.*, 2006), pokazali su se korisnim u diferencijaciji sojeva unutar 16SrI i 16SrXII grupe. Analizom ovih gena moguće je proučiti korelaciju genotipova fitoplazmi izolovanih iz insekata vektora, sojeva izolovanih iz korovskih biljaka i iz biljaka sa simptomima fitoplazmatičnog oboljenja. Na taj način je moguće dobiti potpunu sliku o epidemiološkom ciklusu različitih sojeva fitoplazmi.

### 1.2.1. Fitoplazmatske bolesti vinove loze, sa osvrtom na 'Ca. Phytoplasma solani'

Oboljenja koja izazivaju fitoplazme na vinovoj lozi nazivaju se žutila vinove loze. Prva bolest tog tipa opisana je u Francuskoj (Caudwell, 1957), pod nazivom *Flavescence dorée* (FD). Oboljenja sa sličnim simptomima konstatovana su i u drugim zemljama Evrope kao i u Severnoj Americi, Aziji i Australiji. Tipični simptomi koje izazivaju ova oboljenja su: uvijanje lišća prema spoljašnjosti i njihova diskoloracija u vidu žutila i crvenila, neravnomeran ili potpuni nedostatak lignifikacije stabljika, pojava sterilnih cvetova i odumiranje bobica.

Trenutno je u Evropi prisutno tri vrste žutila koja su izazvana fitoplazmama koje se svrstavaju u tri ribozomalne grupe: 16SrV (*Flavescence dorée* i Palatinate grapevine yellows), 16SrXII-A (stolbur ili Bois noir) i 16SrI-A (Aster Yellows) (Boudon-Padieu, 2003). Fitoplazme koje pripadaju 16SrV grupi manje su zastupljene i ograničene su na Francusku, Španiju, Švajcarsku, Italiju, Srbiju (FD) i Nemačku (PGY) (Boudon-Padieu, 2003). S druge strane, Bois noir fitoplazma je široko rasprostranjena u Evropi, uključujući i Nemačku (Maixner *et al.*, 1995), Španiju (Lavina *et al.*, 2006), Mađarsku (Palermo *et al.*, 2004), Srbiju (Duduk *et al.*, 2004), Francusku (Sforza *et al.*, 1998), Italiju (Lessio *et al.*, 2007), Sloveniju (Petrović *et al.*, 2003), Hrvatsku (Šeruga *et al.*, 2003), Ukrajinu (Milkus *et al.*, 2005), a nedavno je otkrivena i u Crnoj Gori (Radonjić *et al.*, 2009). Iako se smatra da je manje epidemična od FD, Bois noir fitoplazma je rasprostranjena u više regiona.

Bois noir (BN), poznata i kao Vergilbungskrankheit (Nemačka) i Legno Nero (Italija), javlja se u mnogim evropskim zemljama, ali takođe i u Izraelu i Libiji (Boudon-Padieu, 2003, 2005). Kada je bila prvi put opisana, smatralo se da predstavlja neku formu FD, sa zajedničkom etiologijom. Kasnije je utvrđeno da *S. titanus*, koji je vektor FD ne prenosi BN (Caudwell *et al.*, 1971). Fitoplazme 16SrXII-A grupe inficiraju mnoge kulturne biljke i korove, uključujući i vinovu lozu. Najznačajniji vektor stolbur fitoplazme je ciksidea *H. obsoletus* (Sforza *et al.*, 1998), iako je utvrđeno da i druge vrste familije Cixiidae prenose stolbur fitoplazmu: i) *Pentastiridius beileri* Wagner 1970, prenosi stolbur šećerne trske (Gatineau *et al.*, 2001; Lagner & Maixner, 2004), ii) *Reptalus panzeri* (Low, 1833) prenosi stolbur na kukuruz i vinovu lozu (Jović *et al.*, 2009, Cvrković *et al.*, 2014).

Dosadašnja istraživanja na teritoriji Makedonije potvrdila su prisustvo BN fitoplazme u vinovoj lozi (Šeruga *et al.*, 2003), dok prisustvo FD nije utvrđeno u vinovoj lozi, već samo u pavitini (*Clematis vitalba*), koja raste u neposrednoj blizini vinograda i služi kao izvor zaraze vinove loze ovom fitoplazmom (Filippin *et al.*, 2009).

Fitoplazme se održavaju cikličnim smenama između biljaka i insekata vektora. Tokom ishrane na vinovoj lozi, cikade prenose fitoplazme i na taj način loza postaje domaćin fitoplazme. Najznačajnije korovske biljke, domaćini vrste *H. obsoletus* u vinogradima su *Convolvulus arvensis* L., *Calystegia sepium* L., *Urtica dioica* L. i *Cardaria draba* (L.) Desv. (Sforza *et al.*, 1998), ali samo poponac i kopriva su stalno zaraženi stolbur fitoplazmom (Lagner & Maixner, 2004).

Kompleksne interakcije stolbur fitoplazme sa divljim i gajenim, jednogodišnjim i višegodišnjim biljkama i insektima vektorima u različitim ekosistemima mogu biti odgovorne za genetički i fenotipski diverzitet, što se i pokazalo kod test biljke *Catharanthus roseus* koja je ispoljivala različite simptome kada je bila inokulisana različitim izolatima „*Ca. P. solani*” (Marcone *et al.*, 1999). Genetska raznovrsnost stolbur fitoplazme se može odrediti analizom nukleotidnih sekvenci i virtuelnom digestijom. Quaglino *et al.* (2009) su utvrdili visok stupanj genetičke heterogenost među različitim izolatima stolbur fitoplazme.

Na osnovu RFLP analize *tuf* gena, koji kodira faktor elongacije Tu (EF-Tu), stolbur fitoplazma se sastoji od dva genetički različita tipa, *tuf-a* i *tuf-b*, koji su uključeni u dva različita epidemiološka ciklusa BN u vinogradima (Langer and Maixner 2004). *Tuf-b* tip vezan je za poponac (*Convolvulus arvensis*), koji je preferentna biljka domaćin vrste *H. obsoletus* u istočnim i jugoistočnim regionima Evrope (Langer and Maixner 2004; Johannsen *et al.* 2012), mada može inficirati i veliki broj drvenastih biljaka (Riedle-Bauer *et al.* 2008; Johannsen *et al.* 2012; Cvrković *et al.* 2014). *Tuf-a* tip ‘*Ca. P. solani*’ vezan je za koprivu (*Urtica dioica*) koja predstavlja jedinu potvrđenu biljku domaćina ovog genotipa stolbur fitoplazme (Langer and Maixner 2004; Johannsen *et al.* 2012). Epidemiološki ciklus BN, koji je u asocijaciji sa koprivom, najzastupljeniji je u severozapadnim oblastima Evrope (Nemačka, Švajcarska, severna Francuska), a nedavno je registrovan i u Austriji (Aryan *et al.* 2014).

Za proučavanje epidemiologije stolbur fitoplazme, pored *tuf* gena, koriste se i dva stolbur specifična gena koja imaju veću varijabilnost (Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014; Kostadinovska *et al.* 2014; Kosovac *et al.*, neobjavljeni podaci). Ova dva gena kodiraju pretpostavljene membranske proteine, odgovorne za prepoznavanje i interakciju sa domaćinom: *vmp1* i *stamp* gen (Cimerman *et al.* 2009; Fabre *et al.* 2011; Pacifico *et al.* 2009). Obimna molekularna karakterizacija stolbur fitoplazme na osnovu *vmp1* gena je izvedena u okviru evropskog projekta 'Global epidemiology of phytoplasma diseases of economical importance in south-eastern Europe' (SEE-ERA.NET, [www.phytoplasma.eu](http://www.phytoplasma.eu)), gde je identifikovano više od 20 genotipova na osnovu RFLP analize *vmp1* gena. Još uvek nije poznato da li ove genetičke varijante imaju iste ili različite biljke domaćine i epidemiologiju. Kao molekularni marker, varijabilni *vmp1* gen, trenutno se koristi za istraživanja stolbur izolata u evro-mediteranskom basenu, gde su prisutni različiti insekti-vektori ili različite populacije istih insekata-vektora. Preliminarni podaci pokazuju da su RFLP analiza i sekvencioniranje *vmp1* gena moćni markeri za razlikovanje izolata stolbur fitoplazme, ali potrebne su epidemiološke studije na većem broju izolata sakupljenih iz različitih biljaka i insekata domaćina (Cimerman *et al.*, 2009).

Genetička diverzifikacija *stamp* gena izvršena je među kolekcijama stolbur fitoplazme evro-mediteranskog basena. Većina izolata stolbur fitoplazme poreklom iz Francuske, Italije i Hrvatske bila je grupisana na istoj filogenetskoj grani. Druga grana filogenetskog stabla korespondirala je sa izolatima centralne i istočne Evrope, a u treću granu su se grupisali izolati istočno od mediteranskog basena (Grčka, Srbija, Libija i Azerbejdžan), što pokazuje da je varijabilnost *stamp* gena u korelaciji sa geografskim poreklom stolbur fitoplazme. Utvrđeno je da je ovaj gen uključen u interakcije između patogena i insekata vektora i da zbog toga evoluira mnogo brže od ostatka genoma, što ga čini varijabilnijim od drugih gena (Fabre *et al.*, 2011).

### 1.3. Uloga insekata vektora i biljaka rezervoara fitoplazmi u epidemiologiji bolesti

Epidemiologija u okviru biljne patologije definisana je kao "nauka o populacijama patogena u populacijama biljaka domaćina, i bolesti dobijenih iz toga, pod uticajem okoline i ljudskog faktora" (Kranz, 1990). Proučavanje epidemiologije ima za cilj da jasno opiše interakcije između domaćina, patogena i okoline i da iskoristi ovu informaciju u razvijanju strategije za kontrolu bolesti. Prvi korak u opisivanju epidemiologije fitoplazmatskog oboljenja predstavlja opis i karakterizacija patogena, posebno što pojedine vrste ili sojevi fitoplazmi imaju specifičnu biologiju, koja se razlikuje od biologije sličnih ili usko vezanih fitoplazmi. Ove razlike mogu biti u vezi sa ekspresijom i razvojem bolesti, opsegom domaćina i vektora. Proučavanje relacije između određenih vrsta ili sojeva fitoplazmi može pomoći u pronalazenju njihovog porekla ili njihovih vektora.

Epidemiologija fitoplazmatskih bolesti u suštini je povezana sa biologijom njihovih insekata vektora. U Evropi, epidemiologija stolbur fitoplazme na vinovoj lozi je u direktnoj vezi sa biologijom i životnim ciklusom njenog primarnog vektora *H. obsoletus* (Constable, 2010). *Hyalesthes obsoletus* ima jednu generaciju godišnje (Bressan *et al.*, 2007). Jaja polaže u zemlji. Kada se izlegnu, larve se razvijaju hraneći se korenom biljaka, odakle mogu da usvoje fitoplazmu. Prezimljavaju u trećem larvenom stupnju i adulti se javljaju od juna do kraja avgusta, u zavisnosti od klime i biljke domaćina. U Izraelu, *H. obsoletus*, razvija dve generacije godišnje, a adulti se javljaju u proleće i jesen (Sharon, 2005; Constable, 2010). Larve *H. obsoletus*, hraneći se korenjem inficiranih biljaka koprive ili poponca usvajaju stolbur fitoplazmu. *Hyalesthes obsoletus* je najaktivniji od popodneva do večeri (15:00 – 21:00), pa se smatra da u tom periodu inficira i vinovu lozu (Bressan *et al.*, 2007). Eksperimentalno je potvrđeno da se životni vek jedinki *H. obsoletus* smanjuje posle 12 sati ishrane na vinovoj lozi, što znači da vinova loza nije odgovarajući domaćin za vektora. Imaga *H. obsoletus* se slučajno hrane na vinovoj lozi, pa blizina između korovskih biljaka zaraženih stolbur fitoplazmom i vinove loze, utiče na učestalosti BN u vinogradima (Bressan *et al.*, 2007).

Epidemiologija Bois noir na vinovoj lozi vezana je za biljku koja predstavlja rezervoar stolbur fitoplazme. Treba napomenuti da se razlikuju populacije vektora *H.*

*obsoletus* koje se razvijaju na koprivi i poponcu. Populacije koje se razvijaju na koprivi javljaju se ranije u poređenju sa onima koje se razvijaju na poponcu (Johannesen *et al.*, 2008). Kopriva se često javlja na krajevima vinograda, pa se, kao rezultat toga, oboljenje sa najvišom incidencom javlja na ivicama vinograda, a učestalost oboljenja opada sa povećanjem rastojanja između koprive i vinove loze (Maixner, 2006; Bressan *et al.*, 2007). Za razliku od koprive, poponac se obično javlja između redova loze, tako da u vinogradu oboljenje ima slučajnu distribuciju (Maixner, 2006). Ove razlike u prostornoj distribuciji BN pomažu u identifikovanju izvora stolbur fitoplazme i vektora, na osnovu čega može se napraviti plan za kontrolu oboljenja.

Kontrola i zaustavljanje širenja fitoplazmatskih oboljenja, postiže se hemijskim suzbijanjem vektora i uništavanjem potencijalnih izvora zaraze (napušteni usevi i zasadi, biljke autohtone flore) i proizvodnjom zdravog sadnog i reproduktivnog biljnog materijala. Poznavanje diverziteta i biologije cikada u vinogradima kao i etiologije i epidemiologije fitoplazmatskih oboljenja vinove loze, predstavlja osnov za njihovo uspešno suzbijanje i prevenciju.



## 2. Ciljevi istraživanja

Neistraženost diverziteta i dinamike pojave cikada na vinovoj lozi i dugogodišnje prisustvo fitoplazmi, ukazuju na potrebu da se prouči kvalitativan i kvantitativan sastav cikada u vinogradima Makedonije zaraženim fitoplazama. Da bi se što potpunije sagledao uticaj vektora u širem smislu na epidemiologiju BN fitoplazme, uključujući odnose cikada sa vinovom lozom i korovskim biljkama, osnovni ciljevi ovih istraživanja su:

- analiza kvalitativnog i kvantitativnog sastava cikada u vinogradima Makedonije;
- utvrđivanje prisustva '*Candidatus Phytoplasma solani*' u biljkama vinove loze
- utvrđivanje prisustva '*Candidatus Phytoplasma solani*' u cikadama lokalne faune, kao i u biljkama u neposrednom okruženju inficiranih vinograda;
- utvrđivanje korelacije između procenta zaraženih cikada i zaraženih biljaka vinove loze u vinogradima Makedonije
- utvrđivanje uloge cikada u epidemiologiji '*Candidatus Phytoplasma solani*' u vinogradima Makedonije.

Epidemiološki ciklus oboljenja BN obuhvata polifagne vektore i alternativne biljke domaćine, što ga čini kompleksnijim. Zbog toga treba očekivati prisustvo stolbur fitoplazme u cikadama lokalne faune, kao i u biljkama u neposrednom okruženju zaraženih vinograda. Takođe, treba očekivati da postoji korelacija između procenta zaraženih cikada i zaraženih biljaka vinove loze u vinogradima Makedonije.

Na osnovu ovoga predpostavlja se da neke cikade iz autohtone faune vinogradarskih područja mogu biti značajni faktori u epidemiologiji BN fitoplazme, kao potencijalni prenosioci ove bolesti, a korovske biljke rezervoari fitoplazme, što će u okviru ovih istraživanja biti obrađeno i jasnije definisano.

### **3. Materijal i metode**

Metodološki postupci korišćeni u istraživanjima diverziteta cikada u vinogradima zaraženim stolbur fitoplazmom podeljeni su na terenske i laboratorijske. Sakupljanje cikada, uzoraka vinove loze i korovskih biljaka vršeno je tokom 2012. i 2013. godine, na lokalitetima Strumičkog regiona u Republici Makedoniji. Laboratorijske analize sakupljenog materijala obavljene su u laboratorijama Odseka za štetočine bilja u Zemunu, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu.

#### **3.1. Istraživanja diverziteta cikada na vinovoj lozi i utrini oko vinograda**

Analiza kvalitativnog i kvantitativnog sastava cikada na vinovoj lozi vršena je na pet lokaliteta Strumičkog regiona, u Republici Makedoniji: Hamzali (N 41°29'48.45'' E 22°45'0.44''), Dobrošinci (N 41°31'22.68'' E 22°40'30.50''), Gradošorci (N 41°28'59.28'' E 22°37'30.24''), Petralinci (N 41°28'05.32'' E 22°43'34.43'') i Dobrejci (N 41°27'12.41'' E 22°38'34.78'').

Strumički region se nalazi na 200-300 metara nadmorske visine i pripada grupi regiona u kojima vlada kontinentalno-submediteranska klima. Kao rezultat toga, klimatske uslove karakterišu visoke srednje godišnje temperature, veoma topla i suva leta, kišovite zime i jeseni koje su toplije od proleća.

Vinova loza u vinogradima u kojima su vršena istraživanja gaji se u komercijalne svrhe, sa primenom standardnih agrotehničkih mera i redovnom hemijskom zaštitom. Na lokalitetu Hamzali dominantna analizirana sorta je Smederevka, dok je na lokalitetu Gradošorci i Dobrošinci dominirala sorta Vranac.

Sakupljanje cikada je vršeno na svakih 15 dana, od 1. maja do 1. septembra, 2012. i 2013. godine, u vinogradima i na biljkama spontane flore oko vinograda. Sakupljanje cikada sa biljaka vinove loze i korovskih biljaka između redova i u neposrednoj blizini vinograda, vršeno je entomološkim mrežama i usisavanjem usnim aspiratorom. Uhvaćene jedinke su prebacivane u plastične tubice, sa 96% etanolom i čuvane u laboratorijskim uslovima, u frižideru, na temperaturi od 4 do 8 °C.

Sakupljeni materijal je kvalitativno i kvantitativno analiziran, sa ciljem određivanja faunističkog sastava cikada na vinovoj lozi u Makedoniji.

Vrste su identifikovane na osnovu spoljašnjih morfoloških karakteristika i građe genitalnog aparata mužjaka. Za determinaciju sakupljenih vrsta korišćeni su ključevi sačinjeni od strane Holzinger *et al.*, (2003), odnosno Biedermann i Niedringhaus, (2004). Sakupljeni primerci su preparovani i čuvaju se u zbirci Odseka za štetočine bilja u Zemunu, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu.

### **3.2. Ispitivanje prisustva fitoplazmi u sakupljenim cikadama**

Za ispitivanje prisustva fitoplazmi unutar populacija cikada, insekti su sakupljeni paralelno sa sakupljanjem cikada za kvalitativne i kvantitativne analize, sa pet prethodno opisanih lokaliteta (Dobrošinci, Hamzali, Gradošorci, Petralinci i Dobrejci). Sakupljeni primerci su stavljeni u plastične tubice sa 96% etanolom. U laboratoriji, sakupljene vrste su identifikovane i čuvane u zamrzivaču, na temperaturi od -20°C, do ekstrakcije DNK. PCR metodom ekstrahovana DNK je analizirana na prisustvo fitoplazmi.

### **3.3. Ispitivanje prisustva ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ u vinovoj lozi**

Listovi biljaka vinove loze koji su ispoljavali simptome karakteristične za inficiranost fitoplazmama, sakupljeni su sa šireg područja Strumičkog regiona. Uzorkovani listovi sa pojedinačnih čokota (5-10 po biljci), stavljeni su u plastične zip-kese, koje su zatim obeležene i transportovane do laboratorije. Ovako sačuvan materijal je u laboratoriji razdvojen i po 1 gram tkiva lisnih nerava svakog uzorka, zapakovan je u aluminijumsku foliju, obeležen šifrom uzorka i čuvan na -20°C do ekstrakcije DNK. Primenom PCR metode vršena je analiza ekstrahovane DNK na prisustvo stolbur fitoplazme.

### **3.4. Ispitivanje prisustva fitoplazmi u korovskim biljkama**

Vinogradi predstavljaju višegodišnje agrofitocenoze. Način gajenja loze, tj. primena agrotehničkih i specifičnih ampelotehničkih mera stvaraju posebne agroekološke uslove

koji utiču na formiranje korovskih zajednica vinove loze, sa određenim florističkim sastavom.

Tokom dve godine ispitivanja, na svim lokalitetima, dominantnu korovsku floru u vinogradima i utrini oko vinograda činile su biljke: *Amaranthus retroflexus* L., *Capsella bursa – pastoris* L., *Chenopodium album* L., *Convolvulus arvensis* L., *Cynodon dactylon* L., *Solanum nigrum* L., *Panicum crus – galli* L., *Stellaria media* L., *Urtica dioica* L., *Xanthium strumarium* L. i *Taraxacum officinale* L.

S obzirom da su pojedine korovske biljke, koje su prisutne u vinogradima i na utrinama oko vinograda, alternativni domaćini fitoplazmi, sakupljeni su uzorci biljnih vrsta koje su u literaturi poznate kao rezervoari stolbur fitoplazme. Pojedinačni uzorci biljnog materijala stavljeni su u plastične kesice, obeleženi i transportovani do laboratorije. Koren svake biljke je očišćen i čuvan na temperaturi od -20°C do ekstrakcija DNK. PCR metodom ekstrahovana DNK je analizirana na prisustvo stolbur fitoplazme.

### **3.5. Molekularna detekcija i karakterizacija fitoplazmi**

#### **3.5.1. Ekstrakcija DNK**

##### **3.5.1.1. Ekstrakcija DNK iz insekata**

Ekstrakcija DNK iz pojedinačnih insekata vršena je nedestruktivnom, delimično modifikovanom TES metodom (Mahuku, 2004) koja ima za cilj očuvanje fizičke celovitosti jedinki radi daljih morfoloških analiza. Pojedinačni adultni insekti su punktirani kontrolisano pod binokularom Leica MS5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) sterilnom entomološkom iglom, lateralno, u predelu spoja između prva dva sternita. Punktirane jedinke su prebačene u Eppendorf tubice zapremine 2ml u koje je prethodno sipano 400 µl TES ekstrakcionog pufera (20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 20% SDS) i 4 µl enzima proteinaze K (20 mg/ml) sa ciljem degradacije mekih tkiva insekta. Narednih 12 sati insekti su inkubirani na 56°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije u tubicu je sipana jednaka zapremina hloroforma (400 µl) i centrifugiranjem 10 minuta na 11000 obrtaja na 4°C, izdvojena je DNK. Supernatant je prebačen u novu Eppendorf tubicu zapremine 1.5

ml i prethodni postupak ekstrakcije DNK hloroformom je ponovljen. U narednom koraku izdvojenom supernatantu je dodat izopropanol u istoj zapremini (400  $\mu$ l) što je nakon narednog centrifugiranja od 20 minuta na 12000 obrtaja na 4°C dovelo do taloženja DNK na dnu tubice. Izolovana DNK je isprana 96% etanolom, osušena vazдушnim strujanjem pod sterilnim digestorom i rastvorena u 50  $\mu$ l TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6). Ekstrahovana DNK čuvana je na -20°C.

Iz grupa od po 3–5 imaga ekstrahovane su ukupne nukleinske kiseline po CTAB (cethyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolu ekstrakcije, opisanom od strane Gatineau *et al.*, (2001).

Insekti su homogenizovani u Eppendorf tubicama od 2 ml, u tečnom azotu, korišćenjem Eppendorf Micropistille, nakon čega je dodato 0,4 ml 2%-tnog CTAB pufera (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2%  $\beta$ -mercaptoethanol). Tubice sa homogenizovanim insektima su inkubirane 30 minuta na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije dodata je jednaka količina hloroforma (0,4 ml) i DNK je izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 rpm na 4°C. Supernatant je prebačen u nove Eppendorf tubice zapremine 1,5 ml i korak sa dodavanjem hloroforma još jednom je ponovljen. Dodavanjem jednake količine ledeno-hladnog izopropanola (0,4 ml) i centrifugiranjem 15 minuta na 12000 rpm na 4°C dobija se istaložena DNK. Izolovana DNK isprana je 96% etanolom, osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru i rastvorena u 50  $\mu$ l TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6). Nakon ekstrakcije DNK se čuva u zamrzivaču na -20°C.

### **3.5.1.2. Ekstrakcija DNK iz biljaka**

Ekstrakcija DNK iz biljaka je vršena iz centralnog nerva lista vinove loze i iz korena korovskih biljaka, jer prisustvo inhibitornih materija u listovima korovskih biljaka, ometa odvijanje reakcije detekcije fitoplazmi. Ukupne nukleinske kiseline izolovane su po CTAB protokolu izolacije opisanom od strane Angelini *et al.*, (2001).

Lisni nervi ili koren biljke težine 1 g, svakog uzorka zasebno, usitnjen je u avanu sa tučkom pomoću tečnog azota i homogenizovan u 7ml 3%-tnog CTAB pufera (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2%  $\beta$ -mercaptoethanol). Iz ove

suspenzije izdvojen je 1 ml, prebačen u Eppendorf tubice zapremine 2 ml i inkubiran 20 minuta na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije dodata je jednaka količina hloroforma (1 ml) i DNK je izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 rpm. Supernatant je prebačen u nove Eppendorf tubice zapremine 1,5 ml, dodata je jednaka količina izopropanola (0,75 ml), a zatim je centrifugiranjem od 15 minuta na 11000 rpm 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. Tako ekstrahovana DNK čuvana je u zamrzivaču na -20°C.

### **3.5.2. Utvrđivanje prisustva fitoplazmi PCR/RFLP analizom 16S rRNK**

Ekstrahovana DNK iz uzoraka vinove loze analizirana je metodom lančane reakcije polimeraze [engl. Polymerase Chain Reaction (PCR)]. Utvrđivanje prisustva i identifikacija detektovanih fitoplazmi vršena je amplifikacijom regiona 16S ribozomalne RNK (16S rRNK) sa univerzalnim prajmerima specifičnim za ovu grupu bakterija.

16S rRNK region je umnožen u direktnoj i nested PCR reakciji. U direktnoj reakciji amplifikovan je region koji obuhvata 16S rRNK gen, 16S-23S međugenski region i početak 23S rRNK, ukupne dužine 1800 bp, korišćenjem P1 (Deng and Hiruki, 1991) i P7 (Smart *et al.*, 1996) prajmera (Tabela 1). Za nested reakciju korišćeni su F2n i R2 prajmeri (Lee *et al.*, 1998) (Tabela 1) koji obuhvataju fragment 16S rRNK gena u ukupnoj dužini od oko 1250 bp.

PCR umnožavanje u obe reakcije, direktnoj i nested, vršeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja: Taq pufer (1x), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (300 µM), prajmeri (600 nM), Taq polimeraza (Fermentas) (0.0375 U/µl). U smešu za direktni PCR dodat je 1µl 1:100 razređene biljne DNK ili 1µl koncentrovane DNK insekta. U smešu za nested PCR dodat je 1µl 1:50 razređenog produkta direktne reakcije. Da ne bi došlo do unakrsne kontaminacije tokom pripreme uzoraka stavljana je negativna kontrola (dodatna tubica sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 µl uzorka sipan 1 µl molekularne vode) na svakih 10 uzoraka. Umnožavanje je vršeno u Eppendorf Mastercycler®ep, po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija 94°C 90 s; denaturacija

94°C 1 min, elongacija 50°C 2 min, ekstenzija 72°C 3 min (34 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min. Isti protokol je korišćen za direktni i nested PCR.

Posle završenog umnožavanja 5 µl PCR produkta svakog uzorka pušteno je na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom sa ciljem utvrđivanja prisustva fitoplazmi.

Uzorci u kojima su detektovane fitoplazme analizirani su upotrebom restrikcionih endonukleaza u analizi polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata [engl. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)]. RFLP analiza sintetisanih PCR produkata uzoraka i pozitivnih kontrola referentnih izolata sprovedena je u svrhu određivanja vrste prisutne fitoplazme. PCR produkti F2nR2 fragmenta 16S rRNK gena fitoplazmi isečeni su *Tru1I* (*MseI*) restrikcionom endonukleazom (Fermentas). Digestija je urađena u ukupnoj zapremini od 15 µl RFLP smeše sadržaja: 1x pufer za digestiju, 1U enzima, 1-5 µl PCR produkta u zavisnosti od količine sintetisanih amplifikona i 8-12 µl Molecular Biology Grade Water (Eppendorf). Da bi se osigurala potpuna digestija PCR produkata ona je trajala 16 sati. Temperatura digestije je 65°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Restrikcioni produkti su razdvojeni automatskom kapilarnom elektroforezom, odnosno sistemom QIAxcel advanced (QIAGEN) koristeći eng. *Screenin Gel Cartridge* (QIAGEN) uz sledeće parametre: voltaža injektiranja uzorka 5kV, vreme injektiranja uzorka 30s, voltaža separacije 6kV i vreme separacije 320s. Engl. *QX alignment marker* od 15 bp do 5 kb (QIAGEN) je korišćen za poravnanje dobijenih restrikcionih fragmenata i QX DNK marker FX174/HaeIII (QIAGEN) za poređenje dužine fragmenata. Kao pozitivne kontrole reakcije i kontrole za potrebe daljih analiza utvrđivanja vrste fitoplazmi, korišćene su DNK referentnih izolata fitoplazmi 16SrI-B i I-C podgrupe (Dr. Elisa Angelini, Conegliano, Italija), 16SrII-E podgrupe izolovane iz prirodno inficiranih biljaka *Picris hieracioides* iz Srbije (Mitrović *et al.*, 2012), 16SrIII-B podgrupe izolovane iz prirodno inficiranih biljaka *Cirsium arvense* iz Srbije (Rančić *et al.*, 2005), 16SrX-B (Dr. Bernd Schneider, Dossenheim, Germany) i 16SrV-C i XII-A podgrupe izolovane iz prirodno inficirane vinove loze iz Srbije (Krnjajić *et al.*, 2007; Cvrković *et al.*, 2014).

### 3.5.3. Detekcija ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’

Specifična detekcija stolbur fitoplazme (16SrXII-A) u analiziranim biljkama i cikadama vršena je umnožavanjem Stol11 regiona koji je karakterističan za genom ove fitoplazme (Daire *et al.*, 1997). Stol11 region ima specifičnu nukleotidnu sekvencu kod fitoplazmi vrste '*Candidatus Phytoplasma solani*' (16SrXII-A grupe ili stolbur fitoplazme) u odnosu na sve druge do sada opisane fitoplazme. Stol11 region obuhvata deo gena za sintezu dihidrofolat reduktaze (folA gen) i deo gena koji kodira 1-acil-sn-glicerol-3-fosfat aciltransferazu (plsC gen). Na osnovu amplifikacije ovog genskog regiona utvrđeno je prisustvo stolbur fitoplazme u analiziranom materijalu.

Stol11 region genomske DNK stolbur fitoplazme umnožen je u nested PCR proceduri. Za direktni PCR korišćeni su Stol11f2 i Stol11r1 prajmeri (Daire *et al.*, 1997), a za nested PCR Stol11f3 i Stol11r2 prajmeri (Clair *et al.*, 2003) (Tabela 1) koji umnožavaju segment dužine 720 bp. Umnožavanje DNK u obe reakcije, direktnoj i nested, vršeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja: Taq pufer (1x), MgCl<sub>2</sub> (3mM), dNTPs (300µM), prajmeri (750nM), KAPATaq DNA (Kapabiosystems) (0.0375U/µ). U smešu za direktni PCR dodato je 1µl 1:100 razređene biljne DNK ili 1µl koncentrovane DNK insekta. U smešu za nested PCR dodat je 1µl 1:50 razređenog produkta direktne reakcije. Kao pozitivna kontrola reakcije korišćena je DNK izolovana iz vinove loze prirodno inficirane stolbur fitoplazmom (16SrXII-A). Umnožavanje je vršeno u Eppendorf Mastercycler®ep po sledećem protokolu: aktivacija enzima 10 min na 95°C; inicijalna denaturacija 92°C 90 s; denaturacija 92°C 40 s, elongacija 55°C 40 s, ekstenzija 72°C 70 s (30 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 5 min. Isti protokol je korišćen za direktni i za nested PCR.

Posle završenog umnožavanja, 5 µl PCR produkta svakog uzorka, uključujući i pozitivnu i negativne kontrole, su razdvojeni elektroforetski na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom, da bi se utvrdilo u kojim uzorcima je umnožen specifični region '*Candidatus Phytoplasme solani*'. Gel je vizualiziran pod UV transiluminatorom.

#### **3.5.4. Molekularna karakterizacija izolata '*Candidatus Phytoplasma solani*'**

Molekularna karakterizacija, odnosno određivanje genotipa stolbur fitoplazme u analiziranom biljnom i insekatskom materijalu vršena je PCR-RFLP metodom i



sekvenciranjem tri genska regiona: konzervativnog *tuf* gena koji kodira elongation faktor Tu (EF-Tu) i funkcionalno učestvuje u procesu translacije (Schneider *et al.*, 1997) i dva varijabilna membranska proteina (*vmp1* gen i *stamp* gen).

#### 3.5.4.1. Analiza *tuf* gena

Karakterizacija *tuf* gena faktora elongacije Tu (EF-Tu) koji učestvuje u procesu translacije izvršena je PCR-RFLP metodom i analizom nukleotidnih sekvenci ovog gena u dužini od 940 bp.

U direktnoj PCR reakciji korišćeni su Tuf1f i Tuf1r prajmeri, a u nested reakciji TufAYf i TufAYr prajmeri (Langer i Maixner, 2004) (Tabela 1), koji umnožavaju segment genomske DNK fitoplazme dužine 940 bp. Umnožavanje *tuf* gena u obe reakcije, direktnoj i nested, vršeno je u zapremini od 20 µl PCR smeše sadržaja: *Taq* pufer (1x), MgCl<sub>2</sub> (2mM), dNTPs (200µM), prajmeri (400nM), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) (0.0375U/µ). U smešu za direktni PCR dodato je 1µl 1:100 razređene biljne DNK ili 1µl koncentrovane DNK insekta. U smešu za nested PCR dodat je 1µl 1:50 razređenog produkta direktne reakcije. Umnožavanje je vršeno u Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup>ep po istom protokolu za direktni i nested PCR: aktivacija enzima 10 min na 95°C; inicijalna denaturacija 95°C 2 min; denaturacija 95°C 30 s, elongacija 45°C 1 min, ekstenzija 72°C 90 s (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 5 min. Na svakih 10 uzoraka stavljena je jedna negativna kontrola.

Posle umnožavanja dobijeni produkti su digestovani *Hpa*II restrikcionom endonukleazom (Fermentas). Digestija je vršena u ukupnoj zapremini od 15µl RFLP smeše sadržaja: 1x pufer za digestiju, 1U enzima, 1-5µl PCR produkta u zavisnosti od količine sintetisanih amplikona i 8-12µl Molecular Biology Grade Water (Eppendorf). Digestija je trajala 16 sati na temperaturi od 37°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Restrikcioni produkti su razdvojeni automatskom kapilarnom elektroforezom, QIAxcel advanced (QIAGEN) po prethodno opisanoj proceduri. Kao pozitivne kontrole za oba profila (*tuf-a* i *tuf-b*) korišćene su DNK stolbur fitoplazme koje potiču od prirodno inficiranih jedinki *H. obsoletus* iz Mosel regiona u Nemačkoj (obebeđeno od strane Dr Michael Maixner, Bernkastel-Kues). Nested produkti izolata sa nepotpuno definisanim *tuf*-tipom su

podvgnuti sekvencioniranju u oba smera od strane MacroGen Inc. (Seul, Južna Koreja). Dobijene sekvence su pročitane korišćenjem softvera FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Poređenje sekvenci i utvrđivanje nukleotidnih razlika je izvršeno korišćenjem programskog paketa Clustal W integrisanog u softver MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

#### 3.5.4.2. Analiza *vmp1* gena

Karakterizacija *vmp1* gena koji kodira varijabilni membranski protein stolbur fitoplazme izvršena je PCR-RFLP metodom. *Vmp1* gen stolbur fitoplazme umnožen je u nested PCR proceduri. U direktnoj reakciji korišćeni su StolH10F1 i StolH10R1 prajmeri, a u nested reakciji TYPH10F i TYPH10R prajmeri (Tabela 1) (Murolo *et al.*, 2010) koji umnožavaju segment genomske DNK fitoplazme koji je varijabilan u dužini. Dužina *vmp1* regiona kod referentnog PO izolata stolbur fitoplazme na osnovu kog je definisan ovaj marker gen je 1200bp (Cimerman *et al.*, 2009), međutim u kasnijim studijama je utvrđeno da je ovaj region najčešće dužine 1450bp, a može biti i do 1700 bp (Fialová *et al.*, 2009; Murolo *et al.*, 2010). Umnožavanje *vmp1* gena u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u zapremini od 20 µl PCR smeše sadržaja: *Taq* pufer (1x), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), dNTPs (300 µM), prajmeri (750 nM), KAPA*Taq* polimeraza (KAPA Biosystems) (0.0375 U/µl). U smešu za direktni PCR dodato je 1µl 1:100 razređene biljne DNK ili 1µl koncentrovane DNK insekta. U smešu za nested PCR dodat je 1µl 1:50 razređenog produkta direktne reakcije. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler®ep po protokolu za direktni PCR: inicijalna denaturacija 4 min na 94°C; denaturacija 94°C 30 sec, elongacija 52°C 30 sec, ekstenzija 72°C 120 sec (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min; protokol za nested PCR: inicijalna denaturacija 4 min na 94°C; denaturacija 94°C 30 sec, elongacija 52°C 30 sec, ekstenzija 72°C 90 sec (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min.

Posle umnožavanja dobijeni produkti su analizirani sa *RsaI* restrikcijom endonukleazom (Fermentas). Izolati V2 *vmp1* profila dodatno su okarakterisani digestijom sa dva enzima *TaqI* i *AluI* prema metodologiji razlikovanja V2 od V2-TA *vmp1*-profila definisanoj prema Cvrković *et al.*, 2014. Digestija je vršena u ukupnoj zapremini od 15µl RFLP smeše sadržaja: 1x pufer za digestiju, 1U enzima, 1-5µl PCR produkta u zavisnosti

od količine sintetisanih amplicona i 8-12 $\mu$ l Molecular Biology Grade Water (Eppendorf). Digestija je trajala 16 sati na temperaturi od 37°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Restrikcioni produkti su razdvojeni automatskom kapilarnom elektroforezom, odnosno sistemom QIAxcel advanced (QIAGEN) po prethodno opisanoj proceduri. Kao pozitivne kontrole korišćeni su izolati stolbur fitoplazme koji potiču iz prirodno inficiranih biljaka vinove loze i cikade *R. panzeri* (Cvrković *et al.*, 2014) kao i izolati obezbeđeni od strane Dr Xavier Foissac (Bordeaux-France) (Fig. 1).

### 3.5.4.3. Analiza *stamp* gena

Prilikom amplifikovanja *stamp* gena za direktni PCR korišćeni su StampF i StampR0 prajmeri, a za nested PCR StampF1 i StampR1 prajmeri (Fabre *et al.*, 2011), koji umnožavaju segment genomske DNK dužine 637 bp (Tabela 1). Umnožavanje *stamp* gena u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u zapremini od 20  $\mu$ l PCR smeše sadržaja: *Taq* pufer (1x), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), dNTPs (300  $\mu$ M), prajmeri (750 nM), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) (0.0375 U/ $\mu$ ). U smešu za direktni PCR dodato je 1 $\mu$ l 1:100 razređene biljne DNK ili 1 $\mu$ l koncentrovane DNK insekta. U smešu za nested PCR dodat je 1 $\mu$ l 1:50 razređenog produkta direktne reakcije. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler®ep po protokolu za direktni PCR: inicijalna denaturacija 4 min na 94°C; denaturacija 94°C 30 sec, elongacija 52°C 30 sec, ekstenzija 72°C 90 sec (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 7 min; protokol za nested PCR: inicijalna denaturacija 4 min na 94°C; denaturacija 94°C 30 sec, elongacija 52°C 30 sec, ekstenzija 72°C 60 sec (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 7 min.

Nakon amplifikacije, PCR produkti uzoraka određeni za sekvenciranje gena, su prečišćeni pomoću QIAquick® PCR Purification Kit-a (QIAGEN), prateći uputstva proizvođača. Prečišćeni uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu da bi se proverila čistoća uzoraka, njihova molekulska težina i količina sintetisane DNK. Količina umnoženih fragmenata *stamp* gena u svakom uzorku određena je poređenjem dobijenih produkata sa fragmentima komercijalnog markera 100 Bp DNA Ladder (SERVA).

Reakcije sekvenciranja amplicona su urađene u Macrogen Inc. (Južna Koreja) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvenatoru. Umnoženi *stamp* gen stolbur

fitoplazme uzoraka sekvenciran je u jednom smeru upotrebom StampF1 prajmera (Tabela 1). Provera kvaliteta sekvenci i njihovo prevođenje u FASTA format je urađeno u programu FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Poređenje sekvenci sa referentnim *stamp* sekvencama (Fabre *et al.*, 2011; Johannesen *et al.*, 2012; Aryan *et al.*, 2014; Cvrković *et al.*, 2014) i utvrđivanje nukleotidnih razlika je izvršeno pomoću CLUSTAL W programa integrisanog unutar MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

Za filogenetske analize korišćen je GTR+I+G model nukleotidne supstitucije, koji je određen programom jModeltest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012), na osnovu kriterijuma AIC (Akaike information criterion). U cilju dobijanja što celovitijih rezultata, korišćene su dve metode filogenetskih analiza: Monte Karlo metoda na bazi Markovljevih lanaca (MCMC) i metoda maksimalne parsimonije (Maximum-parsimony). Program MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) korišćen je sa sledećim podešavanjima: dva simultana ponavljanja MCMC lanaca po 1 milion generacija, sa frekvencijom od 100 generacija pri čemu je odbačeno prvih 25% rezultata (burn-in). Ispravnost analize, odnosno konvergencija MCMC lanaca, kao i stacionarnost proverena je korišćenjem programa Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). Analiza maksimalne parsimonije je sprovedena u programu PAUP\* 4.0b10 (Swofford 2002), sa 100 replikacija, korišćenjem TBR (tree bisection–reconnection) metode potrage za najboljim stablom. Stabla dobijena na osnovu obe analize su predstavljena u programu FigTree 1.4 (Rambaut, 2012).

Tabela 1. Spisak korišćenih prajmera za utvrđivanje prisustva i molekularnu karakterizaciju fitoplazmi.

<b>Region</b>	<b>Naziv prajmera</b>	<b>Sekvenca prajmera u 5'- 3' smeru</b>
<b>16SrRNK</b>	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
	F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG
	R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG
<b>Stol11</b>	Stol11f2	TATTTTCCTAAAATTGATTGGC
	Stol11r1	TGTTTTTGCACCGTTAAAGC
	Stol11f3	ACGAGTTTTGATTATGTTTAC
	Stol11r2	GATGAATGATAACTTCAACTG
<b>Tuf</b>	Tuf1f	CACATTGACCACGGTAAAAC
	Tuf1r	CCACCTTCACGAATAGAGAAC
	TufAYf	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA
	TufAYr	CGTTGTCACCTGGCATTACC
<b>Stamp</b>	StampF	GTAGGTTTTGGATGTTTTAAG
	StampR0	AAATAAAAGAACAAGTATAGACGA
	StampF1	TTCTTTAAACACACCAAGAC
	StampR1	AAGCCAGAATTTAATCTAGC
<b>Vmp 1</b>	StolH10F1	AGGTTGTAATACTTTTATGT
	StolH10R1	GCGGATGGCTTTTCATTATTTGAC
	StolH10F2	TGTCACAGGGAAACAGACAG
	StolH10R2	CACAAACATGATGATTATCAACGA

## **4. Rezultati**

### **4.1. Diverzitet cikada na vinovoj lozi i utrini oko vinograda u regionu Strumice**

Analiza diverziteta cikada u vinogradima i utrini oko vinograda sprovedena je na pet lokaliteta u regionu Strumice: Hamzali, Gradošorci, Dobrošinci, Petralinci i Dobrejci. Rezultati kvantitativnih analiza zasnovani su na 1263 sakupljene jedinke (Tabela 2) iz podreda Auchenorrhyncha. Jedinke su sakupljene metodom košenja i usisavanjem pomoću usnog aspiratora.

Tabela 2. Pregled vrsta i broj sakupljenih jedinki na analiziranim lokalitetima.

Vrsta	Hamzali	Dobrošinci	Gradošorci	Dobrejci	Petralinci
<i>Hyalesthes obsoletus</i>	138	0	0	49	49
<i>Reptalus quinquecostatus</i>	1	0	1	2	1
<i>Kelisia</i> sp.	2	0	0	0	1
<i>Dictyophara europaea</i>	20	0	10	3	3
<i>Issus</i> sp.	19	8	7	11	18
<i>Philaenus spumarius</i>	11	2	0	0	0
<i>Macropsis fuscula</i>	2	0	4	0	0
<i>Anaceratagallia ribauti</i>	8	2	0	2	5
<i>Dryodurgades reticulatus</i>	0	1	0	0	0
<i>Aphrodes diminuta</i>	0	7	0	0	0
<i>Aphrodes makarovi</i>	5	7	0	0	0
<i>Aphrodes</i> sp.	4	0	0	0	1
<i>Cicadella viridis</i>	9	4	0	0	10
<i>Typhlocyba</i> sp.	5	0	0	5	0
<i>Fieberiella septentrionalis</i>	2	0	3	0	2
<i>Nealiturus fenestratus</i>	2	0	0	0	0
<i>Macrosteles</i> sp.	0	0	0	0	1
<i>Doratura impudica</i>	7	6	0	4	2
<i>Platymetopius guttatus</i>	1	0	0	0	0
<i>Allygus</i> cf. <i>mixtus</i>	6	0	1	0	0
<i>Allygus communis</i>	1	0	0	0	0
<i>Allygidius commutatus</i>	0	0	0	1	0
<i>Euscelis incisus</i>	75	27	0	4	7
<i>Artianus manderstjernii</i>	94	77	71	4	79
<i>Psammotettix alienus</i>	178	88	64	0	17
<i>Jasargus obtusivalvis</i>	0	1	0	0	0
<i>Enantiocephalus cornutus</i>	0	1	0	0	0
<b>Ukupno</b>	<b>590</b>	<b>231</b>	<b>161</b>	<b>85</b>	<b>196</b>

Nakon razdvajanja i determinacije vrsta, na osnovu ključeva sačinjenih od strane Holzinger *et al.*, (2003), odnosno Biedermann i Niedringhaus (2004), utvrđeno je prisustvo 22 vrste cikada u okviru 6 familija, a 5 taksona je određeno do nivoa roda (Tabela 3). Većina evidentiranih vrsta, ukupno 21, pripadaju familiji Cicadellidae, 2 vrste su iz familije Cixiidae i po jedan predstavnik iz familija Aphrophoridae, Delphacidae, Dictyopharidae i Issidae.

Tabela 3. Registrovane vrste cikada u vinogradima i utrini oko vinograda na analiziranim lokalitetima.

Familija	Subfamilija	Vrsta	
Cixiidae	Cixiinae	<i>Hyalesthes obsoletus</i> Signoret, 1865	
		<i>Reptalus quinquecostatus</i> (Dufour, 1833)	
Delphacidae	Delphacinae	<i>Kelisia</i> sp.	
Dictyopharidae	Dictyopharidae	<i>Dictyophara europaea</i> (Linnaeus, 1767)	
Issidae	Issinae	<i>Issus</i> sp.	
Aphrophoridae	Aphrophorinae	<i>Philaenus spumarius</i> (Linnaeus, 1758)	
Cicadellidae	Macropsinae	<i>Macropsis fuscula</i> (Zetterstedt, 1828)	
		<i>Anaceratagallia ribauti</i> (Ossiannilsson, 1938)	
		<i>Dryodurgades reticulatus</i> (Herrich-Schäffer, 1834)	
	Aphrodinae	<i>Aphrodes diminuta</i> Ribaut, 1952	
		<i>Aphrodes makarovi</i> Zachvatkin, 1948	
		<i>Aphrodes</i> sp.	
		Cicadellinae	<i>Cicadella viridis</i> (Linnaeus, 1758)
		Typhlocibinae	<i>Typhlocyba</i> sp.
	Dectoepnalinae	<i>Fieberiella septentrionalis</i> Wagner, 1963	
		<i>Nealiturus fenestratus</i> (Herrich-Schäffer, 1834)	
		<i>Macrosteles</i> sp.	
		<i>Doratura impudica</i> Horváth, 1897	
		<i>Platymetopius guttatus</i> Fieber, 1869	
<i>Allygus</i> cf. <i>mixtus</i> (Fabricius, 1794)			
<i>Allygus communis</i> (Ferrari, 1882)			
<i>Allygidius commutatus</i> (Fieber, 1872)			
<i>Euscelis incisus</i> (Kirschbaum, 1858)			
<i>Artianus manderstjernii</i> (Kirschbaum, 1868)			
<i>Psammotettix alienus</i> (Dahlbom, 1850)			
<i>Jasargus obtusivalvis</i> (Kirschbaum, 1868)			
<i>Enantiocephalus cornutus</i> Herrich-Schaeffer, 1838			



Iz analiza se može zaključiti da je najveći diverzitet cikada na lokalitetu Hamzali. Od svih navedenih vrsta (Tabela 3) na ovom lokalitetu nisu utvrđene sledeće vrste: *Dryodurgades reticulatus*, *Aphrodes diminuta*, *Macrosteles* sp., *Allygidius commutatus*, *Jasargus obtusivalvis* i *Enantiocephalus cornutus*.

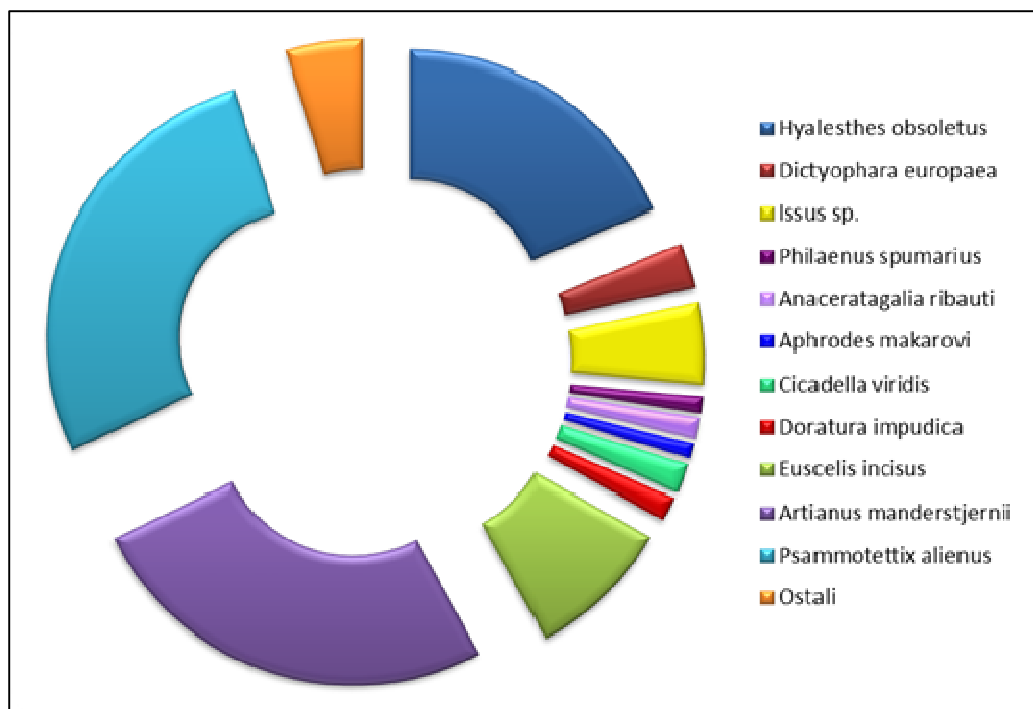
Na lokalitetu Dobrošinci nije utvrđeno prisustvo: *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus quinquecostatus*, *Kelisia* sp., *Dictyophara europaea*, *Macropsis fuscula*, *Aphrodes* sp., *Typhlocyba* sp., *Fieberiella septentrionalis*, *Neoliturus fenestratus*, *Macrosteles* sp., *Platymetopius guttatus*, *Allygus cf. mixtus*, *Allygus communis* i *Allygidius commutatus*.

Lokalitet Gradošorci ima najmanji diverzitet cikada, gde su utvrđene samo vrste: *Reptalus quinquecostatus*, *Dictyophara europaea*, *Macropsis fuscula*, *Fieberiella septentrionalis*, *Allygus cf. mixtus*, *Artianus manderstjernii*, *Psammotettix alienus* i 7 jedinki iz roda *Issus*.

Lokalitet Dobrejci karakteriše prisustvo sledećih vrsta cikada: *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus quinquecostatus*, *Allygidius commutatus*, *Euscelis incisus*, *Artianus manderstjernii*, *Anaceratagallia ribauti*, *Doratura impudica*, *Dictyophara europaea* i vrste iz rodova *Issus* i *Typhlocyba*.

Na lokalitetu Petralinci determinisane su vrste: *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus quinquecostatus*, *Dictyophara europaea*, *Anaceratagallia ribauti*, *Cicadella viridis*, *Fieberiella septentrionalis*, *Doratura impudica*, *Euscelis incisus*, *Artianus manderstjernii*, *Psammotettix alienus* kao i vrste rodova *Kelisia*, *Issus*, *Aphrodes* i *Macrosteles*.

Na svih pet lokaliteta najzastupljena vrsta je *P. alienus* (27,5%), zatim *A. manderstjernii* (25,7%) i *H. obsoletus* (18,7%). Vrsta *E. incisus* je zastupljena sa 8,9%, vrste iz roda *Issus* sp., sa 5,0%, vrsta *D. europaea* sa 2,9%, vrsta *C. viridis* sa 1,8%, *D. impudica* sa 1,5%, *A. ribauti* sa 1,3%. Vrste *P. spumarius* i *Aphrodes makarovi* su zastupljene sa 1%. Ostale vrste imaju stopu zastupljenosti manju od 1% (Grafik 1).



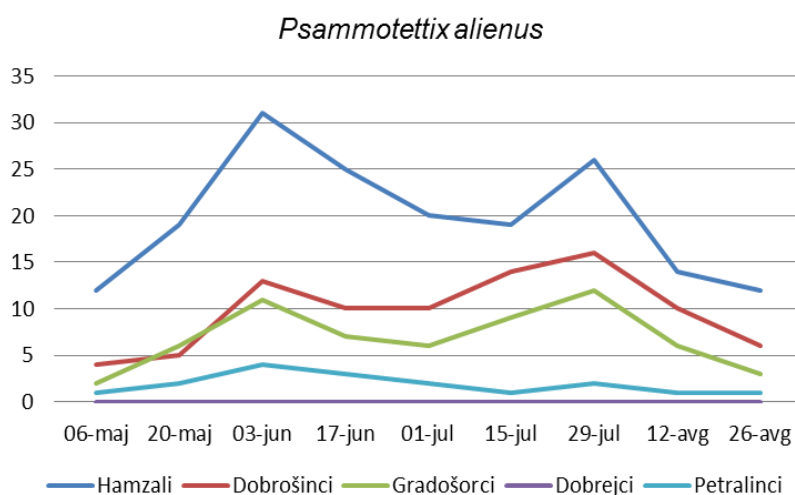
Grafik 1. Zastupljenost vrsta cikada na svim analiziranim lokalitetima u 2012. i 2013. godini.

Vrsta *P. alienus* (Slika 1) je u vinogradima i okolnoj utrini bila prisutna od početka maja do početka septembra. Uočena su dva maksimuma u brojnosti populacije *P. alienus* početkom juna i avgusta, ukazujući na postojanje 2 generacije godišnje koje se preklapaju.



Slika 1. Izgled imaga *Psammotettix alienus*.

Ova vrsta predstavlja pionirsku vrstu sunčanih, kserotermnih staništa, staništa pod intenzivnim antropogenim dejstvom, a posebno visoko nadubrenih livada i oranica. Kao glavne biljke domaćini ove vrste navode se razne vrste trava, tako da je njen nalaz na biljkama utrina oko vinograda u visokoj brojnosti bio očekivan (Grafik 2).

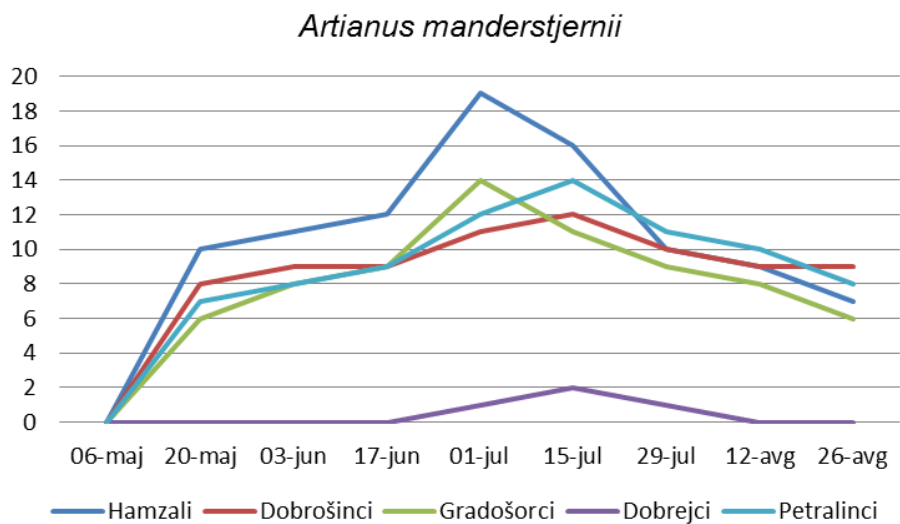


Grafik 2. Dinamika populacije vrste *P. alienus* u vinogradima i utrinama na analiziranim lokalitetima.

Na svim analiziranim lokalitetima, vrsta *A. manderstjernii* (Slika 2) je bila prisutna u vinogradima tokom cele vegetacije. Maksimum brojnosti je dostigla u prvoj polovini jula, nakon čega joj je brojnost opadala.



Slika 2. Izgled imaga *Artianus manderstjernii*.



Grafik 3. Dinamika populacije vrste *A. manderstjernii* u vinogradima i utrinama na analiziranim lokalitetima.

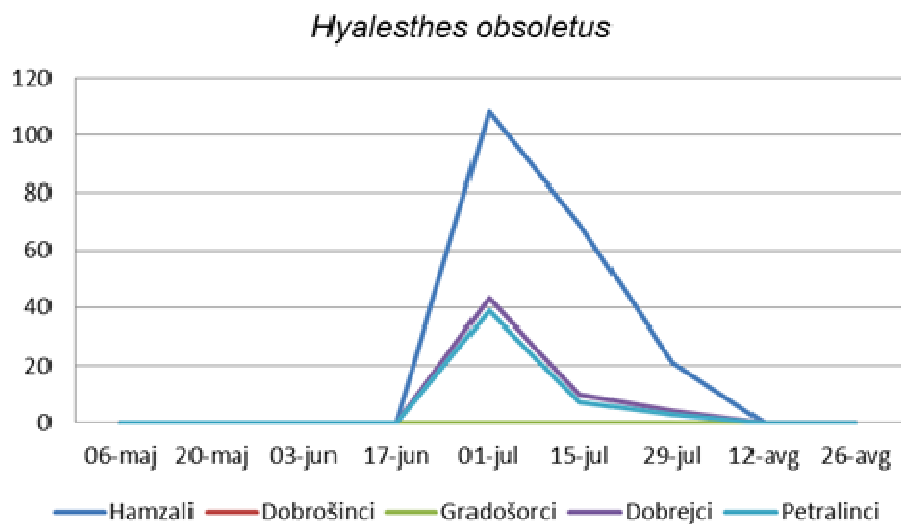
Ova vrsta je vezana za umereno suva, peščana staništa. Kao glavne biljke domaćini vrste *A. manderstjernii* navode se razne vrste porodice Poaceae, što je u skladu sa pojavom velikog broja jedinki ove vrste na biljkama utrina oko vinograda (Grafik 3).

Vrsta *H. obsoletus* (Slika 3) registrovana je na lokalitetima Hamzali, Dobrejci i Petralinci, dok njeno prisustvo nije zabeležano u Gradošorcima i Dobrošincima. Ova vrsta ima jednu generaciju godišnje i prezimljava u stadijumu larve u zemlji.



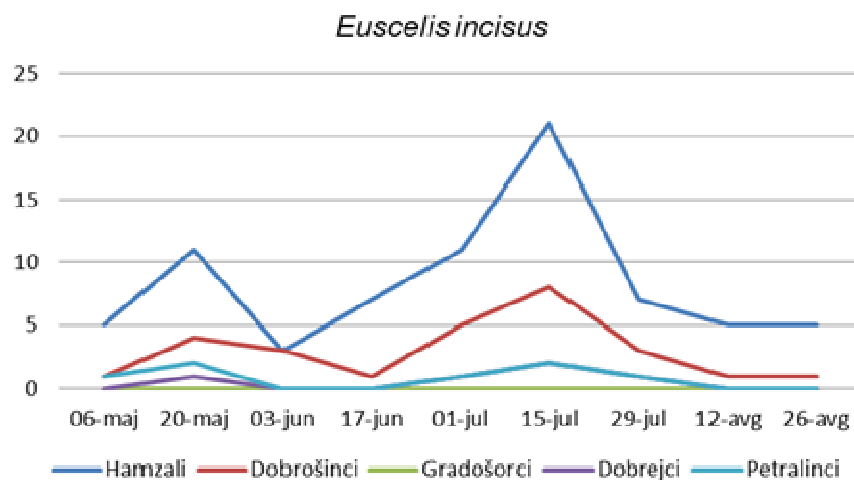
Slika 3. Izgled imaga *Hyalesthes obsoletus*.

U analiziranom vinogradu vrsta *H. obsoletus* je zabeležana na korovskim biljkama između čokota vinove loze i na utrini oko vinograda. Na lokalitetima Petralinci i Dobrejci sakupljena je sa biljaka koprive i poponca. Imaga su se pojavila sredinom juna dok su maksimum brojnosti dostigli početkom jula. Nakon toga brojnost je opadala, tako da do sredine avgusta vrsta nije ni bila prisutna u vinogradu (Grafik 4).



Grafik 4. Dinamika populacije vrste *H. obsoletus* u vinogradima i utrini na analiziranim lokalitetima.

Vrsta *E. incisus* (Slika 4) je registrovana na lokalitetima Hamzali, Dobrošinci, Dobrejci i Petralinci. Ova cikada je u vinogradima i utrini oko vinograda bila prisutna od početka maja do početka septembra. Mogu se uočiti dva maksimuma u brojnosti populacija ove vrste (20. maj i 15. jul), što ukazuje na postojanje dve generacije godišnje (Grafik 5).



Grafik 5. Dinamika populacije vrste *E. incisus* u vinogradima i utrinama na analiziranim lokalitetima.

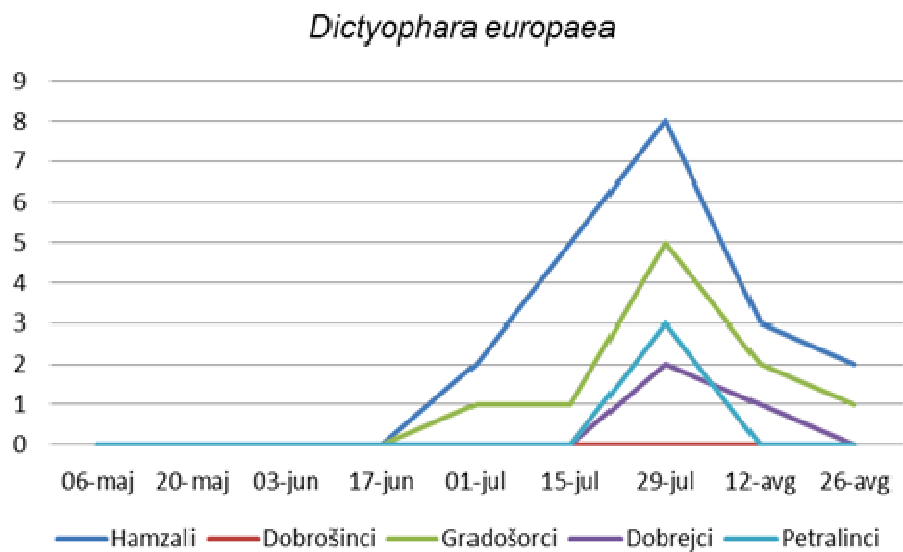
*Euscelis incisus* je izuzetno polifagna vrsta koja se nalazi na sunčanim, umereno vlažnim i vlažnim staništima, uglavnom livadama, pašnjacima, vrtovima i parkovima. Izražen je sezonski dimorfizam, koji se ogleda u različitoj obojenosti imaga i larvi. Njegove glavne biljke domaćini su vrste iz familija Fabaceae i Poaceae, što je u skladu sa pojavom velikog broja jedinki ove vrste na biljkama utrina oko vinograda. Identifikovan je i kao vektor raznih bolesti izazvanih fitoplazmama (Clover phyllody – CP, Clover dwarf – CD, Stolbur) (Nickel, 2003).



Slika 4. Zimska i letnja forma vrste *Euscelis incisus*.

Vrsta *D. europaea* je registrovana na lokalitetima Hamzali, Gradošorci, Dobrejci i Petralinci. Prema grafiku dinamike populacije, njeno prisustvo u vinogradima i utrinama oko vinograda, na analiziranim lokalitetima, je zabeležano početkom jula. Sve do kraja jula njena brojnost je rasla, kada je dostigla maksimum. Posle toga brojnost polako opada, ali je bila prisutna u utrini oko vinograda sve do kraja avgusta (Grafik 6).





Grafik 6. Dinamika populacije vrste *D. europaea* u vinogradima i utrinama na analiziranim lokalitetima.

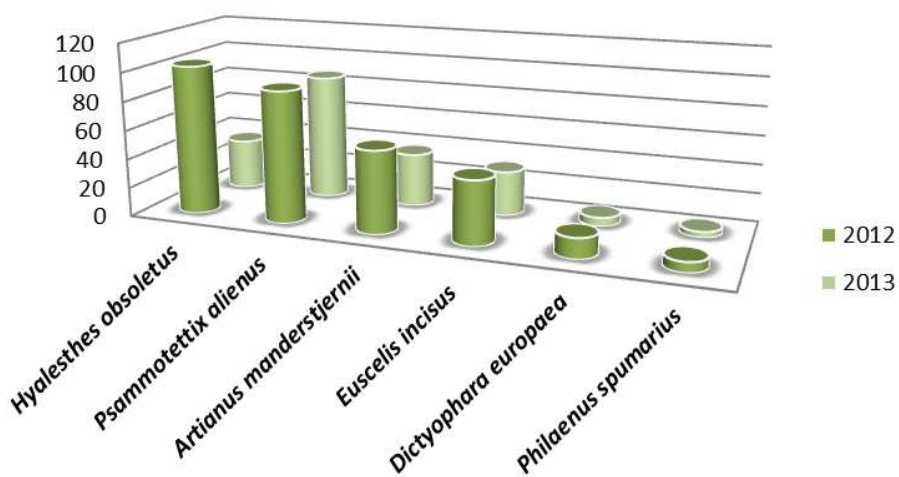
Po literaturi, *D. europaea* (Slika 5) je vezana za sunčana, kserotermna staništa na različitim supstratima. Smatra se da je polifagna vrsta, koja se obično sreće na dikotiledonim travama, ali je zabeležana i na žbunastim i drvenastim biljkama, pa je njeno prisustvo u utrini oko vinograda bilo očekivano.



Slika 5. Izgled imaga i drugi larveni stupanj vrste *Dictyophara europaea*.

#### 4.1.1. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Hamzali

Lokalitet Hamzali se pokazao kao mesto sa najbogatijim diverzitetom cikada. U vinogradu na teritoriji Hamzali, konstatovano je prisustvo 17 vrsta cikada, kao i vrste iz rodova *Aphrodes*, *Issus*, *Kelisia* i *Typhlocyba*. Sakupljeno je ukupno 356 jedinki u 2012. i 234 jedinke u 2013. godini. Dominantne vrste su bile: *P. alienus*, sa sakupljenim 91 primerkom u 2012. i 87 u 2013. godini; *H. obsoletus*, sa sakupljenih 103 primeraka u 2012. i 35 primeraka u 2013. godini; *A. manderstjernii*, sa sakupljenih 57 primeraka u 2012. i 37 u 2013. godini i *E. incisus* sa sakupljenih 44 jedinki u 2012. i 31 u 2013. godini. Vrste *D. europaea* i *P. spumarius* su imale brojnost od 10 do 30 jedinki. Ostale vrste su bile prisutne sa brojnošću manjom od 10 jedinki u toku cele sezone (populacije niske brojnosti) (Grafik 7).

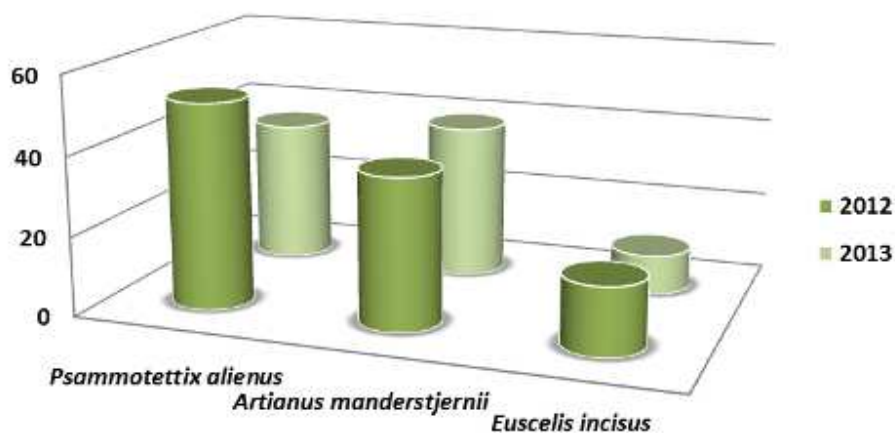


Grafik 7. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Hamzali u 2012. i 2013. godini.

#### 4.1.2. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu

##### Dobrošinci

U vinogradu na teritoriji Dobrošinaca konstatovano je prisustvo 12 vrsti cikada i vrsti iz roda *Issus*. Sakupljena je ukupno 231 jedinka, odnosno 137 jedinki u 2012. i 94 jedinki u 2013. godini. Dominantne vrste su bile: *P. alienus*, sa sakupljenih 52 primeraka u 2012. i 36 u 2013. godini i vrsta *A. manderstjernii*, sa sakupljenih 38 primeraka u 2012. i 39 u 2013. godini. Vrsta *E. incisus* je imala srednju brojnost sa sakupljenih 17 primeraka u 2012. i 10 u 2013. godini. Ostale vrste bile su prisutne sa brojnošću manjom od 10 jedinki u toku cele sezone (populacije niske brojnosti) (Grafik 8).



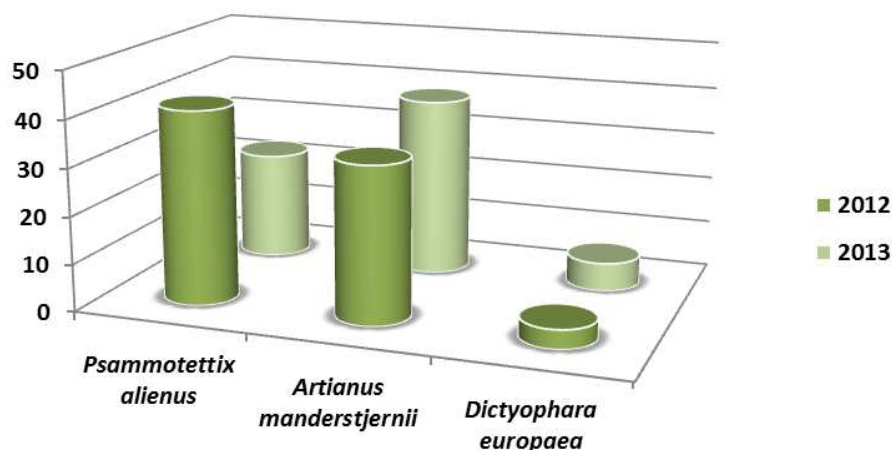
Grafik 8. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Dobrošinci u 2012. i 2013. godini.

#### 4.1.3. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu

##### Gradošorci

Vinograd na teritoriji Gradošorci je pokazao najslabiji diverzitet cikada. Zabeleženo je prisustvo samo 7 vrsta cikada, kao i vrste iz roda *Issus*. Tokom 2012. i 2013. godine sakupljena je ukupno 161 jedinka, odnosno 79 jedinki u 2012. i 82 jedinke u 2013. godini. Dominantne vrste su bile: *A. manderstjernii*, sa sakupljenih 33 primeraka u 2012. i 38 u 2013. godini i vrsta *P. alienus*, sa sakupljenim 41 primerkom u 2012. i 23 u 2013. godini.

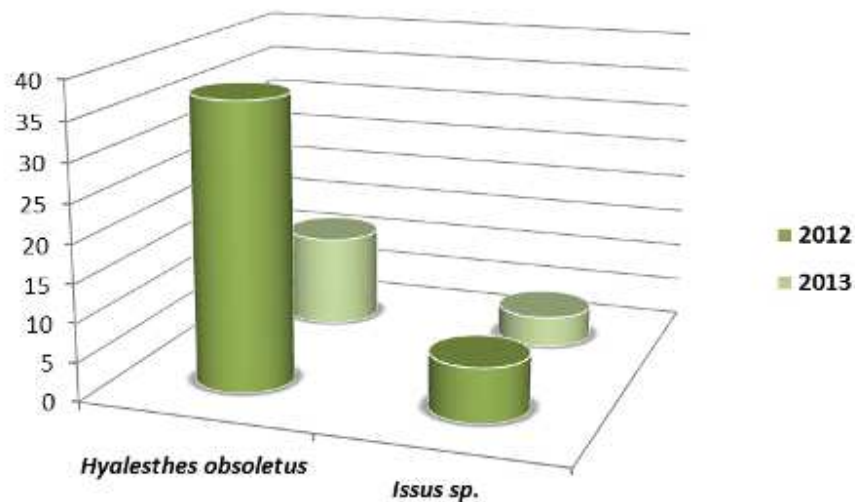
Ukupno sakupljenih jedinki vrste *D. europaea* je bilo 10, odnosno 2 primerka u 2012. i 8 primeraka u 2013. godini. Ostale vrste bile su prisutne sa brojnošću manjom od 10 jedinki u toku cele sezone (populacije niske brojnosti) (Grafik 9).



Grafik 9. Vrste cikada i njihova brojnost u vinogradu na lokalitetu Gradošorci u 2012. i 2013. godini.

#### 4.1.4. Vrste cikada i njihova brojnost na lokalitetu Dobrejci

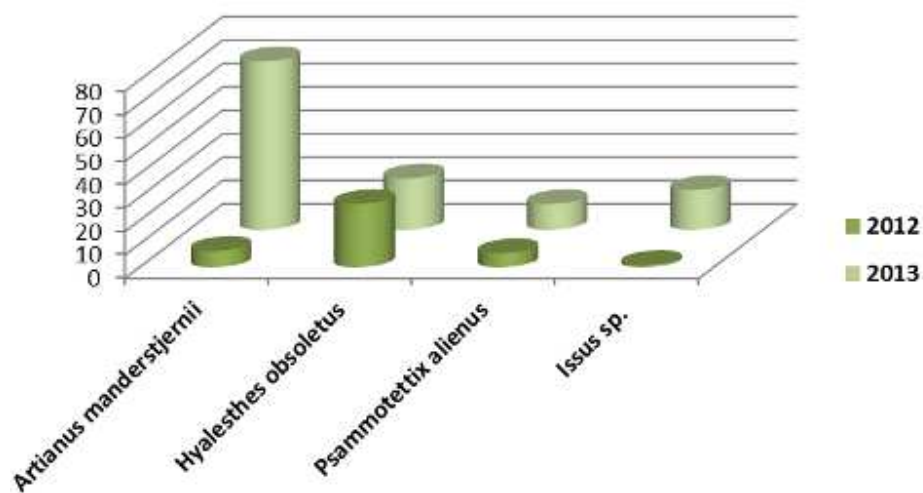
Na lokalitetu Dobrejci registrovano je ukupno 8 vrsti cikada i vrste iz rodova *Typhlocyba* i *Issus*. Sakupljeno je ukupno 85 jedinki, odnosno 52 jedinke u 2012. i 33 u 2013. godini. Dominantna vrsta je bila *H. obsoletus*, sa ukupno sakupljenih 49 primeraka, odnosno 37 u 2012. i 12 u 2013. godini. Vrste iz roda *Issus* su imale brojnost od 11 primeraka tokom dve godine ispitivanja, sa sakupljenih 7 primeraka u 2012. i 4 u 2013. godini. Ostale vrste bile su prisutne sa brojnošću manjom od 10 jedinki u toku cele sezone (populacije niske brojnosti) (Grafik 10).



Grafik 10. Vrste cikada i njihova brojnost na lokalitetu Dobrejci u 2012. i 2013. godini.

#### 4.1.5. Vrste cikada i njihova brojnost na lokalitetu Petralinci

Na lokalitetu Petralinci, registrovano je ukupno 10 vrsti cikada kao i vrste iz rodova *Aphrodes*, *Kelisia*, *Macrosteles* i *Issus*. Sakupljeno je ukupno 196 jedinke, odnosno 50 jedinki u 2012. i 146 jedinki u 2013. godini. Dominantna vrsta je bila *A. manderstjernii* sa ukupno sakupljenih 79 primeraka, odnosno 7 u 2012. i 72 u 2013. godini. Druga po brojnosti je bila vrsta *H. obsoletus*, sa sakupljenih 27 primeraka u 2012. i 22 u 2013. godini. Brojnost vrste *P. alienus* je bila 6 jedinki u prvoj, odnosno 11 u drugoj godini ispitivanja. Vrste iz roda *Issus* su imale brojnost od 18 primeraka tokom dve godine ispitivanja, sa sakupljenim jednim primerkom u 2012. i 17 u 2013. godini. Ostale vrste bile su prisutne sa brojnošću manjom od 10 jedinki u toku cele sezone (Grafik 11).



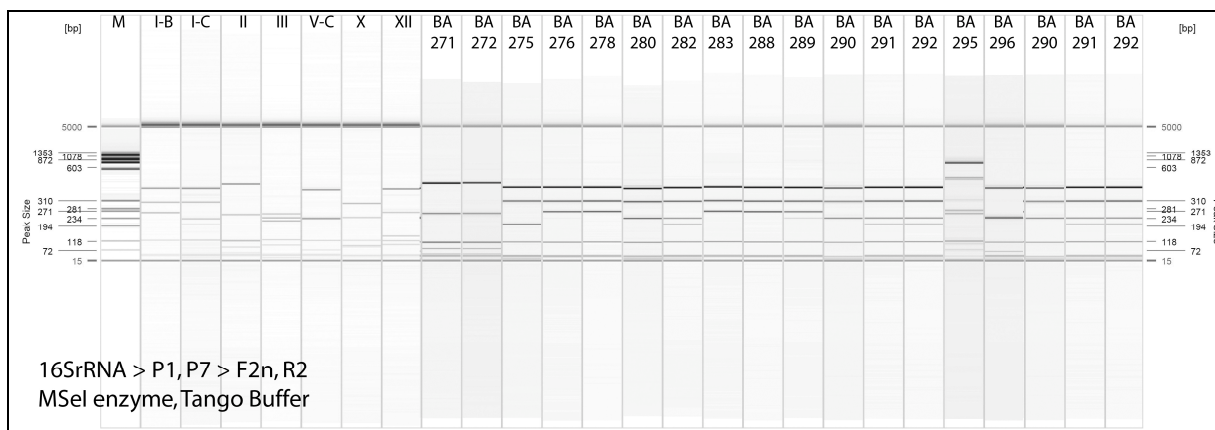
Grafik 11. Vrste cikada i njihova brojnost na lokalitetu Petralinci u 2012. i 2013. godini.

#### 4.2. Prisustvo fitoplazmi u populacijama cikada

Zbog visoke brojnost simptomatičnih biljaka vinove loze u analiziranim vinogradima ( $\approx 50\%$ ), sakupljane su cikade za molekularne analize u cilju utvrđivanja i identifikacije fitoplazmi u njima. Sakupljane su vrste iz visoko brojnih populacija u vinogradima, koje se u literaturi navode kao vektori fitoplazmi.

Tokom dvogodišnjeg istraživanja sakupljeno je i analizirano ukupno 618 primeraka 7 vrsta cikada. PCR amplifikacijom 16S rRNK gena fitoplazmi utvrđeno je prisustvo ovih bakterija u 6 vrsta cikada: *H. obsoletus*, *D.europaea*, *E. incisus*, *P. alienus*, *A. ribauti* i *A. manderstjernii* (Tabela 3).

Na osnovu poređenja RFLP šeme umnoženih fragmenata 16S rRNK fitoplazmi izolovanih iz cikada, sa restrikcionom šemom referentnih izolata identifikovane su 16Sr grupe kojima ove fitoplazme pripadaju (Slika 6).



Slika 6. RFLP analiza  $F_{2n}R_2$  PCR produkata *MseI* enzimom. BA 271-278: *E. incisus*; BA 280-292: *P. alienus*; BA 296: *A. ribauti*; I-B, I-C, II, III, V-C, X i XII – referentni izolati stolbur fitoplazme; M – marker, FX174/*HaeIII*: QX DNA (Qiagen).

Tabela 3. Prisustvo fitoplazmi u populacijama cikada.

Vrsta	16Sr grupa
<i>Hyalesthes obsoletus</i>	XII-A
<i>Reptalus quinquecostatus</i>	-
<i>Dictyophara europaea</i>	XII-A
<i>Euscelis incisus</i>	II, I-B
<i>Psammotettix alienus</i>	I-B, I-C
<i>Anaceratagalia ribauti</i>	I-C
<i>Artianus manderstjernii</i>	XII-A

U jedinkama vrste *E. incisus* utvrđeno je prisustvo dve grupe fitoplazmi: 16SrI-B podgrupe *aster yellows* grupe i 16SrII *peanut witches'-broom* grupe. Ove dve različite grupe fitoplazmi utvrđene su kod jedinki vrste *E. incisus* sakupljenih sa različitih lokaliteta, Dobrošinci i Hamzali.

U jedinkama vrste *P. alienus* detektovano je prisustvo dve podgrupe *aster yellows* fitoplazme, 16SrI-B i 16SrI-C. U primercima *P. alienus* sakupljenih sa lokaliteta Hamzali i Dobrošinci utvrđeno je prisustvo obe podgrupe, dok primerci sakupljeni na lokalitetu Petralinci bili su pozitivni samo na prisustvo 16SrI-C fitoplazme.

U jedinkama vrste *A. ribauti*, sakupljenim na lokalitetu Dobrošinci, detektovano je prisustvo 16SrI-C podgrupe *aster yellows* grupe.

U ostale tri vrste cikada: *H. obsoletus*, *D. europaea* i *A. manderstjernii* utvrđeno je prisustvo 16SrXII-A podgrupe stolbur fitoplazme.

U jedinkama vrste *R. quinquecostatus* nije detektovano prisustvo fitoplazmi.

#### 4.2.1. Prisustvo ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ u cikadama

Posle inicijalne detekcije fitoplazmi u cikadama, dalja istraživanja bila su usmerena samo na prisustvo stolbur fitoplazme prouzrokovača oboljenja Bois noir. Cikade koje su sakupljane u vinogradima i na utrinama oko njih, sa svih pet lokaliteta, analizirane su PCR metodom, na prisustvo stolbur fitoplazme. Analizirano je ukupno 337 primerka 4 vrste cikada. PCR amplifikacijom Stoll1 regiona, koji je karakterističan za genom ove fitoplazme, utvrđeno je prisustvo stolbur fitoplazme u 3 vrste cikada: *H. obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae), *D. europaea* (Auchenorrhyncha: Dictyopharidae) i *A. manderstjernii* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae). Vrsta *R. quinquecostatus* nije bila pozitivna na prisustvo ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’. Rezultati molekularnih analiza prikazani su u Tabeli 4.

Tabela 4. Prisustvo ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ u cikadama.

Vrsta	Broj analiziranih primeraka	Primerki zaraženi BN fitoplazmom	
		Broj	%
<i>Hyalesthes obsoletus</i>	294	90	30.6
<i>Dictyophara europaea</i>	19	4	21
<i>Artianus manderstjernii</i>	313	4	1.3
<i>Reptalus quinquecostatus</i>	4	0	0

Broj zaraženih jedinki i procenat zaraženosti vrsta se razlikovao na različitim lokalitetima. Rezultati analiza na pojedinim lokalitetima prikazani su u Tabeli 5.



Tabela 5. Procenat jedinki zaraženih '*Candidatus Phytoplasma solani*' na različitim lokalitetima.

Vrsta	Hamzali		Dobrošinci		Gradošorci		Dobrejci		Petralinci	
	<i>Hyalesthes obsoletus</i>	29/138	21%	0	0	0	0	31/119	26%	20/37
<i>Dictyophara europaea</i>	1/9	11,1%	0	0	1/4	25%	1/3	33,3%	1/3	33,3%
<i>Artianus manderstjernii</i>	0/92	0	2/71	2.8%	0/68	0	0/6	0	2/76	2.6%

Rezultati PCR analiza cikada sakupljenih na lokalitetu Hamzali, pokazuju prisustvo 'Candidatus Phytoplasma solani' u 2 vrste cikada: *H. obsoletus* i *D. europaea*. Od ukupno 138 analiziranih jedinki *H. obsoletus* kod 29 (21%) je utvrđeno prisustvo 'Candidatus Phytoplasma solani', dok je kod vrste *D. europaea* prisustvo fitoplazme registrovano u 11.1% analiziranih jedinki.

Na lokalitetu Dobrošinci vrste *H. obsoletus* i *D. europaea* nisu registrovane, a prisustvo stolbur fitoplazme utvrđeno je u dve od 71 analizirane jedinke vrste *A. manderstjernii*.

Na lokalitetu Gradošorci, prisustvo 'Candidatus Phytoplasma solani' je utvrđeno u 1 od 4 analizirane jedinke vrste *D. europaea* (25%). Jedinke vrste *A. manderstjernii* nisu bile pozitivne na prisustvo stolbur fitoplazme, dok vrsta *H. obsoletus* nije bila prisutna na ovom lokalitetu.

Na lokalitetu Dobrejci analizirani primerci vrste *A. manderstjernii* su bili negativni na prisustvo stolbur fitoplazme, dok je prisustvo fitoplazme utvrđeno u 26% analiziranih jedinki vrste *H. obsoletus* i 33,3% analiziranih jedinki vrste *D. europaea*.

Rezultati PCR analize cikada sakupljenih na lokalitetu Petralinci, pokazuju prisustvo 'Candidatus Phytoplasma solani' u sve 3 vrste cikada: *H. obsoletus*, *D. europaea* i *A. manderstjernii*. Od ukupno 37 analiziranih jedinki *H. obsoletus*, kod 20 primeraka (54%) je utvrđeno prisustvo 'Ca. P. solani'. Procenat zaraženosti kod vrste *D. europaea* je bio 33,3%. Prisustvo stolbur fitoplazme je potvrđeno i kod dve od 76 analiziranih jedinki vrste *A. manderstjernii*.

#### **4.3. Prisustvo 'Candidatus Phytoplasma solani' u vinovoj lozi**

Listovi biljaka vinove loze koji su ispoljavali simptome karakteristične za prisustvo fitoplazmi kao što su parcijalna promena boje lista, nekroza tkiva između nerava i savijanje listova prema naličju, sakupljeni su sa šireg područja Strumičkog regiona. Ekstrahovano je i analizirano PCR metodom ukupno 12 uzoraka vinove loze. Prisustvo 'Candidatus Phytoplasma solani' utvrđeno je umnožavanjem Stol11 regiona u svih 12 analiziranih uzoraka vinove loze.

#### 4.4. Prisustvo stolbur fitoplazme u korovskim biljkama

Pojedine korovske biljke, koje su prisutne u vinogradima i u utrinama oko vinograda predstavljaju alternativne domaćine fitoplazmi i imaju značajnu ulogu kao izvori patogena za infekciju vektora. Dominantnu korovsku floru u vinogradima i utrini oko vinograda su činile biljke: *Amaranthus retroflexus* L., *Capsella bursa – pastoris* L., *Chenopodium album* L., *Convolvulus arvensis* L., *Cynodon dactylon* L., *Solanum nigrum* L., *Panicum crus – galli* L., *Stellaria media* L., *Urtica dioica* L., *Xanthium strumarium* L. i *Taraxacum officinale* L. Prisustvo stolbur fitoplazme utvrđeno je u dve najčešće biljne vrste prisutne na utrinama Strumičkog regiona: *Convolvulus arvensis* i *Urtica dioica* (Tabela 6). Analizirane biljke nisu ispoljavale simptome karakteristične za infekciju fitoplazmama.

Tabela 6. Prisustvo stolbur fitoplazme u biljkama utrina oko vinograda.

Vrsta	Broj analiziranih biljaka	Biljke zaražene BN fitoplazmom	
		Broj	%
<i>Convolvulus arvensis</i>	50	7	14
<i>Urtica dioica</i>	68	15	22

Rezultati molekularnih analiza pokazali su prisustvo stolbur fitoplazme u 7 od 50 (14%) analiziranih biljaka poponca (*C. arvensis*) i u 15 od 68 (22%) analiziranih biljkaka koprive (*U. dioica*).

#### 4.5. Molekularna karakterizacija stolbur fitoplazme

Molekularna karakterizacija ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ u analiziranom materijalu vršena je analizom genskih regiona *tuf*, *stamp* i *vmp1* gena, RFLP metodom i sekvenciranjem. S obzirom da je procenat biljaka vinove loze sa izraženim simptomima infekcije fitoplazmom u zaraženim vinogradima bio visok (oko 50%), izvršena je molekularna karakterizacija stolbur fitoplazme prisutne u vinovoj lozi, cikadi *H. obsoletus* i u alternativnim biljkama (*U. dioica* i *C. arvensis*), koje predstavljaju biljke domaćine za razvoj larvi *H. obsoletus*.

#### 4.5.1. Analiza *tuf* gena

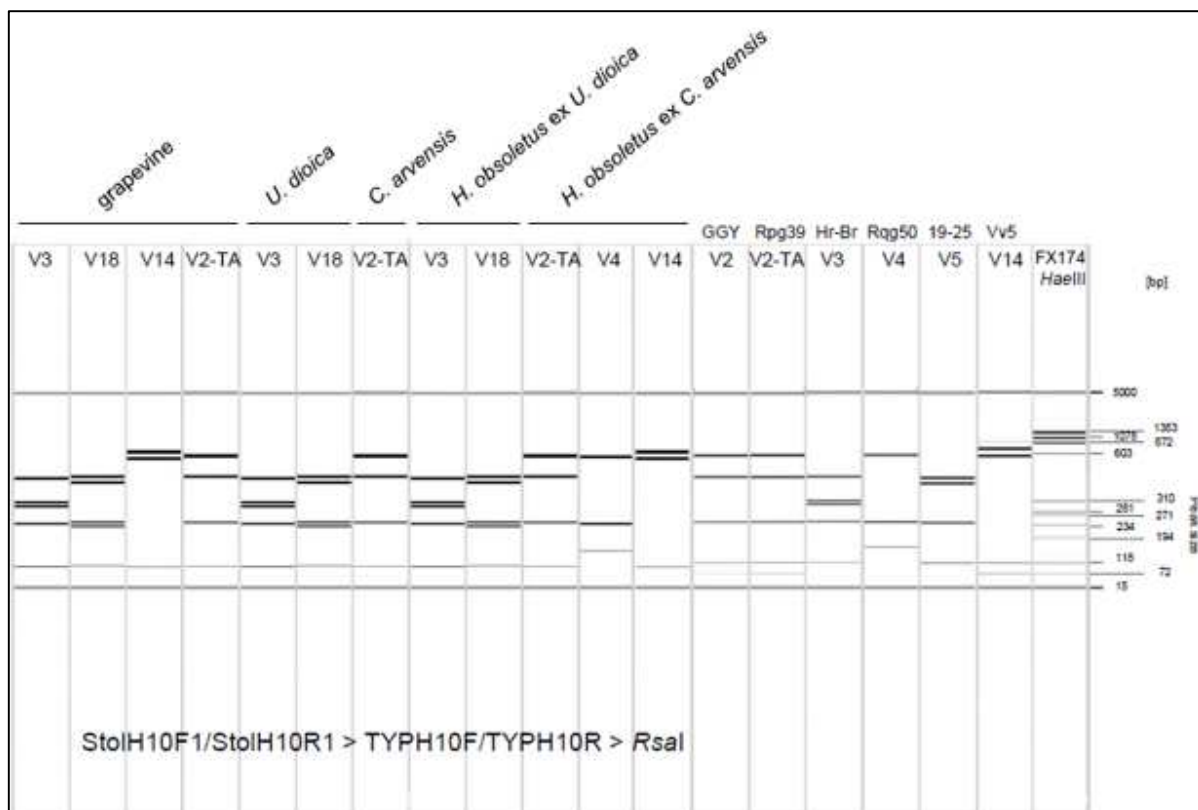
Molekularna karakterizacija *tuf* gena koji kodira faktor elongacije *Tu* stolbur fitoplazme urađena je restrikcijom analizom uzoraka ove fitoplazme *HpaII* endonukleazom. Analiziran je ukupno 91 uzorak od kojih: 12 uzoraka stolbur fitoplazme iz vinove loze, 43 uzorka vrste *H. obsoletus* sakupljenih sa koprive, 14 uzoraka *H. obsoletus* sakupljenih sa poponca, 15 biljaka koprive i 7 biljaka poponca, sakupljenih na ispitivanim lokalitetima. Uspešno je sekvencirano 940 bp *tuf* gena.

RFLP obrazac uzoraka upoređen je sa referentnim izolatima *tuf-a* i *tuf-b* izolovanih iz prirodno inficiranih *H. obsoletus* iz Mosel i Middle-Rhine regiona u Nemačkoj (Dr Michael Maixner, Bernkastel-Kues). Poređenje sa RFLP obrascima referentnih izolata pokazalo je prisustvo oba tipa stolbur fitoplazme u analiziranim uzorcima: *tuf-a* tipa koji je definisan kao tip vezan za koprivu i *tuf-b* tipa koji je u asocijaciji sa poponcem (Langer i Maixner, 2004). Na osnovu *HpaII* restrikcijonih profila utvrđeno je da je *tuf-a* tip prisutan u 25% inficiranih biljaka vinove loze (3 od 12), 40% inficiranih biljaka koprive (6 od 15) i u 48.8% inficiranih jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na koprivi (21 of 43). PCR-RFLP analiza potvrdila je prisustvo *tuf-b* tipa u 75% inficiranih biljaka vinove loze, u svih 7 inficiranih biljaka poponca i u svih 14 jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na poponcu. Takođe je, neočekivano, u 9 od 15 (60%) biljaka koprive i 45% jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na koprivi, potvrđeno prisustvo RFLP profila koji odgovaraju *tuf-b* tipu. Da bi sa sigurnošću mogli da tvrdimo koji je *tuf* tip u pitanju, sekvencionirani su uzorci koji su pokazivali nespecifične *tuf* profile, zajedno sa uzorcima vinove loze. Poređenjem sekvenci utvrđeno je prisustvo 3 *tuf* tipa: *tuf-a*, *tuf-b* i trećeg tipa koji predstavlja intermedijarni tip nazvan *tuf-ab* (Atanasova *et al.*, 2015) (Tabela 7) koji se grupiše zajedno sa *tuf-a* tipom, a koji je prethodno opisan kao *tuf-b2* u asocijaciji sa koprivom (Aryan *et al.*, 2014). Prisustvo intermedijarnog tipa je potvrđeno u svim izolatima sa koprive i u svim jedinkama *H. obsoletus* sakupljenim sa koprive koji su na osnovu RFLP profila određeni kao *tuf-b* tip, kao i u 16.7% (2 of 12) uzoraka vinove loze (Tabela 7).

#### 4.5.2. Analiza *vmp1* gena

Dobijeni produkti nested PCR (1450 bp) su digestirani sa *RsaI*, *TaqI* i *AluI* restrikcionim enzimima. RFLP analizom utvrđena je varijabilnost restrikcionih fragmenata za pet različitih profila, koje su označeni kao V2-TA, V3, V4, V14 i V18, a koji odgovaraju prethodno opisanim profilima (Murolo *et al.*, 2010, 2013; Cvrković *et al.*, 2014). Restrikcioni fragmenti odvojeni su korišćenjem automatskog kapilarnog sistema elektroforeze QIAxcel advanced (Qiagen). Kao reference, za poređenje *vmp1* restrikcionih paterna, korišćeni su sledeći fitoplazmatski izolati: GGY, vinograd iz Nemačke, V2 profil; Rpg39, *R. panzeri* iz Srbije, V2-TA profil; Hr-Br (HR-BR18-09), vinograd iz Hrvatske, V3 profil; Rqg50, *R. quinquecostatus* iz Srbije, V4 profil; 19-25, vinograd iz Nemačke, V5 profil; Vv5, vinograd iz Srbije, V14 profil. FX174/*HaeIII*: QX DNA size marker (Qiagen). Veličine markera (bp) (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72) i marker QX 15 bp/5 kb (15 i 5000) su označene (Slika 7).

Najzastupljeniji među svim izolatima bio je V18 *RsaI* profil prisutan u 36% izolata, a odmah iza njega V3 profil sa 33% zastupljenosti među izolatima. Za sve V18 *vmp1* profile bilo je karakteristično da pripadaju intermedijernom *tuf-ab* tipu. Prisustvo ovog *vmp1* profila bilo je utvrđeno u vinovoj lozi, koprivi i populacijama *H. obsoletus* sakupljenim na koprivama. Prisustvo V3 *vmp1* profila je utvrđeno u asocijaciji sa *tuf-a* tipom u vinovoj lozi, koprivama i jedinkama *H. obsoletus* sa koprive. Među analiziranim izolatima, rede su bili zastupljeni V2-TA, V4 i V14 *vmp1* profili. V14 profil je bio prisutan samo u vinovoj lozi, V4 samo u jedinkama *H. obsoletus* sakupljenim na poponcu, dok je V2-TA profil bio prisutan u vinovoj lozi, poponcu i populacijama *H. obsoletus* u asocijaciji sa poponcem.



Slika 7. *RsaI* RFLP profili *vmp1* markera stolbur fitoplazme povezani sa različitim domaćinima u vinogradima inficiranim BN u Makedoniji. M – marker, FX174/*HaeIII*: QX DNA (Qiagen).

#### 4.5.3. Analiza *stamp* gena

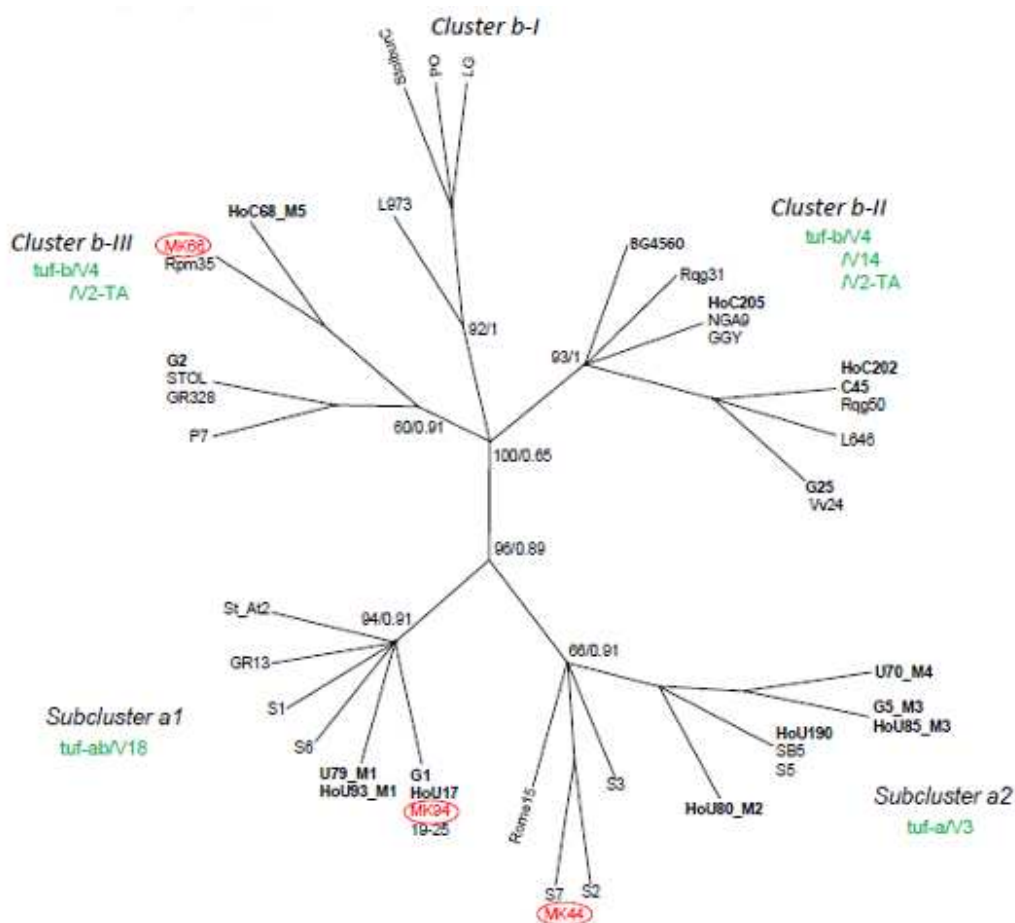
Sekvencionirano je ukupno 495 bp fragmenta *stamp* gena stolbur fitoplazme izolovane iz uzoraka vinove loze, jedinki *H. obsoletus* sakupljenih sa *U. dioica*, uzoraka vrste *H. obsoletus* sakupljenih sa *C. arvensis* kao i iz uzoraka biljaka *U. dioica* i *C. arvensis*.

Identifikovano je ukupno 11 genotipova *stamp* gena sa maksimalom varijabilnošću između sekvenci od 4,9%. Među identifikovanim *stamp* genotipovima, šest genotipova je bilo identično sa prethodno opisanim referentnim izolatima (19-25, SB5, Rqg50, Vv24, GGY i STOL), dok je pet genotipova prvi put utvrđeno u ovim istraživanjima. Ovi genotipovi su nazvani: M1, M2, M3, M4 i M5 (Tabela 7).

Tabela 7. *Stamp* genotipovi stolbur fitoplazme prirodno povezani sa vinovom lozom, *H. obsoletus*, *U. dioica* i *C. arvensis* sa odgovarajućim RFLP profilima *vmp1* i *tuf* gena.

<b>Domaćin</b>	<b>Broj analiziranih/ broj stolbur pozitivnih uzoraka</b>	<b><i>Stamp</i> genotip</b>	<b>Broj izolata za svaki genotip / Broj izolata (procenat)</b>	<b><i>vmp1</i> profil</b>	<b><i>tuf</i> profil</b>
<i>Vitis vinifera</i>	12/12 (100%)	<b>19-25</b>	2/12 (16.7%)	V18	tuf-ab
		<b>M3</b>	3/12 (25%)	V3	tuf-a
		<b>Vv24</b>	3/12 (25%)	V14	tuf-b
		<b>STOL</b>	4/12 (33.3%)	V2-TA	tuf-b
<i>Hyalesthes obsoletus ex Urtica dioica</i>	227/43 (18.9%)	<b>M1</b>	19/43 (44.2%)	V18	tuf-ab
		<b>M2</b>	10/43 (23.3%)	V3	tuf-a
		<b>M3</b>	8/43 (18.6%)	V3	tuf-a
		<b>SB5</b>	3/43 (7%)	V3	tuf-a
		<b>19-25</b>	3/43 (7%)	V18	tuf-ab
<i>Urtica dioica</i>	68/15 (22%)	<b>M1</b>	9/15 (60%)	V18	tuf-ab
		<b>M4</b>	6/15 (40%)	V3	tuf-a
<i>Hyalesthes obsoletus ex Convolvulus arvensis</i>	77/14 (18.2%)	<b>Rqg50</b>	5/14 (35.7%)	V2-TA	tuf-b
		<b>Rqg50</b>	4/14 (29%)	V14	tuf-b
		<b>GGY</b>	4/14 (29%)	V4	tuf-b
		<b>M5</b>	1/14 (7.1%)	V4	tuf-b
<i>Convolvulus arvensis</i>	50/7 (14%)	<b>Rqg50</b>	7/7 (100%)	V2-TA	tuf-b

Na osnovu Bayesian i Maximum parsimony (MP) analize potvrđeno je prisustvo dve velike filogenetske grupe (Slika 8). Prva grupa je u asocijaciji sa poponcem i sastoji se od tri grane *b-I*, *b-II* i *b-III*, dok su se analizirani izolati grupisali u okviru *b-II* i *b-III* klastera. Druga grupa je u asocijaciji sa koprivom i sastoji se od dva podklastera *a1* i *a2*, u okviru kojih su analizirani izolati.



Slika 8. MP (Maximum parsimony) kladogram dobijen iz *stamp* genotipova stolbur fitoplazmi detektovanih u vinovoj lozi, korovima i *H. obsoletus* u Republici Makediniji i iz referentnih izolata (Fabre *et al.*, 2011; Johannesen *et al.*, 2012; Aryan *et al.*, 2014; Cvrković *et al.*, 2014; Kostadinovska *et al.*, 2014). Svaki *stamp* genotip detektovan u našim istraživanjima je boldiran. *Stamp* genotipovi koje su otkriveni u vinovoj lozi u Makedoniji u prethodnim istraživanjima Kostadinovske *et al.*, (2014) su označeni crvenom bojom. “MP bootstrap” vrednosti su prikazane za svaki čvor klastera.



Četiri *stamp* genotipa prvi put utvrđena u ovim istraživanjima (M1- M4) grupisala su se u okviru klastera *a* (od kojih je 3 bilo grupisano u *a2* podklasteru a 1 izolat u *a1* podklasteru). Peti genotip utvrđen prvi put u ovim istraživanjima (M5) se grupisao u okviru klastera *b-III* (Slika 8). Najveći broj izolata pripadao je genotipu M1.

U vinovoj lozi su identifikovana četiri genotipa *stamp* gena. Poređenje sekvenci pokazalo je da su dva od četiri genotipa, koji su označeni kao Vv24 (klaster *b-II*) i STOL (klaster *b-III*) identični kao referentni *stamp* genotipovi utvrđeni u vinovoj lozi iz Srbije (Cvrković *et al.*, 2014). Sekvenca trećeg genotipa je bila identična kao sekvenca referentnog izolata 19-25 i klastirala se u okviru *a1* podklastera, dok je četvrti genotip (M3) bio prisutan samo u vinovoj lozi i *H. obsoletus* sa koprive i imao jedinstvenu sekvencu koja se klastirala u okviru *a2* podklastera.

U jedinkama vrste *H. obsoletus* sakupljenih sa *U. dioica*, identifikovano je pet genotipova *stamp* gena. Dva su bila identična sa referentnim izolatima SB5 iz Hrvatske i 19-25 iz Nemačke i klastirani su u okviru *tuf-a* klastera, dok su genotipovi označeni kao MK1, MK2 i MK3 imali jedinstvene sekvence i klastirali su se unutar klastera *a*.

Kod jedinki *H. obsoletus* sakupljenih sa *C. arvensis*, identifikovana su 2 genotipa *stamp* gena, označena kao Rqg50 i GGY. Oba genotipa su identična sa referentnim genotipovima *H. obsoletus* i klastirani su u okviru *tuf-b* klastera.

U koprivama je identifikovano 2 genotipa sa jedinstvenim sekvencama u poređenju sa referentnim izolatima, označena kao M1 i M4. Genotip M1 je klastiran u okviru *a1* podklastera i pored koprive, bio je prisutan i u jedinkama *H. obsoletus* poreklom sa koprive, dok se genotip M4 grupisao u okviru *a2* podklastera i bio prisutan samo u koprivi.

Svi izolati iz poponca i populacija *H. obsoletus* sa poponca grupisale su se u okviru *b-II* klastera. Većina izolata *H. obsoletus* i svi izolati poponca imali su sekvence identične sekvenci izolata Rqg50 detektovanoj u jedinkama *H. obsoletus* i biljkama vinove loze iz Srbije i Austrije (Aryan *et al.*, 2014; Cvrković *et al.*, 2014). Sekvence četiri izolata *H. obsoletus* pokazala su identičnost sa referentnim izolatima *H. obsoletus* sakupljenim na poponcu u Nemačkoj (GGY) i Sloveniji (NGA9) (Fabre *et al.*, 2011).

#### 4.5.4. Sveobuhvatna karakterizacija na osnovu *tuf/vmp1/stamp* gena

Na osnovu svih rezultata molekularne karakterizacije, četiri genotipa stolbur fitoplazme identifikovano je u prirodno inficiranim biljkama vinove loze (Tabela 8). Na osnovu *tuf/vmp1/stamp* karakterizacije najčešći genotip je bio tuf-b/V2-TA/STOL, koji je bio prisutan u 33% biljaka vinove loze.

Takođe su u velikoj stopi u biljkama vinove loze bili prisutni genotipovi: tuf-b/V14/Vv24 i tuf-a/V3/M3, zastupljeni u po 25% uzoraka. U dva od 12 izolata vinove loze bio je prisutan tuf-ab/V18/19-25 genotip. Dva genotipa stolbur fitoplazme su bila utvrđena u koprivi: tuf-ab/V18/M1 i tuf-a/V3/M4. Najveći broj genotipova je bio utvrđen u izolatima *H. obsoletus* poreklom sa koprive: tuf-ab/V18/M1, prisutan u 44% analiziranih uzoraka, tuf-a/V3/M2, utvrđen u 23% analiziranih uzoraka, tuf-a/V3/M3, prisutan u 19% uzoraka, tuf-ab/V18/19-25 i tuf-a/V3/SB5, utvrđeni u po 7% analiziranih uzoraka. Svi izolati stolbur fitoplazme prisutni u *C. arvensis* i 35% izolata iz jedinki *H. obsoletus* sa poponca, pripadali su genotipu tuf-b/V2-TA/Rqg50. Pored ovog genotipa, među izolatima iz jedinki *H. obsoletus* sa *C. arvensis*, utvrđeno je 3 genotipa stolbur fitoplazme: tuf-b/V14/Rqg50, u 29% zaraženih *H. obsoletus*, tuf-b/V4/GGY, u 29% uzoraka i tuf-b/V4/M5, u 7% jedinki *H. obsoletus* u kojima je bilo utvrđeno prisustvo stolbur fitoplazme.

Tabela 8. Genotipovi stolbur fitoplazme utvrđeni u *Urtica dioica*, *Convolvulus arvensis* i *Hyalesthes obsoletus* sakupljenim sa *U. dioica* i *C. arvensis* u vinogradima Makedonije

<b>Domaćin</b>	<b>Broj analiziranih/ broj stolbur pozitivnih uzoraka</b>	<b>Broj (procenat) kompletnih genotipova <i>tuf/vmp1/stamp</i></b>	<b><i>tuf/vmp1/stamp</i> genotipovi<sup>a</sup></b>	<b>poznati genotipovi<sup>b</sup></b>
<i>Vitis vinifera</i>	12/12 (100%)	3 (25%)	<b>tuf-a/V3/M3</b>	
		2 (17%)	<b>tuf-ab/V18/19-25</b>	CPsM4_At1
		3 (25%)	<b>tuf-b/V14/Vv24</b>	Vv24g
		4 (33%)	<b>tuf-b/V2-TA/STOL</b>	STOLg
<i>Hyalesthes obsoletus</i> sa <i>U. dioica</i>	227/43 (18.9%)	3 (7%)	<b>tuf-a/V3/SB5</b>	
		10 (23%)	<b>tuf-a/V3/M2</b>	
		8 (19%)	<b>tuf-a/V3/M3</b>	
		3 (7%)	<b>tuf-ab/V18/19-25</b>	CPsM4_At1
		19 (44%)	<b>tuf-ab/V18/M1</b>	
<i>Urtica dioica</i>	68/15 (22%)	6 (40%)	<b>tuf-a/V3/M4</b>	
		9 (60%)	<b>tuf-ab/V18/M1</b>	
<i>Hyalesthes obsoletus</i> sa <i>C. arvensis</i>	77/14 (18.2%)	5 (35%)	<b>tuf-b/V2-TA/Rqg50</b>	
		4 (29%)	<b>tuf-b/V14/Rqg50</b>	Rqg50g=CPsM4_At12
		4 (29%)	<b>tuf-b/V4/GGY</b>	CPsM4_At9
		1 (7%)	<b>tuf-b/V4/M5</b>	
<i>Convolvulus arvensis</i>	50/7 (14%)	7 (100%)	<b>tuf-b/V2-TA/Rqg50</b>	

<sup>a</sup> *tuf/vmp1/stamp* genotipovi stolbur fitoplazme detektovani u našim istraživanjima

<sup>b</sup> Kompletni genotipovi stolbur fitoplazme prema referentnom izolatima (Aryan *et al.*, 2014; Cvrković *et al.*, 2014)

## 5. Diskusija

Žutila vinove loze (Grapevine yellows, GY) su bolesti izazvane fitoplazmama koje se javljaju u mnogim vinogradarskim područjima u svetu. Skoro identični simptomi GY sindroma su uzrokovani različitim fitoplazmama. Pomenuti simptomi se mogu uočiti na lišću, izdancima i čokotima vinove loze, pojavljuju se početkom leta (najčešće u junu), a najizraženiji su u avgustu i septembru. Ivice lišća počinju da se uvijaju prema naličju, list požuti, ako je reč o belim sortama, odnosno pocrveni kod crvenih sorti, što je posebno izraženo uz lisnu nervaturu. Lišće je zbog nagomilavanja šećera krto, razvija se ranije, ali otpada kasnije od nezaraženog lišća. Patološke promene vidljive su i na lastarima. Skraćene su internodije, pa je lišće gušće raspoređeno. Poremećeno je odrvenavanje lastara, jer krajem leta ili početkom jeseni ne odrvenavaju već ostaju zeleni, a zatim se tokom zime smrjavaju i propadnu.

Pošto su žutila vinove loze uvek prouzrokovana fitoplazmama i prenose se preko insekata vektora – cikada, različite bolesti se mogu definisati na osnovu patogena i vektora koji učestvuju u epidemiološkom ciklusu. Flavescence dorée (FD), je izazvana fitoplazmom 'Candidatus Phytoplasma Vitis' (16SrV grupa, Elm yellows) i rasprostranjena je u Francuskoj, Italiji, Portugaliji, Španiji, Srbiji, Sloveniji i Švajcarskoj (Boudon-Padieu, 2005). Oboljenje Bois noir, poznato i kao Vergilbungskrankheit i Legno nero, rasprostranjeno je u zemljama južne i centralne Evrope, ali i u Izraelu i Libiji (Boudon-Padieu, 2003, 2005). Kada je oboljenje bilo prvi put registrovano, smatralo se da je neka forma FD-a, sa mogućom zajedničkom etiologijom (Caudwell, 1961). Posle 10 godina istraživanja, utvrđeno je da BN fitoplazma ne može biti preneti cikadom *Scaphoideus titanus* koja je vektor FD fitoplazme (Caudwell *et al.*, 1971). BN je vezana sa fitoplazmom stolbur grupe koja pripada 16SrXII-A podgrupi i ima predloženo ime 'Candidatus Phytoplasma solani' jer je poznato da inficira različite biljke porodice Solanaceae (Firrao *et al.*, 2005).

Poznavanje insekata vektora, njihove biologije, ponašanja i spektra biljaka domaćina je preduslov za razumevanje epidemiologije žutila vinove loze. Dosadašnja istraživanja o cikadama usmerena su na analizu njihovog faunističkog sastava na različitim

staništima, na određenoj teritoriji. Sa otkrićem vektorske uloge cikada u prenošenju fitoplazmi, istraživanja o cikadama se usmeravaju ka proučavanju raznolikosti cikada na vinovoj lozi, njihovog načina života i kruga domaćina, kako bi se utvrdila njihova uloga u prenošenju fitoplazmi vinove loze.

Prema podacima dosadašnjih istraživanja, vrsta *H. obsoletus* je najznačajniji vektor Bois noir (Legno nero, Schwarzhholzkrankheit) (Alma *et al.*, 1987; Maixner *et al.*, 1995) koji je pronađen u oblastima pogođenim ovom fitoplazmom (Palermo *et al.*, 2004; Lessio *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2009; Seljak, 2004; Sforza, 1998). Međutim i drugi predstavnici familija Cixiidae i Cicadellidae su potvrđeni ili potencijalni vektori stolbur fitoplazmi (Boudon-Padieu, 2005). *Goniagnathus guttulinervus* (Kirschbaum) (Garau *et al.*, 2004.) na Sardiniji i *R. panzeri* u Mađarskoj i Italiji (Palermo *et al.*, 2004; Botti *et al.*, 2005), su okarakterisani kao potencijalni vektori stolbur fitoplazme (Boudon-Padieu, 2005), ali njihova vektorska uloga i sposobnost da prenesu BN na vinovu lozu nije bila dokazana. Prema najnovijim istraživanjima, potvrđena je vektorska uloga *R. panzeri* u prenošenju Bois noir fitoplazme (Cvrković *et al.*, 2014). BN fitoplazma je otkrivena i kod različitih vrsta familije Cicadellidae u vinogradima Španije (Sabaté *et al.*, 2003). Neke od ovih vrsta su bile sposobne da zaraze medijum na kome su se hranile ali prenošenje BN fitoplazme na vinovu lozu u laboratorijskim uslovima nije dokazano (Lavina *et al.*, 2006). Prisustvo BN registrovano je i u *Reptalus quinquecostatus* (Dufour, 1833) u italijanskim vinogradima (Trivellone *et al.*, 2005), *Anaceratagallia ribauti* Ossiannilsson, 1938 u austrijskim vinogradima (Riedle-Bauer *et al.*, 2008), kao i u nekoliko vrsta cikada u Izraelu (Orenstein *et al.*, 2003), ali još uvek nije utvrđena njihova vektorska uloga.

Veoma malo je rađeno na diverzitetu cikada koje su prisutne na teritoriji Makedonije. Istraživane su samo cikade iz familije Cicadidae (Gogala *et al.*, 2005), koje nisu registrovane kao štetočine biljaka. Od strane Atanasove *et al.*, (2010, 2013) urađena je analiza kvalitativnog i kvantitativnog sastava cikada na vinovoj lozi u Makedoniji, ali nije proučavana njihova uloga u epidemiologiji fitoplazmi.

U ovim istraživanjima, u vinogradima Makedonije i utrini oko vinograda utvrđeno je prisustvo 22 vrste cikada iz 6 familija, a 5 taksona je određeno do nivoa roda. Na svih pet analiziranih lokaliteta najzastupljenija vrsta je *P. alienus* (27,5%), zatim *A. manderstjernii*

(25,7%) i *H. obsoletus* (18,7%). Uprkos visokoj brojnosti, utvrđeno je da vrste *P. alienus* i *A. manderstjernii* nemaju ulogu u epidemiologiji 'Candidatus Phytoplasma solani'.

Prema literaturnim podacima vrsta *H. obsoletus* je glavni vektor Bois noir (Sforza *et al.*, 1998; Aryan *et al.*, 2014; Berger *et al.*, 2009; Johannensen *et al.*, 2007; Lessio *et al.*, 2007; Weintraub, 2007). *Hyalesthes obsoletus* je polifagna vrsta koja preferira zeljaste, višegodišnje biljke domaćine, kao što su: *Convolvulus arvensis* L., *Calystegia sepium* L. (Convolvulaceae), *Ranunculus* spp., (Ranunculaceae), *Senecio* spp., *Artemisia* spp. (Asteraceae) i *Urtica dioica* L. (Urticaceae) (Maixner, 1994; Holzinger, 2003; Langer & Maixner, 2004). Vinova loza ne predstavlja izvor inokuluma već su kao izvor infekcije značajne korovske biljke, kao rezervoari fitoplazme. Iako je *H. obsoletus* najznačajniji vektor Bois noir, vinova loza je „dead-end host plant“ za ovu vrstu, jer je transmisija stolbur fitoplazme sa loze na lozu neuspješna putem *H. obsoletus*, i na taj način se prekida infekcijski ciklus.

U vinogradarskim regionima gde je mala brojnost vrste *H. obsoletus* utvrđeno je da druge cikade, kao što je *R. panzeri* mogu da prenose 'Ca. Phytoplasma solani' (Cvrković *et al.*, 2014).

Intenzivna pojava simptoma BN fitoplazme u vinogorjima Makedonije inicirala je proučavanje genetskog diverziteta stolbur fitoplazme u uzorcima vinove loze, potencijalnim insektima vektorima i biljkama spontane flore kao primarnim rezervoarima infekcije, sa ciljem da se razjasni epidemiologija BN.

U toku dvogodišnjeg istraživanja ustanovljeno je prisustvo stolbur fitoplazme u svim analiziranim primercima vinove loze. U našim istraživanjima, prisustvo 'Ca. P. solani' utvrđeno je u cikadi *H. obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae), *D. europaea* (Auchenorrhyncha: Dactyopharidae) i *A. manderstjernii* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae).

Tokom dvogodišnjeg istraživanja, vrsta *H. obsoletus* registrovana je samo na lokalitetima Hamzali, Dobrejci i Petralinci. Na sva tri lokaliteta primerci *H. obsoletus* sakupljeni su sa koprive i poponca. Pojava imaga zabeležena je sredinom juna i do početka jula dostigla je maksimalnu brojnost. Tada brojnost počinje da opada tako da do sredine avgusta, prisustvo ove vrste nije zabeleženo ni na vinovoj lozi ni na korovskim vrstama. Naša istraživanja su u skladu sa istraživanjima Lessio *et al.*, (2007), Berger *et al.*, (2009),

Johannensen *et al.*, (2007), Sforza *et al.*, (1998), gde se kao preferentni domaćini vrste *H. obsoletus* pominju kopriva i poponac.

U našim istraživanjima prisustvo '*Ca. P. solani*' detektovano je i u cikadi *Dictyophara europaea*. Ova cikada je polifagna vrsta koja se obično sreće na dikotiledonim travama, ali je zabeležana i na žbunastim i drvenastim biljkama. Njeno prisustvo registrovano je na lokalitetima Hamzali, Gradošorci, Dobrejci i Petralinci, u vinogradu i utrinama oko vinograda. Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da je vrsta *D. europaea* sposobna da prenese stolbur fitoplazmu na vinovu lozu (Cvrković, 2011). Naša istraživanja su pokazala da je na svim lokalitetima na kojima je utvrđeno prisustvo *D. europaea*, određeni procenat jedinki ove vrste bio pozitivan na prisustvo '*Ca. P. solani*'. Na osnovu velikog broja zaraženih biljaka u vinogradima, kao i malog broja sakupljenih primeraka vrste *D. europaea* pretpostavlja se da ova vrsta ne igra značajnu ulogu u epidemiologiji '*Ca. P. solani*' u vinogradima Makedonije, jer je jedan od osnovnih uslova za epidemijsko širenje fitoplazmatskih oboljenja brojnost vektora koji su sposobni da efikasno prenesu fitoplazmu. Da bi se utvrdila uloga *D. europaea* u epidemiološkom ciklusu '*Ca. P. solani*' neophodno je uraditi molekularnu karakterizaciju jedinki ove vrste kao i testove prenošenja fitoplazme na biljke vinove loze.

Na svim analiziranim lokalitetima, vrsta *A. manderstjernii* je bila prisutna u vinogradima tokom cele vegetacije. Maksimum brojnosti je dostizala u prvoj polovini jula, nakon čega joj je brojnost opadala. Ova vrsta je vezana za umereno suva, peščana staništa. Kao glavne biljke domaćini vrste *A. manderstjernii* navode se razne vrste familije Poaceae, što je u skladu sa pojavom velikog broja jedinki ove vrste na biljkama utrina oko vinograda. Uloga *A. manderstjernii* u prenošenju '*Ca. P. solani*' još nije dokazana.

Pojava i rasprostranjenost biljnih patogena koji se prenose pomoću insekata vektora zavisi od brojnosti vektora, njihove pokretljivosti od biljke do biljke i visine stope infekcije (Power, 1992; Orenstein *et al.* 2003; Trivellone *et al.* 2005). Stopa infekcije *H. obsoletus* skupljenih sa *U. dioica* i *C. arvensis* bila je blizu 20%, a populacije ove vrste su bile veoma brojne u jugoistočnoj Makedoniji. Vrsta *R. panzeri* čija je vektorska uloga u prenošenju stolbur fitoplazme potvrđena u ranijim istraživanjima (Cvrković *et al.*, 2014), nije bila prisutna u vinogradima, a potencijalni vektor *R. quinquecostatus* je bio prisutan u

zanemarljivom broju i nije bio pozitivan na prisustvo 'Ca. P. solani'. Sve to jasno ukazuje da *H. obsoletus* ima glavnu ulogu u epidemiologiju BN proučavanih vinograda.

'Ca. P. solani' ima širok spektar različitih domaćina, uključujući zeljaste i drvenaste biljke (Maixner, 2006), a neki od njih su domaćini i vrste *H. obsoletus*. Biljke domaćini su ključni faktori za gustinu populacije polifagnih vektora i frekvenciju zaraze vektora (Botti *et al.*, 2005; Credi *et al.*, 2004; Lagner & Maixner, 2004; Palermo *et al.*, 2004; Seljak *et al.*, 2003; Sharon *et al.*, 2005; Weber & Maixner, 1998). *Urtica dioica* i *C. arvensis* igraju značajnu ulogu u epidemiologiju BN u Evropi. Obe biljke se često mogu naći unutar ili na utrini oko vinograda i njihova lokacija i gustina igraju važnu ulogu u širenju bolesti, jer utiču na gustinu populacije i kretanje vektora ka vinogradu i unutar vinograda (Maixner, 2006). *Vitex agnus-castus* je žbunasta biljka koja je čest domaćin *H. obsoletus* u Izraelu, ali njegova uloga kao rezervoara fitoplazme još nije jasna (Sharon *et al.*, 2005). Postoje i druge zeljaste biljke koje su domaćini BN fitoplazme kao što je *Taraxacum officinalis* (Riedle-Bauer *et al.*, 2006; Credi, 2006), ali je potrebno dokazati da mogu da posluže kao izvor inokuluma. Biljka domaćin utiče na način širenja BN fitoplazme.

Dominantnu korovsku floru u analiziranim vinogradima i utrini oko vinograda činile su biljke: *Amaranthus retroflexus*, *Capsella bursa – pastoris*, *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis*, *Cynodon dactylon*, *Solanum nigrum*, *Panicum crus – galli*, *Stellaria media*, *Urtica dioica*, *Xanthium strumarium* i *Taraxacum officinalis*. Rezultati molekularnih analiza potvrdili su prisustvo 'Ca. P. solani' u dve korovske vrste: *C. arvensis*, koji je bio izrazito čest korov unutar vinograda i *U. dioica*, koja je bila zastupljenija na ivicama zaraženih vinograda.

Za utvrđivanje epidemioloških lanaca prenošenja 'Ca. P. solani' neophodno je odrediti koji genotipovi fitoplazme su prisutni u vinovoj lozi, vektorima i biljkama spontane flore. Visoko konzervativni 16S rDNK gen se obično koristi za detekciju stolbur fitoplazme i nije pogodan za detaljnije studije genetičkog diverziteta i filogenetskih odnosa između izolata stolbur fitoplazme, kao ni za povezivanje odgovarajućih izolata sa biljkama domaćinima i geografskom distribucijom. Da bi se dobile informacije o molekularnoj varijabilnosti BN izolata koriste se drugi, informativniji geni.



*Tuf* gen koji kodira faktor elongacije Tu (EF-Tu) odabran je za analize jer se kao konzervativni gen često koristi u identifikaciji i karakterizaciji stolbur fitoplazme (Schneider *et al.*, 1997). U nekim slučajevima *tuf* gen je koristan za odvajanje različitih ekoloških sojeva ili varijanti u okviru podgrupe 16S rRNA (Langer and Maixner, 2004).

Utvrđeno je da je *stamp* gen, koji kodira antigenski protein membrane, uključen u interakcije između patogena i insekata vektora i da zbog toga evoluira mnogo brže od ostatka genoma, što ga čini varijabilnijim od drugih gena (Fabre *et al.*, 2011).

Za proučavanje genetskog diverziteta fitoplazmi prisutnih kod biljaka i insekata, od nedavno se koristi i *vmp1* gen, koji kodira pretpostavljeni gen proteina membrane.

Dve najznačajnije alternativne biljke domaćini BN fitoplazme, kopriva (*U. dioica*) i poponac (*C. arvensis*), predstavljaju domaćine različitih genotipova BN fitoplazma (Langer & Maixner, 2004). Njihovim istraživanjima utvrđeno je da je *tuf-b* tip vezan za *C. arvensis*, koji predstavlja njen glavni rezervoar. Naši rezultati su u skladu sa njihovim istraživanjima, jer smo detektovali ovaj genotip u poponcu i u *H. obsoletus* sakupljenim sa *C. arvensis*. U koprivi je utvrđeno prisustvo *tuf-a* tipa stolbur fitoplazme, što je dokazano i u istraživanjima Langer & Maixner (2004), Lessio *et al.*, (2007), Berger *et al.*, (2009). U jednom uzorku *H. obsoletus* koji je bio sakupljen sa koprive utvrđeno je prisustvo *tuf-b* tipa stolbur fitoplazme. Ovo može biti posledica polifagnosti insekata vektora ili neposredne blizine korova, koji su se, na pojedinim lokalitetima nalazili neposredno jedan pored drugog.

Postoje dokazi ne samo o povezanosti fitoplazme sa domaćinom, nego i sa njenim vektorom *H. obsoletus*, koji koristi koprivu i poponac kao svoje biljke domaćine (Maixner, 2010). Kao i mnoge vrste familije Cixiidae, svi razvojni stadijumi ove cikade žive u zemlji, hraneći se korenima biljaka domaćina. Glavne biljke domaćini ove cikade su *C. arvensis* i *U. dioica*. Predstavnici drvenastih biljaka domaćina su *Lavandula angustifolia* u južnoj Francuskoj (Sforza *et al.*, 1999) i *Vitex agnus-castus* u Izraelu (Sharon *et al.*, 2005). Jaja polažu u blizini biljke domaćina i prvi larveni stupanj dolazi do korena kojim se hrani i odatle preuzima fitoplazmu. Na taj način, odrasle cikade su već zaražene kad izađu iz zemlje u junu/julu za vreme perioda letenja koji traje od 6-8 nedelja. Nivo infestacije se ne menja znatno tokom perioda letenja, što naglašava značaj akvizicije fitoplazme tokom

hranjenja larve. *Hyalesthes obsoletus* je u stanju da efikasno inokulira vinovu lozu, uprkos svojoj nepreferentnosti prema ovoj biljci. Ovo se može objasniti kratkim periodom inokulacije i obično visokim procentom zaraženih vektora (Bressan *et al.*, 2007). Do sada nije dokazano da *H. obsoletus* može da usvoji 'Ca. P. solani' iz vinove loze, zbog neredovnog hranjenja i kratkog životnog veka odraslih vektora, jer samo adulti insekata se povremeno hrane na lozi.

„Ciklus koprive“, odnosno sistem koji uključuje BN fitoplazmu *tuf*-a tipa, u kojem je *U. dioica* glavni rezervoar BN fitoplazme, a populacije *H. obsoletus* su najzastupljenije na koprivi, uglavnom je karakterističan za severnu Italiju (Alma *et al.*, 2002), ali je zabeleženo i širenje u drugim vinogradarskim regionima gde uzrokuje pojavu Bois noir (Maixner, 2006). Drugi epidemiološki ciklus („ciklus poponac“), zasnovan na BN fitoplazmi *tuf*-b tipa, u kome je *C. arvensis* glavni rezervoar BN fitoplazme, zastupljen je u centralnoj Evropi i dominantan u južnoj Italiji (Pacífico *et al.*, 2007).

Raznolikost otkrivenih stolbur fitoplazmi, kako u biljnom tako i u insekatskom materijalu, bila je veća u genima membranskih proteina u odnosu na konzervativne gene. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim pretpostavkama da su fitoplazmatski geni koji kodiraju membranske proteine, kao što su *stamp* i *vmp1*, uključeni u interakcije sa insektima vektorima zbog čega oni brže evoluiraju od ostatka genoma (Cimerman *et al.*, 2009; Fabre *et al.*, 2011). Izolati koji su okarakterisani u našim istraživanjima pokazali su raznolikost u odnosu na biljni i insekatski materijal iz koga su izolovane fitoplazme.

Pozitivan selekcionni pritisak koji pokazuje *stamp* gen dokazuje da ovaj gen ima ulogu u interakciji sa insektom vektorom (Fabre *et al.*, 2011). Stolbur fitoplazmu prenose različiti vektori. Postoje najmanje tri vrste cikada familije Cixiidae koje prenose 'Ca. P. solani' (Fos *et al.*, 1992; Maixner, 1994; Sforza *et al.*, 1998; Gatineau *et al.*, 2001; Jović *et al.*, 2009).

*Vmp1* gen predstavlja genetički marker koji je jako varijabilan u odnosu na ostale neribozomalne lokuse, jer su najmanje tri *vmp1* profila povezana sa jedinstvenim profilom *tuf* gena (Pacífico *et al.*, 2009) što je potvrđeno i u našim istraživanjima.

Prema *tuf/vmp1/stamp* tipizaciji utvrđeno je ukupno 12 genotipova među svim izolatima. Četiri genotipa povezana su sa vinovom lozom, sa podjednakom zastupljenošću

*tuf-a* i *tuf-b* tipova. Na osnovu kompletne *tuf/vmp1/stamp* tipizacije jedan od BN genotipova, koji je utvrđen u vinovoj lozi u makedonskim vinogradima, odgovara genotipu (STOLg) koji je najrasprostranjeniji u vinogradima i sakupljenim cikadama u Srbiji, dok je drugi genotip bio identičan sa Vv24g koji je bio čest u inficiranoj vinovoj lozi u Srbiji (Cvrković *et al.*, 2014). Genotip *tuf-a* i prelazni *tuf-ab* genotip, bili su identifikovani u vinovoj lozi, koprivi i u *H. obsoletus* sakupljenim sa koprive. Jedan od njih je identičan sa *tuf-ab/V18/19-25* koji je utvrđen u vinovoj lozi u Makedoniji (Kostadinovska *et al.*, 2014). Isti genotip je utvrđen i u vinovoj lozi, *H. obsoletus* i koprivi sakupljenim u vinogradima Austrije (genotip CPsM4\_At1) pri čemu je utvrđeno da je to glavni genotip koji je prouzrokovao epidemiju BN u Austriji (Aryan *et al.*, 2014). Drugi je novi *stamp* genotip poznat kao *tuf-a/V3/M3*, koji je ograničen na vinovu lozu i *H. obsoletus* sakupljen sa koprive. Dva nova genotipa povezana su sa koprivom i označeni su kao *tuf-ab/V18/M1* i *tuf-a/V3/M4* pri čemu je prvi povezan sa odgovarajućom populacijom *H. obsoletus*, a drugi je ograničen samo na koprivu. Visoki diverzitet genotipova stolbur fitoplazme zapažen je i kod *H. obsoletus* sakupljenih sa koprive i poponca. Osim prethodno pomenutih genotipova, pet genotipova povezano je isključivo sa *H. obsoletus*. Dva genotipa utvrđena su kod *H. obsoletus* sa koprive. Jedan je *tuf-a/V3/SB5*, koji je ranije bio detektovan u Hrvatskoj (Fabre *et al.*, 2011), a drugi je novi genotip *tuf-a/V3/M2*. Tri genotipa otkrivena su kod *H. obsoletus* sakupljenih sa poponca: *tuf-b/V4/GGY*, *tuf-b/V4/M5* i *tuf-b/V14/Rqg50*. Genotip *tuf-b/V14/Rqg50* odgovara Rqg50g genotipu, identifikovanom u vinogradima u Srbiji i genotipu CPsM4\_At12 koji se javlja u vinogradima u Austriji. Među izolatima poponca pronađen je samo jedan genotip, nazvan *tuf-b/V2-TA/Rqg50* koji je bio identičan genotipu utvrđenom u vinovoj lozi u Crnoj Gori (Kosovac, neobjavljeni podaci). U svim izolatima profil V3 našao se samo u asocijacijama sa *tuf-a* tipom stolbur fitoplazme, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Foissac *et al.*, 2013). Profil V18 uvek je bio u asocijaciji sa prelaznim *tuf-ab* tipom.

Epidemiološki sistem oboljenja izazvanih fitoplazmama obuhvata najmanje tri komponente: fitoplazmu, biljku domaćina i insekta vektora koji živi na biljci domaćinu. Glavni element koji utiče na efikasnosti epidemiološkog ciklusa je način života vektora,

odnosno, broj generacija, period hibernacije, prioriteta hrana i njegova mobilnost, odnosno sezonska migracija.

Imaga *H. obsoletus* hrane se različitim biljkama ali u vreme razvića larvi kada insekti usvajaju fitoplazme, samo nekoliko biljaka koriste u svojoj ishrani (Lagner and Maixner 2004). Smatra se da je *C. arvensis* primarna biljka domaćin i rezervoar stolbur fitoplazme, ali u poslednjoj dekadi *U. dioica* postala je podjednako preferirana biljka domaćin (Johannesen *et al.*, 2012). Do nedavno smatralo se da je kopriva primarni domaćin samo u Italiji (Lessio *et al.*, 2007). Novija proučavanja naglašavaju da je *tuf-a* stolbur povezan sa koprivom najčešći stolbur genotip, a *U. dioica* dominantna biljka domaćin u Nemačkoj, severoistočnoj Francuskoj, Švajcarskoj i Austriji, gde je pretežno odgovoran za masovnu pojavu *H. obsoletus* i ozbiljnu epidemiju BN (Johannesen and Riedle-Bauer, 2014).

Prirodni ciklusi u epidemiologiji fitoplazmatskih oboljenja sastoje se od više ili manje simptomatskih korovskih biljaka domaćina i vektora koji nisu pogođeni fitoplazmatskim infekcijama (Caudwell, 1983). U ovom slučaju, slaba virulentnost se tumači kao posledica duge koevolucije patogena i njegovog domaćina (Elliott *et al.*, 2003). Epidemija nove bolesti je indukovana bilo produženjem prirodnog ciklusa ka novim biljkama koje su pogodne kao domaćini za ishranu prirodnog vektora, ili preko introdukcije novog vektora u stanište gde oboje, prirodni domaćin i kultura, već postoje. Stoga, pojava bolesti na kulturnim biljkama može da bude posledica širenja prirodnog epidemiološkog ciklusa na nove biljne vrste, koje omogućavaju da fitoplazme eksploatišu nove ekološke niše (Lee *et al.*, 1998). Ovo dovodi do pojave različitih genotipova fitoplazmi, ako su sekundarni epidemiološki ciklusi izolovani od originalnih (Lee *et al.*, 1998).

Naša istraživanja pokazuju da su epidemiološki ciklusi BN u Republici Makedoniji povezani sa poponcem i sa koprivom, kao biljkama rezervoarima stolbur fitoplazme, sa nešto većom zastupljenošću *tuf-a* tipa i *H. obsoletus* u asocijaciji sa koprivom, koja je preferentna biljka domaćin za *H. obsoletus* u ovoj zemlji. Češća pojava *tuf-a* i *tuf-ab* genotipova povezanih sa koprivom verovatno je rezultat poljoprivredne prakse u jugoistočnoj Makedoniji, koja uključuje intenzivno navodnjavanje u toku toplih i suvih leta i omogućava pogodne uslove za razvoj koprive u neposrednoj blizini vinograda. Pošto

kopriva ne pokazuje simptome fitoplazmatske infekcije, a biljke za utvrđivanje prisustva stolbur fitoplazme su sakupljane slučajnim izborom, samo dva različita genotipa su identifikovana kod inficiranih biljaka, rezervoara stolbura. Sa druge strane, znatno veći diverzitet *stamp* genotipova utvrđen je u izolatima *H. obsoletus* skupljenim sa koprive u odnosu na izolate koji potiču iz *H. obsoletus* sakupljenih sa poponca.

Intenzivno širenje BN u Republici Makedoniji od kada je oboljenje prvi put registrovano (Šeruga *et al.*, 2003), kao i veliki broj *H. obsoletus* sakupljenih na koprivama ukazuju na pojavu moguće iznenadne epidemije i postojanje dve različite rase *H. obsoletus*, od kojih je jedna vezana samo za koprivu, a druga za poponac. Ovo upućuje na potrebu za daljim istraživanjima koja će biti fokusirana na razdvajanje *H. obsoletus* u odnosu na biljku domaćina među makedonskim populacijama vektora, a time i postavljanje odgovarajućih strategija za iskorenjivanje oboljenja.

## 6. Zaključak

Na osnovu rezultata dvogodišnjih istraživanja diverziteta faune cikada u vinogradima Makedonije i njihove uloge u epidemiologiji 'Candidatus Phytoplasma solani', doneti su sledeći zaključci:

- ✓ U sastavu faune cikada u vinogradima Makedonije utvrđeno je prisustvo 22 vrste cikada u okviru 6 familija, a 5 taksona je određeno do nivoa roda; 21 vrsta pripada familiji Cicadellidae, 3 vrste su iz familije Cixiidae i po jedan predstavnik iz familija Aphrophoridae, Delphacidae, Dyctiopharidae i Issidae.
- ✓ Na svih pet lokaliteta najzastupljenija vrsta je *P. alienus* (27,5%), zatim *A. manderstjernii* (25,7%) i *H. obsoletus* (18,7%). Vrsta *E. incisus* je zastupljena sa 8,9%, vrste iz roda *Issus* sa 5%, vrsta *D. europaea* sa 2,9%, vrsta *C. viridis* sa 1,8%, *D. impudica* sa 1,5%, *A. ribauti* sa 1,3%. Vrste *P. spumarius* i *Aphrodes makarovi* su zastupljene sa 1%.
- ✓ Prisustvo fitoplazmi utvrđeno je u 6 vrsta cikada: *E. incisus*, *P. alienus*, *A. ribauti*, *H. obsoletus*, *D. europaea* i *A. manderstjernii*.
- ✓ U vrsti *E. incisus* utvrđeno je prisustvo dve grupe fitoplazmi: 16SrI-B podgrupe *aster yellows* grupe i 16SrII *peanut witches'-broom* grupe. U vrsti *P. alienus* detektovano je prisustvo dve podgrupe *aster yellows* fitoplazme, 16SrI-B i 16SrI-C. U vrsti *A. ribauti*, detektovano je prisustvo 16SrI-C podgrupe *aster yellows* fitoplazme.
- ✓ U ostale tri vrste cikade: *H. obsoletus*, *D. europaea* i *A. manderstjernii* utvrđeno je prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani'.
- ✓ Rezultati PCR analiza cikada sakupljenih na lokalitetu Hamzali, pokazuju prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani' u 2 vrste cikada: *H. obsoletus* i *D. europaea*. Od ukupno 138

analiziranih jedinki *H. obsoletus* kod 29 (21%) je utvrđeno prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani', dok je kod vrste *D. europaea* prisustvo fitoplazme registrovano u 11% analiziranih jedinki.

- ✓ Na lokalitetu Dobrošinci vrste *H. obsoletus* i *D. europaea* nisu registrovane, a prisustvo stolbur fitoplazme utvrđeno je u dve od 71 analizirane jedinice vrste *A. manderstjernii*.
- ✓ Na lokalitetu Gradošorci, prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani' je utvrđeno u 1 od 4 analizirane jedinice vrste *D. europaea* (25%), jedinice vrste *A. manderstjernii* nisu bile pozitivne na prisustvo stolbur fitoplazme, dok vrsta *H. obsoletus* nije bila prisutna na ovom lokalitetu.
- ✓ Na lokalitetu Dobrejci analizirani primerci vrste *A. manderstjernii* su bili negativni na prisustvo stolbur fitoplazme, dok je prisustvo fitoplazme utvrđeno u 26% analiziranih jedinki vrste *H. obsoletus* i 33,3% analiziranih jedinki vrste *D. europaea*.
- ✓ Rezultati PCR analize cikada sakupljenih na lokalitetu Petralinci, pokazuju prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani' u sve 3 vrste cikada: *H. obsoletus*, *D. europaea* i *A. manderstjernii*. Od ukupno 37 analiziranih jedinki *H. obsoletus*, kod 20 primeraka (54%) je utvrđeno prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani'. Procenat zaraženosti kod vrste *D. europaea* je bio 33,3%. Prisustvo stolbur fitoplazme je potvrđeno i kod dve od 76 analiziranih jedinki vrste *A. manderstjernii*.
- ✓ Prisustvo 'Ca. Phytoplasma solani' utvrđeno je u svih 12 analiziranih uzoraka vinove loze.
- ✓ Prisustvo stolbur fitoplazme utvrđeno je u dve najčešće biljne vrste prisutne na utrinama Strumičkog regiona: *Convolvulus arvensis* i *Urtica dioica*.

- ✓ Molekularna karakterizacija 'Ca. Phytoplasma solani' u analiziranom materijalu vršena je analizom genskih regiona *tuf* gena, *stamp* gena i *vmp1* gena, RFLP metodom i sekvenciranjem.
- ✓ Poređenje sa RFLP obrascima referentnih izolata pokazalo je prisustvo dva tipa stolbur fitoplazme u analiziranim uzorcima: *tuf-a* tipa koji je definisan kao tip vezan za koprivu i *tuf-b* tipa koji je u asocijaciji sa poponcem. *Tuf-a* tip je prisutan u 25% inficiranih biljaka vinove loze, 40% inficiranih biljaka koprive i u 49% inficiranih jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na koprivi. *Tuf-b* tip je prisutan u 75% inficiranih biljaka vinove loze, u svih 7 inficiranih biljaka poponca i u svih 14 jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na poponcu.
- ✓ U 60% biljaka koprive, 45% jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na koprivi i u 17% uzoraka vinove loze, utvrđeno je prisustvo intermedijarnog tipa *tuf-ab*.
- ✓ RFLP analizom *vmp1* gena sa *RsaI*, *TaqI* i *AluI* restrikcionim enzimima utvrđeno je pet različitih restrikcionih profila označenih kao V2-TA, V3, V4, V14 i V18.
- ✓ Najzastupljeniji RFLP profil je bio V18, prisutan u 36% izolata. Svi V18 *vmp1* profili pripadali su intermedijernom *tuf-ab* tipu i bili su prisutni u vinovoj lozi, koprivi i populacijama *H. obsoletus* sakupljenim na koprivama.
- ✓ Prisustvo V3 *vmp1* profila bilo je utvrđeno u 33% izolata koji su bili u asocijaciji sa *tuf-a* tipom u vinovoj lozi, koprivama i jedinkama *H. obsoletus* sa koprive.
- ✓ V14 profil je bio prisutan samo u vinovoj lozi, V4 samo u jedinkama *H. obsoletus* sakupljenim na poponcu, dok je V2-TA profil bio prisutan u vinovoj lozi, poponcu i populacijama *H. obsoletus* u asocijaciji sa poponcem.



- ✓ Molekularnom karakterizacijom na osnovu *stamp* gena identifikovano je ukupno 11 genotipova sa maksimalom varijabilnošću između sekvenci od 4,9%. Šest genotipova je bilo identično sa prethodno opisanim referentnim izolatima (19-25, SB5, Rqg50, Vv24, GGY i STOL), dok je pet genotipova prvi put utvrđeno u ovim istraživanjima. Ovi genotipovi su nazvani: M1, M2, M3, M4 i M5.
- ✓ U vinovoj lozi su identifikovana četiri genotipa *stamp* gena. od kojih su dva genotipa Vv24 i STOL bili identični kao referentni *stamp* genotipovi utvrđeni u vinovoj lozi iz Srbije. Sekvenca trećeg genotipa je bila identična kao sekvenca referentnog izolata 19-25 iz Nemačke, dok je četvrti genotip (M3) bio prisutan samo u vinovoj lozi i *H. obsoletus* sa koprive i imao jedinstvenu sekvencu.
- ✓ U jedinkama vrste *H. obsoletus* sakupljenih sa *U. dioica*, identifikovano je pet genotipova *stamp* gena. Dva su bila identična sa referentnim izolatima SB5 iz Hrvatske i 19-25 iz Nemačke, dok su genotipovi označeni kao M1, M2 i M3 imali jedinstvene sekvence.
- ✓ Kod jedinki *H. obsoletus* sakupljenih sa *C. arvensis*, identifikovana su 2 genotipa *stamp* gena, označena kao Rqg50 i GGY. Oba genotipa su bila identična sa referentnim genotipovima *H. obsoletus*.
- ✓ U koprivi su identifikovana 2 genotipa sa jedinstvenim sekvencama u poređenju sa referentnim izolatima, označena kao M1 i M4.
- ✓ Svi izolati iz poponca imali su sekvence identične sekvenci izolata Rqg50 detektovanoj u jedinkama *H. obsoletus* i biljkama vinove loze iz Srbije i Austrije.
- ✓ Na osnovu *tuf/vmp1/stamp* karakterizacije četiri genotipa stolbur fitoplazme identifikovano je u prirodno inficiranim biljkama vinove loze. Najzastupljeniji genotip je bio tuf-b/V2-TA/STOL, koji je bio prisutan u 33% biljaka vinove loze. Takođe su u

velikoj stopi u biljkama vinove loze bili prisutni genotipovi: tuf-b/V14/Vv24 i tuf-a/V3/M3, zastupljeni u po 25% uzoraka. U dva od 12 izolata vinove loze bio je prisutan tuf-ab/V18/19-25 genotip.

- ✓ Najveći broj genotipova je bio utvrđen u izolatima *H. obsoletus* poreklom sa koprive: tuf-ab/V18/M1, prisutan u 43% analiziranih uzoraka, tuf-a/V3/M2, utvrđen u 25% analiziranih uzoraka, tuf-a/V3/M3, prisutan u 18% uzoraka, tuf-ab/V18/19-25 i tuf-a/V3/SB5, utvrđeni u po 7% analiziranih uzoraka.
  
- ✓ U koprivama su bila utvrđena dva genotipa stolbur fitoplazme: tuf-ab/V18/M1 i tuf-a/V3/M4. Svi izolati stolbur fitoplazme prisutni u *C. arvensis* i 36% izolata iz jedinki *H. obsoletus* sa poponca, pripadali su genotipu tuf-b/V2-TA/Rqg50. Pored ovog genotipa, među izolatima iz jedinki *H. obsoletus* sa *C. arvensis*, utvrđeno je 3 genotipa stolbur fitoplazme: tuf-b/V14/Rqg50, u 28% zaraženih *H. obsoletus*, tuf-b/V4/GGY, u 28% uzoraka i tuf-b/V4/M5, u 7% jedinki *H. obsoletus* u kojima je bilo utvrđeno prisustvo stolbur fitoplazme.

## 7. Literatura

- Alma A., Arnò C., Arzone A., Vidano C. (1987). New biological reports on Auchenorrhyncha in vineyards. Proceedings 6th Auchenorrhyncha Meeting, Turin: 509-516.
- Alma A. (2002): Auchenorrhyncha as pests on grapevine. In Zikaden Leafhoppers, Planthoppers and Cicadas (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Denisia* 4: 531 – 538.
- Alma A., Soldi G., Tedeschi R., Marzachi C. (2002). Ruolo di *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Homoptera Cixiidae) nella trasmissione del Legno nero della vite in Italia. Atti II Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi, Roma: 57-58.
- Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padiou E. (2001). *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40: 79 - 86.
- Aryan A., Brader G., Mörtel J., Pastar M., Riedle-Bauer M. (2014). An abundant 'Candidatus Phytoplasma solani' tuf b strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology* 140: 213-227.
- Atanasova B., Spasov D., Spasova D., and Dimitrov Y. (2013): Cicada species on vine plantations in the Strumica region, Republic of Macedonia. *Agricultural Sciences* 4 (12): 135-138.
- Atanasova B., Spasov D., Spasova D. (2010): Qualitative and quantitative analysis of cicadas (Homoptera: Auchenorrhyncha) at grapevine in region of Kavadarci, Republic of Macedonia. *Agriculture Science. Plant studies* 1: 109-114.
- Atanasova B., Jakovljević M., Spasov D., Jović J., Mitrović M., Toševski I., Cvrković T. (2015): The molecular epidemiology of *Bois noir* grapevine yellows caused by 'Candidatus Phytoplasma solani' in the Republic of Macedonia. *European Journal of Plant Pathology*. DOI: 10.1007/s10658-015-0649-0.

- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Berger J., Chweigkofler W. S., Erschbamer C. K., Oschatt C. R., Dalla Via J., Baric S. (2009). Occurrence of Stolbur phytoplasma in the vector *Hyalesthes obsoletus*, herbaceous host plants and grapevine in South Tyrol (Northern Italy). *Vitis*. 48: 185–192.
- Bertaccini A. (2004). Phytoplasma diseases of grapevine and fruit trees. Vth Congress of Plant protection. November, 22-26. pp 79.
- Bertaccini A. (2006). Diversity of 16SrXIII phytoplasmas detected in grapevine growing areas worldwide. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006.
- Bertaccini A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Biedermann R., Niedringhaus R. (2004). Die Zikaden Deutschlands. *WABV - Verlag, Scheeßel, Germany*.
- Bondavalli R., Milanesi L., Cavallini G., Montermini A., Mazio P., Bortolotti P., Credi R., Vicchi V., Bertaccini A. (2005). Osservazioni epidemiologiche sui giallumi della vite nelle province di Modena e Reggio Emilia. Atti 3° Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi, Milano 22-24 giugno 2005.
- Botti S., Paltrinieri S., Mori N., Milanesi L., Bondavalli R., Bertaccini A. (2005). Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia. In: III Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi Milano, Italy. pp. 73-75.
- Boudon-Padieu E. (2003). Grapevine phytoplasmas. First internet Conference on Phytopathogenic mollicutes.
- Boudon-Padieu E. (2005). Phytoplasmas associated to Grapevine yellows and potential vectors. *Bulletin O.I.V* 78: 311-320.
- Bovey R., Martelli G.P. (1992): Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Description, historical review and bibliography. MFCIC/ICVG, Tunis, 111.

- Bressan A., Clair D., Sémétey O., Girolami V., Boudon-Padieu E. (2006). Infectivity of *Scaphoideus titanus* in Flavescence dorée infected vineyards. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006.
- Bressan A., Turata R., Maixner M., Spiazzi S., Boudon-Padieu E., Girolami V., (2007). Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettle and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology* 150: 331-339.
- Caudwell A. (1957). Deux années d'études sur la *Flavescence dorée*, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 4: 359 – 363.
- Caudwell, A. (1961). Etude sur le maladie du bois noir de la vigne: ses rapports avec la flavescence doree. *Annales des Epiphyties*, 12: 241-262.
- Caudwell A., Gianotti J., Kuszala C., Larrue J., (1971). Etude du rôle de particules se type "Mycoplasmae" dans l'étiologie de la Flavescence doree de la Vigne. Examen cytologique des plantes maladies et des cicadelles infectieuses. *Annales de Phytopathologie* 3: 107-123.
- Caudwell A. (1983). L'origine des jaunisses a mycoplasmes (MLO) des plantes et l'exemple des jaunisses de la vigne. *Agronomie* 3: 103-111.
- Cimerman A., Pacifico D., Salar P., Marzachi C., Foissac X. (2009). Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and environmental microbiology* 75: 2951-2957.
- Clair D., Larrue J., Aubert G., Gillet J., Cloquemin G., Boudon-Padieu E. (2003). A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42: 151–157.
- Constable F. E. (2010). Phytoplasma epidemiology: Grapevine as a model. *Phytoplasmas - Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Weintraub P.G., Jones P. CAB International. Wallingford Page(s): 188-212.
- Credi R., Terlizzi L., Cricca L., Dradi D. (2004). Epidemiologia del legno nero della vite. *L'Informatore Agrario* 60(7): 72-75.

- Credi R. (2006). Wild host plants of stolbur phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of grapevine Bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006.
- Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. (2011). Potential new Hemipteran vectors of stolbur phytoplasma in Serbian vineyards. *Bulliten of Insectology* 64 (Supplemenet): S129 – S130.
- Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Toševski I. (2014). Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology* 63: 42–53.
- 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.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Davis R. E., Jomantiene R., Zhao Y., Dally E. L. (2003). Folate biosynthesis pseudogenes,  $\psi$  fol P and  $\psi$  fol K, and an O-Sialoglyco protein endopeptidase gene homolog in the phytoplasma genome. *DNA and Cell Biology* 22: 697–706.
- Deng S., Hiruki C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Doi Y.M., Terenaka 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. *Annals of Phytopathology Society of Japan* 33: 259-266.
- 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: 575-579.
- Elliot S.L., Adler F.R., Sabelis M.W. (2003). How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology* 84: 2568–2574.

- Fabre A., Danet J. L., Foissac X., (2011). The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* 472: 37–41.
- Fialová, R., Válková, P., Balakishiyeva, G., Danet, J. L., Šafárová, D., Foissac, X., & Navrátil, M. (2009). Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in south Moravia. *Journal of Plant Pathology* 91: 411-416.
- Filippin L., Jović J., Cvrković T., Forte V., Clair D., Toševski I., Boudon-Padieu E., Borgo M., Angelini E. (2009). Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* 58: 826-837.
- Firrao G., Gibb K., Streten C. (2005) Short taxonomic guide to the genus ‘Candidatus Phytoplasma’. *Journal of Plant Pathology* 87: 249–263. Special issue.
- Fos A., Danet J.L., Zreik L., Garnier M., Bove J. M. (1992). Use of a monoclonal-antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease* 76: 1092–1096.
- Foissac X., Carle P., Fabre A., Salar P., Danet J.-L., STOL-BUR-EUROMED consortium. (2013). ‘Candidatus Phytoplasma solani’ genome project and genetic diversity in the Euro-Mediterranean basin. In: Abstracts, 3rd European Bois Noir Workshop, March 22-23, 2013, Barcelona, Spain. pp 11–13.
- Garau R., Sechi A., Tolu G., Prota V. A., Lentini A., Prota U. (2004). *Goniagnathus guttulinervis* (Kirshbaum) new natural host of the stolbur subgroup 16SrXII-A phytoplasma in Sardinia. *Journal of Plant Pathology* 86: 177-177.
- Gatineau, F., Larrue, J., Clair, D., Lorton, F., Richard-Molard, M., Boudon-Padieu, E. (2001). A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Plant Pathology* 107: 263–271.
- Gatineau F., Jacob N., Vautrin S., Larrue J., Lherminier J., Richard-Molard M., Boudon-Padieu E. (2002). Association with the Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet of a Phytoplasma and a Bacterium-Like Organism Transmitted by a *Pentastiridius* sp. *Phytopathology* 92: 384–392.

- Gogala M., Trilar T., Krpač V. (2005). Fauna of singing cicadas (Auchenorrhyncha: Cicadoidea) of Macedonia – a bioacoustic survey. *Acta entomologica slovenica* 13: 103 – 126.
- Hewitt W.B., Bovey R. (1979): The viroses and virus-like diseases of the grapevine. A bibliographic report, 1971 - 1978. *Vitis* 18: 316-376.
- Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Harrison N., Dickinson M. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1826-1837.
- Hodgetts J., Dickinson M. (2010). Phytoplasma Phylogeny and Detection Based on Genes other than 16s rRNA. *Phytoplasmas - Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Weintraub P.G., Jones P. CAB International. Wallingford Page(s): 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.
- Hogenhout A. S., Šeruga Musić M. (2010). Phytoplasma Genomics, from Sequencing to Comparative and Functional Genomics – What Have We Learnt? *Phytoplasmas - Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Weintraub P.G., Jones P. CAB International. Wallingford Page(s): 19-36.
- Holzinger W. E., Kammerlander I., Nickel H. (2003). The Auchenorrhyncha of Central Europe. Fulgoromorpha, Cicadomorpha Excl. Cicadellidae. (p.673). *Leiden: Brill Academic Publishers*.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- IRPCM (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.
- Johannesen J., Lux B., Michel K., Seitz A., Maixner M. (2007). Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126: 217–227.



- Johannesen J., Lux B., Michel K., Seitz A., Maixner M. (2008). Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126: 217–227.
- Johannesen, J., Foissac, X., Kehrl, P., Maixner, M. (2012). Impact of vector dispersal and hostplant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. *PLoS ONE* 7(12): e51809.
- Johannesen J., Riedle-Bauer M. (2014). Origin of a sudden mass occurrence of the stolbur phytoplasma vector *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae) in Austria. *Annals of Applied Biology* 165: 488–495.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Petrović A., Redinbaugh MG, Pratt RC, Hogenhout SA, Toševski I. (2009). Stolbur phytoplasma transmission to maize by *Reptalus panzeri* and the disease cycle of maize redness in Serbia. *Phytopathology* 99: 1053–1061.
- Jović J., Ember I., Mitrović M., Cvrković T., Krstić O., Krnjajić S., Acs Z., Kolber M., Toševski I. (2011). Molecular detection of potato stolbur phytoplasma in Serbia. *Bulletin of Insectology* 64: 83-84.
- Kirkpatrick B. C., Stenger D.C., Morris T.J., Purcell A.H. (1987): Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238 (4824): 197–200
- Kollar A., Seemuller E., Bonnet F., Saillard C., Bove J. M. (1990) Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80: 233-237
- Kostadinovska E., Quaglino F., Mitrev S., Casati P., Bulgari D., Atilio Bianco P. (2014) Multiple gene analyses identify distinct “bois noir” phytoplasma genotypes in the Republic of Macedonia. *Phytopathologia mediterranea* 53 (3): 491-501.
- Kranz J. (1990). Epidemics, their mathematical analysis and modelling. Kranz J.(ed.) *Epidemics of Plant Diseases: Mathematical Analysis and Modeling*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 1–11.
- 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: 197-198.
- Langer M., Darimont H., Maixner M. (2003). Control of phytoplasma vectors in organic viticulture. *IOBC/wprs Bulletin* 26: 197–202.
- Langer, M., Maixner, M. (2004). Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43: 191-199.
- Lavina, A., Sabaté, J., Batlle, A., (2006). Spread and transmission of *Bois noir* phytoplasma in two Spain regions. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006.
- Lee, I. M. Davis, R. E. (1988). Detection and investigation of genetic relatedness among aster yellows and other mycoplasma-like organisms by using cloned DNA and RNA probes. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1: 303–310.
- Lee I. M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E. and 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 and Evolutionary Microbiology* 48: 1153-1169.
- Lee I. M., Davis R. E., Gundersen-Rindal, D. E. (2000): Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-225.
- 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.
- Lee I. M., Zhao Y., Davis R. E. (2010). Prospects of Multiple Gene-based Systems for Differentiation and Classification of Phytoplasmas. *Phytoplasmas - Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Weintraub P.G., Jones P. CAB International. Wallingford Page(s): 51-63.
- Lessio F, Tedeschi R & Alma A (2007) Population dynamics, host plants and infection rate with Stolbur phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in north-western Italy. *Journal of Plant Pathology* 89: 97–102.

- 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.
- Maixner M. (1994). Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* 33: 103–104.
- Maixner M., Ahrens U., Seemüller E., (1995). Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology* 101: 241-250.
- Maixner M. (2006). Grapevine yellows – current developments and unsolved questions. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006.
- Maixner M. (2010). Phytoplasma epidemiological systems with multiple plant hosts. *Phytoplasmas - Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Weintraub P.G., Jones P. CAB International. Wallingford Page(s): 213-232.
- Marcone C., Hergenhahn F., Ragozzino A., Seemüller E. (1999). Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, rubus stunt, Picris echioides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. *Journal of Phytopathology* 147: 187-192.
- Martelli G. P.(2003): Graft-Transmissible Diseases of Grapevines: Handbook for Detection and Diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome – Italy, 2003.
- Martini M., Lee I-M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan J., Osler R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2037–2051.
- Mihajlović Lj. (2007): *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera: Auchenorrhyncha) nova štetna vrsta za entomofaunu Srbije. *Glasnik šumarskog fakulteta* 95: 127-134.
- Milanesi L., Bondavalli R., Mori N., Dradi D., Menozzi I., Bertaccini A. (2005). Osservazioni sul vettore del fitoplasma del Legno Nero della vite, *Hyalesthes obsoletus*, in Emilia Romagna. 2005. Atti 3° Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi, Milano 22-24 giugno 2005.

- Milkus B., Clair D., Idir S., Habili N., Boudon-Padieu E. (2005). First detection of Stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. *Plant Pathology* 54: 236.
- 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 *Neotalitrus fenestratus* (Deltocephalinae) as a natural vector. *European Journal of Plant Pathology*: 134: 647-660.
- Moya-Raygoza G., Nault L. R. (1998). Transmission biology of maize bushy stunt Phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 91: 668-676.
- Murrall D. J., Nault L. R., Hoy C. W., Madden L. and Miller S. A. (1996). Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 89: 1223-1232.
- Murray, R. G. E., Schleifer, K. H. (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 174-176.
- Murray R. G. E., Stackebrandt E. (1995) Taxonomic Note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described prokaryotes. *International journal of systematic bacteriology* 45: 186-187.
- Murolo S., Marcone C., Prota V., Garau R., Foissac X., Romanazzi G. (2010). Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2049–2059.
- Murolo S., Marcone C., Prota V., Garau R., Foissac X., Romanazzi G., 2013. Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. Corrigendum. *Journal of Applied Microbiology* 115: 631-633.
- Nickel H., Remane R. (2002): Check list of the planthoppers and leafhoppers of Germany, with notes on food plants, diet width, life cycles, geographic range and conservation

- status (Hemiptera, Fulgoromorpha and Cicadomorpha). *Beiträge zur Zikadenkunde* 5: 27-64.
- Nickel H. (2003). The leafhoppers and planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. *Pensoft publishers*, 460 pp.
- Nickel H., Hildebrandt J. (2003): Auchenorrhyncha communities as indicators of disturbance in grasslands (Insecta, Hemiptera) – a case study from the Elbe flood plains (northern Germany). *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98: 183 – 199.
- Nielson M. W. (1975): A revision of the Subfamily Coelidiinae (Homoptera: Cicadellidae), Tribes Tinobregmini, Sandersellini and Tharrini. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology, Supplement* 24: 1–197.
- Orenstein, S., Zahavi, T., Nestel, D., Sharon, R., Barkalifa, M., Weintraub, P. (2003). Spatial dispersion patterns of potential leafhopper and planthopper (Homoptera) vectors of phytoplasma in wine vineyards. *Annals of Applied Biology* 142: 341-348.
- Pacifico D., Foissac X., Veratti F., Marzachi C. (2007). Genetic diversity of Italian phytoplasma and French ‘bois noir’ isolates. *Bulletin of Insectology* 60: 345–346.
- Pacifico D., Alma A., Bagnoli B., Foissac X., Pasquini G., Tessitori M., Marzachi C. (2009). Characterization of Bois noir Isolates by restriction fragment length polymorphism of a Stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* 99: 711-715.
- Palermo S., Elekes M., Botti S., Ember I., Alma A., Orosz A., Bertaccini A., Kölber M. (2004). Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian viticulture. *Vitis* 43: 201-203.
- Petrović N., Seljak G., Matis G., Miklavc J., Beber K., Bobenl J., Ravinkar M. (2003). The presence of grapevine yellows and their potential natural vectors in wine-growing regions of Slovenia. Extended Abstracts of 14 th Meeting of ICVG, Locorotondo 2003: 97-98. [http://www.agr.uniba.it/ICVG\\_2003](http://www.agr.uniba.it/ICVG_2003).

- Pinzauti F., Trivellone, V., Bagnoli, B. (2008). Ability of *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae) to inoculate stolbur phytoplasma to artificial feeding medium. *Annals of Applied Biology* 153: 299-305.
- Power, A.G. (1992). Host plant dispersion, leafhopper movement and disease transmission. *Ecological Entomology* 17: 63 - 68.
- Quaglino F., Zhao Y., Bianco P. A., Wei W., Casati P., Durante G., Davis R.E. (2009). New 16Sr subgroups and distinct single nucleotide polymorphism lineages among grapevine Bois noir phytoplasma populations. *Annals of Applied Biology* 154: 279–289.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W., Davis, R.E. (2013). ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2879–2894.
- Radonjić, S., Hrnčić, S., Jović, J., Cvrković, T., Krstić, O., Krnjajić, S., Toševski, I. (2009). Occurrence and Distribution of Grapevine Yellows Caused by Stolbur Phytoplasma in Montenegro. *Journal of Phytopathology* 157: 682-685.
- Rambaut A., Drummond A.J. (2009). Tracer v1.5, URL <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rambaut, A. (2012). FigTree. URL <http://www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rančić D., Paltrinieri S., Toševski I., Petanović R., Stevanović B., Bertaccini A. (2005). First report of multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense* and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. *Plant Pathology* 54: 561–561.
- Reemane R., Wachmann E. (1993). Zikaden: kennenlernen-beobachten. Naturbuch Verlag, Augsburg.
- Richards O. W., Davies R.G. (1977). ImmS general textbook of entomology. Tenth edition, 2. Classification and biology.
- Riedle-Bauer M., Tiefenbrunner W., Otreba J., Hanak K., Schildberger B., Regner F. (2006). Epidemiological observations on bois noir in Austrian vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg* 56: 177–181.

- Riedle-Bauer M, Sára A, Regner F. (2008). Transmission of a stolbur phytoplasma by the agalliinae leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae). *Journal of Phytopathology* 156: 687–690.
- Sabaté J., Laviña A., Batlle A. (2003). Potential vectors of grapevine bois noir phytoplasma in Spain and evaluation of their transmission capacity. Extended Abstracts 14th ICVG Conference, Locorotondo, Italy.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381–3389.
- Sears B. B., Lim P. O., Holland N., Kirkpatrick B. C., Klomparens K. L. (1989). Isolation and characterization of DNA from a mycoplasma-like organism. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 2: 175–180.
- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3-26.
- Seljak, G., Matis, G., Miklavc, J., Beber, K. (2003). Identification of potential natural vectors of grape yellows in Drava wine-growing region. Zbornik predavanj in referatov 6. Slovenskega Posvetovanja o Varstvu Rastlin, Zrece, Slovenije, 4-6 marec 2003.
- Seljak G. (2004). Contribution to the knowledge of planthoppers and leafhoppers of Slovenia (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Slovenica* 12 (2): 189-216.
- Sforza R, Clair D, Daire X, Larrue J, Boudon-Padieu E. (1998). The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of *Bois noir* of grapevine in France. *Journal of Phytopathology* 146: 549-556.
- Sforza R., Bourgoïn T., Wilson S.W., Boudon-Padieu E. (1999). Field observations, laboratory rearing and descriptions of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Entomology* 96: 409–418.
- Shao, J., Jomantiene, R., Dally, E.L., Zhao, Y., Lee, I.-M., Nuss, D.L. and Davis, R.E. (2006). Phylogeny and characterization of phytoplasmal NusA and use of the *nusA* gene in detection of group 16SrI strains. *Journal of Plant Pathology* 88: 193–201.

- Sharon R., Soroker V., Wesley S.D., Zahavi T., Harari A., Weintraub P.G. (2005). *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1051–1063.
- 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.
- Swofford DL (2002). Paup\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Šeruga, M., Škorić, D., Kozina, B., Mitrev, S., Krajačić, M., Ćurković Perica, M. (2003). Molecular identification of a phytoplasma infecting grapevine in the Republic of Macedonia. *Vitis* 42: 181–184.
- Šeruga Musić M., Krajačić M., Škorić D. (2008). The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *Journal of Microbiological Methods* 73: 69–72.
- 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.
- Trivellone, V., Pinzauti, F., Bagnoli, B. (2005). *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha Cixiidae) as a possible vector of Stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia* 88: 103-108.
- Weber A., Maixner M. (1998). Habitat requirement of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) and approaches to control this planthopper in vineyards, pp. 77–78. In Proceedings IOBC/wprs Meeting. Ed. P. Blaise. Hungary: IOBC.
- Weintraub P. G. (2007). Insect vectors of phytoplasmas and their control – an update. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 169-173.
- 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*, Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. and Lane D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Zhao Y., Wei W., Davis R. E., Lee I-M. (2010). Recent Advances in 16S rRNA Gene-based Phytoplasma Differentiation, Classification and Taxonomy. *Phytoplasmas - Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Weintraub P.G., Jones P. CAB International. Wallingford Page(s): 64 – 92.

## **Biografija**

Biljana Atanasova je rođena 13.07.1978. godini u Strumici u Makedoniji. Osnovnu i srednju školu završila je u rodnom mestu. U februaru 2002. godine diplomirala je na Prirodno - matematičkom fakultetu, studijski program Biologija.

Magistarski rad pod nazivom „Faunistički sastav cikada (Homoptera: Auchenorrhyncha) vinove loze u Republici Makedoniji“, odbranila je 2010. godine čime je stekla zvanje magistra poljoprivrednih nauka. 2012. godine je upisala doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu, na Biološkom fakultetu, studijski program „Biologija“, modulu „Morfolologija, sistematika i filogenija životinja“.

Od 01.07.2007. godine zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta "Goce Delčeva" u Štipu, Makedonija, i uspešno sprovodi svoje nastavne aktivnosti kao asistent više predmeta iz oblasti zaštita bilja (entomologije, fitofarmacija, zaštita useva). Tokom svoje profesionalne karijere učestvovala je kao saradnik - mladi istraživač u nekoliko domaćih i jednom međunarodnom naučno - istraživačkom projektu. Učestvovala je na mnogim konferencijama, kongresima i specijalizacijama u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани- Билјана Атанасова

број индекса B3056/2012

### Изјављујем

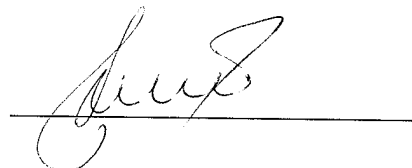
да је докторска дисертација под насловом

Фауна цикада (Hemiptera: Auchenorrhyncha) у виноградима Македоније и њихова улога у епидемиологији 'Candidatus Phytoplasma Solani'

- 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, 14.04.2015



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Билјана Атанасова

Број индекса V3056/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада Фауна цикада (Hemiptera: Auchenorrhyncha) у виноградима Македоније и њихова улога у епидемиологији 'Candidatus Phytoplasma Solani'

Ментор Проф. др Жељко Томановић, др Татјана Цврковић

Потписани/а Билјана Атанасова

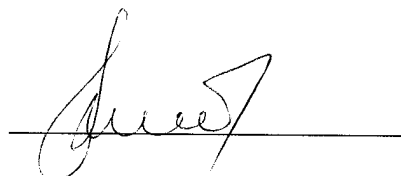
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 14.04.2015



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Фауна цикада (Hemiptera: Auchenorrhyncha) у виноградима Македоније и њихова улога у епидемиологији 'Candidatus Phytoplasma Solani'

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

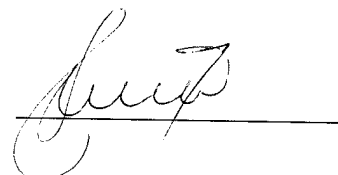
5. Ауторство – без прераде

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, 14.04.2015



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

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

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

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

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

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