

CREPIS FOETIDA L. – NOVA BILJKA DOMAĆIN CIKADE HYALESTHES OBSOLETUS SIGNORET 1865 (HEMIPTERA: CIXIIDAE), VEKTORA STOLBUR FITOPLAZME

ANDREA KOSOVAC, MILJANA JAKOVLJEVIĆ, OLIVER KRSTIĆ,
TATJANA CVRKOVIĆ, MILANA MITROVIĆ, IVO TOŠEVSKI, JELENA JOVIĆ

*Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za štetočine bilja, Zemun
e-mail: kosovac.andrea@gmail.com*

REZIME

Epidemiologija biljnih bolesti uzrokovanih fitoplazmama direktno je zavisna od biologije insekta vektora i njegove preferentnosti prema biljkama domaćinima. Bolest žutila vinove loze *Bois Noir* (BN) uzrokovana prisustvom stolbur fitoplazme (16SrXII-A podgrupa, 'Candidatus Phytoplasma solani'), tokom zadnjih 15 godina je postala jedna od ekonomski najznačajnijih bolesti vinove loze u Evropi. *Hyalesthes obsoletus* Signoret 1865 (Hemiptera: Cixiidae) kao glavni vektor stolbur fitoplazme na vinovu lozu direktno utiče na pojavu i učestalost ove bolesti, kao i na stepen štete u vinogradima. Epidemiološki ciklus BN fitoplazme uslovljen je biljkom domaćinom cikade *H. obsoletus* koja predstavlja izvor zaraze u vinogradu i od koje direktno zavisi prisustvo patogena u populaciji insekta. Prisustvo stolbur fitoplazme i simptoma BN bolesti registrovano je u svim vinogradarskim regionima Srbije.

U cilju utvrđivanja epidemioloških specifičnosti prenošenja stolbur fitoplazme u Srbiji, istraživanja u ovoj studiji su bila usmerena u pravcu determinisanja biljaka domaćina adulta cikade *H. obsoletus* i njihove genetičke osobenosti. Primarno su analizirane populacije u asocijaciji sa ranije poznatim domaćinima, koprivom (*Urtica dioica* L.) i poponcem (*Convolvulus arvensis* L.). Na osnovu sprovedenih terenskih istraživanja utvrđena je nova asocijacija odraslih jedinki *H. obsoletus* sa biljkom *Crepis foetida* L. (Asteraceae) na više lokaliteta u istočnoj i južnoj Srbiji.

Genetička struktura populacija cikade *Hyalesthes obsoletus* vezanih za odgovarajuće biljke domaćine je analizirana radi dobijanja jasne slike epidemioloških ciklusa stolbur fitoplazme u gajenim kulturama u Srbiji. Na osnovu analize tri mitohondrijalna genska regiona utvrđena je genetička diferencijacija populacija *H. obsoletus* u vidu dva genotipa vezanih svojim životnim ciklusom za *C. arvensis* i *U. dioica* sa jedne strane, odnosno za novoutvrđenog domaćina *C. foetida* sa druge strane. Dominacija jednog od ova dva genotipa u prirodi i distribucija biljaka domaćina daju osnov za dalja istraživanja potencijalne vektorske uloge i karakterizacije stolbur fitoplazme koju *H. obsoletus* prenosi kao i epidemioloških ciklusa vezanih za novu biljku domaćina u Srbiji.

Gljučne reči: *Hyalesthes obsoletus*, *Crepis foetida*, Srbija, vektor, biljka domaćin

UVOD

Hyalesthes obsoletus Signoret 1865 (Hemiptera: Cixiidae) je polifagna cikada, primarno mediteranskog rasprostranjenja čija je severna granica areala jugozapadna Nemačka, dok se na jugoistok prostire i na azijsko kopno na teritoriji Male Azije (Hoch i Remane, 1985). Glavni je i najznačajniji vektor stolbur

fitoplazme 'Candidatus Phytoplasma solani' (Maixner, 1994; Sforza i sar., 1998), koja se dovodi u vezu sa više zabeleženih bolesti gajenih kultura iz familije Solanaceae kao što su krompir, paradajz i paprika, ali i vinova loza, kukuruz, lavanda, jagoda i druge biljne kulture (Quaglino i sar., 2013). *Hyalesthes obsoletus* prenosi stolbur fitoplazmu putem ishrane floemskim

sokovima biljke domaćina, usled čega polifagni način ishrane ove cikade omogućava zaražavanje različitih biljnih vrsta i uslovljava kompleksan epidemiološki ciklus bolesti.

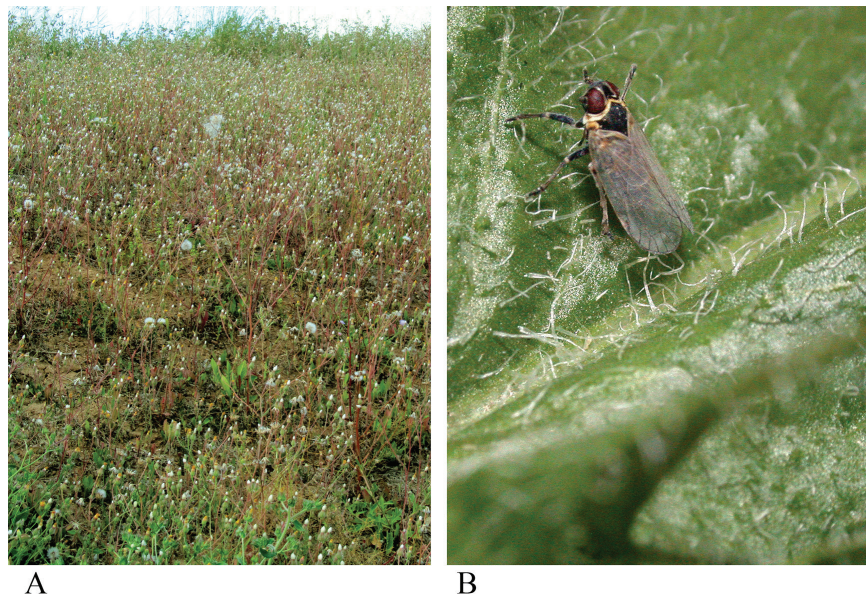
U mnogim vinogradarskim područjima širom Evrope i Male Azije stolbur fitoplazma uzrokuje ekonomski veoma značajnu bolest žutila vinove loze – *Bois Noir* (BN), poznatu kao *Vergilbungskrankheit* (VK) u Nemačkoj i *Legno nero* u Italiji. Karakteristični simptomi zaraze vinove loze stolbur fitoplazmom najčešće su crvenilo ili žutilo listova duž lisnih nerava, savijanje listova, izostanak lignifikacije korena i sušenje plodova. Unutar vinograda, simptomi BN često mogu biti lokalizovani na svega nekoliko čokota, što je posledica slučajnog zaražavanja biljaka usled polifagne ishrane vektora *H. obsoletus*, kome vinova loza nije primarni domaćin. Međutim, ukoliko je brojnost populacije insekta vektora i stopa zaraženosti jedinki stolbur fitoplazmom visoka, BN može uzrokovati značajne štete u vinogradima i dovesti do gubitka celokupne biomase vinove loze kada stepen zaraze može biti i preko 50%. (Maixner, 2006). Prisustvo stolbur fitoplazme i simptoma BN bolesti registrovano je u svim vinogradarskim regionima Srbije, a u pojedinim vinogradima stepen zaraze dostiže i preko 50% zaraženih čokota (Cvrković, 2010).

Životni ciklus *H. obsoletus* je sličan kao i kod ostalih vrsta cikada iz familije Cixiidae. Oplodene ženke polažu jaja u zemljištu u blizini korena biljke u grupama od 23–50 i tako se svih 5 larvenih stupnjeva razvija hraneći se na korenu domaćina. Prezimljavanje se odvija u L3 stadijumu u zemljištu na dubini od 20–25cm (Sforza i sar., 1999; Langer i sar., 2003). Kada se iz larvi razvijaju adulti, oni migriraju ka gornjim delovima biljke, ali to ne mora biti ista biljka, pa

ni ista biljna vrsta. U Evropi, *H. obsoletus* ima jednu generaciju godišnje, a period letenja adulta traje od polovine juna do sredine avgusta, u zavisnosti od abiotičkih faktora datog područja kao i biljke domaćina (Sforza i sar., 1998; Darimont i Maixner, 2001).

Hyalesthes obsoletus je polifagna vrsta, ali je razvićem ipak vezan za manji broj određenih biljaka na kojima se uglavnom može naći u većem broju. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da su širom južne Evrope i u Nemačkoj glavne biljke domaćini, na kojima se odvija razviće larvi *H. obsoletus*, poponac (*Convolvulus arvensis* L.) i kopriva (*Urtica dioica* L.) (Langer i Maixner, 2004), dok je u južnoj Francuskoj to *Lavandula angustifolia* L. (Sforza, 1999), a u Izraelu *Vitex agnus-castus* L. (Sharon, 2005).

Do sada nije utvrđeno koji sve faktori utiču na izbor biljke domaćina *H. obsoletus*, ali taj izbor ima značajan uticaj na vektorsku ulogu insekta i kao jak selektivni faktor može dovesti do simpatričke ekološke specijacije (Berlocher i Feder, 2002; Imo i sar., 2013). U Nemačkoj su, populacije *H. obsoletus* koje su u asocijaciji sa *C. arvensis* ili *U. dioica*, inficirane različitim genetičkim sojevima stolbur fitoplazme (Langer i Maixner, 2004) i ove dve populacije pokazuju različite biološke osobenosti u pogledu različitih perioda letenja (Maixner, 2006). Ovakva i slična saznanja ukazuju na potrebu za istraživanjima biljaka domaćina *H. obsoletus* na teritoriji Srbije u cilju utvrđivanja vektorske uloge različitih populacija i epidemioloških ciklusa koje one uslovljavaju. Tokom istraživanja ekoloških karakteristika populacija vrste *H. obsoletus* u Srbiji zabeležena je asocijacija sa novom biljkom domaćinom do sada nepoznatom u literaturi. Pored potvrđenih asocijacija sa već poznatim i očekivanim biljkama domaćinima, *U. dioi-*



Slika 1. A – Xserotermno stanište *Crepis foetida*; B – *Hyalesthes obsoletus* na listu *C. foetida*.
Figure 1. A – Xerothermic habitat of *Crepis foetida*; B – *Hyalesthes obsoletus* on *C. foetida* leaf.

ca i *C. arvensis*, registrovane su visokobrojne populacije odraslih jedinki *H. obsoletus*, koncentrisanih na gornjim delovima biljne vrste *Crepis foetida* L. (Asteraceae), (Slika 1).

U cilju utvrđivanja epidemioloških specifičnosti prenošenja stolbur fitoplazme u Srbiji, istraživanja u ovoj studiji su bila usmerena u pravcu determinisanja biljaka domaćina adulta cikade *H. obsoletus* i njihove genetičke osobenosti.

MATERIJAL I METODE

Za ova istraživanja, populacije *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima sakupljane su tokom 2012. i 2013. godine na teritoriji istočne i južne Srbije. Sakupljanje insekata je vršeno u periodu od polovine juna do polovine avgusta kako u agroekosistemima na korovskim vrstama, tako i u prirodnim ekosistemima ruderalnih i livadskih staništa. Insekti su sakupljeni metodom košenja biljaka entomološkom mrežom i direktno sa nadzemnih delova biljaka domaćina pomoću aspiratora. Posebna pažnja je bila posvećena preciznom sakupljanju odraslih insekata na odgovarajućim biljkama domaćinima kako bi se populacije mogle dosledno grupisati i ispratiti od samog trenutka sakupljanja do analize rezultata. Obzirom da adulti *H. obsoletus* pokazuju izraženiju aktivnost i agregaciju na gornjim delovima biljke tokom najtoplijeg dela dana, sakupljanje je vršeno u skladu sa tim. Ulovljene jedinke su zatim sakupljene pomoću aspiratora i prebačene u krio-tubice (Sarstedt, Nemačka) sa 96% etil-alkoholom. Tubice sa sakupljenim insektima su na terenu čuvane na temperaturi od 7-11°C u prenosnom frižideru, a zatim u laboratorijskim uslovima u frižideru na 4°C.

Ekstrakcija DNK iz insekata je vršena nedeaktivnom, delimično modifikovanom TES metodom (Mahuku, 2004), koja ima za cilj očuvanje jedinki radi daljih morfoloških analiza. Pojedinačni adulti su punktirani kontrolisano pod binokularom Leica MS5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), sterilnom entomološkom iglom, lateralno, u predelu spoja između

među 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, u izdvojeni supernatant je dodat izopropanol u istoj zapremini (400 µl), 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 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6). Ekstrahovana DNK čuvana je na -20°C.

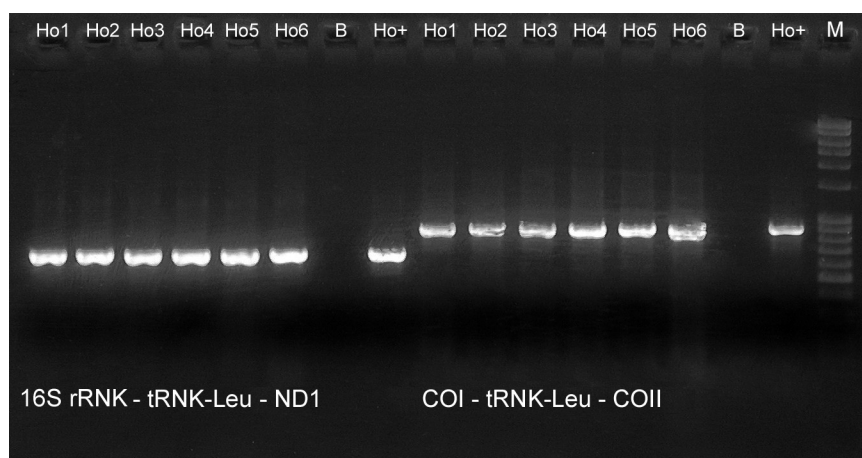
U cilju utvrđivanja genetičke osobenosti populacija *H. obsoletus* vezanih za različite biljke domaćine, analizirana su tri mitohondrijalna (mtDNK) genska regiona: i) 16S rRNK tRNK-Leu - ND1 region koji obuhvata 16S ribozomalnu RNK (16S rRNK), transportnu RNK za leucin (tRNK-Leu) i nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) dehidrogenazu subjedinicu 1 (ND1); ii) COI - tRNK-Leu - COII koji obuhvata gene za citohrom oksidazu subjedinicu 1 (COI), tRNK-Leu i citohrom oksidazu subjedinicu 2 (COII); iii) region gena COI dužine 1150 baznih parova (bp), uključujući i barkoding region (Tabela 1).

Prvi region, 16S rRNK - tRNK-Leu - ND1, ukupne dužine 400 bp, umnožen je pomoću LR-N-12945 i N1-J-12261 para prajmera (Hedin, 1997) (Tabela 1). PCR umnožavanje vršeno je u 20 µl zapremini reakcione smeše sadržaja: KAPA Taq A pufer (1 x 1.5 mM MgCl₂), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.5 mM), prajmeri (0.4 µM), KAPA Taq polimeraza (Kapabiosystems) (0.0375 U/µl) i 1 µl ekstrahovane DNK uzorka. Da bi se eliminisala mogućnost da je tokom pripreme uzoraka došlo do

Tabela 1. Analizirani genski regioni mtDNK sa odgovarajućim prajmerima i sekvencama.

Table 1. Analyzed mtDNA gene regions with corresponding primers and sequences.

Genski region	Dužina analiziranog regiona	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru	Literatura
16S rRNK – tRNK-Leu - ND1	400 bp	LR-N-12945	CGACCTCGATGTTGAATTA	Hedin (1997)
		N1-J-12261	TCGTAAGAAATTATTTGAGC	Hedin (1997)
COI- tRNK-Leu - COII	780bp	S2792	ATACCTCGACGTTATTCAGA	Brown i sar. (1996)
		A3661	CCACAAATTTCTGAACATTGACCA	Brown i sar. (1996)
COI	1150bp	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer i sar. (1994)
		UEA8	TAACCTTTTTTCCCAACATTTT	Lunt i sar. (1996)



Slika 2. Amplikoni dva mtD-NK genska regiona *Hyalesthes obsoletus*: 16S rRNK - tRNK-Leu - ND1 i COI - tRNK-Leu - COII; kolone Ho1-Ho6 - uzorci *H. obsoletus*; B - negativna kontrola (voda); Ho+ - pozitivna kontrola *H. obsoletus* DNK.

Figure 2. Amplicones of two mtDNA gene regions of *Hyalesthes obsoletus*: 16S rRNA - tRNA-Leu - ND1 and COI - tRNA-Leu - COII; Ho1-Ho6 lines - *H. obsoletus* samples; B - negative controle (water); Ho+ - positive control of *H. obsoletus* DNA.

unakrsne kontaminacije, na svakih 10 uzoraka je primenjena negativna kontrola koju predstavlja dodatna tubica sa reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, u koju je umesto 1 μ l uzorka dodat 1 μ l molekularne vode. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler[®]ep, prema sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija 95°C 2 min; denaturacija 95°C 30 s, hibridizacija prajmera 48°C 1 min, ekstenzija 72°C 90 s (35 ciklusa), finalna ekstenzija 72°C 10 min.

Drugi region, COI - tRNK-Leu - COII, ukupne dužine 780 bp, umnožen je upotrebom prajmera S2792 i A3661 (Brown i sar., 1996) (Tabela 1). Uslovi reakcije umnožavanja bili su slični prethodno opisanim, kao i protokol pripreme uzoraka. Termalni uslovi reakcije bili su identični gore opisanim, dok je reakciona smeša sadržala višu finalnu koncentraciju $MgCl_2$ (5 mM).

Analiza trećeg mtDNK regiona, 1150 bp COI gena, izvršena je umnožavanjem pomoću para prajmera LCO1490 (Folmer i sar., 1994) i UEA8 (Lunt i sar., 1996) (Tabela 1.). Umnožavanje DNK vršeno je u 20 μ l zapremini PCR smeše sadržaja: KAPA Taq A pufer (1 x 1.5mM $MgCl_2$), $MgCl_2$ (2.25 mM), dNTPs (0.6 mM), prajmeri (0.5 mM), KAPA Taq polimeraza (Kapabiosystems) (0.05 U/ μ l) i 1 μ l DNK uzorka. Umnožavanje je vršeno prema sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija 94°C 3 min; denaturacija 94°C 1 min, elongacija 48°C 1 min, ekstenzija 72°C 2 min (30 ciklusa), finalna ekstenzija 72°C 7 min.

Nakon završenog umnožavanja, radi provere uspešnosti amplifikacije, 5 μ l PCR produkta svakog uzorka je elektroforetski razdvojeno u 1% agaroznom gelu obojenom etidium bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom (Slika 2). Reakcije sekvenciranja amplikona su urađene u MacroGen-u (Južna Koreja) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvencatoru. Provera kvaliteta sekvenci

i njihovo prevođenje u FASTA format je urađeno u programu FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Poređenje sekvenci i utvrđivanje nukleotidnih razlika je izvršeno pomoću CLUSTAL W programa integrisanog unutar MEGA5 programa (Tamura i sar., 2011), a ocena nukleotidnih razlika između populacija pomoću *engl.* pairwise metoda. Za analizu filogenetskih odnosa između populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima korišćeni su Neighbor-Joining metod (Saitou i Nei, 1987) i metod maksimalne parsimonije. Sve filogenetske analize urađene su pomoću programa MEGA 5.

REZULTATI

Tokom istraživanja asocijacija cikade *Hyalesthes obsoletus* sa različitim biljkama domaćinima, obrađeno je ukupno dvadeset dva lokaliteta u istočnoj i južnoj Srbiji, na kojima su utvrđene populacije ove cikade vezane za *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica* i *Crepis foetida*. Na dva lokaliteta utvrđene su populacije *H. obsoletus* vezane za *C. arvensis* kao biljku domaćina, na 12 lokaliteta populacije vezane za *U. dioica* i na 8 za *C. foetida* kao novoutvrđenu biljku domaćina. Prisustvo i rasprostranjenje biljaka domaćina na teritoriji Srbije pokazalo je da se sve tri biljne vrste koje su bile predmet istraživanja ne mogu ograničiti na korovsko-ruderalnu kategoriju jer su pored poljoprivrednih površina i ruderalnih staništa, koja su pod konstantnim ili povremenim uticajem čoveka, prisutne i kao elementi biljnih zajednica u nenarušenim ekosistemima. *Convolvulus arvensis* je česta korovska vrsta u agroekosistemima, dok se *U. dioica* za razliku od centralne Evrope, gde je dominantna korovska vrsta vezana za vinograde, na teritoriji Srbije češće javlja na ruderalnim staništima. *Crepis foetida* je zabeležena unutar vinograda gde je na jednom od lokaliteta nađena u

sintopiji sa *C. arvensis*. Međutim, ova biljka se često javlja i na ruderalnim staništima gde je na dva lokaliteta registrovana u sintopiji sa *U. dioica*, ali je kao i prethodne dve vrste prisutna i u prirodnim ekosistemima, najčešće kserotermnih livada.

Sve tri biljke domaćini koje su registrovane na teritoriji Srbije su pokazale manje-više iste brojnosti populacija *H. obsoletus* nezavisno od tipa staništa. Terenske aktivnosti u cilju sakupljanja imaga *H. obsoletus* trajala su tokom cele sezone njihovog leta (polovina juna do polovina avgusta) kako bi bili pokriveni periodi kada je dinamika aktivnosti svih populacija najveća. Populacije *H. obsoletus* vezane za *C. arvensis* su registrovane samo na dva od ukupno dvadeset dva lokaliteta, dok su populacije vezane za *U. dioica* dominirale, i u ovim istraživanjima su utvrđene na ukupno dvanaest lokaliteta gde su insekti sakupljeni u značajnoj brojnosti. Potvrđeno je da se periodi leta adulta *H. obsoletus* u asocijaciji sa *U. dioica* i *C. arvensis* razlikuju u vremenu pojavljivanja. Jedinke vezane za *C. arvensis* se pojavljuju ranije (sredina juna) i imaju kratak period leta koji se preklapa u desetak dana sa populacijama vezanim za *U. dioica*. Populacije vezane za *C. foetida* su veoma brojne i prisutne u letu u periodu jula meseca i gotovo se u potpunosti poklapaju sa periodom leta populacija vezanih za *U. dioica*.

Analize genetičkih osobnosti populacija u asocijaciji sa ove tri biljke domaćina su izvršene na osnovu tri mtDNK regiona od kojih su dva već bila prethodno analizirana (Johannesen et al., 2008; 2012). Mitohondrijalni genski regioni 16SrRNK - tRNK-Leu - ND1 i COI - tRNK-Leu - COII su u analizama korišćeni kao jedinstvena spojena sekvencija (engl. concatenated) u dužini od 1180 bp. Upotrebom CLUSTAL W programa urađeno je poravnanje novodobijenih sekvenci sa sekvencama prethodno opisanih haplotipova (Johannesen et al., 2008; 2012) i kao rezultat je dobijen ukupno 21 haplotip. Rezultati analize genetičke distance pokazali su da je između haplotipova vezanih za *C. arvensis* i *U. dioica* sa jedne strane (17 haplotipova) i *C. foetida* sa druge (4 haplotipa), prisutna konstantna genetička distanca od 1.4%, dok su genetičke distance unutar grupa bile 0.3% u slučaju *C. arvensis* i *U. dioica* haplotiposke grupe i 0.1% u slučaju haplotipova vezanih za *C. foetida*.

Rekonstrukcija filogenetskog stabla kod sekvenciranih primeraka izvršena je preko modela p-distance, primenom Neighbor-Joining metoda i metodom maksimalne parsimonije. Na osnovu obe analize dobijena su filogenetska stabla identične topologije koja su pokazala grupisanje sekvenci u odnosu na njihove biljke domaćine sa visokim vred-

nostima "bootstrap" testa od 100%.

Dodatnom analizom COI fragmenta dužine 1150 baznih parova potvrđena je konstantna genetička divergentnost od 2.2% između populacija *H. obsoletus* vezanih za različite biljke domaćine. I na osnovu ovog genskog regiona sekvence su se grupisale u dva klastera, jedan sačinjen od primeraka u asocijaciji sa *C. arvensis* i *U. dioica*, a drugi od primeraka *H. obsoletus* u asocijaciji sa *Crepis foetida*.

DISKUSIJA

Istraživanja asocijacija cikade vektora *Hyalesthes obsoletus* sa različitim biljkama domaćinima doprinose razjašnjavanju problematike epidemiologije stolbur fitoplazme, posebno imajući u vidu da je u literaturi poznato preko 70 biljnih vrsta iz 14 familija u kojima je zabeleženo prisustvo stolbur fitoplazme (Sforza, 1998). Biljka domaćin ima fundamentalni značaj i uticaj na brojnost populacija vektora, njihovo rasprostranjenje kao i incidencu stolbur fitoplazme u vinogradima, a pored toga kao stalni izvor zaraze čini preduslov začetka epidemiološkog ciklusa bolesti i samim tim zahteva posebnu istraživačku pažnju. U slučaju *Bois Noir* oboljenja, vinova loza predstavlja krajnjeg domaćina, engl. dead end host-plant (Boudon-Padieu, 2000), što znači da *H. obsoletus* prenosi stolbur fitoplazmu slučajnim događajem, pasivno, prilikom ishrane floemskim sokovima biljke (Maixner i sar., 1995), ali ne može izvršiti akviziciju fitoplazme sa vinove loze. Problematika utvrđivanja biljke domaćina, koja omogućava razvoj larvalnih stupnjeva ali i predstavlja izvor hrane adultima, sve više dobija na značaju u epidemiološkim istraživanjima i u formiranju strategije kontrole bolesti. U Evropi je pokazano da su biljke koje su izvori zaraze stolbur fitoplazmom vrste na kojima *Hyalesthes obsoletus* kompletira svoje razviće: *Convolvulus arvensis* i *Urtica dioica* ili u južnoj Francuskoj *Lavandula angustifolia*. U Izraelu *H. obsoletus* kompletira ceo životni ciklus na *Vitex agnus-castus*, ali populacije koje izleću nisu zaražene fitoplazmom što znači da ova biljna vrsta nije istovremeno i rezervoar biljka (Sharon, 2005).

Crepis foetida kao novozabeležena biljka domaćin igra potencijalno značajnu ulogu u epidemiologiji stolbur fitoplazme u Evropi. Obzirom da su na ovoj biljci registrovane izuzetno brojne populacije *H. obsoletus* u Srbiji, ona svakako predstavlja izvor hrane adultima (Slika 1). Ukoliko se larvalni stadijumi razvijaju na korenu ove vrste i ukoliko je ona zaražena fitoplazmom, otvoriće se nova polja istraživanja usmerena ka utvrđivanju značaja ove biljne vrste u epidemiologiji stolbur fitoplazme. *Crepis*

foetida ima južno palearktičko rasprostranjenje od transkavkazja do Engleske, pa samim tim ako je u pitanju skorašnji događaj promene domaćina (*engl.* host shift) na teritoriji jugoistočne Evrope, usled globalnog zagrevanja se slična dešavanja mogu očekivati širom areala, što za posledicu svakako ima širenje areala vektora pa i same zaraze.

Analiza tri mitohondrijalna genska regiona populacija *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima pokazuje značajnu i konstantnu genetičku diferencijaciju što ukazuje na postojanje dve divergentne linije (genotipa) koji su u vezi sa od-

govarajućim domaćinom. Obzirom da veći broj biljaka domaćina uvećava mogućnosti genetičke razmene i lokalnih adaptacija, ovaj podatak je od izuzetnog značaja, dajući mogućnosti za stvaranje novih epidemioloških puteva i ciklusa (Christensen i sar., 2005).

ZAHVALNICA

Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu realizovani su u okviru projekta III-43001 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

Berlocher, H.S., Feder, J.L. (2002): Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology*, 47: 773–815.

Boudon-Padieu, E. (2000): Recent advances on grapevine yellows: Detection, etiology, epidemiology and control strategies. 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, March 12–17, 2000. Extended abstracts, 87–88.

Brown, J.M., Abrahamson, J.G., Way, P.A. (1996): Mitochondrial DNA phylogeography of host-races of the goldenrod ball gallmaker, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution*, 50: 777–786.

Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005): Phytoplasma and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11): 525–536.

Cvrković, T. (2010): Diverzitet faune cikada u vinogradima Srbije i njihova uloga u prenošenju *Bois noir* fitoplazme. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Darimont, H., Maixner, M. (2001): Actual distribution of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) in German viticulture and its significance as a vector of Bois noir. *IOBC/wprs Bulletin*, 24: 199–202.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3: 294–299.

Hedin, M.C. (1997): Molecular phylogenetics at the population/species interface in cave spiders of the southern Appalachians (Araneae: Nesticidae: *Nesticus*). *Molecular Biology and Evolution*, 14: 309–324.

Hoch, H., Remane, R. (1985): Evolution und Speziation der Zikaden-Gattung *Hyalesthes* SIGNORET, 1865 (Homoptera Auchenorrhyncha Fulgoroidea Cixiidae). *Marburger Entomologische Publikationen*.

Imo, M., Maixner, M., Johannesen, J. (2013): Sympatric diversification vs. immigration: deciphering host-plant specialization in a polyphagous insect, the stolbur phytoplasma vector *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Molecular Ecology* doi: 10.1111/mec.12237

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., Kehrli, P., Maixner, M. (2012): Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. PLoS ONE, 7(12): e51809.

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.

Lunt, D., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M. (1996): The insect COI gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Molecular Biology, 5: 153–165.

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): Research note: Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the plant-hopper *H. obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). Vitis, 33: 103–104.

Maixner, M., Ahrens, U., Semüller, 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, 3: 241–250.

Maixner, M. (2006): Temporal behaviour of grapevines infected by type II Vergilbungskrankheit (Bois Noir). In Proceedings of the 15th ICVG Conference, pp. 223–224. Stellenbosch, South Africa: South African Society for Entology and Viticulture.

Maixner, M., Langer, M., Gerhard, Y. (2006): Epidemiological characteristics of Bois Noir type I. In Proceedings of the 15th ICVG Conference, pp. 86–87. Stellenbosch, South Africa: South African Society for Entology and Viticulture.

Mahuku, G.S. (2004): A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. Plant Molecular Biology Reporter, 22: 71–81.

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 doi:10.1099/ijs.0.044750-0.

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 grapevines 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.

Sharon, R., Soroker, V., Wesley, S., Zahavi, T., Harari, A., Weintraub, P. (2005): *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. Journal of Chemical Ecology, 31: 1051–1063.

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.

(Primljeno: 15.01.2014.)
(Prihvaćeno: 24.02.2014.)

CREPIS FOETIDA L. – NEW HOST PLANT OF CIXIID PLANTHOPPER HYALESTHES OBSOLETUS SIGNORET 1865 (HEMIPTERA: CIXIIDAE), VECTOR OF STOLBUR PHYTOPLASMA

ANDREA KOSOVAC, MILJANA JAKOVLJEVIĆ, OLIVER KRSTIĆ,
TATJANA CVRKOVIĆ, MILANA MITROVIĆ, IVO TOŠEVSKI, JELENA JOVIĆ

*Institut for Plant Protection and Environment, Department of Plant Pests, Zemun
e-mail: kosovac.andrea@gmail.com*

SUMMARY

Epidemiology of plant diseases caused by phytoplasmas depends on vector's biology and its preference to the host plant. Grapevine yellows (GY) caused by stolbur phytoplasma (16SrXII-A subgroup, 'Candidatus Phytoplasma solani'), during last 15 years became one of the economically most important diseases of the grapevine in Europe. The cixiid plant-hopper *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera: Cixiidae) is a principle vector of stolbur phytoplasma and has the main influence on the incidence of the disease and yield losses in the vineyards. Epidemiological cycle of the Bois Noir (BN) is determined by the host plant of the *H. obsoletus* which is primal source of the disease in the vineyard and it affects presence of the pathogen in the insect's population. Presence of stolbur phytoplasma and symptoms of the BN disease is registered in all wine growing regions in Serbia.

This research was focused toward determining host plants of the *H. obsoletus* and its genetic characteristics in order to determine epidemiological characteristics of BN in Serbia. Based on this field research, along with populations associated with previously known host plants nettle (*Urtica dioica*) and bindweed (*Convolvulus arvensis*), new host plant association with *Crepis foetida* L (Asteraceae) was registered on several localities in east and south Serbia.

Genetic structure of *H. obsoletus* populations associated with specific host plants is analyzed in order to obtain precise information about epidemiological cycle of stolbur phytoplasma in agroecosystems in Serbia. According to results of the three analyzed mtDNA regions, genetic differentiation is present between *H. obsoletus* populations associated with *C. arvensis* and *U. dioica* on the one and *C. foetida* on the other side. Domination of one of these two genotypes in nature and distribution of the host plants provides the basis for further research of the potential vector ability and characterization of the stolbur phytoplasma which is being transmitted by *H. obsoletus* and epidemiological cycles related to the new host plant in Serbia.

Key words: *Hyalesthes obsoletus*, *Crepis foetida*, Serbia, vector, host plant

(Received: 15.01.2014.)

(Accepted: 24.02.2014.)

INSTITUT ZA ZAŠTITU BILJA I ŽIVOTNU SREDINU - BEOGRAD
INSTITUTE FOR PLANT PROTECTION AND ENVIRONMENT - BELGRADE

ZAŠTITA BILJA PLANT PROTECTION