

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Andrea M. Kosovac

Uticaj biljke domaćina na kriptičnu
diferencijaciju populacija vektora *Hyalesthes*
obsoletus Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) i
epidemiološke puteve prenošenja '*Candidatus*
Phytoplasma solani'

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Andrea M. Kosovac

The influence of host-plant use on cryptic
differentiation of vector *Hyalesthes*
obsoletus Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae)
and on epidemiological transmission routes of
'*Candidatus* Phytoplasma solani'

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentori:

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

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

Članovi komisije:

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

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija urađena je u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za štetočine bilja u Zemunu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. III43001 - „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“ (rukovodilac prof. dr Željko Tomanović).

Deo populaciono-genetičkih istraživanja je urađen na Katedri za Zoologiju, Odseka za Ekologiju, Johan Gutenberg Univerziteta u Majncu u saradnji sa profesorom dr Jesom Johannesenom.

Morfološka identifikacija H. obsoletus primeraka asociranih sa V. agnuscatus i C. foetida je urađena u saradnji sa profesorkom dr Hannelore Hoch iz Prirodnjačkog muzeja u Berlinu.

Zahvaljujem mentorki dr Jeleni Jović na prenetom znanju i mentoru profesoru dr Željku Tomanoviću na savetima i podršci. Hvala kolegama Odseka za štetočine bilja, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu: dr Ivu Toševskom, dr Milani Mitrović, dr Tatjani Cvrković, dr Oliveru Krstiću i Miljani Jakovljević na pomoći u istraživanjima, prijateljskim razgovorima i savetima. Hvala dr Sanji Radonjić i dr Snježani Hrnčić sa Biotehničkog fakulteta, Univerziteta u Podgorici, na pomoći pri sakupljanju materijala.

*Zahvaljujem profesorki dr Hannelore Hoch na muzejskom paratipskom primerku vrste *Hyalesthes thracicus* ustupljenom iz lične entomološke kolekcije.*

Zahvalnost dugujem profesoru dr Jesu Johannesenu za preneto znanje i prijateljsku podršku čime ga smatram neformalnim mentorom.

Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima na nesebičnoj podršci i razmevanju.

Uticaj biljke domaćina na kriptičnu diferencijaciju populacija vektora
Hyalesthes obsoletus Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) i
epidemiološke puteve prenošenja '*Candidatus Phytoplasma solani*'

SAŽETAK:

Hyalesthes obsoletus, vektor biljnog patogena '*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma solani*', smatra se polifagnom štetočinom od ekonomskog značaja u centralnoj Evropi i Mediteranu. Istraživanjima sprovedenim u jugoistočnoj Evropi, koja gravitira centru arela vrste i gde je zabeležen značajan broj '*Ca. P. solani*'-uslovljenih biljnih bolesti, utvrđeno je postojanje četiri asocijacije vektora sa biljkama dualnim domaćinima: *Convolvulus arvensis* (*Ca*), *Urtica dioica* (*Ud*), *Vitex agnus-castus* (*Vac*) i *Crepis foetida* (*Cf*). Populaciono-genetičkim analizama mitohondrijskih i nuklearnih markera (mikrosatelita) utvrđena je kriptična diferencijacija simpatričkih (uključujući sintopske) i geografski udaljenih *H. obsoletus* populacija na tri filogenetičke linije uslovljene biljkom domaćinom: (1) *Ca-Ud*, (2) *Vac* i (3) *Cf*. Pored jasne diferencijacije na mitohondrijskim genima (1.1% - 1.5%) i mikrosatelita koji potvrđuju izdvajanje populacija u jedan od tri klastera prema biljci domaćinu (pripadnost >90%), podršku za izdizanje genetičke divergencije *H. obsoletus sensu lato* na nivo kriptične specijacije daje registrovana distanca u odnosu na morfološki najrodniju vrstu - *Hyalesthes thracicus* (2.1% - 3.3%). Posledice specijalizacije i diferencijacije *H. obsoletus sensu lato* prema biljkama domaćinima na epidemiologiju '*Ca. P. solani*' procenjene su multigenomskom karakterizacijom izolata fitoplazme detektovanih (1) *in situ* u prirodnim epidemiološkim sistemima mediteranskih vinograda i (2) eksperimentima unakrsne inokulacije biljaka putem prirodno inficiranih populacija vektora. Potvrđena je osnovna epidemiološka divergencija '*Ca. P. solani*' na *tuf-a/-ab* i *tuf-b* cikluse vezane za *Ud* i *Ca* uz ukrštanje sa *Vac*-uzrokovanom *tuf-b* epidemiologijom i utvrđena kompleksnost *tuf-b* epidemiologije u kojoj učestvuje i treća genetička linija vektora, *H. obsoletus ex Cf*, kao i sama biljka dualni domaćin - *C. foetida*.

KLJUČNE REČI: *Hyalesthes obsoletus*, biljka domaćin, populaciona genetika, kriptična evolucija, stolbur fitoplazma, epidemiologija, multigenska karakterizacija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Entomologija

UDK: [[577.832+595.753]:576.89]:579.887(043.3)

The influence of host-plant use on cryptic differentiation of vector *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) and on epidemiological transmission routes of 'Candidatus Phytoplasma solani'

ABSTRACT:

The cixiid planthopper *Hyalesthes obsoletus* is generally considered as a polyphagous vector of 'Candidatus (Ca.) P. solani' associated with numerous wild and cultivated plants in central Europe and Mediterranean. Research conducted in southeastern Europe, the distribution centre of *H. obsoletus* and the area of most 'Ca. P. solani'-inflicted crop diseases, points toward specific dual host-plant associations with: *Convolvulus arvensis* (Ca), *Urtica dioica* (Ud), *Vitex agnus-castus* (Vac) and *Crepis foetida* (Cf). Population-genetic analysis of mitochondrial and nuclear genetic markers (microsatellites) have revealed cryptic differentiation between sympatric (including syntopic) and geographically distant *H. obsoletus* populations into three phylogenetic lineages delineated by host-plant preference: 1) Ca-Ud, 2) Vac i 3) Cf. Cryptic species diversification within *H. obsoletus sensu lato* is supported by the genetic divergence of mitochondrial genes (1.1% - 1.5%), microsatellites that confirm population clustering into three genetic groups associated with specific host-plant (average assignment >90%) and genetic distances among host-associated *H. obsoletus* metapopulations comparable to the most closely related, morphologically distinguishable species - *Hyalesthes thracicus* (2.1% - 3.3%). Consequences of the *H. obsoletus sensu lato* differentiation on the epidemiology of 'Ca. P. solani' are assessed by multilocus genotyping of the phytoplasma isolates detected (1) *in situ* in natural epidemiological systems of the Mediterranean vineyards and (2) plant inoculation experiments using naturally infected vector populations. Basic 'Ca. P. solani' epidemiological divergence into *tuf-a/-ab* and *tuf-b* cycles, each associated with Ud and Ca, respectively, is confirmed with evidences of intermixing Vac-induced *tuf-b* epidemiology, while complexity of the *tuf-b* epidemiology is further evidenced through influence of the third genetic lineage of the vector *H. obsoletus ex C. foetida* and its dual host-plant .

KEY WORDS: *Hyalesthes obsoletus*, host-plant, population genetics, cryptic evolution, stolbur phytoplasma, epidemiology, multilocus genotyping

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Entomology

UDC: [[577.832+595.753]:576.89]:579.887(043.3)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Taksonomija, biologija i vektorska uloga <i>Hyalesthes obsoletus</i> Signoret, 1865	3
1.2 Biologija i epidemiologija fitoplazmi (' <i>Candidatus Phytoplasma</i> ')	7
1.3 ' <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ' – stolbur fitoplazma: epidemiologija uslovljena vektorom, putevi prenošenja i molekularna identifikacija.....	11
1.4 Specijalizacija vektora <i>H. obsoletus</i> prema biljkama domaćinima i uticaj na epidemiologiju ' <i>Ca. P. solani</i> '	14
2. Ciljevi	17
3. Materijal i metode	18
3.1 Populaciono-genetičke analize diverziteta <i>H. obsoletus</i>	19
3.1.1 Sakupljanje populacija specijalizovanih prema biljci domaćinu.....	19
3.1.2 Ekstrakcija DNK.....	19
3.1.3 Genotipizacija mitohondrijskih markera	20
3.1.3.1 Amplifikacija mitohondrijskih markera.....	20
3.1.3.2 Genealogija mitohondrijskih gena, analize diverziteta i populaciona diferencijacija.....	23
3.1.3.3 Filogenetske analize	27
3.1.4 Genotipizacija mikrosatelitskih nuklearnih markera.....	28
3.1.4.1 Amplifikacija mikrosatelitskih nuklearnih markera.....	28
3.1.4.2 Diverzitet i varijabilnost mikrosatelita.....	30
3.1.4.3 Populaciona struktura i diferencijacija.....	30
3.2 Molekularna detekcija i karakterizacija ' <i>Ca. P. solani</i> ' u populacijama <i>H. obsoletus</i>	32
3.2.1 Detekcija ' <i>Ca. P. solani</i> '	32
3.2.2 Multigenaska karakterizacija izolata ' <i>Ca. P. solani</i> '	33
3.2.2.1 Analiza <i>tuf</i> gena	34
3.2.2.2 Analiza <i>stamp</i> gena	36
3.2.2.3 Analiza <i>vmp1</i> gena.....	37
3.3 Molekularno-epidemiološke analize praćenja puteva diseminacije ' <i>Ca. P. solani</i> ' u prirodnim sistemima mediteranskih vinograda.....	39
3.3.1 Sakupljanje materijala	40
3.3.1.1 Sakupljanje <i>H. obsoletus</i>	40
3.3.1.2 Sakupljanje biljaka domaćina <i>H. obsoletus</i>	41
3.3.2 Ekstrakcija DNK.....	42
3.3.2.1 Ekstrakcija DNK iz <i>H. obsoletus</i>	42
3.3.2.2 Ekstrakcija DNK iz biljaka	42
3.3.3 Molekularna detekcija i karakterizacija ' <i>Ca. P. solani</i> '	43

3.3.4	Vektorska uloga <i>H. obsoletus</i> ex <i>V. agnus-castus</i> u epidemiologiji 'Ca. P. solani' u mediteranskim vinogradima.....	43
3.4	Eksperimenti prenošenja 'Ca. P. solani' prirodno inficiranim populacijama <i>H. obsoletus</i>	44
3.4.1	Sakupljanje materijala <i>H. obsoletus</i>	45
3.4.2	Eksperimentalne procedure ukrštenog prenošenja 'Ca. P. solani' između različitih prirodnih asocijacija vektora	46
4.	Rezultati	48
4.1	Lokaliteti uzorkovanja <i>H. obsoletus</i> populacija u asocijacijama sa različitim biljkama domaćinima	48
4.2	Populaciono-genetički diverzitet i varijabilnost <i>H. obsoletus</i>	55
4.2.1	Diverzitet i varijabilnost mitohondrijskih markera	55
4.2.2	Diverzitet i varijabilnost mikrosatelitskih nuklearnih markera	62
4.3	Genetička diferencijacija populacija <i>H. obsoletus</i> specijalizovanih prema biljkama domaćinima	64
4.3.1	Filogenetske analize mitohondrijskih i mikrosatelitskih markera	64
4.3.2	Struktura populacija <i>H. obsoletus</i> bazirana na mikrosatelitima	68
4.3.3	Segregacija sintopskih populacija	70
4.4	'Ca. P. solani' inficiranost populacija <i>H. obsoletus</i> specijalizovanih prema biljkama dualnim domaćinima	71
4.4.1	Genotipski diverzitet 'Ca. P. solani' u populacijama <i>H. obsoletus</i> ex <i>U. dioica</i>	71
4.4.2	Genotipski diverzitet 'Ca. P. solani' u populacijama <i>H. obsoletus</i> ex <i>C. arvensis</i>	77
4.4.3	Genotipski diverzitet 'Ca. P. solani' u populacijama <i>H. obsoletus</i> ex <i>V. agnus-castus</i>	80
4.4.4	Genotipski diverzitet 'Ca. P. solani' u populacijama <i>H. obsoletus</i> ex <i>C. foetida</i> i potvrda statusa dualnog domaćina <i>C. foetida</i>	82
4.5	Molekularna epidemiologija 'Ca. P. solani': uticaj specijalizacije vektora prema biljkama dualnim domaćinima na puteve diseminacije patogena.....	85
4.5.1	Pokazatelji prirodnih ukrštanja epidemioloških puteva diseminacije 'Ca. P. solani': slučaj mediteranskih vinograda	85
4.5.1.1	Genotipizacija 'Ca. P. solani' u populacijama <i>H. obsoletus</i> ex <i>U. dioica</i> , <i>C. arvensis</i> i <i>V. agnus-castus</i>	87
4.5.1.2	Ukrštanje puteva infekcije: praćenje genotipova 'Ca. P. solani' od biljaka rezervoara, kroz populacije vektora, do obolele vinove loze.....	89
4.5.2	Eksperimentalni pokazatelji ukrštanja epidemioloških ciklusa i puteva diseminacije 'Ca. P. solani'	91
4.5.2.1	Vektorska sposobnost i genotipovi 'Ca. P. solani' koje prenosi <i>H. obsoletus</i> ex <i>C. arvensis</i>	95
4.5.2.2	Vektorska sposobnost i genotipovi 'Ca. P. solani' koje prenosi <i>H. obsoletus</i> ex <i>V. agnus-castus</i>	97

4.5.2.3	Vektorska sposobnost i genotipovi ' <i>Ca. P. solani</i> ' koje prenosi <i>H. obsoletus</i> ex <i>C. foetida</i>	100
4.5.3	Genotipski i epidemiološki diverzitet ' <i>Ca. P. solani</i> ' uslovljen biljkama dualnim domaćinima patogena i vektora.....	102
5.	Diskusija	106
5.1.	Genetička divergencija populacija <i>H. obsoletus</i> kao posledica specijalizacije prema biljci domaćinu.....	108
5.1.1	Genetička homogenost <i>H. obsoletus</i> u asocijacija sa <i>C. arvensis</i> i <i>U. dioica</i> u jugoistočnoj Evropi.....	109
5.1.2	Asocijacija <i>H. obsoletus</i> sa <i>V. agnus-castus</i>	111
5.1.3	Asocijacija <i>H. obsoletus</i> sa <i>Crepis foetida</i>	112
5.2.	Taksonomski status <i>H. obsoletus</i> : potreba za integrativnim pristupom	114
5.3.	Biogeografska istorija <i>H. obsoletus</i>	116
5.4.	Razvoj epidemioloških puteva širenja ' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' pod uticajem specijalizacije vektora.....	118
5.4.1	Uloga <i>H. obsoletus</i> ex <i>Urtica dioica</i> u <i>tuf-b</i> epidemiologiji ' <i>Ca. P. solani</i> '	120
5.4.2	Vektorska uloga <i>H. obsoletus</i> ex <i>V. agnus-castus</i> i ukrštanje <i>tuf-b</i> epidemiologije ' <i>Ca. P. solani</i> ' ex <i>V. agnus-castus</i> i <i>C. arvensis</i>	123
5.4.3	Ukrštanje <i>tuf-b</i> puteva diseminacije ' <i>Ca. P. solani</i> ' i vektorska uloga tri asocijacije u epidemiologiji <i>Bois noir</i> bolesti vinove loze.....	128
6.	Zaključci	132
7.	Literatura	135
8.	Prilozi	157

1. Uvod

Hyalesthes obsoletus Signoret, 1865 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cixiidae) je polifagna cikada kserotermnih staništa, primarno mediteranskog rasprostranjenja čiji areal na severu doseže do jugozapadne Nemačke i severne Francuske, dok se ka jugoistoku pruža do Male Azije i Bliskog istoka (Hoch & Remane 1985). *Hyalesthes obsoletus* je ujedno i tipska vrsta roda *Hyalesthes* koji sadrži više od trideset poznatih vrsta koje su podeljene u pet specijskih grupa sa dva pretpostavljena centra diverziteta, jedan u istočnom Mediteranu i drugi na Kanarskim ostrvima (Hoch 1986a). U proteklih pet decenija, ova cikada je bila predmet brojnih istraživanja, pre svega u kontekstu vektorske uloge i epidemiologije obligatnog biljnog patogena '*Candidatus* Phytoplasma solani', trivijalnog naziva stolbur fitoplazma, koja inficira više desetina biljnih vrsta i direktno ugrožava mnoge gajene kulture (Aleksić *et al.* 1967; Maixner 1994; Sforza *et al.* 1998; Sharon *et al.* 2005; Bressan *et al.* 2007; Johannesen *et al.* 2008; 2012; Kessler *et al.* 2011; Imo *et al.* 2013; Maniyar *et al.* 2013; Đurić *et al.* 2017; Chuche *et al.* 2018). Do razvoja molekularnih metoda dijagnostike ovi patogeni su najčešće navođeni kao virusi ili mikoplazmama slični organizmi (Doi *et al.* 1967), dok sredinom devedesetih godina prošlog veka, bakterije koje izazivaju simptome filodija, virescence i nekroze kod biljaka nisu nazvane fitoplazmama (Seemüller *et al.* 1994; Toth *et al.* 1994). Zbog nemogućnosti *in vitro* gajenja i morfološke karakterizacije, njihov taksonomski status je definisan statusom kandidata '*Candidatus* (*Ca.*) Phytoplasma' u okviru klase Mollicutes (IRPCM 2004).

Primena molekularnih metoda u proučavanju populaciono-genetičke strukture ekonomski korisnih ili štetnih insekata, omogućila je sagledavanje do tada nepoznatih genetičkih karakteristika pojedinih insekatskih vrsta na njihovom intra- i interpopulacionom nivou (McPheron 2000; Hunter 2002; Brunner *et al.* 2004; Tsagkarakou *et al.* 2007; De Barro & Ahmed 2011; Imo *et al.* 2013; Toševski *et al.* 2011; 2015; Horowitz & Ishaaya 2014). Trenutni pristup u molekularnoj filogeniji podstiče testiranje i primenu različitih genetičkih markera koji mogu otkriti kriптиčni potencijal vrsta kroz rasvetljavanje palete divergentnih odnosa, od ekološke specijalizacije do *de facto* specijacije (Caterino *et al.* 2000; Scheffer &

Lewis 2001; Hebert & Gregory 2005; Bickford *et al.* 2007; Toševski *et al.* 2011; Peccoud *et al.* 2013). Kada se poređenje morfološki istih organizama svede na genetiku, otkriva se unutrašnja diferencijacija koju fenotip ne oslikava i koja se kroz ingerativnu taksnomiju može kasnije dopuniti drugim karakteristikama kao što su akustični signali, interakcije sa drugim vrstama, pa čak i morfološke mikrostrukture (Scheffer & Wiegmann 2000; Berlocher & Feder 2002; Toševski *et al.* 2011; Wilkins *et al.* 2013). Identifikacija kriptične specijacije i diferencijacije srodnih vrsta je posebno značajna kod štetnih insekata zbog regulativa koje zemlje sprovode u cilju razvoja strategije kontrole (Brown 2004; Johannesen *et al.* 2012; Peccoud *et al.* 2013; Horowitz & Ishaaya 2014).

Direktna agroekonomska šteta koju cikade nanose biljkama svojom ishranom je neznatna, ali ukoliko vrste uz ekspanziju unutar ekosistema i prodor na nova staništa, uđu u epidemioški lanac raznošenja fitoplazmi, može doći do značajnih ekonomskih posledica (Weintraub & Beanland 2006; Weintraub & Jones 2010). Poslednjih nekoliko decenija incidenca biljnih bolesti koje su etiološki vezane za fitoplazme je u značajnom porastu i kod ekonomski najznačajnijih poljoprivrednih kultura (Jović *et al.* 2007; 2009; Weintraub & Jones 2010; Ember *et al.* 2011; Chuche & Thiéry 2014; Cvrković *et al.* 2014; Jeger *et al.* 2016; Mitrović *et al.* 2016). Savremena istraživanja *H. obsoletus* se u najvećoj meri fokusiraju na *Bois noir* (BN) bolest vinove loze koja u nekim regionima eskalira i do organičavajućeg faktora u proizvodnji sa gubicima i do 80% (Johannesen *et al.* 2008; Maixner 2011; Zahavi *et al.* 2013; Aryan *et al.* 2014).

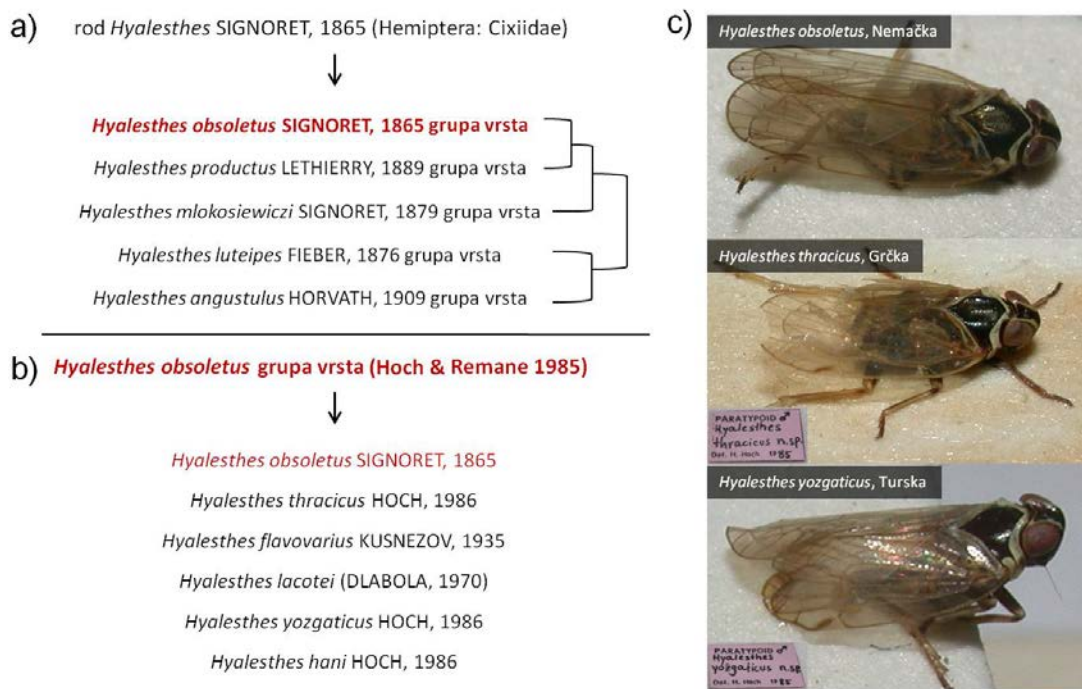
Cikade predstavljaju najznačajniju kariku za širenje fitoplazmatskih bolesti čiji uspeh prenošenja zavisi od interakcije patogena i insekta (Suzuki *et al.* 2006), odnosno od stepena kompatibilnosti tkiva i produkata vektora (Hogenhout *et al.* 2008). Cikade koje prenose fitoplazme na poljoprivredne kulture su uglavnom iz familija Cicadellidae i Cixiidae (Weintraub & Beanland 2006) među kojima je vrsta *H. obsoletus* najpoznatija, najšire rasrostranjena i sa učešćem u najvećem broju epidemioloških ciklusa u agroekosistemima Evrope (Aleksić *et al.* 1967; Langer & Maixner 2004; Weintraub & Jones 2010; Aryan *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015).

1.1 Taksonomija, biologija i vektorska uloga *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865

Kao i sve cikade familije Cixiidae, *H. obsoletus* najveći deo životnog ciklusa provodi u stadijumu endogejske larve hraneći se floemskim sokovima korena biljaka domaćina (Sforza *et al.* 1999; Cargnus *et al.* 2012). Usled specifičnog načina života, ostvaruje blisku vezu sa biljkama koje koristi za razvoj, ishranu, parenje i kao supstrat za ovipoziciju. Brojne biljne vrste su do sada zabeležene kao povremeni ili stalni domaćini, ili biljke hraniteljke odraslih jedinki *H. obsoletus*, dok je za svega nekoliko njih utvrđeno da pružaju pogodnu nišu za kompletiranje životnog ciklusa (Suhov & Razvyazkina 1955; Sforza *et al.* 1999; Sharon *et al.* 2005; Kessler *et al.* 2011; Cargnus *et al.* 2012; Chuche *et al.* 2018). Tokom protekle dve decenije biologija *H. obsoletus* i asocijacije sa biljkama domaćinima su intenzivno proučavane zbog značaja ove cikade kao glavnog vektora biljnog patogena '*Candidatus Phytoplasma solani*' ('*Ca. P. solani*', CPs) poznatog pod trivijalnim nazivom stolbur fitoplazma (Langer & Maixner 2004; Johannesen *et al.* 2012; Quaglino *et al.* 2013).

Palearktički rod *Hyalesthes* Signoret, 1865 čine 33 vrste od kojih je njih 28 prema morfo-filogenetskim analizama genitalija mužjaka svrstano u jednu od 5 monofiletičkih grupa (Slika 1a) (Hoch & Remane 1985; Remane & Hoch 1986; Emelyanov 1995). Činjenica da *H. obsoletus* predstavlja jednu od 6 bliskih vrsta, koje pripadaju istoimenoj grupi vrsta (Slika 1b), doprinosi nedovoljno jasnoj slici o interakcijama koje ova cikada ostvaruje u prirodi koju dodatno komplikuje česta i neadekvatna upotrebe termina *biljka domaćin*. Idenična spoljna morfologija, sličnost genitalnih struktura mužjaka i simpatričko prisustvo vrsta ove grupe praćeno je preklapanjem areala cirkum-mediteranskog *H. obsoletus* sa vrstama *H. flavovarius* Kusnezov, 1935 (Uzbekistan), *H. lacotei* (Dlabola, 1970) (južna Francuska), *H. thracicus* Hoch, 1985 (jugoistočna Grčka i Turska), *H. yozgaticus* Hoch, 1985 (Turska, Anatolia) i *H. hani* Hoch, 1985 (Liban). Prepoznatljiva bela kragna je kao zajednička karakteristika vrsta ove grupe korišćena u mnogim studijama kao već na prvi pogled jasna sugestija da se radi o vrsti *H. obsoletus*

(Slika 1c). Međutim, poređenjem muških genitalija može se jasno videti da karakteri spoljašnje morfologije nisu pouzdani prilikom determinacije vrste.



Slika 1. Diverzitet roda *Hyalesthes* i fenotipske sličnosti između vrsta grupe *H. obsoletus*; a) morfo-filogenetske grupe vrsta u okviru roda *Hyalesthes*; b) vrste *H. obsoletus* grupe vrsta; c) preparovani primerci iz lične kolekcije prof dr Hanelor Hoh.

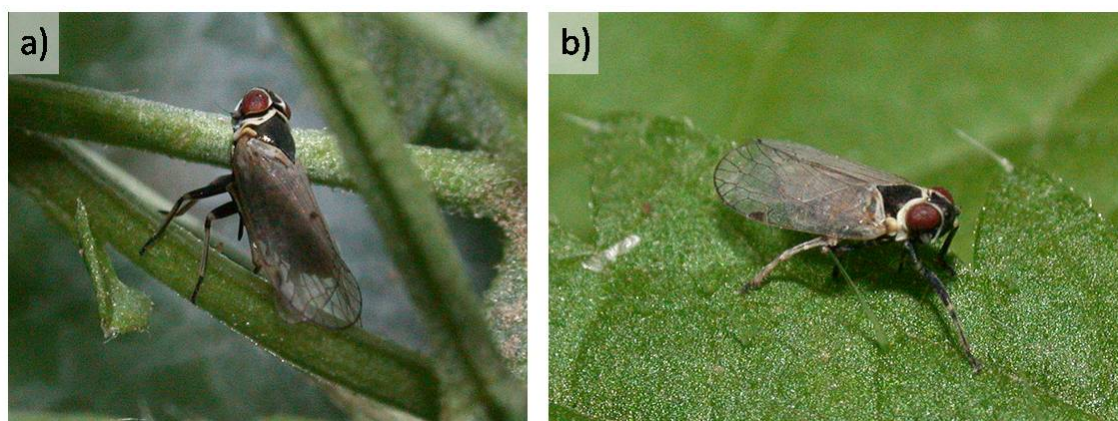
Areal *H. obsoletus* koji pokriva široko područje od Portugala na zapadu do Iraka na istoku, od južne Nemačke na severu do Maroka na jugu, poklapa se sa podacima o agroekonomskoj šteti koju na brojnim poljoprivrednim kulturama uzrokuje stolbur fitoplazma (Hoch & Remane 1985; EFSA 2014). Staništa koja naseljava ova cikada su raznovrsna: u severnoj Africi su to suva rečna korita, u Španiji livadska vegetacija u priobalju i unutrašnjosti kopna, u Italiji priobalna područja, livade i žbunasta vegetacija na osunčanim padinama, u Grčkoj obala i suva rečna korita itd. (Hoch & Remane 1985). Međutim, odlučujući faktor koji obezbeđuje ili limitira opstanak *H. obsoletus* u određenom ekosistemu su specifične biljne vrste koje koristi kroz sve faze životnog ciklusa. Na ovom geografski i klimatski raznovrsnom području brojne biljke se često neprecizno dovode u vezu sa ovom cikadom (Prilog 1) uz opisne navode lokaliteta i biljnih

zajednica pogodnih za sakupljanje adulata kao što su: kserotermne trave, tople i osunčane padine, nasipi, stare i napuštene bašte kao i degradirani ekosistemi. Veoma guste populacije *H. obsoletus* može razviti na ivicama zasada, međama i brazdama gde uspešno kompletira ceo životni ciklus u asocijaciji sa odgovarajućom biljkom domaćinom u biocenozi koju čine i mnogi drugi insekti štetočine (Hoch & Remane 1985; Nickel 2003; Alford 2011).

Prvi podaci o životnom ciklusu *H. obsoletus* potiču sa teritorije bivšeg SSSR-a gde se, osim opisa razvojnih stadijuma, prvi put pominju konkretne asocijacije sa biljkama, i to sa *Convolvulus arvensis* i *Cardaria draba* (Suhov & Razvyazkina 1955). Prateći pojavu i razvoj simptoma zaraze *stolburom* paradajiza i krompira u južnim regionima zemlje, otkrivene su pojedinosti životnog ciklusa *H. obsoletus* koje su posebno značajne u kontekstu interakcija sa biljkama. Utvrđeno je da se endogejske larve hrane na korenovima višegodišnjih korova, uglavnom na *C. arvensis* i *C. draba*, koje se navode kao prijemčive *stolburu* i neretko pokazuju simptome zaraze. Krajem maja i početkom juna se završava larvalno razviće i adulti sredinom juna izleću na površinu nakon čega se jedno vreme zadržavaju na biljci na čijem korenu su se i ispilili. Ubrzo zatim migriraju na druge biljke i upravo u tom periodu se odvija masovno neselektivno inficiranje useva i korova. Suhov i Razvyazkina (1955) prvi put ukazuju na primarnu infekciju vektora tokom stadijuma larve kada se akvizicija patogena odvija preko korenovog sistema inficiranih korova. Već tokom jula ženke počinju da polažu jaja u pukotine zemlje, uz biljku domaćina. U avgustu se u južnoj Rusiji adulti više ne mogu naći, dok se prve L1 larve ispiljuju iz jaja već tokom jula kada se pozicioniraju uz korenove sisteme preferentnih biljaka gde im se nalaze i gnezda (Suhov & Razvyazkina 1955).

Opšteprihvaćeno stanovište polifagnosti *H. obsoletus* se u mnoštvu podataka može svesti na dve biljne vrste preferentne u ishrani adultima u gotovo celom arealu: *C. arvensis* (poponac) i *Urtica dioica* (kopriva) (Slika 2; Prilog 1). Pored toga, za obe biljke je utvrđeno da ženke formiraju gnezda u pukotinama zemlje podno njih i da se ispiljene larve hrane na njihovim korenovim sistemima što ih čini legitimnim biljkama domaćinima (Sforza *et al.* 1999; Kaul *et al.* 2009; Kessler *et al.* 2011). Tesna veza koji *H. obsoletus* ostvaruje sa *C. arvensis* je poznata još od

polovine prethodnog veka (Suhov & Vovk 1949), kasnije je registrovana širom Evrope i dopunjena CPs epidemiološkim studijama vezanim za ovog domaćina (Aleksić *et al.* 1967; Hoch & Remane 1985; Fos *et al.* 1992; Maixner 1994; Sforza *et al.* 1998; Cargnus *et al.* 2012; Atanasova *et al.* 2015), dok su prvi podaci vezani za *U. dioica* kao domaćina vektoru novijeg datuma (Alma 2002; Langer & Maixner 2004; Bressan *et al.* 2007; Lessio *et al.* 2007; Cargnus *et al.* 2012; Šafářova *et al.* 2011; Riedle-Bauer *et al.* 2013; Aryan *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015). Značajnim delom areala *H. obsoletus* pokriva mediteranski basen (Hoch & Remane 1985; Hoch 1986a, b) i među brojnim biljkama se ističu česti nalazi agregacije na *Vitex agnus-castus* (konopljika) (Hoch & Remane 1985; Sharon *et al.* 2005). Status domaćina ove biljke je potvrđen na teritoriji Izraela (Sharon *et al.* 2005; 2015). Asocijacija sa konopljikom na Balkanskom poluostrvu je poznata još od najstarijeg dostupnog podatka o preferentnosti *H. obsoletus* prema nekoj biljnoj vrsti koji govori kako adulti često mogu biti pronađeni na *V. agnus-castus* u hrvatskom primorju (Horvath 1891). Prvi sledeći i jedini ovakav nalaz u Evropi je zabeležen gotovo ceo jedan vek kasnije na obali Grčke i grčkih ostrva Krit, Lezbos, Ikarija i Rodos (Hoch & Remane 1985).



Slika 2. *Hyalesthes obsoletus* na biljci domaćinu: a) *Convolvulus arvensis*; b) *Urtica dioica*

Jedina gajena kultura koju vektor eksploatiše kroz ceo životni ciklus je *Lavandula angustifolia* (lavanda) koja biva pogođena 'Ca. P. solani' indukovanom bolešću engl. *lavandin decline* (Fos *et al.* 1992). Njena pogodnost je zabeležena u Francuskoj i eksperimentalno potvrđena u laboratorijskim ogledima (Sforza *et al.* 1999). Kao rezultat ovog istraživanja dat je opis pet larvenih stupnjeva po principu ključa, kao i razvojne razlike u laboratorijskom gajenju i prirodnim uslovima. Poponac, kopriva i lavanda, osim što pružaju nišu svim razvojnim stadijumima *H. obsoletus*, istovremeno su i rezervoari stolbur fitoplazme čime se u epidemiološkim istraživanjima tretiraju kao *dualni domaćini* kroz koje se ukrštaju životni ciklusi vektora i patogena.

Gotovo sva istraživanja koja se bave biologijom *H. obsoletus* su fokusirana na njegovu vektorsku ulogu u epidemiologiji 'Candidatus Phytoplasma solani' i imaju za cilj utvrđivanje biljaka koje su izvor hrane adultima i/ili larvama kako bi se uključile, odnosno isključile iz epidemiološkog ciklusa kao rezervoari inokuluma u agroekosistemima. Sagledavanje biljnih vrsta kao domaćina na osnovu povremenih nalaza ishrane adolata *H. obsoletus* na njima ili na osnovu poklapanja molekularno okarakterisanih 'Ca. P. solani' izolata u oba domaćina, daje zbunjujuće informacije o preferentnosti vektora i onemogućava rasvetljavanja biologije ovog vektora i njegove vektorske uloge.

1.2 Biologija i epidemiologija fitoplazmi ('Candidatus Phytoplasma')

Fitoplazme ('Candidatus Phytoplasma', Mollicutes) su obligatni, intracelularni patogeni biljaka i insekata koji naseljavaju floemske sudove biljaka domaćina izazivajući sistemsku infekciju, a prenose se insektima iz reda Hemiptera koji se hrane floemskim sadržajem biljaka domaćina (Lee *et al.* 2000; Hogenhout *et al.* 2008). Mehanizam prenošenja fitoplazmi putem vektora je (1) horizontalan, sa jedne biljke na drugu, iste vrste ili različite, i (2) perzistentan, jer insekt vektor posle perioda inkubacije patogena ostaje infektivan tokom čitavog životnog ciklusa. Epidemiologija fitoplazmatičnih biljnih bolesti uključuje tri osnovne komponente: 1) biljku rezervoar infekcije i izvor inokuluma za inficiranje vektora (često asimptomatska), 2) insekta vektora i 3) obolelu biljku koja u većini slučajeva

gajenih kultura ispoljava karakteristične simptome infekcije fitoplazmama. Preferentnost vektora prema biljkama domaćinima je od centralnog epidemiološkog značaja, obzirom da različite biljke mogu predstavljati izvore različite infekcije patogenom i polazišne tačke za razvijanje različitih puteva prenošenja, tj. epidemioloških ciklusa (Langer & Maixner, 2004).

Fitoplazme su prethodno poznate u literaturi uglavnom kao organizmi slični mikoplazmama (engl. *mycoplasma-like organisms*, MLO), prečnika su oko 500 nm, nestalnog oblika usled nedostatka ćelijskog zida i redukovano genoma veličine od 530 do 1350 kilobaza (Hogenhout *et al.* 2008). Glavna metodološka prepreka u identifikaciji i karakterizaciji fitoplazmi je nemogućnost *in vitro* gajenja (Lee *et al.* 2000). Održavanje u laboratorijskim uslovima postiže se kalemljenjem eksperimentalnih biljaka koje su inicijalno inokulisane od strane prirodno inficiranih insekata vektora i u te svrhe se uglavnom koristi perivinka (*Cataranthus roseus*). Ova biljka pogoduje umnožavanju fitoplazmi u visokom titru i eksprimira različite simptome u zavisnosti od vrste i genotipa fitoplazme kojom je inficirana (Aryan *et al.* 2016). Na osnovu jedinstvenih karakteristika fitoplazmi, na Internacionalnoj konferenciji sistematike bakterija održanoj 1996. godine na Floridi (SAD) predložena je i prihvaćena opšta klasifikacija fitoplazmi u okviru novog roda pod statusom kandidata, odnosno '*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*' (Seemüller *et al.* 1998; IRPCM 2004; Firrao *et al.* 2005).

Osnove detekcije i filogenije fitoplazmi su postavljene primenom molekularnih metoda i to primarno lančane reakcije polimeraze (engl. *Polimerase Chain Reaction*, PCR) na genskom regionu prokariota 16S rRNK gena koji istovremeno poseduje konzervativne i dovoljno varijabilne genske regione (Murray & Schleifer 1994; Lee *et al.* 2000). Klasifikacija bazirana na nukletodnim sekvencama 16S rRNK gena fitoplazmi iz različitih delova sveta, ukazuje na postojanje 33 glavnih grupa fitoplazmi (16SrI-XXXIII) i preko 100 podgrupa (Zhao *et al.* 2010; Zhao & Davis 2016). Filogenetski udaljene grupe fitoplazmi mogu dovesti do pojave istih simptoma kod inficirane biljke, ali i jedna fitoplazma može izazvati različite simptome na različitim biljnim vrstama. Radi jasnijeg tumačenja etiologije fitoplazmatičnih bolesti, pored razvoja metoda neposredne molekularne

dijagnostike, neophodno je i razumevanje biologije insekata vektora kroz multidisciplinarna epidemiološka istraživanja i eksperimente (Weintraub & Beanland 2006; Hogenhout *et al.* 2008).

Vaskularno povezivanje biljaka parazitskim cveticama (*Cuscuta* sp.) gotovo zanemarljivo doprinosi širenju fitoplazmi u prirodi u odnosu na prenošenje tokom ishrane inficiranog vektora (Marccone *et al.* 1997; Marccone *et al.* 1999). Disperzija i fitofagne osobenosti insekata vektora diktiraju ritam infekcije (Boudon-Padieu 2003; Hogenhout *et al.* 2008). Vektorska kompetentnost se određenoj vrsti insekta pripisuje ukoliko su zadovoljena tri kriterijuma: (1) akvizicija fitoplazmi ishranom floemskim sokovima zaraženih biljaka, (2) održavanje i umnožavanje patogena u pljuvačnim žlezdama vektora i (3) unošenje fitoplazmi putem ishrane i salivacije u floem nezaražene biljke (Weintraub & Jones 2010). Od inicijalne akvizicije fitoplazmi sa inficirane biljke (izvor inokuluma), do trenutka mogućnosti inokulacije nezaražene biljke, potrebno je da prođe *latentni period* tokom kojeg se fitoplazma umnožava do odgovarajućeg titra u telu vektora, što je preduslov za njen prelazak u drugog domaćina u ekosistemu. Dužina ovog perioda je najčešće tri sedmice, ali može varirati od 7 do 80 dana (Murrall *et al.* 1996; Moya-Raygoza & Nault 1998). Fitoplazme mogu biti patogene po insekte, ali generalno ne utiču negativno na fitnes vektora (Bertaccini 2007). Neka istraživanja ukazuju da njihovo prisustvo u insektu može uvećati fekunditet ženki i produžiti životni vek zaraženih jedinki, ali i da mogu uticati na preferentnosti vektora prema inficiranim biljkama kao izvorima hrane (Hogenhout *et al.* 2008). Najuspešnije vektore fitoplazmi predstavljaju cikade iz familija Cixiidae i Cicadellidae i nekoliko vrsta familije Psyllidae jer se adulti uglavnom hrane floemskim sokovima biljnih vrsta na kojima se odvijalo i larvalno razviće, dok je sam način ishrane po biljku nedestruktivan (Weintraub & Beanland 2006).

Epidemiologija fitoplazmatičnih bolesti zasnovana je na tri-trofičkim interakcijama koje se multilateralno ostvaruju između biljaka, vektora i patogena (Weintraub & Beanland 2006; Firrao *et al.* 2007). Preduslov raznošenja fitoplazmi u ekosistemima je disperzija vektora, dok odabir biljaka koje koristi u ishrani rezultuje u novom potencijalnom inokulumu ili krajnjem domaćinu (Lee *et al.* 2000; Hogenhout *et al.* 2003). Raznovrsnost vektora i biljaka rezervoara uvećava

šansu za genetičkim promenama i adaptacijama fitoplazme što dovodi do razuđivanja epidemioloških puteva (Christensen *et al.* 2005). Kada vektor promeni preferentnu biljku za ishranu, ili biljku domaćina, fitoplazme se unose u biljne vrste koje nisu njeni prirodni rezervoari. Evolutivna nekompatibilnost kao i dovoljno česti susreti fitoplazmi i nezaraženih biljaka u životnoj sredini mogu dovesti do eskalacije infekcije do nivoa epidemije (Weiver & Reisen 2010). Ovakvi incidentni događaji dovode do neusklađenih interakcija patogena sa domaćinima u vidu nesinhronizovanih puteva prenošenja, nanošenja štete biljakama koje inficiraju ili uvećane virulentnosti kao posledice kompeticije sa drugim izolatima ili simbiotima (Elliot *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005; Weiver & Reisen 2010; Mannelli *et al.* 2012). Učestalost ovakvih dešavanja direktno zavisi od relativne gustine populacija domaćina i geografskog rasprostranjenja vektora (Tatem *et al.* 2006; Fabiszewski *et al.* 2010; Aplin *et al.* 2011).

Interakcije fitoplazmi i biljaka koje koriste kao nišu je u kontekstu ekoloških interspecijskih odnosa teško definisati (Hogenhout *et al.* 2008). Iako se najčešće koristi termin *biljka domaćin*, kao i u odnosu cikada i biljaka, u najširem smislu u slučaju fitoplazmi se radi se o obligatnom parazitizmu čime biljka biva neophodnost za preživljavanje ovog biljnog patogena. Fragmentacije staništa i narušavanje prirodne ravnoteže nutrijenata navode insekte na ishranu na gajenim kulturama što ima za posledicu unošenje patogena u biljne vrste koje nisu koevoluirale sa njim. Kao posledica povremene ishrane vektora na biljkama koje nisu domaćini insekta, fitoplazma može napustiti zatvoreni ciklus (biljka domaćin - insekt vektor i *vice versa*) čime se epidemiološki ciklus otvara, a put prenošenja patogena usložnjava. Biljke prirodni izvori zaraze uglavnom nemaju simptome ili su takvi da ne ugrožavaju opstanak jedinke, za razliku od useva koji razvojem simptoma mogu potpuno stradati (COST action FA 0807 2014). Za mnoge gajene biljke koje trpe agroekonomsku štetu još uvek nije poznato da li predstavljaju krajnje domaćine (engl. *dead-end hosts*) ili izvore patogena, ali je sigurno da stepen zaraze zavisi od kompetentnosti i brojnosti vektora, kao i od *biljaka dualnih domaćina* gde se životni ciklusi insekta i fitoplazme ukrštaju (Boudon-Padieu 2003; Johannesen *et al.* 2012).

1.3 'Candidatus Phytoplasma solani' – stolbur fitoplazma: epidemiologija uslovljena vektorom, putevi prenošenja i molekularna identifikacija

Stolbur fitoplazma (16S rRNK XII-A podgrupa), predložena i opisana kao 'Candidatus Phytoplasma solani' ('*Ca. P. solani*', CPs) na osnovu STOL izolata iz zaražene paprike sa teritorije Srbije (Seemüller *et al.* 1994; Quaglino *et al.* 2013), endemična je za Evropu i Mediteran i ostvaruje složene epidemiološke cikluse kroz nekoliko oligo- ili polifagnih vektora (Lee *et al.* 1998; Seemüller *et al.* 1998; Firrao *et al.* 2005). Iako se primarno dovodi u vezu sa usevima iz familije *Solanaceae* i vinovom lozom u čijoj proizvodnji dovodi do značajnih gubitaka, u literaturi je do sada poznato preko 70 biljnih vrsta iz 14 familija u kojima je detektovano njeno prisustvo (Quaglino *et al.* 2013; COST action FA 0807 2014). Široko rasprostranjenje i visoka incidenca CPs-indukovanih bolesti gajenih biljaka su posledica areala *H. obsoletus* kao efikasnog vektora i povoljnih sredinskih uslova, ali i raznovrsnih epidemioloških puteva diseminacije patogena u zavisnosti od prisustva biljaka koje su istovremeno rezervoari infekcije i domaćini vektora (Langer & Maixner 2004; Johannesen *et al.* 2008; 2012). Zbog toga su istraživanja biologije i ekologije ove cikade primarno fokusirana na jasno definisanje biljaka domaćina u cilju utvrđivanja njihovog značaja u epidemiologiji 'Ca. P. solani' (Langer & Maixner 2004; Sharon *et al.* 2005; Kessler *et al.* 2011; Aryan *et al.* 2014; Maixner *et al.* 2014). Iako postoji konsenzus da je *H. obsoletus* polifagna vrsta i brojne publikacije navode da je ova vrsta prisutna na raznim zeljastim i drvenastim biljnim vrstama (pregled dat u Maixner 2010; Prilog 1), pojedini autori navode takođe i striktne asocijacije larvi na korenovom sistemu određenih biljaka (Suhov & Razvyazkina 1955; Güclü & Ozbek 1988; Hoch & Remane 1985; Sforza *et al.* 1999; Langer & Maixner 2004; Sharon *et al.* 2005).

Ekonomski najznačajnija, najšire rasprostranjena i najviše proučavana bolest koju uzrokuje 'Ca. P. solani' jeste *Bois noir* (BN) bolest vinove loze (Maixner 2010). Većina dosadašnjih istraživanja asocijacija *H. obsoletus* sa biljkama domaćinima i puteva CPs prenošenja su fokusirana na vinograde centralne Evrope, područje koje gravitira severnoj granici areala ove cikade (Sforza *et al.* 1998;

Langer & Maixner 2004; Bressan *et al.* 2007; Johannesen *et al.* 2008; 2012; Kessler *et al.* 2011; Imo *et al.* 2013; Maniyar *et al.* 2013; Aryan *et al.* 2014). Biljke koje se na ovom području dovode u vezu sa *H. obsoletus* su tradicionalni evropski domaćini *C. arvensis* i *U. dioica* kao korovske vrste direktno prisutne u vinogradima ili njihovoj okolini i na kojima se odvija primarna akvizicija patogena (Langer & Maixner 2004; Johannesen *et al.* 2012). Na osnovu razlika među CPs genotipovima vezanim za *C. arvensis* i *U. dioica* utvrđeno je postojanje dva nezavisna epidemiološka ciklusa uslovljena prisustvom dva izvora infekcije (Langer & Maixner, 2004; Maixner 2010). Skorašnja istraživanja invazivnosti, puteva širenja populacija *H. obsoletus*, specifičnosti prema biljkama domaćinama i uticaja na epidemiju pojavu BN u južnoj Nemačkoj, idu u prilog genetičkoj segregaciji populacija na nivou inicijalnih rasa asociраних sa *C. arvensis* i *U. dioica* (Johannesen *et al.* 2018; 2012; Imo *et al.* 2013). Na osnovu analize mikrosatelita populacija *H. obsoletus* asociраних sa *C. arvensis* i *U. dioica*, uočena je ekspanzija i porast brojnosti populacija na granici severnog areala vrste. Istraživanja u južnoj Nemačkoj su ukazala da je ekspanzija i porast brojnosti populacija pre svega posledica lokalnih adaptacija populacija ove cikade prelaskom na koprivu kao pogodnijeg domaćina (engl. *host shift*), a ne prodora iz južnih područja (Imo *et al.* 2013).

Različiti genski markeri su do sada testirani i predloženi kao korisni u epidemiološkim studijama '*Ca. P. solani*' među kojima se kao najinformativniji najčešće koriste konzervativni *tuf* gen koji kodira Tu faktor elongacije (Langer & Maixner 2004) i geni *stamp* i *vmp1* koji kodiraju membranske proteine koji učestvuju u interakciji fitoplazme sa domaćinom (Cimerman *et al.* 2009; Fabre *et al.* 2011a; 2011b). Multilokusni pristup karakterizaciji izolata (engl. *Multilocus Sequence Typing*, MLST) je postao standard u epidemiološkim istraživanjima '*Ca. P. solani*' jer se na ovaj način mogu prevazići geografske i biološke barijere, kao i otkriti preferentnost patogena prema specifičnom domaćinu ili domaćinama (Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014).

Iako se testiranjem filogenetske informativnosti *tuf* gena pokazalo da on nije adekvatan marker za nivo diferencijacije kandidata vrsta fitoplazmi, njegov značaj u istraživanjima '*Ca. P. solani*' postaje nezamenljiv od trenutka otkrića stabilne divergencije uslovljene biljkom izvorom infekcije (Schneider *et al.* 1997;

Langer *et al.* 2003; Langer & Maixner 2004). Pitanje dualnog domaćina u 'Ca. P. solani' epidemiologiji vođenoj od strane *H. obsoletus* kao vektora je krucijalno jer se primarna akvizicija fitoplazme odvija od strane larvi koje se hrane i razvijaju na korenu odgovarajućih biljaka (Suhov & Razvyazkina 1955; Kaul *et al.* 2009). Genotipizacijom *tuf* gena kroz PCR i RFLP metode utvrđena je bazična genetička divergencija u vidu epidemioloških puteva koje realizuje (1) *tuf-a* (VK-I) CPs tip izvirući iz inokuluma *U. dioica* i (2) *tuf-b* (VK-II) CPs tip čija je biljka domaćin *C. arvensis* (Langer & Maixner 2004). Oba tipa stolbur fitoplazme kroz asociirane populacije vektora dospevaju do vinove loze i drugih kultura koje u zavisnosti od biljke dualnog domaćina mogu biti inficirane *tuf-a* ili *tuf-b* tipom. Obrazac pojave i širenja dva tipa 'Ca. P. solani' u kontekstu *Bois noir* bolesti vinove loze je u narednim godinama potvrđen širom areala vektora ističući postojanje dva epidemiološka sistema koji prožimaju prirodne i agroekosisteme i nedvosmisleno ukazuju na biljku koja predstavlja izvor infekcije (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Aryan *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015).

Za razliku od simptoma koje mogu ispoljavati CPs zaražene biljke poponca (Aleksić *et al.* 1967; Maixner 1994; Sforza *et al.* 1998), nedostatak istih na koprivi ukazuje na dugoročni komensalni odnos sa ovim domaćinom (Constable 2010). Upravo zbog toga je dokaz o koprivi kao rezervoaru 'Ca. P. solani' utvrđen tek nakon ustanovljene preferentnosti *H. obsoletus* populacija ka ovoj biljci kada se pojavilo interesovanje za njenu ulogu kao potencijalnog izvora infekcije (Langer & Maixner 2004). Zahvaljujući molekularnim metodama koje su omogućile utvrđivanje izvora zaraze karakterizacijom samo jednog gena 'Ca. P. solani', pokazalo se da je kopriva odgovorna za uvećanu incidencu *Bois noir* u Nemačkoj i Austriji usled vrlo brojnih i visoko inficiranih populacija vektora (Bressan *et al.* 2007; Lessio *et al.* 2007; Maixner *et al.* 2007; Aryan *et al.* 2014).

Skorašnji nalaz novog *tuf* tipa 'Ca. P. solani' detektovan na teritoriji Austrije je prividno destabilizovao dotadašnju jasnu epidemiološku divergenciju (Aryan *et al.* 2014). Iako ovaj epidemiološki tip potiče isključivo iz koprive kao dualne biljke domaćina i samo jednom mutacijom je udaljen od tradicionalnog *tuf-a* tipa, pozicija izmenjenog nukleotida uslovljava nedostatak restrikcionog mesta prepoznavanja *HpaII* enzima i lažno prikazivanje kao *tuf-b* tipa odakle je i usledio njegov naziv *tuf-*

b2. Prilikom prvog nalaza prisustva ovog genotipa na teritoriji jugoistočne Evrope predloženo je njegovo preimenovanje u *tuf-ab*, odnosno tretiranje ovog genotipa kao prelaznog tipa koji se u RFLP analizi prikryveno pokazuje kao *tuf-b* i može se precizno odrediti samo sekvenciranjem kao *tuf* genotip koji pripada *tuf-a* epidemiologiji vezanoj za koprivu (Atanasova *et al.* 2015).

1.4 Specijalizacija vektora *H. obsoletus* prema biljkama domaćinima i uticaj na epidemiologiju '*Ca. P. solani*'

Dosadašnjim istraživanjima je otkriveno nekoliko manje ili više stabilnih bioloških i ekoloških razlika vezanih za *H. obsoletus* asocijacije sa biljkama domaćinima, *C. arvensis*, *U. dioica* i *V. agnus-castus*. To su manje razlike u larvalnom razviću zabeležene na teritoriji Italije (Cargnus *et al.* 2012) i manje razlike u periodu leta populacija *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, uz ozbiljnije odstupanje u odnosu na *ex V. agnus-castus* asocijaciju koje pored toga karakteriše i dvogeneracijsko razviće u Izraelu (Langer & Maixner 2004; Maixner & Langer 2006; Sharon *et al.* 2005). Najupečatljivija razlika između populacija asociiranih sa poponcem i koprivom je stabilna divergencija '*Ca. P. solani*' izolata koje asociirane populacije vektora prenose kroz dva zasebna epidemiološka puta (Langer & Maixner 2004). Uprkos tome, simpatrija *H. obsoletus* populacija asociiranih sa ova dva domaćina nije redak slučaj i može se čak zabeležiti i u striktnoj sintopiji (Imo *et al.* 2013; Atanasova *et al.* 2015; Landi *et al.* 2015).

Istraživanja genetičke strukture *H. obsoletus* asocijacija su inicirana epidemijom izbijanjem bolesti *Bois noir* u vinogradima Nemačke, Austrije i Švajcarske koja su pokazala da je potpuno sagledavanje epidemiologije '*Ca. P. solani*' moguće samo poznavanjem biologije vektora (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Imo *et al.* 2013; Manyar *et al.* 2013; Aryan *et al.* 2014; Johannesen & Riedle-Bauer 2014). Analize populaciono-genetičke strukture evropskih *H. obsoletus* asocijacija sa poponcem i koprivom, uz poređenje sa izraelskom populacijom sakupljenom na konoplji i maslini (*Olea europaea*), ukazale su na genetički diverzitet uslovljen biljkom domaćinom kao i potencijal ekspanzije (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Imo *et al.* 2013). Analizama mitohondrijskih gena

utvrđena je ekspanzija *H. obsoletus* asocijacije sa koprivom u severne regione centralne Evrope iz cirkum-alpijskog područja uz detekciju niskog haplotipskog diverziteta (Johannesen *et al.* 2008; Aryan *et al.* 2014; Johannesen & Riedle-Bauer 2014). Sa druge strane, najviši genetički diverzitet zabeležen izraelske populacije sugeriše na bliskoistočno poreklo vrste i kolonizaciju novih staništa preko jugoistočne Evrope. Unutar evropskih *H. obsoletus* populacija su detektovane dve geografski uslovljene genetičke linije, i postojanje dve *host rase* vezane za domaćine *C. arvensis* i *U. dioica* koje su *in situ* evoluirale na severozapadnoj granici areala čime se pokazalo genetičko raslojavanje vrste na više nivoa (Johannesen *et al.* 2008; Imo *et al.* 2013).

Monofagne vrste insekata u slučajevima promene geografskog areala, nedostupnosti preferentne biljke i/ili usled promena u sopstvenom ponašanju mogu uvesti novu biljku domaćina u životni ciklus (Diehl & Bush 1984; Wingfield *et al.* 2011). Međutim, sam prelazak na novog domaćina nije jedino moguće objašnjenje za simpatričku diferencijaciju insekata koja može biti podstaknuta prestankom korišćenja dotadašnje biljke domaćina usled ekološkog pritiska, kojoj se može vratiti nakon ponovnog uspostavljanja optimalnih uslova sredine (Singer *et al.* 1992). Fenomen *host rase* je karakterističan i za insekte koji koriste spektar biljaka širom areala ali su usled klimatskih i geografskih ograničenja i specifičnosti staništa orjentisani na svega nekoliko domaćina. Specijalizacija i diferencijacija populacija vezanih životnim ciklusom za različite biljke posledično može voditi ka genetičkom udaljavanju ovih „linija“, o čemu svedoče mnogi slučajevi u prirodi koji zadovoljavaju kriterijume evolucije *host rase* i potencijalne simpatričke specijacije (Drès & Mallet 2002; Berlocher & Feder 2002). Ovo je posebno značajno kada se uzme u obzir činjenica da je na teritoriji Balkana utvrđena asocijacija populacija *H. obsoletus* sa koprivom, poponcem i sa novom biljkom domaćinom *Crepis foetida* (Slika 3) kod kojih je registrovana genetska divergentnost (Kosovac *et al.* 2013). Preliminarni rezultati genetičkih analiza pokazali su da se populacije asociirane sa poponcem i koprivom znatno razlikuju od populacija sakupljenih na *C. foetida* (Kosovac *et al.* 2013). Genetički parametri su ukazali na moguće postojanje specifične filogenetičke linije unutar vrste *H. obsoletus* koja je vezana za *C. foetida* u jugoistočnoj Evropi čiji stepen diferencijacije u odnosu na populacije asociirane sa

C. arvensis i *U. dioica* prevazilazi ranije detektovan fenomen *host rasa* sa severa areala.

Odabir različitih biljaka domaćina od strane populacija iste vrste fitofagnog insekta, kao pogodne niše za kompletan životni ciklus ili samo deo razvića, nosi sa sobom čitav niz posledica, kao što su prostorne i vremenske promene u populacionoj dinamici, reproduktivnom ponašanju i koevoluciji sa različitim endosimbiontima (Bernays & Chapman 2007). Istraživanja populacione genetike *H. obsoletus* sprovedena u poslednjoj deceniji rezultirala su promenom

sagledavanje ove vrste kao polifaga i ukazala da je preferentnost ka određenoj biljci zapravo bihevioralno eksprimiranje divergencije genetičkih linija koje podležu složenim evolutivnim promenama na području kompletnog cirkum-mediterranskog areala u odnosu na biljku domaćina (Johanessen *et al.* 2008; 2012; Imo *et al.* 2013; Kosovac *et al.* 2013).



Slika 3. *Hyalesthes obsoletus* ženka neposredno ispod cvasti *Crepis foetida*; lokalitet Niš, jul 2014.

2. Ciljevi

Naučni cilj doktorske disertacije je testiranje potencijala kriptične specijacije *H. obsoletus* kao posledice ekološke specijalizacije prema biljci domaćinu i uticaja ove diferencijacije na epidemiološke puteve prenošenja '*Ca. Phytoplasma solani*'. U cilju sagledavanja preferentnosti *H. obsoletus* prema različitim domaćinima ispitivane su genetičke karakteristike populacija u sintopiji i široj simpatriji, prateći varijabilnost mikrosatelita kao markera informativnih za utvrđivanje skorašnje diferencijacije i razmene genetičkog materijala među bliskim populacijama. Analizom mitohondrijskih markera jedinki *H. obsoletus* iz populacija sa šireg geografskog područja jugoistočne Evrope, ciljano sakupljenih sa različitih domaćina, testirana je njihova evolutivna istorija, filogenetski odnosi i status kriptičnih vrsta/podvrsta. Putevi diseminacije genotipova '*Ca. Phytoplasma solani*' prisutni u biljkama dualni domaćinima vektora analizirani su molekularno epidemiološkim pristupom u cilju utvrđivanja njihovog ukrštanja i povezanosti. Eksperimentalnim testiranjima vektorskog potencijala specijalizovanih populacija *H. obsoletus sensu lato* ispitivano je preklapanje epidemioloških ciklusa genotipova '*Ca. Phytoplasma solani*' koji potiču od različitih biljaka rezervoara bolesti i koji preko asociiranih populacija vektora uslovljavaju različite epidemiološke cikluse.

Specifični ciljevi ove disertacije su:

- Ispitivanje genetičke diferencijacije populacija *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima na području jugoistične Evrope;
- Analize nivoa protoka gena među simpatričkim i sintopskim populacijama *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima;
- Utvrđivanje inficiranosti različitih populacija vektora *H. obsoletus* sa '*Ca. Phytoplasma solani*' i uloge biljaka domaćina vektora kao rezervoara fitoplazme i izvora infekcije;
- Analize uticaja preferentnosti i specifičnosti *H. obsoletus* prema biljkama domaćinima na epidemiološke cikluse '*Ca. Phytoplasma solani*';
- Utvrđivanje molekularnih specifičnosti različitih genotipova '*Ca. Phytoplasma solani*' i praćenje puteva diseminacije od biljke rezervoara preko insekta vektora do obolele biljke.

3. Materijal i metode

Istraživanja populacionog diverziteta, vektorske uloge i epidemiološkog značaja asocijacija vektora *Hyalesthes obsoletus* sa različitim biljkama domaćinima u jugoistočnoj Evropi sprovedena su tokom perioda od šest godina (2011–2016). Istraživanja su bazirana na sakupljenim populacijama *H. obsoletus* asociiranim sa četiri biljke domaćina: *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Vitex agnus-castus* i *Crepis foetida* na teritoriji 6 država jugoistočne Evrope i Turskoj: Srbije, Bugarske, Rumunije, Crne Gore, Makedonije, i Grčke. Analizama su prikjučene informacije ili DNK izolati preuzeti iz prethodno publikovanih istraživanja populacija *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus* iz Izraela, populacije iz Rumunije i Rusije i svi prethodno okarakterisani mitohondrijski haplotipovi (Johannesen *et al.* 2008; Imo *et al.* 2013; Chuche *et al.* 2018).

U filogenetske analize je uključen paratipski primerak mužjaka vrste *Hyalesthes thracicus* (Slika 4) kao morfo-filogenetski najrodnije vrste iz *H. obsoletus* grupe vrsta (Hoch & Remane 1985; Hoch 1986b). Preparovani insekt sakupljen 1979. godine u okolini jezera Volvi (Grčka) je bio deponovan u entomološkoj zbirci prof. dr Hannelore Hoch (*Museum für Naturkunde, Leibniz-Institut für Evolutions- und Biodiversitätsforschung, Berlin*).



Slika 4. Muzejski paratip *Hyalesthes thracicus* Hoch, 1986. Primerak je ustupljen od strane prof. dr Hannelore Hoch iz lične entomološke zbirke.

3.1 Populaciono-genetičke analize diverziteta *H. obsoletus*

3.1.1 Sakupljanje populacija specijalizovanih prema biljci domaćinu

Uzorkovanje *H. obsoletus* populacija u asocijaciji sa ciljnim biljkama domaćinima, sprovedeno je od kraja juna do početka oktobra u skladu sa dostupnim podacima o periodu leta (Aleksić *et al.* 1967; Hoch & Remane 1985; Sharon *et al.* 2005; Cargnus *et al.* 2012; Kosovac *et al.* 2013). Prilikom sakupljanja insekata metodom košenja entomološkom mrežom birane su individualne biljke ili manji monodominantni vegetacijski sklopovi. Ciljna staništa su bile nenarušene kserotermne livade, zaparložene površine, ruderalna staništa i kamenite podloge u mediteranskom litoralu čime je fokus bio usmeren ka prirodnim staništima ciljnih biljaka domaćina populacija *H. obsoletus*, u odnosu na sva dosadašnja istraživanja koja su usmerena na agroekosisteme i korovsku vegetaciju. Na ovaj način je procenjena prirodna biološka dinamika vektora nezavisna od kultura koje mogu uticati na preživljavanje i populacionu brojnost cikada.

Pojedinačni primerci su sakupljeni usnim aspiratorom, prebačeni u tubice zapremine 2ml (Sarstedt) ispunjene 96% etanolom i zatim transportovani do laboratorije u prenosnom frižideru na temperaturi od 10°C. Sakupljeni insekti su u laboratorijskim uslovima skladišteni u frižideru na temperaturi od 4°C, do kasnijih analiza. Sve jedinke su determinisane kao *H. obsoletus* pod stereomikroskopom (Leica MZ7.5) prateći ključ za determinaciju vrsta roda *Hyalesthes* (Hoch & Remane 1985) baziran na morfologiji genitalnog aparata mužjaka.

Na lokalitetima u istočnoj Srbiji, gde je sprovedenim istraživanjima utvrđeno prisustvo populacija aduata *H. obsoletus* u asocijaciji sa *C. foetida*, izvršeno je ciljano sakupljanje larvi familije Cixiidae na korenu *C. foetida* koje su kasnije molekularno determinisane kako bi se proverio status ove biljke kao domaćina.

3.1.2 Ekstrakcija DNK

Nedestruktivna i delimično modifikovana natrijum dodecil sulfat (SDS) metoda ekstrakcije DNK (Rees *et al.* 2001; Mahuku 2004) korišćena je za izolovanje genomske sadržaja iz pojedinačnih jedinki *H. obsoletus*. Svi primerci su punktirani sterilnom iglom u predelu toraksa između drugog i trećeg tergita.

Punktiranje je vršeno pod binokularnom lupom (Leica MS5). Punktirani insekti su zatim prebačeni u tubice zapremine 2ml (Sarstedt), ispunjene sa 400 µl ekstrakcionog pufera (20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) i 4 µl enzima proteinaze K (Fermentas) koncentracije 187.5 µg/mL. Inkubacijom tubica 12 sati u vodenom kupatilu na 56°C degradiraju se meka tkiva i nukleinski sadržaj se rastvara u puferu. Nakon inkubacije, insekti su uklonjeni iz rastvora i prebačeni u nove tubice zapremine 1.5 ml ispunjene 96% etanolom u kojima su čuvane na temperaturi od 4°C za dalje morfološke analize. U pufer sa organskim sadržajem uzorka dodata je jednaka zapremina hloroforma (400 µl) i DNK je izdvojena centrifugiranjem sadržaja na 11000 obrt/min na temperaturi od 4°C u trajanju od 10 minuta. Korak sa hloroformom je ponovljen, a zatim je u dobijeni supernatant dodata jednaka zapremina ledeno hladnog izopropanola (400 µl). Centrifugiranjem brzinom 12000 obrt/min u trajanju od 15 minuta istaložena je DNK u vidu plake na dnu tubice, koja je zatim isprana 96% etanolom, osušena pod stujom steilnog vazduha i rastvorena u 50 µl TE pufera (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.6). Paratipski primerak *H. thracicus* (Slika 4) je pažljivo odvojen od entomološke pločice i zatim pripremljen za ekstrakciju na prethodno opisan način. Genomska DNK ovog primerka je izolovana koristeći komercijalni komplet za izolovanje DNK DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Nemačka) prateći uputstva proizvođača. Obe metode izolacije DNK su omogućile morfološko očuvanje svih individua za potencijalne dalje analize. Ekstrahovana DNK pojedinačnih insekata je čuvana u zamrzivaču na -20°C do daljih analiza.

3.1.3 Genotipizacija mitohondrijskih markera

3.1.3.1 Amplifikacija mitohondrijskih markera

Populaciono-genetičke analize mitohondrijske DNK (mtDNK) su sprovedene na dva genska regiona, od kojih je svaki sastavljen od po tri gena čija je informativnost u kontekstu divergencije *H. obsoletus* asocijacija prethodno potvrđena (Johannesen *et al.* 2008; 2012): (1) *COI-tRNK(Leu)-COII* genski region sastavljen on *citohrom oksidaze subjedinice I (COI)*, transportne RNK (*tRNK*) za leucin (*Leu*), *citohrom oksidaza subjedinica II (COII)* i (2) *16S-tRNK(Leu)-ND1* region koji čine 16S subjedinica ribozomalne RNK (*16S rRNK*), transportna RNK

(*tRNK*) za leucin (*Leu*), *nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenaza subjedinica 1* (*ND1*). Umnožavanje mtDNK regiona je urađeno lančanom reakcijom polimeraze (PCR) koristeći prajmere S2792 i A3661 za *COI-tRNK(Leu)-COII* genski region (Brown *et al.* 1996) i LR-N-12945 i N1-J-12261 za *16S-tRNK(Leu)-ND1* region (Hedin 1997) (Tabela 1). Reakcije umnožavanja su za oba genska regiona urađene u 20 μ l PCR smeše koju čine: Kapa Biosystems High Yield Reaction Buffer A (1 x 1.5 mM MgCl₂), MgCl₂ (3.5 mM za *COI-tRNK(Leu)-COII* region, 1.5 mM za *16S-tRNK(Leu)-ND1* region), dNTPs (0.5 mM), odgovarajući prajmeri (0.4 μ M), KAPA *Taq* polimeraza (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA) (0.0375 U/ μ l) i 1 μ l ekstrahovane DNK.

Temperaturni protokol umnožavanja u Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) je bio sledeći:

95°C	2 min	inicijalna denaturacija	} 35 ciklusa
95°C	30 sec	denaturacija	
48°C	1 min	hibridizacija prajmera	
72°C	90 sec	elongacija	
72°C	10 min	finalna elongacija	

Radi provere uspešnosti amplifikacije, 5 μ l PCR produkta svakog uzorka je elektroforetski razdvojeno u 1% agaroznom gelu u TBE puferu (Tris-Borat 90 mM, EDTA 1 mM), obojeno etidium bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom. Nakon vizuelne procene koncentracije i dužine umnoženih fragmenata mtDNK regiona u odnosu na DNK marker 100 bp DNA Ladder Extended (SERVA), PCR produkti su sekvencirani na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvenatoru (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). Provera kvaliteta sekvenci i njihovo prevođenje u FASTA format je urađeno u programu FinchTV v.1.4.0 (www.geospiza.com). Poređenje, utvrđivanje nukleotidnih razlika i poravnanje sekvenci je izvršeno pomoću CLUSTAL W programa integrisanog unutar MEGA 5.2 programskog paketa (Thompson *et al.* 1994; Tamura *et al.* 2011).

Dužine sekvenci mtDNK regiona korišćenih u analizama su 780 bp (*COI-tRNK(Leu)-COII*) i 400 bp (*16S-tRNK(Leu)-ND1*) kako bi rezultati bili poredivi sa

publikovanim podacima. Dva genska regiona su u analizama spojena i tretirana kao jedan jedinstven genski segment (jedna particija) koja u imenovanju haplotipova prati prethodno postavljenu alfabetsku nomenklaturu (Johannesen *et al.* 2008; Prilog 2). Sekvence svih novodetektovanih haplotipova su pohranjene u online NCBI genetičku bazu podataka (engl. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pod pristupnim brojevima (engl. *accession number*, acc. no.) KY368699-KY368724 za *COI-tRNK(Leu)-COII* i KY368692-KY368698 za *16SrRNK-tRNK(Leu)-ND1* genski region.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju dva genska regiona paratipskog primerka *H. thracicus*. Nazivi novodizajniranih prajmera i degenerisana mesta prajmerskih sekvenci su označeni podebljanim slovima. Prikazane dužine mtDNK genskih segmenata ne obuhvataju prajmerske pozicije.

Region	Naziv prajmera i sekvenca u 5' → 3' smeru	Dužina obuhvaćenog regiona
<i>COI-tRNK(Leu)-COII</i>	S2792 ATACCTCGACGTTATTCAGA (Brown <i>et al.</i> 1996)	S2792 / Hy-TL-R1 245 bp
	Hy-TL-R1 GRTTTWCTTTMTAGAYGAATTTAAG	
	Hy-TL-F1 TGGCAGAAAAGTGCTRTGAA	Hy-TL-F1 / Hy-COII-R 340 bp
	Hy-COII-R1 TCATATCTTCARTATCATTGATG	
	Hy-COII-F1 CCATCAATTTCDATYAAAACHATAGG	Hy-COII-F1 / A3661 270 bp
	A3661 CCACAAATTTCTGAACATTGACCA (Brown <i>et al.</i> 1996)	
<i>16SrRNK-tRNK(Leu)-ND1</i>	LR-N-12945 CGACCTCGATGTTGAATTAA (Hedin 1997)	LR-N-12945 / Hy-ND1-R1 307 bp
	Hy-ND1-R1 TTWCGAAAYTGAATATAWCC	
	Hy-ND1-F1 GTTGCTTAYTTTATTCTTCTTGA	Hy-ND1-F1 / N1-J-12261 337 bp
	N1-J-12261 TCGTAAGAAATTATTTGAGC (Hedin 1997)	

Imajući u vidu da je DNK muzejskih primeraka insekata usled starosti i načina čuvanja često degradirana i fragmentisana, osmišljena je posebna metodologija njene analize kod paratipskog primerka *H. thracicus*, umnožavanjem kratkih fragmenata ciljanih genskih regiona. Dizajnirani su degenerisani prajmeri koji će omogućiti umnožavanje kraćih fragmenata genskih regiona i obuhvatiti kompletnu željenu sekvencu. Dizajn prajmera za umnožavanje kratkih fragmenata, obzirom da je sekvenca za koju treba da se vežu nepoznata, bio je baziran na poravnanju sekvenci svih poznatih haplotipova *H. obsoletus* i sekvenci sledećih cikada familije Cixiidae: *Hyalesthes philesakis*, *H. luteipes*, *H. ponticorum*, *H. aylanus*, *Reptalus panzeri*, *R. melanochaetus*, *R. cuspidatus* i *Setapius apiculatus*. Šest novodizajniranih prajmera su u kombinaciji sa standardnim (Brown *et al.* 1996; Hedin 1997), pokrili kompletan željeni genski region naknadno sastavljen od 5 kratkih genskih fragmenata (Tabela 1).

Korišćena PCR smeša za umnožavanje kratkih fragmenata je bila ista kao za umnožavanje fragmenata pune dužine *H. obsoletus* uzoraka, dok je termalni protokol izmenjen samo u koraku elongacije koja je skraćena na 45 sekundi. Nukleotidne sekvence genskih regiona *H. thracicus*, *COI-tRNK(Leu)-COII* i *16SrRNK-tRNK(Leu)-ND1*, takođe su deponovane u NCBI genetičku bazu pod pristupnim brojevima KY368725 i KY368726.

3.1.3.2 Genealogija mitohondrijskih gena, analize diverziteta i populaciona diferencijacija

Analize populaciono-genetičkih specifičnosti, intra- i inter-specijske varijabilnosti i utvrđivanje ancestralnih (predačkih) haplotipova između i unutar populacija *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćina sprovedena je konstruisanjem genealoške haplotipske mreže zasnovane na mtDNK genskim regionima. Genealoška analiza je urađena primenom dva programa sa različitim algoritamskim metodom formiranja haplotipske mreže: 1) metod statističke parsimonije primenjen u programu TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000; Templeton *et al.* 1992) uz limit poverenja od 95% i 2) *median-joining* metod primenjen u programu Network v.4.612 (www.fluxus-engineering.com) uz vrednost parametra epsilon: $\epsilon=0$. Genealoške analize konstruisanja haplotipske mreže obuhvatale su *H.*

obsoletus haplotipove detektovane u 55 populacija jugoistočne Evrope i Turske sakupljene u ovoj studiji kojima su pridruženi svi prethodno opisani haplotipovi iz zapadne i centralne Evrope i Izraela (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Johannesen & Riedle-Bauer 2014; Chuche *et al.* 2018) (Tabela 2, Prilog 2).

Tabela 2. Uzorkovane *H. obsoletus* populacije asocirane sa četiri biljke domaćina na teritoriji jugoistočne Evrope i Turske. Geografska koordinata je označena skraćenicom GPS, dok je broj jedinki sakupljenih po populaciji prikazan u koloni N.

Biljka domaćin <i>H. obsoletus</i>	Država	Lokalitet	GPS	N	
<i>Convolvulus arvensis</i>	Srbija	Topola	N44 13.532 E20 40.224	20	
		Aleksinac	N43 36.010 E21 40.592	6	
		Predejane	N42 49.992 E22 07.912	9	
	Rumunija	Petrevo selo	N45 49.528 E21 31.548	9	
	Crna Gora	Martinići	N42 32.245 E19 10.763	17	
		Podgorica	N42 26.919 E19 12.509	20	
	Makedonija	Hamzali	N41 29.860 E22 44.996	12	
		Strumica	N41 26.505 E22 39.922	11	
	Grčka	Kilkis	N40 54.984 E22 49.101	6	
	Turska	Erzindžan	N39 57.253 E38 38.063	3	
	<i>Urtica dioica</i>	Srbija	Gakovo	N45 57.88 E19 3.28	22
			Bačka Topola	N45 47.518 E19 35.604	20
Bačko Petrovo selo			N45 43.693 E20 06.114	20	
Vršac			N45 03.874 E21 11.208	12	
Srednjevo			N44 39.685 E21 30.362	15	
Boljetin			N44 31.740 E22 02.090	12	
Negotin			N44 16.604 E22 30.484	6	
Zaječar			N43 54.492 E22 17.728	20	
Knjaževac			N43 30.610 E22 18.833	15	
Grnčar			N43 01.270 E22 21.825	17	
Vranje			N42 31.725 E21 54.319	12	
Vranjska banja			N42 35.417 E21 59.839	11	
Crna Gora		Godinje	N42 13.421 E19 06.800	6	

		Martinići	N42 32.245 E19 10.763	20
		Podgorica	N42 26.919 E19 12.509	20
	Makedonija	Hamzali	N41 29.860 E22 44.996	17
		Strumica	N41 26.505 E22 39.922	19
	Grčka	Aretusa	N40 45.767 E23 33.096	12
		Filadelfion	N40 45.246 E23 27.846	20
		Profitis	N40 39.930 E23 17.331	6
<i>Vitex agnus-castus</i>	Crna Gora	Bar	N42 07.031 E19 04.581	18
		Godinje	N42 13.421 E19 06.800	19
		Kamenari	N42 28.591 E18 41.028	20
		Ulcinj	N41 56.515 E19 16.052	19
	Grčka	Apolonija	N40 38.380 E23 29.960	10
		Asprovalta	N40 45.124 E23 44.024	19
		Aretusa	N40 41.616 E23 40.397	20
		Larisa	N39 38.544 E22 16.981	7
		Lezbos	N39 18.565 E26 8.379	5
		Tasos	N 40 35.177 E 24 37.525	3
<i>Crepis foetida</i>	Srbija	Aleksinac	N43 36.010 E21 40.592	10
		Deligrad	N43 38.546 E21 33.444	20
		Požarevac	N44 39.310 E21 11.983	12
		Porečka reka	N 44 24.267 E22 10.350	4
		Negotin	N44 16.604 E22 30.484	21
		Tamnič	N44 04.973 E22 32.048	7
		Zaječar	N43 50.016 E22 17.334	6
		Temaska	N43 16.537 E22 31.840	12
		Pirot	N43 12.880 E22 31.585	19
		Jasenovik	N43 22.365 E22 02.441	20
		Vranjska banja	N42 34.139 E21 58.367	7
	Bugarska	Vidin	N43 57.711 E22 51.258	6
	Rumunija	Kalafat	N43 59.926 E22 58.119	10
	Turska	Erzindžan	N39 57.253 E38 38.063	8
		Kırşehir	N39 26.021 E34 07.795	1

Stepen divergencije unutar i između haplogrupa (metapopulacija) sugerisanih mtDNK genealoškom mrežom određen je primenom *pairwise F*-statistike (Weir & Cockerham 1984) koristeći program Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). Standardni parametri molekularnog diverziteta F_{ST} i theta (θ) izračunati su uzimajući u obzir broj i frekvenciju haplotipova prisutnih unutar tri metapopulacije formirane haplotipskom mrežom: (1) *C. arvensis* + *U. dioica*, 177 jedinki; (2) *V. agnus-castus*, 56 jedinki i (3) *C. foetida*, 83 jedinke (Tabela 2). Stepen genetičkog diverziteta unutar metapopulacija je utvrđen koristeći parametar theta (θ) procenjen na osnovu broja alela (θ_k), očekivane homozigotnosti (θ_H), segregacionih mesta (θ_S) i nukleotidnih razlika (θ_π). Theta (θ) parametar pokazuje distribuciju varijacija unutar i između populacija kada se analizirani uzorak smatra elementom višeg nivoa grupisanja iz koga potiče, što je u ovom slučaju metapopulacija uslovljena biljkom domaćinom (Tajima 1983; 1989).

Indeks fiksacije (F_{ST}) i Nei-ov prosečan broj *pairwise* razlika (Nei & Li 1979) izračunati su u programu Arlequin kako bi se utvrdio stepen diferencijacije između *H. obsoletus* populacija asociiranih sa različitim biljkama. Kalkulacije su urađene za ukupno 51 populaciju koje su imale najmanje 5 individua (Tabela 2). Vrednost F_{ST} se kreće u intervalu od 0 (podrazumevajući negativne vrednosti) do 1, gde 0 ukazuje na odsustvo divergencije između populacija, a 1 ukazuje na potpuno razdvajanje (Hudson *et al.* 1992; Weir & Cockerham 1984). Nei-ove *pairwise* razlike proističu iz mutacija i promena u frekvenciji haplotipova u populacijama usled slučajnog uzorkovanja.

U cilju utvrđivanja delovanja selekcije ili populaciono-demografskih procesa na populacije *H. obsoletus* u asocijaciji sa navednim biljkama domaćinima, odnosno odstupanja od pretpostavki neutralne evolucije, izvršene su kalkulacije testova neutralnosti: Tajimovog D testa (Tajima 1989) i Fu-ove F_S statistike neutralnosti čije su simulacije bazirane na ISM (engl. *infinite sites model*) matematičkom modelu mutacija (Fu 1997). Negativne vrednosti Fu-ovog F_S parametra ukazuju na prekomernost alela koja se očekuje kod populacija u ekspanziji, dok pozitivne vrednosti ukazuju na manjak alela kod populacija koje su prošle kroz genetički drift (Holsinger 2012). Tajimov D test je zasnovan na frekvenciji segregacionih varijabilnih mesta i bazira se na odbacivanju nulte hipoteze neutralnog modela

nukleotidne varijabilnosti koji predviđa jednakost između prosečnog broja nukleotidnih razlika između haplotipova i broja varijabilnih mesta. Negativne vrednosti Tadžiminog D parametra ukazuju na pojavu mutacija usled evolutivnih pritisaka i populacione ekspanzije, dok pozitivne vrednosti ukazuju na balansnu selekciju ili skorašnje mešanje različitih populacija.

3.1.3.3 Filogenetske analize

Rekonstrukcija filogenetskih odnosa, kao i u slučaju konstruisanja genealoške mreže, izvršena je na osnovu *H. obsoletus* haplotipova detektovanih u 55 populacija iz ove studije kojima su pridruženi i prethodno opisani haplotipovi iz Evrope i Izraela (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Johannesen & Riedle-Bauer 2014; Chuche *et al.* 2018). Spojene sekvence dva mtDNK regiona u dužini od 1180 bp su poravnate za sve *H. obsoletus* haplotipove i u analizama tretirane kao jedinstvene particije dvoslovne oznake. Najpogodniji model nukleotidne supstitucije za utvrđivanje filogenetskih odnosa unutar *ingroup* sekvenci je izračunat u programu jModelTest v.2.1.7 (Darriba *et al.* 2012) prateći Bajesov informacijski kriterijum (engl. *Bayesian Information Criterion*; BIC). Sugerisani model nukleotidne supstitucije je u programu PAUP* v.4.0b10 (Swofford 2002) predefinisani u okviru kalkulacija *neighbour-joining* (NJ) filogenetske analize i korišćen prilikom izračunavanja evolutivnih distanci između haplotipova i sugerisanih filogenetskih klastera. Genetičke distance su procenjene i na osnovu izdvojenih *COI-COII* gena kao filogenetski najinformativnijih markera za diferencijaciju i identifikaciju vrsta (Hebert *et al.* 2003; Bertin *et al.* 2010; Wang *et al.* 2017). U istom programu je urađena i rekonstrukcija filogenetskih odnosa *maximum parsimony* (MP) metodom uz 500 replikacija (engl. *bootstrap*), kao i u slučaju NJ analize, odabirom *ACCTRAN* optimizacije karaktera i TBR topološke transformacije (engl. *Tree-Bisection-Reconnection branch swapping mode*). Filogenetske analize bazirane na Bajesovoj statistici urađene su u programu MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003) korišćenjem modela nukleotidne supstitucije sugerisanog BIC kriterijumom u jModelTest-u. Parametri analize su podrazumevali: dva simultana ponavljanja od po 1,000,000 generacija, uzorkovanje na svakih 100 generacija i odbacivanje 25% rezultata (engl. *burn-in*

25%) radi eliminisanja greške. Za procenu verodostojnosti rezultata analize, odnosno dostizanje stacionarne faze Markovljevih lanca (engl. *Markov Chain Monte Carlo*, MCMC) prilikom uzorkovanja i proveru stabilnosti Bajesove analize u MrBayes-u, korišćen je program Tracer v.1.5.0 (Rambaut & Drummond 2009).

Za sve tri filogenetske analize kao *outgrup*-a je korišćena mtDNK sekvenca vrste *H. thracicus*. Za vizualizaciju stabala i posteriornih verovatnoća korišćen je program FigTree v.1.4 (Rambaut 2012).

3.1.4 Genotipizacija mikrosatelitskih nuklearnih markera

3.1.4.1 Amplifikacija mikrosatelitskih nuklearnih markera

Populaciono-genetička struktura *H. obsoletus* asocijacija bazirana na nuklearnoj DNK (nDNK), tačnije kratkim ponavljajućim varijabilnim sekvencama - mikrosatelitima, procenjena je kombinacijom statističkih i filogenetskih analiza sedam lokusa: B82, F56, F84, H120, E96, G85 i C147 (Imo *et al.* 2011) (Tabela 3).

Tabela 3. Nazivi nuklearnih mikrosatelitskih markera, prikaz ponavljajućeg motiva mikrosatelita i nukleotidnih sekvenci odgovarajućih prajmera (Imo *et al.* 2011).

Naziv lokusa (mikrosatelita)	Ponavljajući motiv	Sekvenca prajmera u 5' → 3' smeru
B82	(CA) ₁₀	Frw: TGTAAGCACAAGAGACCTATCG Rev: CTCTTCCCTTCGTCAACG
F56	(CCA) ₁₂	Frw: AAGGCGCACGTTTCTACTGT Rev: TCGAAAATCGCGTTATCAGTC
F84	(CA) ₁₃	Frw: CCACCTTTTCCGCTTATGAA Rev: GAGACTCCAGTTGCCACACA
H120	(CA) ₃ TA(CA) ₇	Frw: AACTCTCATGCGGACCAGAC Rev: AAGGGGATGGGTAGAACCAC
E96	(GA) ₁₅ (prekinuto sa 4 T)	Frw: CGGCGTAAATTTGGAGAGAA Rev: ATCCCTTCCCCTTCTTCA
G85	(CA) ₁₀	Frw: AGCAAACACCTGCCTCTGAA Rev: CCAAAATTAGCGAACCGAAC
C147	(CA) ₂₁	Frw: GGTGTTTTTCTCTACTGTCTGAG Rev: GGACATGGCTACGTTCAACA

Proceduri umnožavanja mikrosatelita je prethodilo utvđivanje koncentracije ekstrahovane DNK koristeći mikrozapreminski nano-spektrofotometar NanoDrop (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) radi pripreme radnih rastvora DNK koncentracije 30 ng/ μ L koji omogućavaju poredive rezultate i optimalan kvalitet amplifikacije (Manyar *et al.* 2013; Imo *et al.* 2013).

Mikrosateliti ukupno 702 *H. obsoletus* jedinke grupisane u 50 populacija (Tabela 2), amplifikovani su u dve nezavisne PCR procedure koristeći 4, odnosno 3 para fluorescentnih prajmera. Umnožavanje je urađeno koristeći komercijalni PCR komplet *QIAGEN Multiplex PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Nemačka) u ukupnoj zapremini od 10 μ l, odnosno 8.5 μ l PCR smeše i 1.5 μ l genomske DNK optimalne koncentracije. PCR smeša je sadržala 1x *QIAGEN Multiplex PCR Master Mix* (3 mM MgCl₂) i 0.2 μ M koncentracije svakog od prajmera.

Termalni uslovi reakcije su bili sledeći (Imo *et al.* 2011; 2013):

95°C	30 sec	inicijalna denaturacija	} 30 ciklusa
94°C	30 sec	denaturacija	
60°C (B82, F56, F84 i H120)	} 90 sec	hibridizacija prajmera	
62.5°C (E96, G85, i C147)			
72°C	90 sec	elongacija	
72°C	10 min	finalna elongacija	

Amplikoni su sekvencirani na GA3130XL kapilarnom sekvenatoru (Applied Biosystems) koristeći 11.7 μ l HiDi-formamida, 0.3 μ l boje ROX 500 standard (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) i 1 μ l PCR produkta. Dužina umnoženih alela je utvrđena u programu GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems) kroz iščitavanje vrednosti pikova elektroferograma. U slučaju uzoraka čiji se mikrosateliti u jednom ili oba PCR miksa nisu umnožili, kompletna procedura amplifikacije i sekvenciranja je ponovljena u cilju verifikacije rezultata.

3.1.4.2 Diverzitet i varijabilnost mikrosatelita

Prisustvo nultih alela je procenjeno koristeći EM algoritam inkorporiran u program FreeNa (www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/FreeNA) (Dempester *et al.* 1977; Chapuis & Estoup 2007). Pored određivanja frekvencija nultih alela na nivou lokusa i populacija, izračunata je i prosečna učestalost nultih alela na nivou asocijacija sa biljkom domaćinom. Devijacije od Hardi-Vajnbergove ravnoteže (engl. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) procenjene su u programu MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004). Genotipska povezanost lokusa (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) proverena je u *on-line* verziji programa GENEPOP (Raymond & Rousset 1995) nakon čega je primenjena Bonferroni korekcija (Rice 1989). Iz obe analize je isključen polno vezani lokus C147. Broj alela (engl. *Allelic number*, A) i bogatstvo alela (engl. *Allelic richness*, A_R) su procenjeni na osnovu svih 7 mikrosatelita u programu FSTAT v.2.9.3 (Goudet 1995), dok je lokus C147 isključen pri izračunavanju koeficijenta inbridinga (F_{IS}). Prosečna očekivana heterozigotnost (H_E) je izračunata u programu ARLEQUIN v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). Zavisnost ovog parametra od veličine uzorka proverena je linearnom regresijom, dok je statistička značajnost razlika između H_E i A_R vrednosti na među-asocijacijskom nivou utvrđena primenom studentovog t-testa u programu STATISTICA v.5.1 (StatSoft, Inc. 1997).

3.1.4.3 Populaciona struktura i diferencijacija

Uticaj biljke domaćina i geografije na genetičku strukturu na individualnom i populacionom nivou procenjen je na osnovu multilokusnih genotipova *H. obsoletus* jedinki analiziranih Bajesovom statistikom u programu STRUCTURE v.2.3.3 (Falush *et al.* 2003). Inicijalno je testiran optimalan broj klastera (ΔK) u okviru kojih se grupišu 702 jedinke iz 50 populacija (Tabela 2) uz priključenih 20 prethodno genotipiziranih individua *H. obsoletus ex V. agnus-castus* iz Izraela (Imo *et al.* 2013). Cilj polaznog testa je bila provera poklapanja sugerisanog broja genetičkih klastera sa centralnom hipotezom o diferencijaciji populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima. Znajući da analize Bajesove statistike mogu biti pod uticajem frekvencije genotipova i dovesti do prikrivanja signala nižeg nivoa klastiranja, procena broja genetičkih grupa je urađena i na unutar-

asocijacijskom nivou kako bi se bolje sagledao uticaj biljke domaćina i/ili geografije. U svakoj od analiza je zadato po 20 nezavisnih ponavljanja za svaki pojedinačni broj klastera (K) koji se kretao od 1 do n (broj *a priori* definisanih populacija), uz definisane vrednost od 50,000 za period testiranja (engl. *burn-in*) i 200,000 iteracija Markovljevih lanaca. Za analizu je odabran mešoviti model (engl. *admixture model*) koji pretpostavlja da individue pojedinačno vuku segmente svog genotipa u određenom procentu iz svakog od pretpostavljenih klastera, što znači da preci mogu biti pripadnici različitih genetičkih grupa jer se sve analizirane jedinke tretiraju kao pripadajuće istoj vrsti. Definisani model frekvencije alela je model vezane frekvencije (engl. *correlated allele frequencies model*) koji sugeriše da su frekvencije alela kod različitih populacija slične usled migracija ili zajedničkog porekla (Falush *et al.* 2003).

Internet verzija programa STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012) korišćena je za vizualizaciju platoa verovatnoće (engl. *likelihood plateau*) koji ukazuje na trenutak dostizanja stabilnosti logaritamske distribucije $\ln P(D)$ za različite vrednosti K (Evanno *et al.* 2005). Sintopski lokaliteti gde se geografija isključuje kao destabilizirajući faktor su nezavisno analizirani. Step genetičke diferencijacije između genetičkih grupa identifikovanih u svakoj od postavljenih analiza klastiranja u programu STRUCTURE su testirane analizom molekularne varijanse (engl. *Analysis of MOlecular VAriance*; AMOVA) u programu ARLEQUIN v.3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010).

Procena filogenetskih odnosa *H. obsoletus* asocijacija urađena je i na osnovu mikrosatelita *maximum likelihood* metodom u programu Contml u okviru softverskog paketa Phylip v.3.69 (Felsenstein 2010). Jedinke vrste *Hyalesthes luteipes*, sakupljene na poljskom brestu (*Ulmus minor*) u istočnoj Srbiji, korišćene su kao *outgrup*-a. Ova analiza je bazirana na 4 mikrosatelita (F56, F84, H120 i G85) koji su se uspešno amplifikovali kod primeraka *H. luteipes*. Stablo je vizualizirano u programu FigTree v.1.4 (Rambaut 2012). Odabir *outgrup*-e se razlikuje u slučaju filogenetskih analiza zasnovanih na mtDNK i nDNK. U slučaju mitohondrijskih markera dovoljan je bio samo jedan uzorak (sekvenca) filogenetski najsrodnijeg primerka *H. thracicus*, dok je u slučaju mikrosatelita neophodan minimum od 6

analiziranih individua kako bi se održala verodostojnost i konzistentnost dobijenih rezultata.

3.2 Molekularna detekcija i karakterizacija 'Ca. P. solani' u populacijama *H. obsoletus*

Sve jedinice *H. obsoletus* iz četiri asocijacije, sakupljene za istraživanje populacione-genetike vektora (poglavlja 3.1.1 i 3.1.2) analizirane su i na prisustvo infekcije 'Ca. P. solani' čiji su izolati dalje multigeniski okarakterisani.

3.2.1 Detekcija 'Ca. P. solani'

Inicijalna provera prirodne inficiranosti sakupljenih *H. obsoletus* adulata urađena je umnožavanjem STOL11 genskog regiona dužine 720 bp (Daire *et al.* 1997). Ovaj region je specifičan za 'Ca. P. solani' i obuhvata deo gena za sintezu dihidrofolat reduktaze (*folA* gen) i deo gena koji kodira 1-acil-sn-glicerol-3-fosfat aciltransferazu (*plsC* gen). Amplifikacija je urađena u dve uzastopne PCR analize, direktnoj i nested. PCR procedura je bila ista za obe analize, u zapremini od 20 µl PCR smeše sledećeg sadržaja: KAPA *Taq* A pufer (1 x 1.5mM MgCl₂), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.3 mM), prajmeri (0.75 µM), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) 0,0375 U/µl. U direktnoj PCR analizi korišćen je prajmerski par STOL11f2 (5'-TATTTTCCTAAAATTGATTGGC-3') i STOL11r1 (5'-TGTTTTTGCACCGTTAAAGC-3') (Daire *et al.* 1997), dok su u nested reakciji korišćeni STOL11f3 (5'-ACGAGTTTTGATTATGTTTAC-3') i STOL11r2 (5'-GATGAATGATAACTTCAACTG-3') prajmeri (Clair *et al.* 2003). Amplifikacija je urađena u Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) po istom temperaturnom protokolu za obe PCR analize (Radonjić *et al.* 2009):

92°C	90 sec	inicijalna denaturacija	} 30 ciklusa
92°C	40 sec	denaturacija	
55°C	40 sec	hibridizacija prajmera	
72°C	70 sec	elongacija	
72°C	5 min	finalna elongacija	

Kao pozitivna kontrola reakcije korišćena je referentna DNK '*Ca. P. solani*' izolata izolovanih iz prirodno inficiranih adulata *H. obsoletus* iz Mozel regiona u Nemačkoj (obezbeđeno od strane dr Michael Maixner, Bernkastel-Kues, Nemačka). U direktnom PCR-u korišćen je 1 µl ekstrahovane DNK, dok je u nested reakciji korišćen 1 µl produkta direktnog PCR-a razređenja 1:50. Radi kontrole unakrsne kontaminacije, na svakih 10 uzoraka stavljena je negativna kontrola u vidu 1 µl molekularne vode. Nakon umnožavanja gena, finalni produkti su posle elektroforetskog razdvajanja na 1% agaroznom gelu vizualizirani pod UV transiluminatorom radi provere uspešnosti reakcije i utvrđivanja broja '*Ca. P. solani*'-inficiranih jedinki.

3.2.2 Multigenaska karakterizacija izolata '*Ca. P. solani*'

Među nekolicinom genetičkih markera koji su do sada testirani i korišćeni za karakterizaciju '*Ca. P. solani*' izolata u epidemiološkim studijama, sledeća tri gena su izabrana kao najinformativnija:

- (1) konzervativni *tuf* gen koji kodira faktor elongacije Tu (*EF-Tu*) i funkcionalno učestvuje u procesu translacije; primarno testiran u svrhu filogenetske klasifikacije fitoplazmi (Schneider *et al.* 1997,) a kasnije pokazan kao gen osnovne epidemiološke divergencije '*Ca. P. solani*' (Langer *et al.* 2003; Langer & Maixner 2004);
- (2) varijabilni *stamp* gen koji kodira antigenski membranski protein '*Ca. P. solani*'; podleže pozitivnom pritisku selekcije i ima evolutivnu ulogu u interakciji sa insektom vektorom, odnosno vezivanju sa mikrofilamentima digestivnog trakta (Fabre *et al.* 2011a) i
- (3) *vmp1* gen koji kodira varijabilni membranski protein '*Ca. P. solani*' čije varijacije u dužini i sekvencama mogu uticati na ekološke osobenosti izolata kao što je preferentnost prema specifičnom domaćinu (Cimerman *et al.* 2009); prvobitno je nazvan *stol-1H10* gen i korišćen ciljano za utvrđivanje genetičkog diverziteta '*Ca. P. solani*' (Pacifico *et al.* 2007; 2009).

3.2.2.1 Analiza *tuf* gena

Umnožavanje *tuf* gena je urađeno koristeći standardne prajmere, i to Tuf1f/Tuf1r u direktnoj reakciji amplifikacije i TufAYf/TufAYr ili TufUf/TufUr (Schneider *et al.* 1997) u nested reakciji. Termalni uslovi reakcije su se razlikovali u direktnom i nested PCR-u i bili su delimično prilagođeni (Schneider *et al.* 1997; Langer & Maixner 2004).

U direktnoj reakciji temperaturni uslovi su bili sledeći:

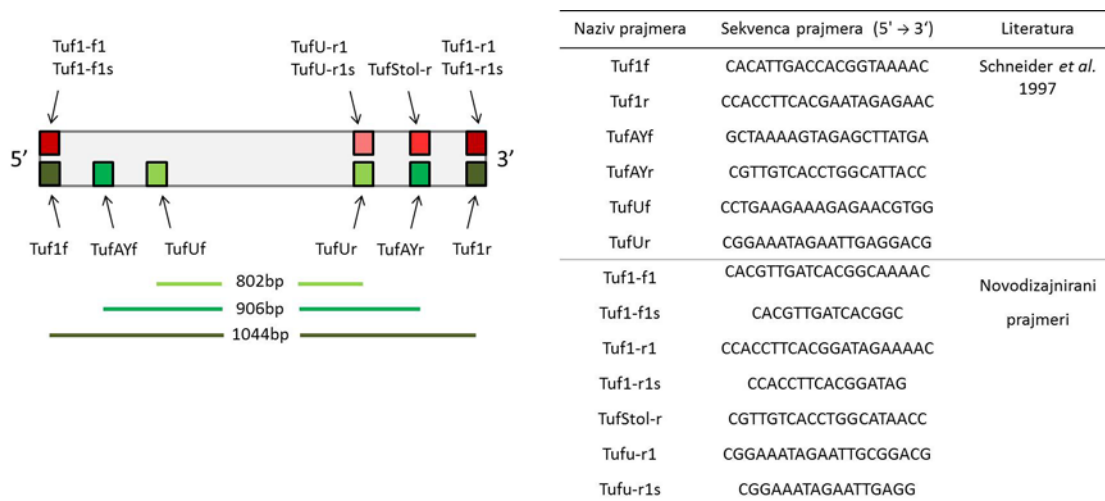
95°C	2 min	inicijalna denaturacija	} 35 ciklusa
95°C	30 sec	denaturacija	
45°C	30 sec	hibridizacija prajmera	
72°C	60 sec	elongacija	
66°C	5 min	finalna elongacija	

U nested reakciji temperaturni uslovi su bili sledeći:

95°C	2 min	inicijalna denaturacija	} 35 ciklusa
95°C	30 sec	denaturacija	
53°C	30 sec	hibridizacija prajmera	
72°C	60 sec	elongacija	
72°C	5 min	finalna elongacija	

Amplifikacija gena se odvijala u 20 µl PCR smeše sadržaja: KAPA *Taq* A pufer (1x) (1.5 mM MgCl₂), MgCl₂ (0.5 mM), dNTPs (0.2 mM), prajmeri (0.4 µM), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) 0.0375U/µl. Ponavljanje procedure umnožavanja *tuf* gena je urađeno upotrebom novodizajniranih prajmera za sve uzorke koji se nisu umnožili primenom standardnih prajmera (Slika 5). Pozicije sedam novih prajmera odgovaraju mestima vezivanja standardnih, dok je nukleotidna sekvenca na određenim pozicijama izmenjena kako bi bila potpuno komplementarna sa referentnim *tuf*-a i *tuf*-b genotipovima '*Ca. P. solani*' (FJ441241 i FJ441242, Radonjić *et al.* 2009). Temperaturni uslovi amplifikacije su

bili isti u obe PCR reakcije i odgovarali su protokolu direktnog PCR-a uz izmenu temperature elongacije sa 72°C na 66°C.



Slika 5. Šematski prikaz prajmera korišćenih za umnožavanje *tuf* gena uz odgovarajuće nukleotidne sekvence. Zelena polja i linije ukazuju na pozicije prajmera preuzetih iz literature i dužine odgovarajućih regiona koje obuhvataju ne uključujući prajmere. Crvena polja predstavljaju novodizajnirane prajmere koji imaju preklapajuće pozicije sa već poznatima.

Svi dobijeni nested amplikoni su podvrgnuti restrikcionalnoj analizi *HpaII* endonukleazom (Fermentas) prateći uputstva proizvođača (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Digestija je trajala 16 sati na temperaturi od 37°C i urađena je u 15 µl RFLP smeše sadržaja: 1 x pufer za digestiju, 1 U enzima, 1-5 µl PCR produkta u zavisnosti od količine sintetisanih amplikona i 8-12 µl *Molecular Biology Grade* vode (Eppendorf). Restrikcioni produkti su razdvojeni automatskom kapilarnom elektroforezom QIAxcel advanced (Qiagen, Hilden, Nemačka) koristeći *Screenin Gel Cartridge* uz sledeće parametre: voltaža injektiranja uzorka 5 kV, vreme injektiranja uzorka 30 sec, voltaža separacije 6 kV i vreme separacije 320 sec. DNK marker *QX alignment marker* (15 bp - 5 kb) je korišćen za poravnanje fragmenata analiziranih uzoraka, dok je *QX DNK marker FX174/HaeIII* (Qiagen, Hilden, Nemačka) korišćen za procenu dužine fragmenata. Kao pozitivne kontrole *tuf-a* i *tuf-b* restrikcionalnih profila korišćeni su referentni '*Ca. P. solani*' izolati iz prirodno inficiranih jedinki *H. obsoletus* sakupljenih na koprivi,

odnosno poponcu, u Mozel regionu u Nemačkoj (obezbeđeno od strane dr Michael Maixner, Bernkastel-Kues, Nemačka).

Nested produkti koji su bili nejasnog *tuf* profila, neočekivanog *tuf*-tipa u odnosu na okarakterisana druga dva gena, kao i svi izolati koji su umnoženi primenom novodizajniranih prajmera, prečišćeni su, kvantifikovani i sekvencirani (Macrogen Inc., Seul, Južna Koreja). Dobijene sekvence su poravnate sa referentnim izolatima (Radonjić *et al.* 2009; Aryan *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015) koristeći programski paket CLUSTAL W integrisan u softver MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) kako bi se uporedile nukleotidne razlike. Ovo je bilo posebno značajno radi nedvosmislene detekcije prisustva *tuf*-ab genotipa u analiziranim uzorcima.

3.2.2.2 Analiza *stamp* gena

Prilikom umnožavanja *stamp* gena korišćeni su samo standardni prajmeri za direktnu i nested reakciju, i to StampF (5'-GTAGGTTTTGGATGTTTAAAG-3') i StampR0 (5'-AAATAAAAGAACAAGTATAGACGA-3'), praćeni nested parom StampF1 (5'-TTCTTTAAACACACCAAGAC-3') i StampR1 (5'- AAGCCAGAATTTAATCTAGC-3') (Fabre *et al.* 2011a). Amplifikacija gena se odvijala u 20 µl PCR smeše sadržaja: KAPA *Taq* A pufer (1x) (1.5 mM MgCl₂), MgCl₂ (0.5 mM), dNTPs (0.3 mM), prajmeri (0.75 µM), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) 0.0375U/µl. Primenjeni temperaturni protokoli amplifikacije su opisani od strane istih autora (Fabre *et al.* 2011a) i razlikuju se u direktnom i nested PCR-u u temperaturi hibridizacije prajmera (56°C, odnosno 52°C) i u dužini elongacije (90sec, odnosno 30 sec).

Temperaturni uslovi su bili sledeći:

94°C	4 min	inicijalna denaturacija	} 35 ciklusa
94°C	30 sec	denaturacija	
56°C/52°C	30 sec	hibridizacija prajmera	
72°C	90 sec/30 sec	elongacija	
72°C	7 min	finalna elongacija	

Dobijeni nested produkti su sekvencirani (Macrogen Inc.) i upoređeni sa referentnim *stamp* izolatima (Fabre *et al.* 2011b; Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015; Murolo & Romanazzi 2015; Quaglino *et al.* 2016; Chuche *et al.* 2016) koristeći prethodno navedene programske pakete. Genealogija *stamp* gena koja prikazuje relacije referentnih genotipova i novodetektovanih izolata urađena je metodom statističke parsimonije u okviru programa TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000).

3.2.2.3 Analiza *vmp1* gena

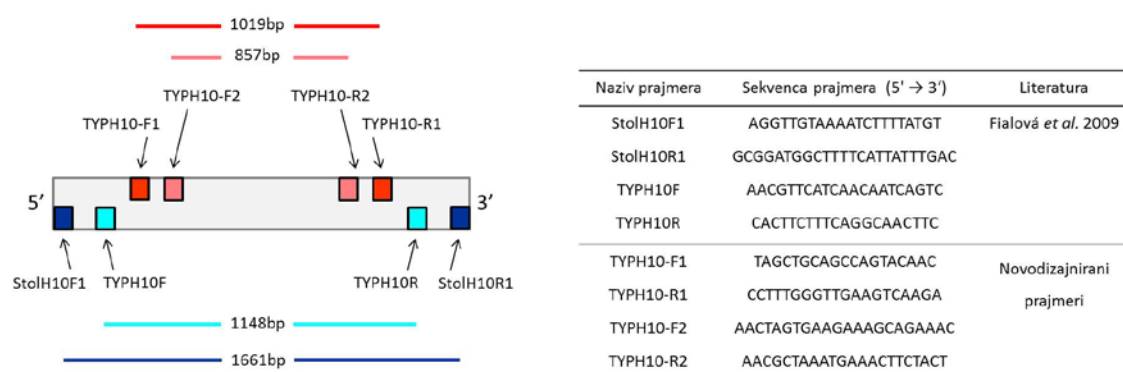
Primarna amplifikacija *vmp1* gena urađena je takođe kroz dvostruki PCR kombinacijom standardnih prajmerskih parova St01H10F1/St01H10R1 u direktnoj i TYPH10F/TYPH10R u nested reakciji (Fialová *et al.* 2009). Umnožavanje je urađeno u 20 µl PCR smeše sledećeg sadržaja: KAPA *Taq* A pufer (1x) (1.5 mM MgCl₂), MgCl₂ (0.5 mM), dNTPs (0.3 mM), prajmeri (0.75 µM), KAPATaq polimeraza (KAPA Biosystems) 0.0375U/µl. Temperaturni uslovi amplifikacije su preuzeti od strane istih autora i bili sledeći u direktnoj reakciji:

94°C	4 min	inicijalna denaturacija	} 35 ciklusa
94°C	30 sec	denaturacija	
52°C	30 sec	hibridizacija prajmera	
72°C	2 min	elongacija	
72°C	10 min	finalna elongacija	

U nested reakciji je termalni protokol bio sledeći:

94°C	4 min	inicijalna denaturacija	} 35 ciklusa
94°C	30 sec	denaturacija	
55°C	30 sec	hibridizacija prajmera	
72°C	2 min	elongacija	
72°C	10 min	finalna elongacija	

Jedina izmena u odnosu na referentni temperaturni protokol je bilo zadržavanje istog vremena trajanja elongacije od 2 minuta u obe reakcije. Kod uzoraka koji se nisu umnožili, a prisustvo '*Ca. P. solani*' je prethodno potvrđeno detekcijom STOL11 genskog regiona, amplifikacija je ponovljena u više kombinacija standardnih i novodizajniranih prajmera (Slika 6). Pozicije i sekvence novih prajmera su odabrane na osnovu poravnanja i poređenja referentnih izolata (Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014). Odabrane stabilne pozicije unutar *vmp1* gena, iako obuhvataju kraći region u odnosu na standardne prajmere, pokrivaju informativni segment gena na osnovu kojeg se utvrđuju razlike restrikcioni profila (Cimerman *et al.* 2009).



Slika 6. Šematski prikaz prajmera korišćenih za umnožavanje *vmp1* gena uz odgovarajuće nukleotidne sekvence. Plava polja i linije ukazuju na pozicije prajmera preuzetih iz literature i odgovarajuće dužine regiona koje obuhvataju ne uključujući prajmere. Crvena polja ukazuju na položaj novodizajniranih prajmera u odnosu na već postojeće, dok se linije odgovarajuće boje odnose na dužine regiona koje obuhvataju.

Svi nested produkti dobijeni korišćenjem standardnih prajmerskih parova su podvrgnuti digestiji sa *RsaI* restrikcionim enzimom (Fermentas) prateći uputstva proizvođača. Kao referentni profili korišćeni su sledeći '*Ca. P. solani*' izolati iz kolekcije Laboratorije za molekularnu dijagnostiku, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu i kolekcije Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, (Bordeaux, France, obezbeđeno od strane dr Xavier Foissac): CH1 (inficirana loza iz Italije, V1 profil); GGY (inficirana loza iz Nemačke, V2 profil); Rpg39 (inficiran *R. panzeri* iz Srbije, V2-TA profil); Hr-Br (inficirana loza iz Hrvatske, V3 profil); Rqg50 (inficiran

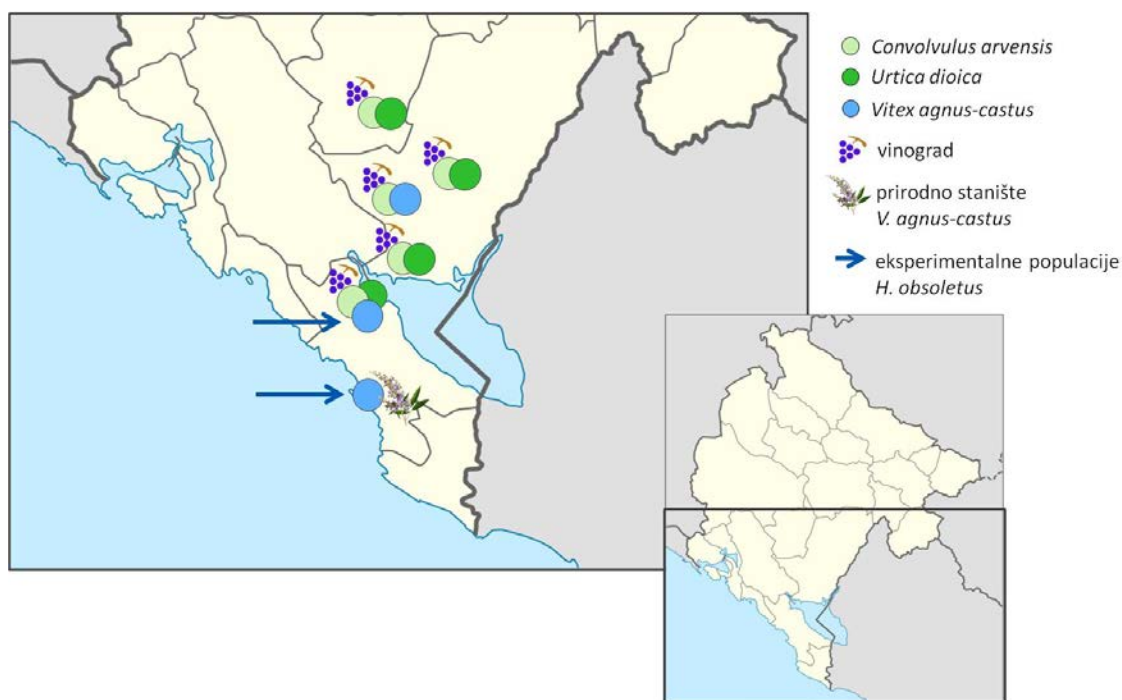
R. quinquecostatus iz Srbije, V4 profil); 19-25 (inficirana loza iz Nemačke, V5 profil); Vv5 (inficirana loza iz Srbije, V14 profil); Chrt2 (Charentes2) (inficiran *H. obsoletus* iz Francuske, V15 profil); U79 (inficirana *U. dioica* iz Makedonije, V18 profil). Izolati V2 profila su dodatno okarakterisani sečenjem sa dva enzima, *TaqI* i *AluI* (Fermentas), radi razlikovanja V2 i V2-TA profila, dok su uzorci V7 profila dodatno sečeni *AluI* enzimom kako bi se utvrdilo da li pripadaju V7 ili V7-A tipu (Cvrković *et al.* 2014). Restrikcioni produkti su razdvojeni i analizirani na kapilarnoj elektroforezi prema parametrima navedenim u poglavlju 3.2.2.1.

Svi uzorci amplifikovani primenom novodizajniranih prajmera nisu podvrgnuti RFLP analizi, već su nested amplikoni sekvencirani. Njihova pripadnost određenom *vmp1* profilu utvrđena je primarno virtuelnom digestijom u programu pDRAW32 (www.acaclone.com), a zatim i poređenjem sa publikovanim izolatima putem BLAST online servisa (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3 Molekularno-epidemiološke analize praćenja puteva diseminacije 'Ca. P. solani' u prirodnim sistemima mediteranskih vinograda

Istraživanja prirodnih epidemioloških puteva '*Ca. P. solani*' kroz koje se *in situ* kreće fitoplazma do momenta inokulacije vinove loze sprovedena su u Podgoričkom i Primorskom vinogorju Crne Gore (Slika 7) u kojima su prethodno detektovani CPs infekcija zasada i prisustvo *H. obsoletus* populacija (Radonjić *et al.* 2009; Krstić *et al.* 2012). U pet oglednih vinograda koji se nalaze na području mediteranske klime i međusobno su udaljeni 5-35 km, očekivano je prisustvo tri biljke domaćina vektora: *C. arvensis*, *U. dioica* i *V. agnus-castus* (Slika 7). U 3 od 4 vinograda koji se nalaze u Podgoričkom vinogorju, u Zetskoj ravnici severno od Skadarskog jezera: Šušunja (N42 19.3240, E19 13.3220), Martinići i Podgorica (Tabela 2), sintopski su detektovani *C. arvensis* i *U. dioica*, dok je u Berima (N42 26.0510, E19 10.4390) uz *C. arvensis* prisutan i *V. agnus-castus*. Južno od Skadarskog jezera, u Primorskom vinogorju u litoralu Crne Gore, obrađen je vinograd u Godinju gde su bile prisutne sve tri prethodno pomenute biljke potencijalni dualni domaćini *H. obsoletus* i '*Ca. P. solani*' (Slika 7). Lokaliteti na kojima je bio prisutan *V. agnus-castus* su bili posebno značajni jer je na njima

istovremeno proveren status ove biljke kao domaćina vektoru i fitoplazmi. Na osnovu multigenске karakterizacije 'Ca. P. solani' izolata detektovanih u vinovoj lozi, biljkama domaćinima vektoru i sa njima asociranim *H. obsoletus* populacijama u okviru odabranih mediteranskih vinograda, pokazani su prirodni putevi disperzije fitoplazme kroz odgovarajuće domaćine.



Slika 7. Mapa mediteranskih lokaliteta 5 oglednih vinograda i prirodnog staništa *V. agnus-castus* gde su uzorkovane biljke domaćini i asocirane *H. obsoletus* populacije. Krugovi tri boje odgovaraju specifičnoj biljci domaćinu kao u legendi. Simbol vinove loze ukazuje na ogledne vinograde, simbol *V. agnus-castus* na prirodno stanište ovog domaćina i asociranih populacija vektora u Baru, dok su strelicama označene *H. obsoletus* populacije u Godinju i Baru odakle su prirodno inficirane jedinice korišćene u testovima inokulacije vinove loze.

3.3.1 Sakupljanje materijala

3.3.1.1 Sakupljanje *H. obsoletus*

Adulti *H. obsoletus* su sakupljeni prethodno opisanom metodologijom (poglavlje 3.1.1) u periodu od polovine juna do kraja jula. Svi lokaliteti su obrađeni tri puta u navedenom periodu kako bi se izbegla odstupanja u uzorkovanju uslovljena manjim razlikama u periodu leta populacija asociranih sa *C. arvensis* i *U. dioica* (Cargnus *et al.* 2012). Za populacije vezane za *V. agnus-castus* prethodno je

utvrđeno na jadranskim i egejskim obalama da se period leta poklapa sa preostalim asocijacijama. U oglednim vinogradima gde je bilo prisutno više od jedne biljke domaćina, insekti su ciljano selektivno sakupljani kako ne bi došlo do mešanja uzorkovanih asocijacija. Za potrebe detekcije i karakterizacije 'Ca. P. solani' uvršten je reprezentativan broj jedinki *H. obsoletus* po lokalitetu (više ili manje individua u odnosu na Tabelu 2), dok su uključene i dve prethodno navede *H. obsoletus* populacije asociirane sa *V. agnus-castus* na lokalitetima: Šušunja i Beri (Slika 7).

3.3.1.2 Sakupljanje biljaka domaćina *H. obsoletus*

Praćenje prirodnih puteva širenja 'Ca. P. solani' u mediteranskim vinogradima zasnivalo se na prethodno detektovanim CPs izolatima koji inficiraju ogledne vinograde (Radonjić *et al.* 2009). Ovi izolati su dopunjeni ciljanim uzorkovanjem simptomatskih biljaka vinove loze sakupljenim u avgustu i septembru kako bi se dostigao minimalni broj od šest CPs izolata po eksperimentalnom vinogradu. Uzorkovani su listovi i petiole čokota sa simptomima karakterističnim za prisustvo fitoplazmi. Za razliku od vinove loze, biljke domaćini *H. obsoletus*, prisutne na lokalitetima vinograda, nisu ispoljavale simptome infekcije fitoplazmama. Po lokalitetu je u istom periodu nasumično sakupljeno 12 asimptomatskih uzoraka biljaka potencijalnih dualnih domaćina koje su bile prisutne unutar ili na obodu vinograda. U slučaju *C. arvensis* i *U. dioica* uzorkovana je biomasa korena jer *H. obsoletus* može usvojiti fitoplazmu hraneći se na korenu inficirane biljke u stadijumu larve. Od prisutnih biljaka *V. agnus-castus* sakupljeni su i analizirani listovi jer ova žbunasta vrsta ima izuzetno razvijen korenov sistem koji prodire duboko u kamenitu podlogu čime podzemno uzorkovanje nije bilo moguće realizovati. Svaki uzorak je pojedinačno spakovan u sterilnu plastičnu zip-kesu i obeležen odgovarajućom šifrom. U prenosnom frižideru na temperaturi od oko 15°C su doneti u laboratoriju gde je po 1 gram biljnog tkiva svakog uzorka pripremljen u aluminijumskoj foliji i čuvan u zamrzivaču na -20°C do DNK ekstrakcije.

3.3.2 Ekstrakcija DNK

3.3.2.1 Ekstrakcija DNK iz *H. obsoletus*

Ukupne nukleinske kiseline svih *H. obsoletus* adulata sakupljenih u oglednim vinogradima ekstrahovana je iz pojedinačnih insekata prethodno opisanom SDS metodom izolacije DNK (poglavljje 3.1.2).

Alternativna metoda ekstrakcije, primenjena samo prilikom analiza učestalosti CPs infekcije u *H. obsoletus* jedinkama ex *V. agnus-castus* korišćenim u eksperimentalnim inokulacijama vinove loze (poglavljje 3.3.3) bila je izolacija DNK iz većeg broja primeraka, odnosno pulova od po tri adulta. Ukupne nukleinske kiseline izolovane su primenom CTAB (cetiltrimetilamonijum-bromid) protokola ekstrakcije (Gatineau *et al.* 2001). Insekti su homogenizovani u tubicama zapremine 2 ml koristeći tečni azot za naglo zamrzavanje i plastične mikro tučkove (engl. *micropestle*, Eppendorf) za fino usitnjavanje. U tubice je dodato po 0.4 ml 2%-tnog CTAB pufera (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0,2% β-merkaptotanol) nakon čega su inkubirane u vodenom kupatilu 30 minuta na 65°C. U narednom koraku je u tubice dodata jednaka zapremina hloroforma (0.4 ml). Postupci koji su usledili posle 10 minuta centrifugiranja na 11000 obrt/min na 4°C su isti kao i u slučaju SDS ekstrakcije iz pojedinačnih primeraka. Izolovana DNK je finalno rastvorena u 80 µl TE pufera i takođe čuvana u zamrzivaču na -20°C do daljih analiza.

3.3.2.2 Ekstrakcija DNK iz biljaka

Nukleinski sadržaj iz biljaka vinove loze i potencijalnih dualnih domaćina izolovan je primenom CTAB protokola izolacije koji je prilagođen biljnom materijalu, opisan od strane Angelini i saradnika (2001).

Uzorci biljnog tkiva mase 1 g (koren ili lisni nervi i peteljke), svakog uzorka zasebno, usitnjeni su u avanu sa tučkom uz zamrzavanje tečnim azotom i homogenizovani u 7ml 3% CTAB pufera (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol). Jedan mililitar smeše izdvojen je u novu plastičnu tubicu zapremine 2 ml (Sarstedt) i inkubiran u vodenom kupatilu 20 minuta na 65°C. U narednom koraku je dodata jednaka zapremina hloroforma (1 ml) i nakon centrifugiranja 10 minuta na 11000 obrt/min na ambijentalnoj

temperaturi DNK je izdvojena u supernatantu. Ova suspenzija je prebačena u tubicu zapremine 1.5 ml uz dodavanje jednake zapremine ledeno-hladnog izopropanola (750 µl). Narednim centrifugiranjem od 15 minuta na 11000 obrt/min DNK je istaložena na dnu rastvora, zatim isprana 96% etanolom, osušena pod digestorom i rastvorena u 100 µl TE pufera. Ekstrahovana DNK je čuvana u zamrzivaču na -20°C.

3.3.3 Molekularna detekcija i karakterizacija 'Ca. P. solani'

Za sve uzorke insekata čija je DNK ekstrahovana iz pojedinačnih jedinki, detekcija i karakterizacija 'Ca. P. solani' je urađena na prethodno opisan način (poglavlje 3.2). U slučaju uzoraka sačinjenih od DNK ekstrahovane iz pulova tri jedinke, izvršena je samo ciljana identifikacija CPs prisustva (poglavlje 3.2.1) bez dalje karakterizacije usled mogućnosti prisustva višestrukih genotipova fitoplazme.

Inicijalna detekcija 'Ca. P. solani' na osnovu amplifikacije STOL11 genskog regiona je ponovljena kod uzoraka biljaka koji su se pokazali neinficiranim u inicijalnom DNK razređenju od 1:10. Detekcija bez razređenja i u razređenju od 1:100 je urađena kako bi se proverila inhibicija i eliminisala mogućnost lažno negativnih rezultata.

3.3.4 Vektorska uloga *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus* u epidemiologiji 'Ca. P. solani' u mediteranskim vinogradima

Eksperimenti prenošenja 'Ca. P. solani' na vinovu lozu od strane prirodno zaraženih *H. obsoletus* jedinki ex *V. agnus-castus* postavljeni su nakon provere CPs inficiranosti populacija vektora i biljke domaćina. U skladu sa tim odabrane su: populacija vektora iz Godinja gde *V. agnus-castus* raste uz sam vinograd i populacija iz Bara (N42 07.0310, E19 04.5810) gde je ova asocijacija detektovana na prirodnom ruderalnom staništu bez vinograda u blizini (Slika 7). Ogledne biljke vinove loze su odgajene iz semena sorte *Plovdina*. Nakon isključivanja na vlažnom filter-papiru u petri šolji, pojedinačni klijanci su zasađeni u sterilnu zemlju (Klasmann TS 1, Klasmann Dielmann) u saksije dimenzija: 10 cm prečnika i 15 cm

visine u kojima su nastavili razvoj. Biljke su održavane u klima-komori na temperaturi od $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pod svetlosnim režimom od 16 sati svetla i 8 sati mraka tokom 2 meseca. Do trenutka izlaganja insektima, sve mladice vinove loze su dostigle habitus od 4-6 listova i stabljike visine dvadesetak centimetara. Biljke su neposredno pred postavljanje eksperimenata presađene u plastične cilindre koji su se sastojali od saksije i plastičnog poklopca visine 35 cm sa ventilacionim otvorom na vrhu za provetravanje i bočnim otvorom za manipulaciju insektima.

Testovi inokulacije su sukcesivno postavljeni u julu tokom više sezona i broj replikacija je zavisio od trenutne brojnosti odabranih populacija vektora. Po 30 insekata je sakupljeno prethodno opisanom metodologijom košenja entomološkom mrežom i pažljivo prebačeno usnim aspiratorom u zglobne flakone iz kojih su dalje direktno pušteni na eksperimentalne vinove loze pripremljene na prethodno opisan način. Postavljeni cilindri su transportovani do laboratorije u prenosnom frižideru na temperaturi od 15°C i tokom narednih 48 sati su držani u klima komori na temperaturi $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (16/8 časova dan/noć period). Preživljavanje insekata i ishrana na biljkama je praćena na svakih 8h. Posle 48h, sve jedinice izložene eksperimentalnim biljkama su sakupljene usnim aspiratorom i prebačene u 96% etanol nakon čega su čuvane na -4°C u frižideru. Pored oglednih biljaka iz testova, pod istim uslovima je gajeno i 6 kontrolnih biljaka vinove loze.

Tokom naredna tri meseca (do kraja novembra) biljke su održavane u klima komori prema ustaljenom režimu i praćene radi detektovanja simptoma CPs infekcije nakon čega su uzorkovane. Iz uzoraka 1 g lisne mase svake od replikacija (eksperimentalnih biljaka), kao i kontrolnih biljaka, ekstrahovana je genomska DNK (poglavlje 3.3.2.2) nakon čega su uzorci analizirani i okarakterisani prema prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 3.3.3).

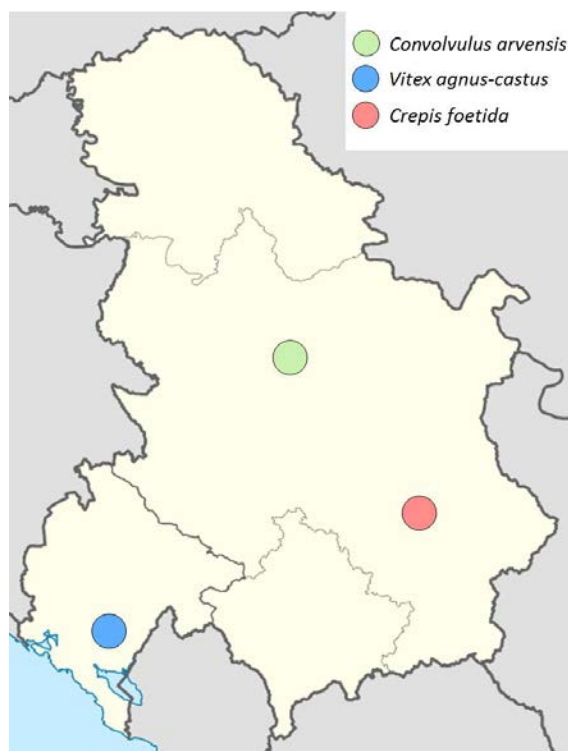
3.4 Eksperimenti prenošenja 'Ca. P. solani' prirodno inficiranim populacijama *H. obsoletus*

Eskeprimentalne transmisije 'Ca. P. solani' od strane tri *H. obsoletus* asocijacije sa teritorije jugoistočne Evrope uključene u *tuf*-b epidemiologiju: *ex C. arvensis*, *ex V. agnus-castus* i *ex C. foetida*, imale su primarno za cilj proveru i

testiranje njihovog vektorskog potencijala. Kroz *ex situ* ogleda inficiranja sopstevne i preostale dve biljke domaćina, eksperimentalne biljke perivinke (*Catharantus roseus*) i ugrožene kulture vinove loze, rasvetljava se epidemiologija putem praćenja kretanja, ukrštanja i preklapanja CPs genotipova koje populacije ovog vektora raznose pod uticajem preferentnost prema bljkama.

3.4.1 Sakupljanje materijala *H. obsoletus*

Svi eksperimenti inokulacije biljaka su postavljeni nakon provere prirodne inficiranosti odabranih oglednih populacija vektora. Testovi inficiranja biljaka su sprovedeni tokom pet uzastopnih godina (2012-2016) u julu. Početkom meseca je postavljena većina ogleda vezana za *H. obsoletus ex C. arvensis*, polovinom jula su na teritoriji Crne Gore sakupljanje jedinice *ex V. agnus-castus*, dok je u drugoj polovini uzorkovana populacija vektora *ex C. foetida*. Kako bi se održala stabilnost ogleda bilo je neophodno odabrati populacije koje su dovoljno brojne kako bi se postavio jednak broj replikacija svih biljaka. U slučaju oglednih *H. obsoletus* populacija *ex C.*



Slika 8. Mapa lokaliteta tri *H. obsoletus* asocijacije čije su populacije korišćene u eksperimentima unakrsnog prenošenja '*Ca. P. solani*'. Krugovi tri boje koji pokazuju lokalitete uzorkovanja oglednih populacija vektora odgovaraju specifičnoj biljci domaćinu kao u legendi.

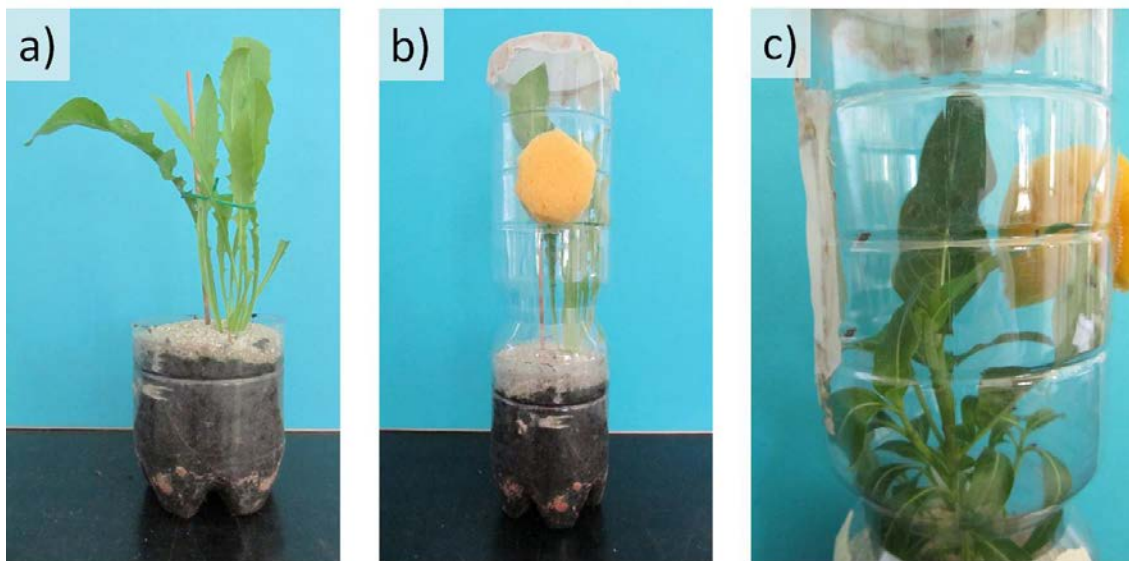
arvensis i *ex V. agnus-castus* korišćene su jedinice sakupljene na svojim biljkama domaćinima unutar i u blizini vinograda (Slika 8). Populacija vektora vezana za *C. arvensis* je uzorkovana u Topoli unutar vinograda (Tabela 2), dok je populacija asociirana sa *V. agnus-castus* na lokalitetu Beri sakupljena na biljkama u neposrednoj blizini zasada. Eksperimentalnu populaciju vektora *ex C. foetida* činile

su jedinke ove asocijacije sakupljene u Jasenoviku (okolina Niša) i nekoliko bliskih lokaliteta međusobno udaljenih desetak kilometara (Slika 8). U sklopu sakupljanja ogleadne populacije *H. obsoletus* asociirane sa *C. foetida* urađeno je i uzorkovanje korena ove biljke radi provere njene prirodne inficiranosti sa 'Ca. P. solani' i uloge kao izvora inokuluma. Uzorkovano je po 12 asimptomatskih biljaka na tri bliska lokaliteta u okolini Jasenovika na kojima su prethodno detektovane CPs inficirane *H. obsoletus* populacije.

3.4.2 Eksperimentalne procedure ukrštenog prenošenja 'Ca. P. solani' između različitih prirodnih asocijacija vektora

Za svaku od oglednih *H. obsoletus* populacija asociiranih sa određenom biljkom domaćinom: *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida*, primarno je testirana sposobnost inokulacije sopstvenog domaćina na kojem vektor kompletira razviće i koji mu u prirodi predstavlja izvor i rezervoar 'Ca. P. solani' infekcije. Postavljanje unakrsnih testova inokulacije druge dve biljke „neodgovarajućih“ domaćina imalo je za cilj testiranje mogućnosti inficiranja drugih biljaka domaćina *H. obsoletus* članova *tuf*-b ciklusa i posledičnog ukrštanja epidemioloških puteva prenošenja.

Iako je vektorski značaj populacija *H. obsoletus ex C. arvensis* u epidemiologiji *Bois noir* bolesti vinove loze prethodno eksperimentalno dokazan (Maixner 1994), ponovljena su prenošenja na lozu radi boljeg razumevanja epidemioloških puteva kojima se CPs izolati kreću do momenta inokulacije i sagledavanja njihovog diverziteta i potencijalne genotipske specifičnosti vezane za biljku izvor inokuluma. Vektorska uloga *H. obsoletus ex V. agnus-castus* u epidemiologiji *Bois noir* je eksperimentalno testirana u okviru *in situ* studije o 'Ca. P. solani' epidemiologiji u mediteranskim vinogradima (poglavlje 3.3.4). Prirodno inficirana populacija *H. obsoletus ex C. foetida* je takođe izložena ishrani na oglednim vinovim lozama kako bi se proverio vektorski potencijal u iniciranju i širenju *Bois noir* u jugoistočnoj Evropi. Svaka od populacija je takođe postavljena i na perivinke (*Catharanthus roseus*) kao biljke prijemčive fitoplazmama kako bi se sagledao puni diverzitet CPs izolata koje nose prirodno inficirane populacije vektora svake od tri testirane asocijacije.



Slika 9. Dinamika postavljanja testova prenošenja '*Ca. P. solani*' na eksperimentalnu biljku od strane prirodno inficirane *H. obsoletus* populacije; a) *C. foetida* u saksiji cilindra; b) kompletno pripremljena eksperimentalna biljka *C. foetida* poklopljena cilindrom sa ventilacionom gazom i otvorom za ubacivanje insekata (zatvorenim sunderom); c) eksperimentalna vinka na koju su postavljeni *H. obsoletus* adulti.

Broj replikacija je bio stabilan na nivou jedne testirane biljne vrste i zavisio je od brojnosti populacija vektora. Seme biljaka domaćina je sakupljeno u prirodi, perivinke su uzgojene iz semena biljaka koje se gaje u klima-komorama Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Zemunu, dok je seme vinove loze sorte *Plovdina* sakupljeno iz vinograda. Svake sezone su praćene i po tri kontrolne biljke od svake vrste koje nisu izlagane insektima i gajene su pod istim uslovima radi provere konzistentnosti metodologije i dobijenih rezultata.

Primenjena je prethodno opisana metodologija gajenja biljaka i pripremanja za eksperimente (poglavlje 3.3.4) uz manje specifičnosti (Slika 9). Biljke su gajene u proseku dva meseca tokom kojih su dostigle sledeću veličinu: stabljike *C. arvensis* od 30 cm dužine, 6-8 listova u rozeti *C. foetida*, 20 cm visine i 8-10 listova *V. agnus-castus*, 10 listova perivinke i 4-6 listova vinove loze. Postupak koji je usledio do trenutka zatvaranja eksperimenata se nije razlikovao, kao ni kasnije tretiranje i gajenje biljaka. Uzorkovanje biljaka u novembru je podrazumevalo formiranje uzoraka od korena oglednih biljaka *C. arvensis* i *C. foetida*, dok je u slučaju *V. agnus-castus*, perivinki i vinovih loza uzorkovan lisni materijal.

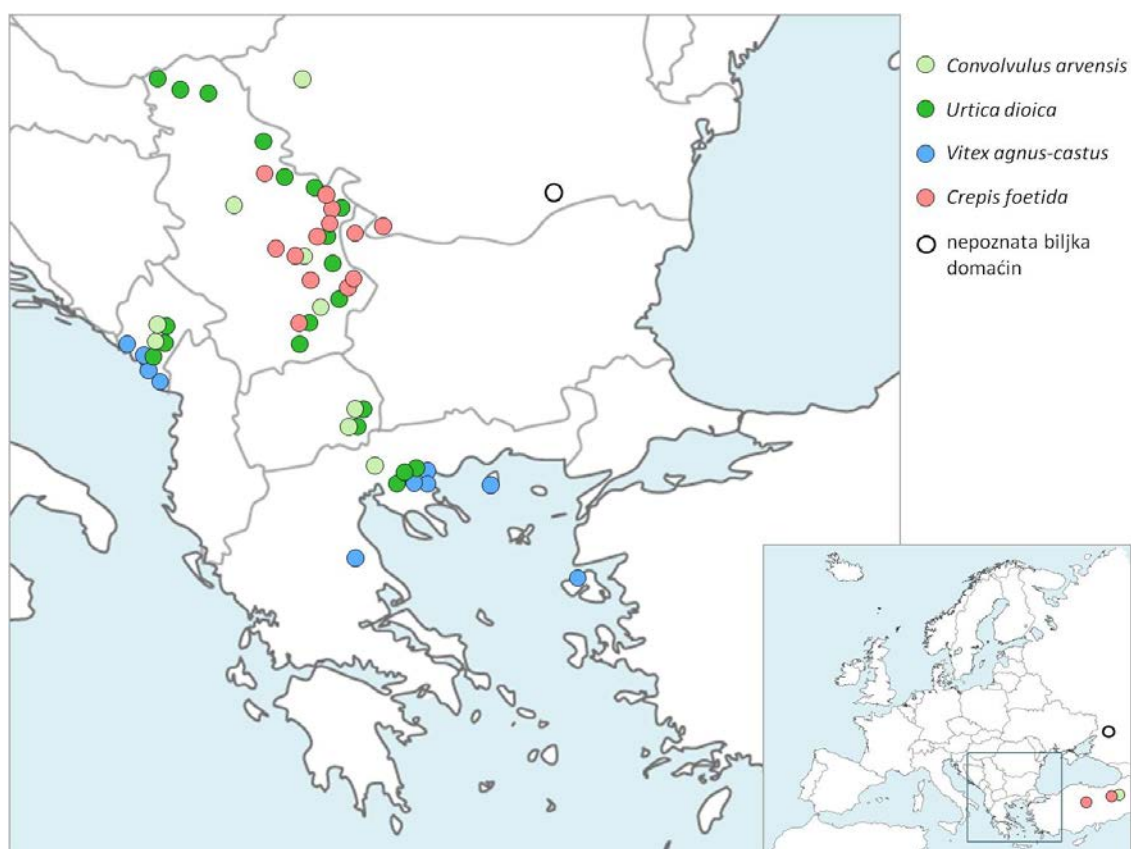
4. Rezultati

4.1 Lokaliteti uzorkovanja *H. obsoletus* populacija u asocijacijama sa različitim biljkama domaćinima

Sakupljanja *H. obsoletus* populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima na teritoriji jugoistočne Evrope pružila su informacije o arealu svake od asocijacija, preklapanju njihove distribucije, populacionoj strukturi i sintopskoj diferencijaciji. Terenska istraživanja su pokazala da su populacije *H. obsoletus* u ovom delu areala: 1) brojne i česte u asocijaciji sa *U. dioica*, 2) retkog pojavljivanja i umerene brojnosti u asocijaciji sa *C. arvensis*, 3) relativno česte i brojne u asocijaciji sa *V. agnus-castus* i 4) izuzetno brojne i česte u asocijaciji sa *C. foetida*, ali prisutne samo u istočnim delovima istražene teritorije (Slika 10). Na teritoriji Srbije, kao najpodrobnije istraženog područja, *C. arvensis* je kao korov prisutan u većini zasada (vinova loza, krompir, paprika i kukuruz). Asocijacija vektora sa poponcem je detektovana na brojnim staništima van obradivih površina: na vlažnom ili suvom zemljištu nenarušenih biljnih zajednica, degradiranim površinama ili pored puteva. Usled slabo razvijene mreže akvadukta za navodnjavanje, pojavljivanje *U. dioica* kao korova unutar zasada je retko i kao korov se može naći samo sporadično na obodima i međama. Osim retkih lokaliteta vezanih za useve, uzorkovanje *H. obsoletus* populacija ex *U. dioica* domaćinom uglavom je sprovedeno na prirodnim mezofilnim staništima koprive blizu potoka i kanala ili na degradiranom zemljištu. Istraživanja mediteranske asocijacije *H. obsoletus* sa *V. agnus-castus* su intenzivno sprovedena na teritoriji Crne Gore (poglavlje 3.3) i pokrajine Egejske Makedonije u severoistočnoj Grčkoj. Preferentna staništa konopljike gde su sakupljani insekti bila su suva i polusuva korita potoka i reka, kao i litoralna i kamenita područja u obalskoj zoni Jadranskog i Egejskog mora.

Posebna pažnja je uložena u pronalaženje *H. obsoletus* populacija vezanih za *C. foetida* i utvrđivanje rasprostranjenja ove asocijacije na Balkanskom poluostrvu. Lokaliteti uzorkovanja populacija su bila topla i suva staništa kao što su šindra, suve livade i ruderalne površine pored puteva i useva. *Crepis foetida* je pionirska vrsta kserotermnih staništa ili prisutna u livadskim zajednicama i lako prepoznatljiva po pokrivenosti stabljike dlačicama, oborenim pupoljcima i

karakterističnim mirisom badema. Nakon prvog nalaza u istočnoj Srbiji, usledila su uzorkovanja dodatnih lokaliteta u istočnoj i jugoistočnoj Srbiji, a zatim 2011. godine i dva nalaza ove asocijacije u Turskoj. Prisustvo *H. obsoletus* populacija *C. foetida* asocijacije je ciljano traženo na obalama obe strane Dunava, što je rezultiralo potvrdom prisustva asocijacije na tromeđi sa Rumunijom i Bugarskom. Nasuprot tome, utvrđeno je da ova asocijacija nije prisutna na području južnog Balkana, odnosno teritoriji Grčke, Crne Gore i Makedonije. Kako bi se proverio status domaćina *C. foetida*, sakupljeno je po 12 larvi familije Cixiidae L4-L5 stadijuma sa korena *C. foetida* na tri lokaliteta: Jasenovik, Negotin i Temska koje su kasnije molekularno determinisane.



Slika 10. Mapa lokaliteta uzorkovanja *H. obsoletus* populacija na teritoriji jugoistočne Evrope i Turske. Krugovi četiri boje koji pokazuju lokalitete odgovaraju specifičnoj biljci domaćinu kao u legendi. Nebojjeni krugovi označavaju prethodno publikovane populacije sakupljene na lokalitetima Radovanu (Rumunija) i Majak (Rusija) na krompiru (Imo *et al.* 2013).

Ukoliko se uzme u obzir da je svaka od asocijacija uzorkovana u vreme maksimuma brojnosti populacije, broj sakupljenih jedinki je zavisio od prirodne gustine populacije i agregacije insekata uslovljene sredinskim faktorima kao što su klima, specifičnosti podloge i opšta podobnost staništa.

Sakupljanje *H. obsoletus* populacija realizovano na teritoriji 7 država rezultovalo je uzorkovanjem najmanje jedne od četiri ciljane asocijacije: Srbija (*C. arvensis*, *U. dioica* i *C. foetida*), Rumunija (*C. arvensis* i *C. foetida*), Crna Gora (*C. arvensis*, *U. dioica* i *V. agnus-castus*), Makedonija (*C. arvensis* i *U. dioica*), Grčka (*C. arvensis*, *U. dioica* i *V. agnus-castus*), Turska (*C. arvensis* i *C. foetida*) i Bugarska (*C. foetida*). Na području Bugarske i Rumunije je uzorkovan po jedan lokalitet sa *C. foetida* asocijacijom i to uz obalu Dunava kako bi se proverila ruta kolonizacije i da li su *H. obsoletus* populacije vezane za ovu biljku prevazišle Dunav kao barijeru prema centralnoj Evropi. Sakupljanja sprovedena u Turskoj su urađena samo na dva navedena lokaliteta bez istraživanja njihovog okruženja i drugih potencijalnih biljaka domaćina (Slika 10; Tabela 4).

Tabela 4. Podaci o lokalitetima i genetičkom diverzitetu *H. obsoletus* populacija organizovanim prema biljci domaćinu i geografiji.

<i>Convolvulus arvensis</i>							
lokalitet	GPS	N	mtDNK		nDNK-mikrosateliti		
			haplotip	frekvencija	A _R	H _E	F _{is}
Topola (SRB)	N44 13.532 E20 40.224	20	EC*	6	4.774	0.791	0.054
Aleksinac (SRB)	N43 36.010 E21 40.592	6	EC*	6	4.626	0.771	-0.015
Predejane (SRB)	N42 49.992 E22 07.912	9	EC*	6	4.956	0.837	0.164
Petrevo selo (RO)	N45 49.528 E21 31.548	9	EC*	6	4.763	0.816	0.151
Martinići (CG)	N42 32.245 E19 10.763	17	AB*	6	4.412	0.777	0.264
Podgorica (CG)	N42 26.919 E19 12.509	20	AB*	6	4.192	0.748	0.143
Hamzali (MK)	N41 29.860 E22 44.996	12	EC*	6	4.549	0.787	0.169

Strumica (MK)	N41 26.505	11	EC*	4	4.282	0.744	0.146
	E22 39.922		π C	1			
Kilkis (GR)	N40 54.984 E22 49.101	6	AB*	1	4.550	0.721	0.216
			XB	1			
			WL	2			
			WB	2			
Erzindžan (TR)	N39 57.253 E38 38.063	3	SK	3	-	-	-

Urtica dioica

lokalitet	GPS	N	mtDNK		nDNK-mikrosateliti		
			haplotip	frekvencija	A _R	H _E	F _{is}
Gakovo (SRB)	N45 57.88 E19 3.28	22	EC*	4	4.937	0.820	0.141
			FC*	1			
			RC	1			
Bačka Topola (SRB)	N45 47.518 E19 35.604	20	EC*	4	4.934	0.826	0.157
			ω C	2			
Bačko Petrovo selo (SRB)	N45 43.693 E20 06.114	20	EC*	6	5.100	0.844	0.155
Vršac (SRB)	N45 03.874 E21 11.208	12	EC*	6	4.590	0.804	0.148
Srednjevo (SRB)	N44 39.685 E21 30.362	15	EC*	6	4.705	0.787	0.087
Boljetin (SRB)	N44 31.740 E22 02.090	12	EC*	6	4.714	0.815	0.212
Negotin (SRB)	N44 16.604 E22 30.484	6	EC*	6	4.644	0.803	-0.003
Zaječar (SRB)	N43 54.492 E22 17.728	20	EC*	4	4.807	0.816	0.072
			ξ Q	2			
Knjaževac (SRB)	N43 30.610 E22 18.833	15	EC*	6	4.923	0.836	0.226
Grnčar (SRB)	N43 01.270 E22 21.825	17	EC*	6	4.492	0.777	0.130
Vranje (SRB)	N42 31.725 E21 54.319	12	EC*	6	4.380	0.760	0.120
Vranjska banja (SRB)	N42 35.417 E21 59.839	11	EC*	6	4.425	0.753	0.060
Godinje (CG)	N42 13.421 E19 06.800	6	EC*	6	4.395	0.758	0.166

Martinići (CG)	N42 32.245 E19 10.763	20	EC*	6	4.306	0.746	0.122
Podgorica (CG)	N42 26.919 E19 12.509	20	EC*	2	4.362	0.760	0.113
			αC	2			
			βC	2			
Hamzali (MK)	N41 29.860 E22 44.996	17	EC*	6	4.091	0.714	0.024
Strumica (MK)	N41 26.505 E22 39.922	19	EC*	6	4.194	0.735	0.104
Aretusa (GR)	N40 45.767 E23 33.096	12	EC*	6	4.007	0.685	-0.060
Filadelfion (GR)	N40 45.246 E23 27.846	20	EC*	6	3.500	0.622	-0.009
Profitis (GR)	N40 39.930 E23 17.331	6	EC*	3	3.602	0.643	0.193
			WB	2			
			ρC	1			

Vitex agnus-castus

lokalitet	GPS	N	mtDNK		nDNK-mikrosateliti		
			haplotip	frekvencija	A _R	H _E	F _{is}
Bar (CG)	N42 07.031 E19 04.581	18	ZN	5	4.198	0.747	0.038
			γN	1			
Godinje (CG)	N42 13.421 E19 06.800	19	ηN	6	4.590	0.803	0.101
Kamenari (CG)	N42 28.591 E18 41.028	20	ZN	5	3.667	0.670	0.059
			ZO	1			
Ulcinj (CG)	N41 56.515 E19 16.052	19	ZN	2	4.753	0.817	0.163
			ηN	2			
			θN	2			
Apolonija (GR)	N40 38.380 E23 29.960	10	YM	6	4.732	0.819	0.168
Asprovalta (GR)	N40 45.124 E23 44.024	19	YM	6	4.771	0.795	0.176
Aretusa (GR)	N40 41.616 E23 40.397	20	YM	4	5.154	0.855	0.204
			ηM	2			
Larisa (GR)	N39 38.544 E22 16.981	7	YM	6	4.320	0.775	0.065
Lezbos (GR)	N39 18.565 E26 8.379	5	YM	3	-	-	-
			σM	2			

Tasos (GR)	N 40 35.177 E 24 37.525	3	YM	3	-	-	-
<i>Crepis foetida</i>							
lokalitet	GPS	N	mtDNK		nDNK-mikrosateliti		
			haplotip	frekvencija	A _R	H _E	F _{is}
Aleksinac (SRB)	N43 36.010	10	JH	4	3.430	0.689	0.388
	E21 40.592		MH	2			
Deligrad (SRB)	N43 38.546	20	JH	2	3.552	0.688	0.193
	E21 33.444		MH	2			
			μH	2			
Požarevac (SRB)	N44 39.310	12	JH	4	3.334	0.638	0.181
	E21 11.983		MH	2			
Porečka reka (SRB)	N 44 24.267	4	JH	1	-	-	-
	E22 10.350		MH	1			
			UH	1			
			VH	1			
Negotin (SRB)	N44 16.604	21	JH	3	3.323	0.619	0.282
	E22 30.484		MH	3			
Tamnič (SRB)	N44 04.973	7	JH	4	3.365	0.613	0.165
	E22 32.048		MH	2			
Zaječar (SRB)	N43 50.016	6	JH	4	3.329	0.602	0.363
	E22 17.334		MH	2			
Temska (SRB)	N43 16.537 E22 31.840	12	JH	6	3.370	0.656	0.200
Pirot (SRB)	N43 12.880 E22 31.585	19	JH	6	3.689	0.687	0.257
Jasenovik (SRB)	N43 22.365 E22 02.441	20	JH	6	3.743	0.715	0.147
Vranjska banja (SRB)	N42 34.139	7	JH	2	3.067	0.598	0.370
	E21 58.367		MH	2			
			λH	2			
Vidin (BG)	N43 57.711	6	JH	4	2.800	0.563	0.198
	E22 51.258		MH	2			
Kalafat (RO)	N43 59.926	10	JH	4	3.452	0.631	0.305
	E22 58.119		MH	2			

Erzindžan (TR)	N39 57.253 E38 38.063	8	JH	6	4.379	0.768	0.175
Kırşehir (TR)	N39 26.021 E34 07.795	1	JH	1	-	-	-

Za svaku populaciju su predstavljene sledeći podaci: lokalitet uzorkovanja uz skraćenice SRB (Srbija), RO (Rumunija), CG (Crna Gora), MK (Makedonija), GR (Grčka), TR (Turska) i BG (Bugarska); geografska koordinata (GPS); broj jedinki po populaciji (N). Za populacije koje broje 6 ili više jedinki, pored prikazanog mitohondrijskog haplotipskog diverziteta (mtDNK), predstavljene su i parametri nuklearnog genetičkog diverziteta (nDNK-mikrosateliti): bogatstvo alela (A_R); očekivana heterozigotnost (H_E) i koeficijent inbridinga (F_{is}). Simbol „-“ odnosi se na genetičke parametre koji nisu izračunati usled niske brojnosti populacije. Prvo slovo u oznaci mtDNK haplotipa se odnosi na *COI-tRNK(Leu)-COII* genski region, a drugo na *16S-tRNA(Leu)-ND1* genski region. Haplotipovi obeleženi simbolom „*“ su prethodno publikovani (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Johannesen & Riedle-Bauer 2014; Chuche *et al.* 2018).

Ukupno 718 *H. obsoletus* adulata poreklom iz 55 populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima je uzorkovano na 44 lokaliteta (Slika 10; Tabela 4). Iako je uložena trud da broj sakupljenih jedinki po populaciji bude od minimalnih šest do poželjnih 20 adulata, na određenim lokalitetima to nije bilo moguće postići usled niske brojnosti populacije ili kraja perioda leta ciljane asocijacije. Na 11/44 lokaliteta je detektovano sintopsko prisustvo populacija dve asocijacije i to: po dva *C. arvensis/U. dioica* sintopska lokaliteta u Makedoniji i Crnoj Gori, po jedan *U. dioica/V. agnus-castus* u Grčkoj i Crnoj Gori, po jedan *C. arvensis/C. foetida* u Srbiji i Turskoj i čak tri *U. dioica/C. foetida* u Srbiji (Slika 10; Tabela 4).

Devet populacija *H. obsoletus ex C. arvensis* je uzorkovano na teritoriji jugoistočne Evrope i jedna na istoku Turske. Populacije *ex U. dioica* su sakupljene na ukupno 20 lokaliteta. Mediteranska asocijacija *H. obsoletus sa V. agnus-castus* je u Grčkoj uzorkovana na šest lokaliteta, od kojih su dva na egejskim ostrvima (Tasos i Lezbos) udaljenim 10 km od najbližeg kopna, dok su u primorju Crne Gore sakupljeni uzorci četiri populacije. Populacije *H. obsoletus ex C. foetida* su detektovane uglavnom na teritoriji istočne i jugoistočne Srbije do Morave kao zapadne granice rasprostranjenja, uz po jedan lokalitet u Bugarskoj i Rumuniji. Iako je sama biljka prisutna na preostaloj istraživanoj teritoriji, asocijacija vektora nije zabeležena. Dodatnih devet *H. obsoletus* adulata je sakupljeno na ovoj biljci na

dva lokaliteta u Turskoj, od koji je Erzindžan sintopski lokalitet sa *C. arvensis* asociranom populacijom (Slika 10; Tabela 4).

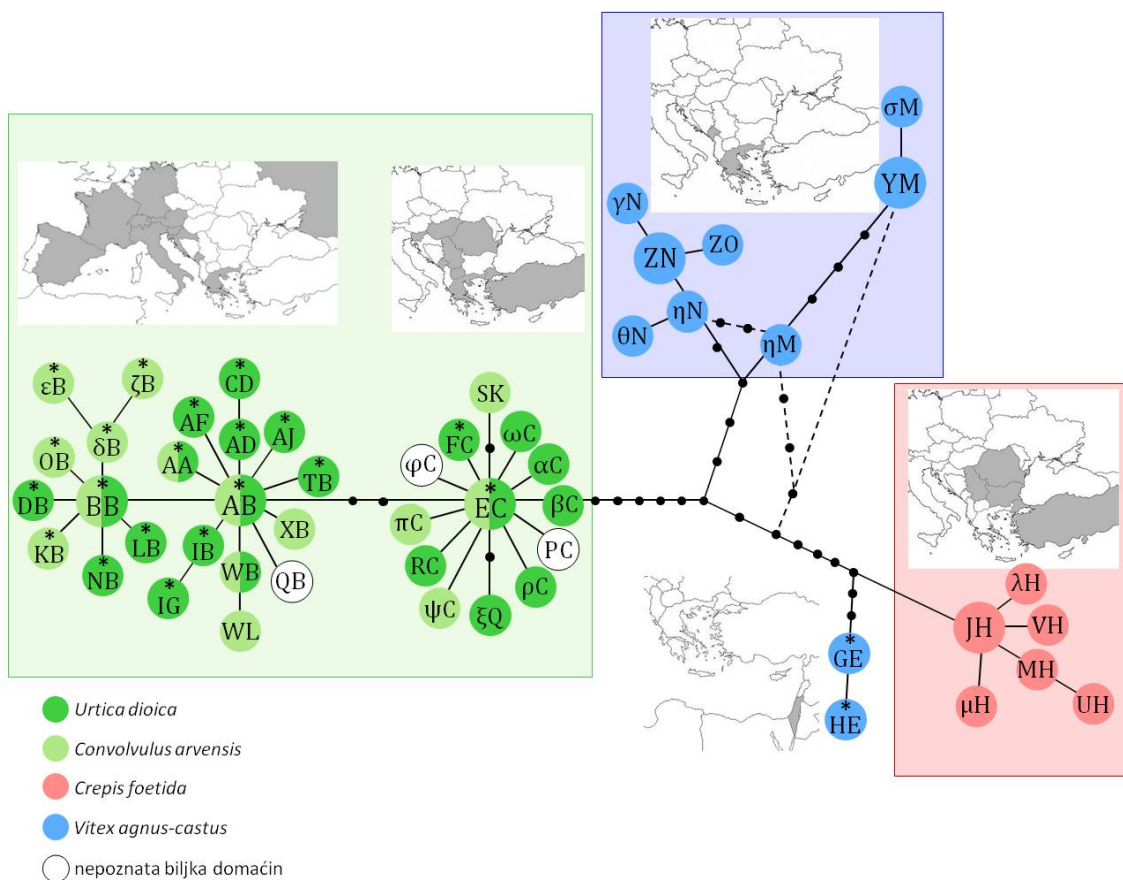
4.2 Populaciono-genetički diverzitet i varijabilnost *H. obsoletus*

4.2.1 Diverzitet i varijabilnost mitohondrijskih markera

Poređenjem mtDNK regiona 316 analiziranih *H. obsoletus* jedinki poreklom iz 55 populacija asociranih sa jednom od četiri biljke domaćina (*C. arvensis* - 57 jedinki, *U. dioica* - 120, *V. agnus-castus* - 56 i *C. foetida* - 83), utvrđeno je prisustvo ukupno 29 haplotipova (Tabela 4). Tri haplotipa (AB, EC i FC) prethodno su poznata iz centralne Evrope kao *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* (Johannesen *et al.* 2008), dok je 26 haplotipova novoopisano (Prilog 3). Prethodno poznati haplotipovi *ex V. agnus-castus* iz Izraela, GE i HE (Johannesen *et al.* 2008), nisu utvrđeni u populacijama ove asocijacije u Crnoj Gori i Grčkoj. Nasuprot tome, nijedan od haplotipova *ex C. foetida* nije bio ranije poznat. Populacije asocirane sa *C. arvensis* i *U. dioica* dele pet haplotipova, za razliku od genetički zatvorenih asocijacija *ex V. agnus-castus* i *ex C. foetida* u kojima je opisano 8, odnosno šest specifičnih haplotipova (Slika 11; Prilog 3). Tri nova haplotipa su detektovana u *H. obsoletus* populacijama Radovanu u Rumuniji (PC i φC) i Majak u Rusiji (QB) čija biljka domaćin nije poznata.

U geneaološkim analizama rekonstrukcije mtDNK haplotipske mreže, pored 29 *H. obsoletus* haplotipova iz jugoistočne Evrope, Turske i jugozapadne Rusije (Tabela 4; Prilog 3), priključena su i 22 ranije opisana haplotipa asocirana sa *C. arvensis*, *U. dioica* i *V. agnus-castus* (Prilog 2). U haplotipskoj mreži sačinjenoj od ukupno 51 haplotipa, pokazalo se istovremeno postojanje jasnih i dvosmislenih asocijacija sa biljkama domaćinima (Slika 11). Geneaološka analiza filogenetskih među-asocijacijskih odnosa unutar vrste *H. obsoletus* otkrila je postojanje tri haplogrupe koje poseduju dodatnu unutrašnju divergenciju pod prikrivenim geografskim uticajem. Klastriranje haplotipova ne prati u potpunosti *a priori* obrazac biljke domaćina, već ukazuje na genetičku homogenost populacija *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, i nezavisno odvajanje genetičkih grupa vezanih za druga dva domaćina, *V. agnus-castus* i *C. foetida*. Dve alternativne haplotipske mreže koje su

dala oba korišćena programa razlikuju se samo u mestu račvanja tri osnovne genetičke grane (isprekidane linije na Slici 14).



Slika 11. Haplotipska mreža *COI-tRNA(Leu)-COII* i *16S-tRNA(Leu)-ND1* genskih regiona 51 *H. obsoletus* haplotipa rekonstruisana statističkom parsimonijom i *median-joining* metodom. Boja krugova odgovara biljci domaćinu ili nepoznatom domaćinu kao u legendi. Haplotipovi opisani u prethodnim studijama (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Johannesen & Riedle-Bauer 2014; Chuche *et al.* 2018) su označeni zvezdicom „*“. Najčešći haplotipovi su prikazani većim krugovima. Isprekidana linija predstavlja alternativnu varijantu haplotipske mreže koja se može dobiti u oba korišćena programa. Uz svaku haplogrupu su date mape distribucije na nivou država čime je pokriven gotovo ceo areal vrste, od Izraela i istočne Turske do Španije.

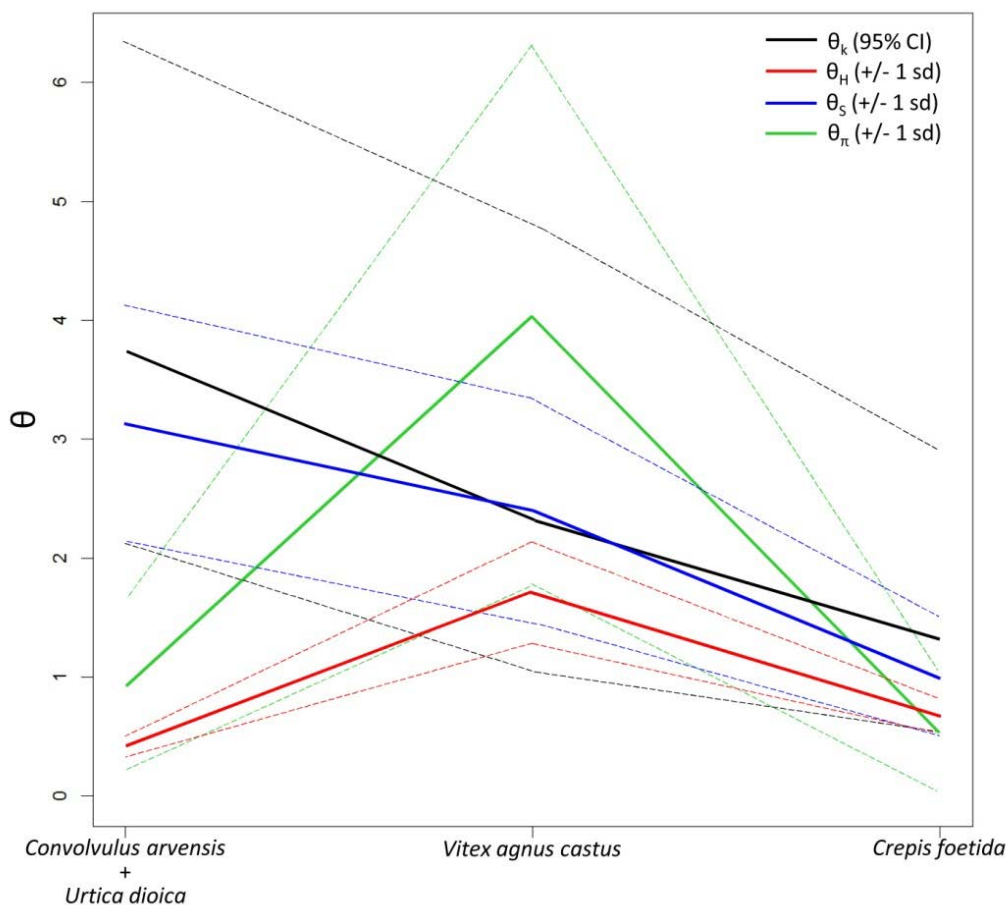
Asocijacije vektora sa *C. arvensis* i *U. dioica* dele pet haplotipova (BB, AB, AA, WB i EC), ali poseduju i privatne i to 10, odnosno 17 haplotipova. Jedinke iz Rumunije i jugozapadne Rusije (PC, φC i QB) klastrirale su se u ovu genetičku grupu sugerišući da je njihov domaćin upravo jedna od ove dve biljke. Ukupno 32 haplotipa ove stabilne dvo-asocijacijske haplotipske grupe razbijeno je u dve

filogeografske podgrupe prethodno sugerisane od strane Johannesen i saradnika (2008, 2012): „zapadnu“ koju čine haplotipovi koji divergiraju od BB i AB haplotipova i „istočnu“ koju čini klaster koji proističe iz centralnog EC haplotipa. Izuzetak ovog geografskog klastiranja je QB haplotip poreklom iz Rusije koji se pridružio „zapadnoj“ liniji i koji ukazuje da je specijalizacija *H. obsoletus* i asocijacija sa biljkom domaćinom starija od geografske segregacije populacija (Slika 11).

Haplotipovi *ex V. agnus-castus* su parafiletički podeljeni u tri geografske podgrupe koje čine monofiletičke crnogorska i grčka linija (pet, odnosno tri haplotipa) i parafiletička izraelska grupa (dva haplotipa). Haplotip η M predstavlja vezu između crnogorske i grčke podgrupe (linije), i iako je sakupljen u Grčkoj on se postavlja u mreži na dva načina: (1) kao jasni član pripadajuće grčke haplogrupe ili (2) kao haplotip koji vodi ka crnogorskom klasteru. Izraelski haplotipovi GE i HE su nasuprot tome, filogenetski blisko pozicionirani *C. foetida* genetičkoj grupi i udaljeni 10 (ili 12) mutacija od genetičkog klastera svog domaćina (Slika 11). Populacije *ex C. foetida* se u vidu 6 haplotipova monofiletički izdvajaju u stabilnu grupu koja divergira od centralnog i najčešćeg JH haplotipa detektovanog u svim analiziranim populacijama od istočne Turske do istočne Srbije (Tabela 4). Larve L4-L5 stupnja sakupljene na korenu *C. foetida* na tri lokaliteta u istočnoj Srbiji, su morfološkom analizom identifikovane kao pripadnici familije *Cixiidae* (Sforza *et al.* 1999), a zatim su i molekularnim analizama identifikovne kao *H. obsoletus* jedinke JH haplotipa, odnosno pripadnici *C. foetida* genetičke grupe. Ovim nalazom se *C. foetida* može smatrati legitimnom i potvrđenom biljkom domaćinom *H. obsoletus* kako će se nadalje i tretirati. Haplotipovi detektovani u okviru jednog od tri genetička klastera nisu prisutni u druge dve genetičke grupe, odnosno svi haplotipovi su specifični i uslovljeni biljkom domaćinom na svim lokalitetima. Važno je napomenuti da je u populaciji iz Rumunije pored haplotipova PC i φ C, detektovan i centralni haplotip „istočne“ linije grupe poponca i koprive, EC, kao i haplotipovi JH i MH čije je poreklo kroz genealošku mrežu vezano isključivo za *C. foetida* kao domaćina (Slika 11).

U dalje procene mtDNK diverziteta i varijabilnosti uključeni su samo haplotipovi (diverzitet i frekvencije) populacija sakupljenih u ovoj studiji. Analize

mtDNK diverziteta i varijabilnosti, koje su obuhvatile 316 jedinki iz 55 populacija (Tabela 4), pokazale su statistički značajnu divergenciju između tri genetičke grupe na koje je ukazala haplotipska mreža: (1) metapopulacija dva domaćina: *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, (2) metapopulacija *ex V. agnus-castus* i (3) metapopulacija *ex C. foetida*. Čak 88% genetičke varijabilnosti između ove tri grupe je uslovljeno biljkom domaćinom ($F_{ST} = 0.88$, $p < 0.001$), dok svega 12% genetičkih razlika potiče od unutargrupnih diferencijacija.



Slika 12. Grafički prikaz parametra theta (θ), izračunatog za 316 *H. obsoletus* jedinki grupisanih u tri metapopulacije sugerisane genealoškom mrežom. Metapopulaciju *ex C. arvensis* + *ex U. dioica* čini 177 jedinki, metapopulaciju *ex V. agnus-castus* čini 56 jedinki, metapopulaciju *ex C. foetida* čine 83 jedinke. Oznake θ parametra se odnose na sledeće genetičke osnove procene populaciono-genetičkog diverziteta: broj alela (θ_k), očekivana homozigotnost (θ_H), segregaciona mesta (θ_s), nukleotidne razlike (θ_π). Isprekidane linije na grafikonu označavaju standardnu devijaciju odgovarajućeg parametra.

Poređenjem θ vrednosti molekularnog diverziteta unutar svake od tri metapopulacije očekivano se pokazalo da je najveći genetički diverzitet, procenjen na osnovu broja alela i segregacionih mesta, prisutan unutar grupe *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* ($\theta_k = 3.73$ i $\theta_s = 3.13$; Slika 12) koja je sakupljena na najširem geografskom području i sačinjena od najvećeg broja populacija. Visoka vrednost θ_k koja ukazuje na bogatstvo genetičkih varijanti prisutnih unutar ove grupe, oponira se niskoj θ_π vrednosti koja ukazuje na genetičku bliskost detektovanih haplotipova vezanih za dva domaćina. U slučaju asocijacija sa *V. agnus-castus* i *C. foetida* vrednosti parametra θ_k , zasnovanom na broju alela, bile su 2.32, odnosno 1.31, a vrednosti parametra θ_s , procenjenom na osnovu segregacionih mesta, 2.39, odnosno 1.00 (Slika 12). Više vrednosti parametara genetičkog diverziteta metapopulacije *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* su u saglasnosti sa odstupanjem od populacionog ekvilibrijuma (neutralne evolucije) koje ukazuje na skorašnju ekspanziju populacija, o čemu svedoče statistički značajne negativne vrednosti Fuovog F_s i Tajimiminog D parametra testova neutralnosti ($F_s = -9.59$, $p < 0.001$; $D = -1.87$, $p < 0.01$; Prilog 4). Niži nivo očekivane homozigotnosti ($\theta_H = 0.42$) u poređenju sa preostale dve asocijacije ($\theta_H = 1.71$ za *ex V. agnus-castus* i $\theta_H = 0.67$ za *ex C. foetida*) moguća je posledica dominantnog napredovanja alela niske učestalosti tokom geografske ekspanzije ovih populacija (Excoffier & Ray 2008).

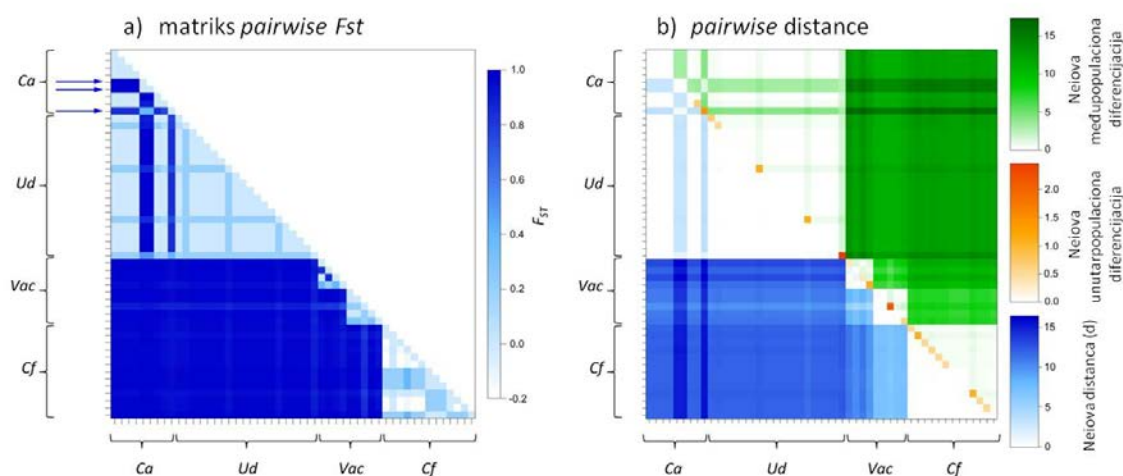
Međutim, na osnovu analize molekularne varijanse utvrđeno je da je stepen divergencije unutar združenih metapopulacija *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* veoma nizak ($F_{ST} = 0.25$, $p < 0.001$) i pokazuje da čak 75% prisutnih razlika potiče od unutargupne varijanse. Imajući to u vidu, razdvajanje ovog genetičkog klastera u dve asocijacije i ponavljanje kalkulacija testova neutralnosti pokazalo je da prethodno otkrivena naznaka ekspanzije zapravo potiče od *H. obsoletus* asocijacije sa *U. dioica* čiji je signal izraženiji u odnosu na prethodnu združenu procenu ($F_S = -8.59$, $p < 0.001$; $D = -2.18$, $p < 0.001$; Prilog 4). Testovi neutralnosti urađeni i za preostale dve asocijacije nisu pokazali statističku značajnost (Prilog 4). Asocijacija sa *V. agnus-castus* je pokazala najviši stepen unutrašnje divergencije (θ_π) što je u skladu sa analizama molekularne varijanse kojima je utvrđeno da 90.5% ($p < 0.001$) genetičke diferencijacije potiče od divergencije crnogorske i grčke haplogrupe (Slika 12). U slučaju metapopulacije *ex C. foetida*, kroz sva četiri θ parametra je

utvrđen nizak nivo diferencijacije u vidu genetičke stabilnosti utemeljene na JH haplotipu koji nosi 90% analiziranih jedinki asociраниh sa ovim domaćinom i malom broju haplotipova koji divergiraju od njega svega jednom nukleotidnom promenom (Slike 11 i 12).

Indeks fiksacije (F_{ST}), kao mera populacione diferencijacije, i Nei-ove distance koje ukazuju na *pairwise* razlike između i unutar populacija, potvrdile su prethodne rezultate o postojanju tri genetičke grupe unutar vrste *H. obsoletus* koje uslovljava biljka domaćin (Slika 13). Analize unutargrupne genetičke strukture otkrile su diferencijaciju na populacionom nivou unutar metapopulacije *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* u vidu odstupanja F_{ST} vrednosti kod nekolicine populacija poponca, kao i unutar *V. agnus-castus* genetičke linije (Slika 13). Vrednosti genetičkih distanci između 51 *H. obsoletus* populacije asociране sa četiri biljke domaćina, prikazane kroz F_{ST} vrednosti, bile su visoke (od 0.81 do 1.00) i statistički značajne ($p < 0.01$) (Slika 13; tamno plavi i zeleni elementi na grafikonima). Poređenjem populacija *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* većinom su dobijene niske F_{ST} vrednosti u intervalu od 0 do 0.20, nezavisno od geografskog porekla. Međutim, tri populacije *ex C. arvensis*, iz Crne Gore (lokaliteti Martinići i Podgorica) i Grčke (lokalitet Kilkis), pokazale su visoku i statistički značajnu diferencijaciju u odnosu na preostale populacije iste genetičke grupe ($F_{ST} = 0.70-1.00$; $p < 0.01$) (Slika 13a). Dati nalaz je posledica prisustva haplotipova vezanih za AB-grupu na ovim lokalitetima (Tabela 4), dok su u svim drugim populacijama ovih domaćina prisutni haplotipovi EC-haplogrupe. Njihova genetička divergencija je bila manje izražena samo u odnosu na jednu grčku populaciju *ex U. dioica* (Profitis) uz vrednost $F_{ST} = 0.40-0.50$ ($p < 0.05$) zbog prisustva haplotipova obe prethodno pomenute haplogrupe na ovom lokalitetu. Unutar grupe populacija *ex V. agnus-castus*, pokazala se divergencija između populacija sakupljenih u Crnoj Gori i Grčkoj ($F_{ST} = 0.73-1.00$; $p < 0.01$). Nasuprot geografskom signalu genetičkog razdvajanja populacija *ex V. agnus-castus*, diferencijacija između populacija *ex C. foetida* bila je veoma niska ($F_{ST} = -0.20-0.20$), iako je u ovu analizu uvrštena i veoma udaljena populacija iz Erzindžana u istočnoj Turskoj (Slika 13a).

Prosečan broj Nei-ovih *pairwise* razlika između populacija potvrdio je genetičku diferencijaciju prema biljci domaćinu (Slika 13b). Veoma visoke Nei-ove

distance su detektovane između populacija koje pripadaju genetičkoj grupi *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* i populacija asociiranih sa druga dva domaćina, *V. agnus-castus* (9-12) i *C. foetida* (12-15). Unutargrupne *pairwise* distance su bile 0.0-4.0 za metapopulaciju *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, 0.0-1.2 u slučaju crnogorskih *ex V. agnus-castus* populacija i 0.0-2.1 u slučaju grčkih (4-8 je između ove dve geografske celine), dok je između populacija *ex C. foetida* zabeležena vrednost bila 0.0-1.0. Najviša vrednost unutarpopulacione diferencijacije je zabeležena u slučaju populacija asociiranih sa *C. foetida* što je posledica broja i frekvencije haplotipova (Slika 13b; narandžasti elementi).



Slika 13. Grafički prikaz parametara mtDNK genetičke diferencijacije između *H. obsoletus* populacija asociiranih sa specifičnom biljkom domaćinom u vidu: a) pairwise F_{ST} vrednosti i b) Neiovog prosečnog broja *pairwise* razlika. Biljke domaćini su označene sledećim skraćenicama: Ca (*C. arvensis*), Ud (*U. dioica*), Vac (*V. agnus-castus*) i Cf (*C. foetida*). Raspored populacija je kao u Tabeli 4. Strelice na grafiku a) ukazuju na populacije *ex C. arvensis* iz Martinića, Podgorice i Kilisa koje iskazuju značajne genetičke razlike u odnosu na ostale populacije iste genetičke grupe (Ca-Ud). Plavi elementi ispod F_{ST} dijagonale su vrednosti od -0.2 do 1, gde 0 i negativne vrednosti ukazuju na izostanak divergencije između populacija, dok vrednost 1 označava da su populacije potpuno razdvojene. Na grafiku b) zeleni elementi iznad dijagonale pokazuju Neiov prosečan broj *pairwise* razlika između populacija, narandžasti elementi duž dijagonale pokazuju Neiov prosečan broj *pairwise* razlika unutar populacija i plavi elementi ispod dijagonale pokazuju apsolutni broj nukleotidnih razlika između populacija (Neiova distanca, d).

4.2.2 Diverzitet i varijabilnost mikrosatelitskih nuklearnih markera

Nuklearni diverzitet i varijabilnost 50 *H. obsoletus* populacija u okviru koji je uzorkovan dovoljan broj individua (≥ 6 , ukupno 702 jedinke) procenjen je na osnovu analiza 7 mikrosatelitskih lokusa (Tabela 4). Od ukupno 162 detektovana alela, 15 je novih u odnosu na prethodno publikovane podatke (Imo *et al.* 2013). Svi lokusi kroz sve populacije su se pokazali polimorfnim uz prosečnu vrednost od 23 alela po lokusu, u opsegu od 16 (F84) do 30 (C147). U analiziranom uzorku je detektovano 28 (17%) privatnih alela koji se pojavljuju samo u okviru jedne populacije. Najviši broj privatnih alela je bio 7 i to u populacijama *ex V. agnus-castus* (lokaliteti Asprovalta i Aretusa, GR). U metapopulaciji *ex C. foetida* je bilo prisutno najmanje privatnih alela (2), zatim *ex C. arvensis* (6), *ex V. agnus-castus* (9) i *ex U. dioica* (11).

Prosečna frekvencija nultih alela kroz sve mikrosatelite i populacije je bila 0.06, uz najvišu vrednost detektovanu na lokusu B82 (0.11), a odmah zatim i na E96 i G85 (0.10) što ne bi trebalo da ima uticaja na analize. Združena asocijacija *C. arvensis* i *U. dioica* ima frekvenciju nultih alela 0.05, metapopulacija *ex V. agnus-castus* gotovo istu (0.06), dok je znatno viša u slučaju *ex C. foetida* i iznosi 0.09. Utvrđena disproporcija na nivou asocijacija ukazuje na nepotpunu kompatibilnost mikrosatelitskih prajmera sa uzorcima što je verovatno posledica činjenice da je razvijanje protokola za umnožavanja mikrosatelita bilo bazirano na centralnoevropskim *H. obsoletus* populacijama *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* (Imo *et al.* 2011). Registrovane više vrednosti nultih alela su u skladu sa detektovanim populaciono-genetičkim promenama jer se ovakav fenomen može očekivati kod populacija koje se udaljavaju od izvorne vrste ili podležu diverzifikaciji na obodu areala (Chapius & Estoup 2007; Li *et al.* 2003). Tri prethodno navedena lokusa sa najvišim vrednostima nultih alela (B82, E96 i G85) odstupaju od Hardy-Vajnbergove ravnoteže što može biti posledica lažnog uvećanja homozigotnosti vezane za ove markere, dok opšta devijacija na nivou populacija nije detektovana. Statistički značajan poremećaj ravnoteže genotipske povezanosti (LD) nije detektovan ni za jedan par lokusa nakon Bonferroni korekcije (Rice 1989). Bogatstvo alela (A_R) *H. obsoletus* metapopulacije *ex C. foetida* iznosi 3.449 i znatno

je niže u odnosu na prosečne vrednosti preostale tri asocijacije ($A_R = 4.498$). Značajna razlika u A_R vrednostima je zabeležena i unutar same asocijacije u vidu uvećane vrednosti kod turske populacije (lokalitet Erzincan) u odnosu na evropsku *ex C. foetida* metapopulaciju (4.379, odnosno 3.371).

Tabela 5. Poređenje parametara genetičkog diverziteta baziranih na mikrosatelitima: Heterozigotnost i A_R -bogatstvo alela, između četiri *H. obsoletus* metapopulacije uslovljene biljkom domaćinom.

	<i>C. arvensis</i>	<i>U. dioica</i>	<i>C. foetida</i>	<i>V. agnus-castus</i>
prosečna H_E	0.777	0.765	0.651*	0.785
prosečno A_R	4.567	4.455	3.449*	4.523
br. populacija	9	20	13	8

* $p < 0.05$

C. foetida vs *C. arvensis* H_E : $t = 5.885$, $df = 20$, $p < 0.05$; A_R : $t = 7.910$, $df = 20$, $p < 0.05$

C. foetida vs *U. dioica*, H_E : $t = 5.355$, $df = 31$, $p < 0.05$; A_R : $t = 6.945$, $df = 31$, $p < 0.05$

C. foetida vs *V. agnus-castus*, H_E : $t = -5.291$, $df = 19$, $p < 0.05$; A_R : $t = -5.935$, $df = 19$, $p < 0.05$

Analizom linearne regresije na nivou asocijacija i populacija potvrđena je nezavisnost očekivane heterozigotnosti (H_E) od veličine uzorka ($0.0005 < R^2 < 0.16$, $p > 0.05$). Studentovim t-testom je pokazano da razlike u vrednostima genetičkih parametara H_E i A_R nisu statistički značajne ($p > 0.05$) između asocijacija sa *C. arvensis* ($H_E = 0.777$ i $A_R = 4.567$), *U. dioica* ($H_E = 0.765$ i $A_R = 4.455$) i *V. agnus-castus* ($H_E = 0.785$ i $A_R = 4.523$) (Tabela 5). Nasuprot tome, oba genetička parametra su u slučaju asocijacije sa *C. foetida* bila niža u odnosu na preostale tri uz statističku značajnost od $p < 0.05$ (Tabela 5). Zabeleženi signal se može pripisati populacijama iz Srbije, Rumunije i Bugarske, dok je populacija iz Turske imala znatno više vrednosti oba parametra u odnosu na evropske ($H_E = 0.768$ i $A_R = 4.379$; Tabela 4).

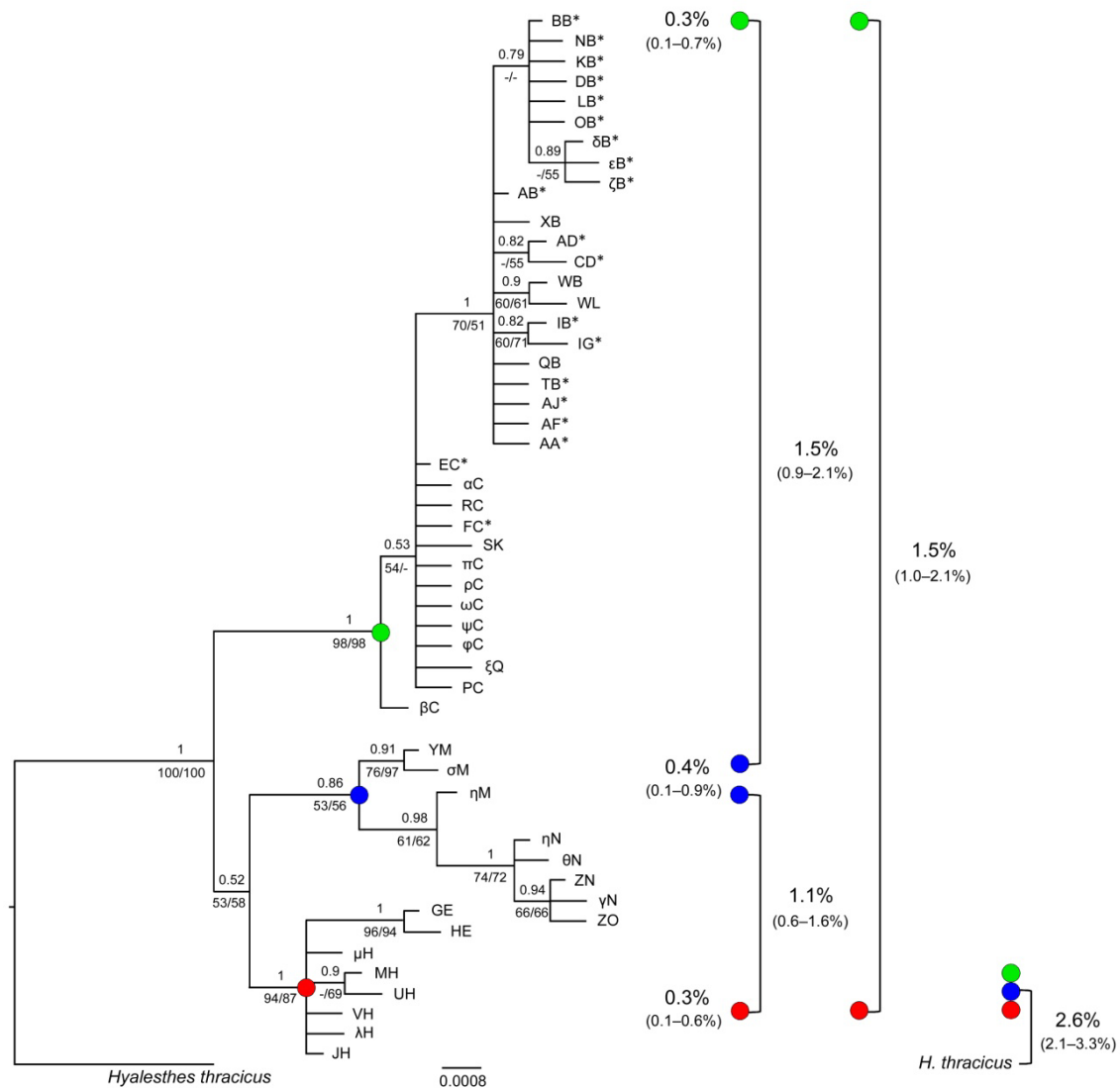
4.3 Genetička diferencijacija populacija *H. obsoletus* specijalizovanih prema biljkama domaćinima

4.3.1 Filogenetske analize mitohondrijskih i mikrosatelitskih markera

U filogenetskim analizama mtDNK utvrđene su evolutivne relacije između 51 *H. obsoletus* haplotipa koji su korišćeni i prilikom izrade genealoške mreže (poglavlje 4.2.1). Pre samih analiza urađena je procena najpogodnijeg modela nukleotidne supstitucije i prateći Bajesov kriterijum (BIC) utvrđeno je da model HKY+I (Hasegawa-Kishino-Yano model sa invarijabilnim mestima, pinvar = 0.881) (Hasegawa *et al.* 1985) najverodostojnije prikazuje odnose unutar analiziranog seta haplotipova asociiranih sa različitim biljkama domaćinima. U skladu sa tim, ovaj model je korišćen prilikom rekonstrukcije filogenetskih stabala *neighbour-joining* metodom, u Bajesovoj analizi, kao i prilikom procene *pairwise* genetičkih distanci (Slika 14; Tabela 6). Topologija filograma dobijenog preklapanjem stabala tri filogenetske analize (Slika 14) u potpunosti odgovara prethodno prikazanom klastiranju haplogrupa (poglavlje 4.2.1, Slika 11) i podrazumeva jasno razdvajanje tri filogenetske grupe uslovljene biljkom domaćinom: 1) *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, 2) *ex V. agnus-castus*, i 3) *ex C. foetida* (mesto razdvajanja označeno zelenim, plavim i crvenim krugovima na Slici 17).

Filogenetske analize bazirane na tri različita metoda izračunavanja filogenetskih odnosa su rezultirale u rekonstrukciji stabala iste opšte topologije. Monofilija dve mitohondrijske linije, *C. arvensis-U. dioica* i *C. foetida*, izražena je visokim podrškama Bajesove analize (1.00) i *bootstrap* vrednostima (87–98%), dok su iste podrške za izdvajanje *V. agnus-castus* genetičke grane bile niže (0.86, 53% and 56%) kao posledica uticaja geografije na genetičku varijabilnost unutar ove grane. Haplotipovi koji pripadaju *ex V. agnus-castus* i *ex C. foetida* genetičkim linijama formiraju zajedničku polazišnu granu sa nižim podrškama (0.52, 53% i 58%) što je posledica visokog diverziteta unutar asocijacijskih klastera, ali može ukazivati i na zajedničko poreklo. Potvrđena su i razdvajanja geografskih linija unutar *C. arvensis-U. dioica* grane na „istočnu“ bazalnu grupu haplotipova i „zapadnu“ haplogrupu koja izvire iz nje, kao i na „crnogorsku“ i „grčku“ grupu unutar *V. agnus-castus* asocijacije. Grupisanje izraelskih haplotipova *ex V. agnus-*

castus u filogenetsku granu *ex C. foetida* je očekivano u skladu sa geneaološkim analizama (Slike 11 i 14) i ukazuje na kompleksne procese simpatričke diferencijacije. Vrsta *H. thracicus* korišćena kao *outgrupa* je stabilizovala stablo, ali nije omogućila izdvajanje bazalne grane ishodne asocijacije.



Slika 14. Bajesovo filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu 1180 bp mtDNK sekvenci *COI-tRNK(Leu)-COII* i *16S-tRNK(Leu)-ND1* *H. obsoleteus* haplotipova detektovanih u okviru ove studije kao i svih ranije publikovanih haplotipova. Relevantne Bajesove verovatnoće (>0.50) dobijene u programu MrBayes su prikazane iznad grana, dok su ispod grana date *bootstrap* vrednosti parsimone i *neighbor-joining* analize (>50%) dobijene u programu PAUP*. Čvorišta koja nisu rekonstruisana u nekoj od analiza su označena simbolom „-“. Osnovna čvorišta su

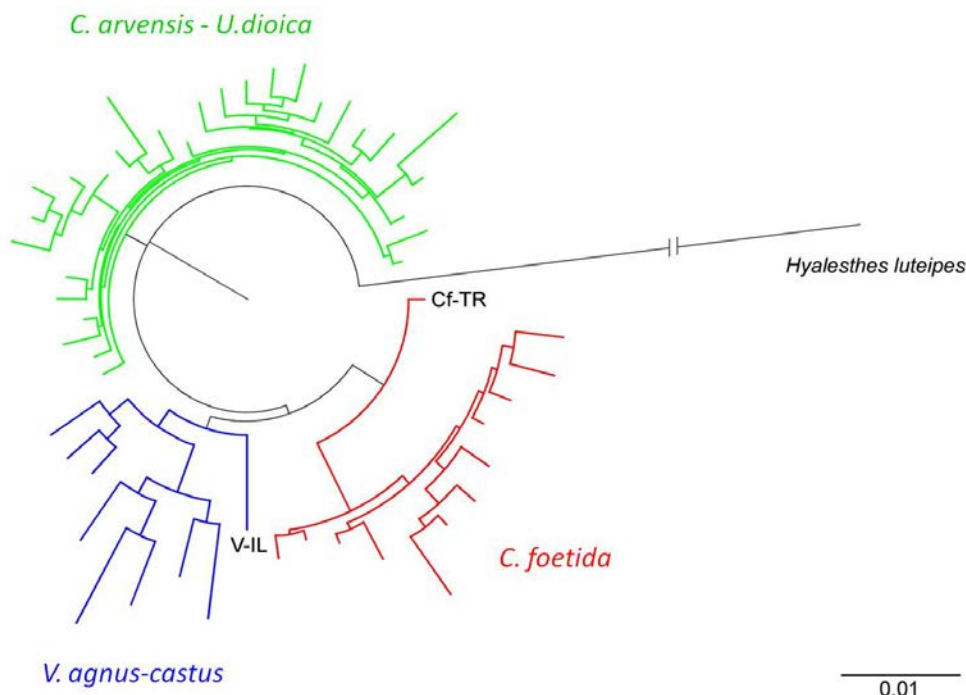
označena krugovima čija boja odgovara asocijaciji: zelena *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, plava *ex V. agnus-castus* i crvena *ex C. foetida*. Evolutivne distance izračunate po HKY+I modelu obuhvataju sve prikazane haplotipove; izraelski GE i HE haplotipovi tretirani su kao članovi *C. foetida* klastera, dok su QB, φC i PC uključeni u grupu *C. arvensis-U. dioica*. Prosečne unutargrupne distance za svaku od tri genetičke grupe su prikazane levo od kruga odgovarajuće boje, dok su međugrupne distance prikazane sa desne strane. Opseg vrednosti unutargrupnih i međugrupnih varijacija je prikazan u zagradama. Distance između *H. obsoletus* haplogrupa i *outgrupe H. thracicus* prikazane su u donjem desnom uglu figure. Prethodno publikovani haplotipovi (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Johannesen & Riedle-Bauer 2014; Chucho *et al.* 2018) su označeni zvezdicom „*“.

Genetička diferencijacija bazirana na nukleotidnim (*pairwise*) razlikama (x100) izračunata je između tri filogenetska klastera koji se izdvajaju na stablu (Slika 14). Genetička diferencijacija unutar asocijacija koja varira od 0.3-0.4%, zanemarljiva je u odnosu na međuasocijacijske vrednosti od 1.1% (*C. arvensis-U. dioica*↔*V. agnus-castus* i *V. agnus-castus*↔*C. foetida*) do 1.5% (*C. arvensis-U. dioica*↔*C. foetida*).

Tabela 6. Evolutivne distance (x100) izračunate za izdvojeni *COI-COII* genski region za 37 *H. obsoletus* haplotipova, korigovane HKY+I modelom nukleotidne supstitucije (pinvar=0.813). Opseg vrednosti distanci je prikazan u zagradama ispod kojih je data srednja vrednost; **d₁**-prosečna divergencija između svih sekvenci, **d₂**-prosečna divergencija između parova sekvenci unutar asocijacije, **D**-prosečna divergencija između grupa (asocijacija).

<i>H. obsoletus</i> asocijacija	d₁	d₂	D			
			1	2	3	4
1 <i>C. arvensis</i>	[0-0.027] 0.010	[0.001 - 0.009] 0.004	-			
2 <i>U. dioica</i>		[0.001 - 0.007] 0.004	[0 - 0.009] 0.004	-		
3 <i>V. agnus-castus</i>		[0.001 - 0.011] 0.005	[0.01 - 0.025] 0.018	[0.009 - 0.021] 0.016	-	
4 <i>C. foetida</i>		[0.001 - 0.004] 0.003	[0.014 - 0.027] 0.020	[0.012 - 0.025] 0.018	[0.002 - 0.017] 0.012	-
<i>Hyalesthes thracicus</i>	-	-	[0.033 - 0.043] 0.038	[0.031 - 0.043] 0.037	[0.025 - 0.032] 0.029	[0.025 - 0.032] 0.029

Pored toga, genetičke distance su procenjene i za 37 haplotipova (isključeni su P, ϕ , Q, G i H) izdvojenog filogenetski informativnog regiona *COI-COII* gena (bez *tRNK-Leu*) od 711bp dužine (Tabela 6). Vrednosti divergencije u ovom slučaju dostižu čak 2.5% između haplotipova različitih asocijacija. Genetičke distance *H. obsoletus* asocijacija u odnosu na *H. thracicus* kao morfo-filogenetski najrodniju vrstu, variraju između 2.1% i 3.3% na nivou kompletnog mtDNK regiona, dok su na izdvojenom *COI-COII* genskom regionu vrednosti znatno više i to od 2.9% do 3.8% (Slika 14; Tabela 6). Poređenjem genetičkih distanci između tri *H. obsoletus* genetička klastera uslovljena biljkom domaćinom, i divergencije u odnosu na morfološki jasno različitu vrstu *H. thracicus*, uočavaju se evolutivni odnosi koji podsećaju na postojanje tri blisko srodne kriptične vrste koje razdvaja specijalizacija prema biljci domaćinu.



Slika 15. *Maximum likelihood* filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu 4 mikrosatelitska lokusa za ukupno 722 *H. obsoletus* jedinke. Svaka od grana na koncentričnom stablu predstavlja jednu od 51 populacije. Zelene grane predstavljaju genetičku grupu *C. arvensis-U. dioica* asocijacije, plave *V. agnus-castus* i crvene *C. foetida*. Populacija iz Erzindžana (Turska) ex *C. foetida* je označena na stablu kao „Cf-TR“, dok je izraelska populacija ex *V. agnus-castus* označena kao „V-IL“ (Imo *et al.* 2013). Kao *outgrupa* analize korišćena je populacija vrste *Hyalesthes luteipes*.

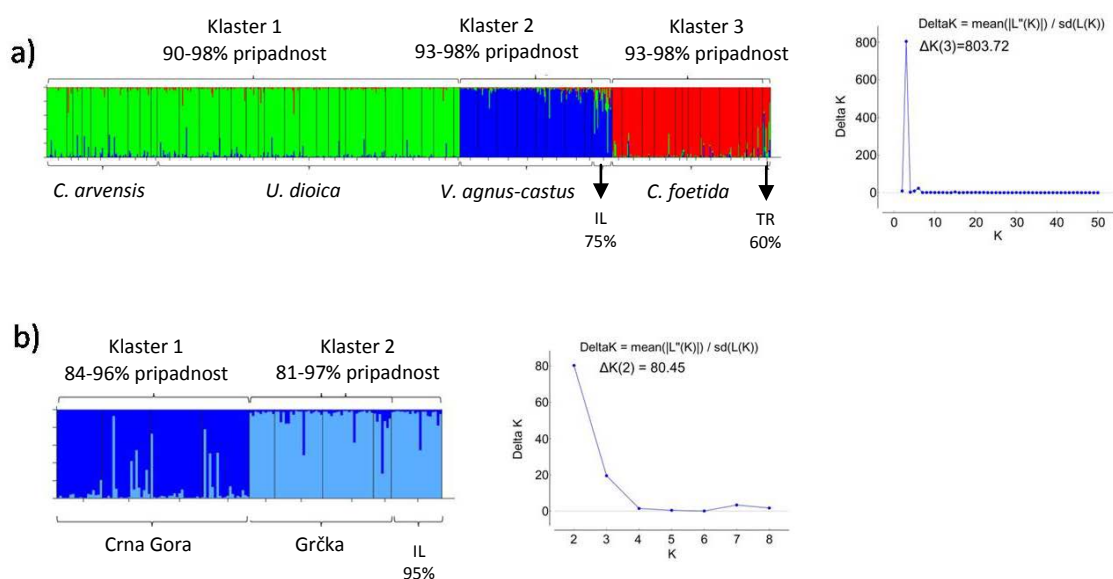
Fenogram dobijen *maximum likelihood* algoritmom, baziran je na na 4/7 mikrosatelitskih lokusa koji su se umnožili (Slika 15) u slučaju vrste *H. luteipes* čijih je 6 jedinki korišćeno kao populaciona *outgrupa*. Manji broj mikrosatelita uključenih u analizu nije ugrozio rezultat. Dobijeno filogenetsko stablo u strukturi odstupa od mtDNK filogenetskog stabla (Slika 14) samo u odgovarajućem grupisanju izraelske *ex V. agnus-castus* populacije koja se postavlja kao bazalna grana preostalim populacijama odgovarajuće asocijacije.

4.3.2 Struktura populacija *H. obsoletus* bazirana na mikrosatelitima

U analizama procene populaciono-genetičke strukture vrste *H. obsoletus* zadržan je osnovni set uzoraka od 702 jedinke poreklom iz 50 populacija (≥ 6 jedinki), dok je u određene testove klastiranja uvrštena i prethodno publikovana izraelska populacija koju čini 20 jedinki *ex V. agnus-castus* (Imo *et al.* 2013). Analizom opšteg klastiranja celokupnog uzorka pokazano je grupisanje populacija u tri prethodno utvrđene mtDNK genetičke grupe uz izuzetno visoku vrednost podrške (Evanno $\Delta K(3) = 803.72$) (Slika 16). Prosečna genetička pripadnost populacija klasterima bila je u visokom procentu ($>90\%$) i u potpunosti je pratila *a priori* informaciju o biljkama domaćinima sa kojih potiču: jedinke asocijane sa *C. arvensis-U. dioica* su grupisane u Klaster 1, jedinke *ex V. agnus-castus* su grupisane u Klaster 2, dok su sve individue sakupljene na *C. foetida* grupisane u Klaster 3 (Slika 16a). Populacija iz Izraela se nedvosmisleno grupisala u genetički klaster odgovarajućeg domaćina što nije bio slučaj na nivou mtDNK u okviru kojih ona gravitira ka asocijaciji *ex C. foetida* (poglavljje 4.2.1, Slika 11 i poglavljje 4.3.1, Slika 14). Za razliku od balkanskih *ex V. agnus-castus* populacija Klastera 2, izraelska populacija poseduje manji procenat genetičke pripadnosti (75%) što može biti posledica geografske izolacije (Slika 16a). Odstupanje u visokoj pripadnost genetičkoj grupi je zabeleženo i u slučaju populacije *ex C. foetida* iz Turske koja se, za razliku od evropskih populacija iste asocijacije, grupisala u odgovarajući Klaster 3 sa 60% pripadnosti (Slika 16a).

Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je pokazala da 77% ukupne genetičke varijabilnosti detektovane u uzorku potiče od asocijacije prema biljci domaćinu (Prilog 5). Kako bi se utvrdila podstruktura tri sugerisana klastera, svaki

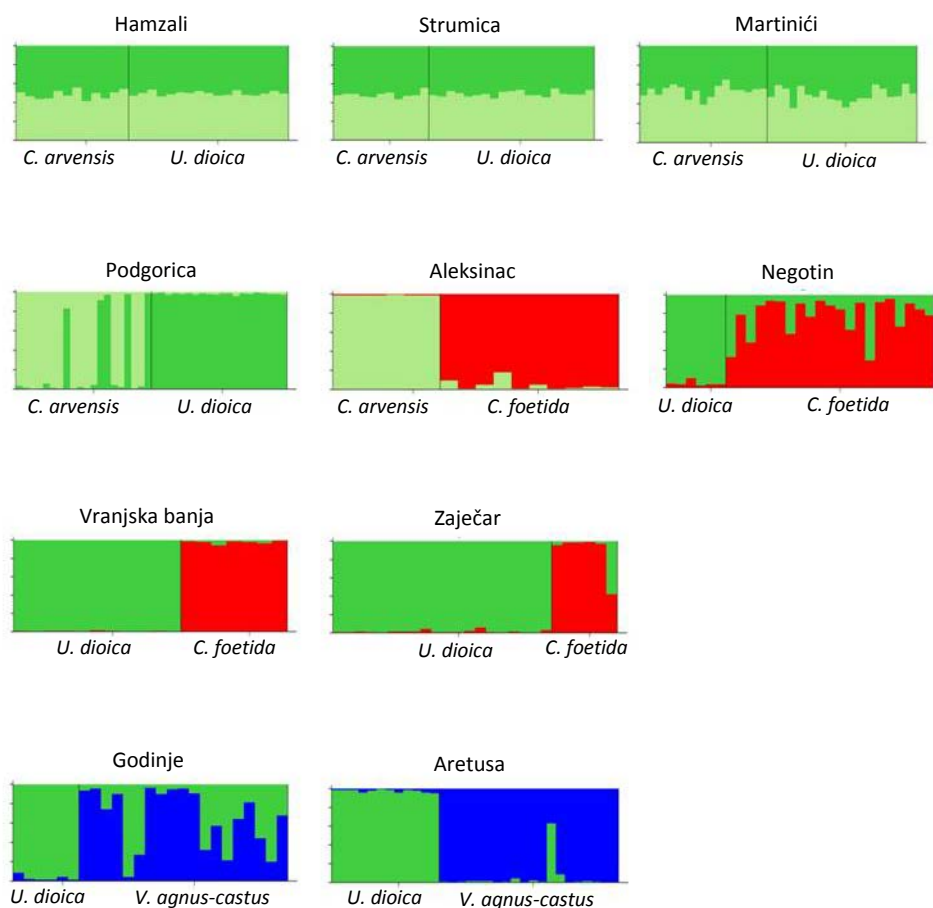
od njih je pojedinačno analiziran. Klaster 1 (29 populacija *ex C. arvensis* i *ex U. dioica*, $\Delta K(2-28)=0.06-11.14$) i Klaster 3 (13 populacija *ex C. foetida*, $\Delta K(2-12)=0.18-5.32$) nisu pokazali unutrašnju diferencijaciju uslovljenu geografijom, dok kod Klastera 1 nije prisutan ni signal divergencije prema domaćinu. Nasuprot tome, 60% genetičke varijanse unutar Klastera 2 (*ex V. agnus-castus*), pripisuje se genetičkoj divergenciji između crnogorskih i grčkih metapopulacija međusobno udaljenih 400 km (Prilog 5). U STRUCTURE analizi klastiranja unutar *V. agnus-castus* asocijacije ($\Delta K(2) = 80.45$; Slika 16b), genetičkoj grupi grčkih populacija se pridružuje istočnomediteranska populacija iz Izraela uz populacionu pripadnost ovom klasteru od 81–97%. AMOVA analiza raspodele genetičke varijanse unutar asocijacije sa konopljikom pokazala je da 42% genetičke divergencije vodi poreklo od geografskog grupisanja populacija u vidu dve genetičke grupe: (1) crnogorske i (2) združenih grčkih i izraelskih populacija (Prilog 5).



Slika 16. Bajesova analiza grupisanja jedinki i populacija u genetičke klasterne dobijena u programu STRUCTURE. (a) klastiranje 702 *H. obsoletus* jedinke grupisane u 50 populacija uz pridruženu izraelsku populaciju od 20 individua (Imo *et al.* 2013); (b) klastiranje 132 *H. obsoletus* jedinke iz 8 populacija asociiranih sa konopljikom u Crnoj Gori i Grčkoj uz pridruženu prethodno pomenutu izraelsku populaciju. Svaka kolona predstavlja jednu individuu, dok crne uspravne linije predstavljaju granice između populacija. Boje na grafikonima odgovaraju proporcionalnoj pripadnosti individua svakom od genetičkih klastera: zelena (*C. arvensis-U. dioica*), plava (*V. agnus-castus*), crvena (*C. foetida*).

4.3.3 Segregacija sintopskih populacija

Od ukupno 11 sintopskih lokaliteta, njih deset je podvrgnuto analizama genetičkog klastiranja na osnovu mikrosatelita čime je dobijen uvid u protok genetičkog materijala između *H. obsoletus* asocijacija (Slika 17). Populacija asociirana sa *C. arvensis* u istočnoj Turskoj (Erzindžan) koja je sintopski prisutna sa *ex C. foetida* populacijom, nije uvrštena u analize jer je broj uzorkovnih jedinki nedovoljan (tri individue, Tabela 4). Na 3/4 sintopska lokaliteta sa populacijama *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* nije detektovana genetička divergencija uslovljena biljkom domaćinom što je u skladu sa odsustvom iste u svim prethodnim analizama.



Slika 17. Klastiranje *H. obsoletus* jedinki na sintopskim lokalitetima. Svaka kolona predstavlja jednu individuu, dok su crne uspravne linije granice između populacija. Iznad grafikona je naznačen lokalitet, a ispod asocijacija kojoj data sintopska populacija pripada.

Međutim, na jednom sintopskom lokalitetu (Podgorica, CG) Evanno-va vrednost $\Delta K(2) = 76.94$ ukazala je na postojanje dva klastera što podseća na

genetičke relacije ovih asocijacija u slučaju host rasa na jugozapadu Nemačke (Imo *et al.* 2013). Ovakav odnos je posledica prisustva haplotipova iz „zapadne“ AB-haplogrupe u ovoj populaciji asociiranoj sa *C. arvensis*, dok su u populaciji *ex U. dioica* prisutni haplotipovi „istočne“ EC-haplogrupe. Na ostalim sintopskim lokalitetima (*C. arvensis/C. foetida*, *U. dioica/C. foetida*, *U. dioica/V. agnus-castus*) bili su očigledni genetička divergencija i manjak protoka gena između asocijacija uz populacionu pripadnost odgovarajućem klasteru od 68% do 99% (Slika 17). Većinska pripadnost klasteru od >50% nije bila karakteristična za sve individue. Genotipizacija mtDNK ovih „pogrešno klastiranih“ jedinki potvrdila je njihov identitet kao članova *a priori* određene asocijacije čime je ispoljeno odstupanje u podacima koje pružaju mitohondrijalni i nuklearni markeri.

4.4 'Ca. P. solani' inficiranost populacija *H. obsoletus* specijalizovanih prema biljkama dualnim domaćinima

Molekularno-epidemiološkom karakterizacijom 'Ca. P. solani' izolata detektovanih u *H. obsoletus* jedinkama asociiranim sa četiri biljke domaćina, utvrđeno je prisustvo multilokusnih (MLST) genotipova sva tri *tuf*-tipa (*tuf-a*, *tuf-ab* i *tuf-b*) čiji epidemiološki putevi otpočinju od specifičnih dualnih domaćina i šire se asociiranim populacijama vektora. Za 'Ca. P. solani' izolate *tuf-a* i *tuf-ab* tipa potvrđena je korelacija sa *U. dioica* kao rezervoarom i asociiranim *H. obsoletus* populacijama, dok je u slučaju *tuf-b* tipa izolata utvrđeno da se epidemiologija razvija u vidu mreže koja povezuje tri dualna domaćina: *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida*, kroz sa njima asociirane *H. obsoletus* populacije.

4.4.1 Genotipski diverzitet 'Ca. P. solani' u populacijama *H. obsoletus ex U. dioica*

Epidemiološki značaj i prirodna inficiranost populacija *H. obsoletus* asociiranih sa *U. dioica* kao biljkom domaćinom i rezervoarom 'Ca. P. solani' je istraživana na ukupno 21 lokalitetu na teritoriji Balkana (12 u Srbiji, četiri u Crnoj Gori, dva u Makedoniji i tri u Grčkoj; Tabela 7). Molekularnom identifikacijom i karakterizacijom 'Ca. P. solani' u 332 *H. obsoletus* adulta sakupljena sa *U. dioica*

potvrđeno je dominantno prisustvo *tuf*-a epidemiološkog genotipa specifičnog za ovu asocijaciju (Tabela 7). Pored toga, detektovana je i infekcija vektora *tuf*-ab tipom koji je u jugoistočnoj Evropi prethodno zabeležen samo u Makedoniji takođe u asocijaciji sa koprivom (Atanasova *et al.* 2015). Oba *tuf*-tipa su specifična isključivo za epidemiološki ciklus koji izvire iz *U. dioica* što je u skladu sa dosadašnjim podacima o epidemiološkoj specijalizaciji '*Ca. P. solani*' u odnosu na biljku dualnog domaćina. Međutim, za značajan broj jedinki *H. obsoletus ex U. dioica* utvrđena je infekcija *tuf*-b CPs genotipom za koji se po literaturnim podacima smatra da potiče iz drugih biljaka rezervoara patogena (npr. *C. arvensis*; Langer & Maixner 2004) (Tabela 7).

Tabela 7. Učestalost infekcije i prikaz MLST okarakterisanih izolata '*Ca. P. solani*' detektovanih u jedinkama populacija *H. obsoletus ex U. dioica* koje su prethodno podvrgnute populaciono-genetičkim analizama (Tabela 4). Uz lokalitet je u zagradi prikazana i država sledećim skraćenicama: SRB (Srbija), CG (Crna Gora), MK (Makedonija) i GR (Grčka).

Lokalitet	GPS	broj CPs+ jedinki/ ukupan broj jedinki	<i>tuf</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i>	Broj izolata
Gakovo (SRB)	N45 57.88 E19 3.28	4/22	-	19-25	-	(1)
			-	HoU354	-	(1)
			-	HoU355	-	(1)
			-	HoU362	-	(1)
Bačka Topola (SRB)	N45 47.518 E19 35.604	3/20	<i>tuf</i> -ab	19-25	V18	(2)
			-	HoU346	-	(1)
Bačko Petrovo selo (SRB)	N45 43.693 E20 06.114	2/20	<i>tuf</i> -ab	19-25	V18	(1)
			-	19-25	-	(1)
Vršac (SRB)	N45 03.874 E21 11.208	0/12	/	/	/	(0)
Srednjevo (SRB)	N44 39.685 E21 30.362	3/15	<i>tuf</i> -ab	19-25	V18	(1)
			-	19-25	-	(1)
			-	HoU448	V23	(1)
Boljetin (SRB)	N44 31.740 E22 02.090	7/12	<i>tuf</i> -a	SB5	V3	(1)
			-	STOL	-	(5)

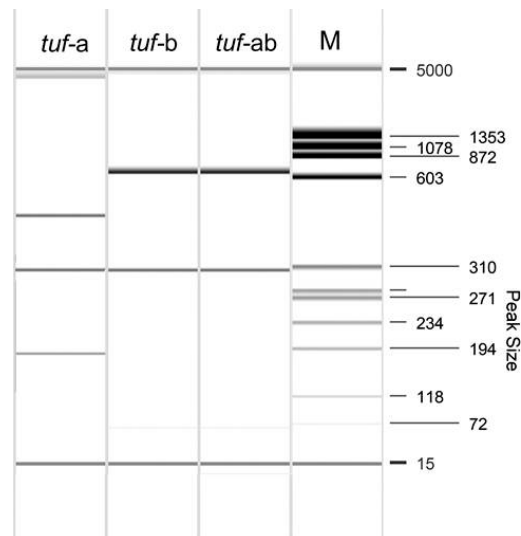
			-	HoU302	-	(1)
Negotin (SRB)	N44 16.604 E22 30.484	0/6	/	/	/	(0)
			-	STOL	-	(3)
Zaječar (SRB)	N43 54.492 E22 17.728	5/20	-	HoU296	-	(1)
			-	HoU294	-	(1)
Knjaževac (SRB)	N43 30.610 E22 18.833	1/15	-	STOL	-	(1)
Grnčar (SRB)	N43 01.270 E22 21.825	1/17	<i>tuf-a</i> ¹	SB5	V3 ²	(1)
			<i>tuf-a</i>	M2	V3	(3)
Vranje (SRB)	N42 31.725 E21 54.319	9/12	<i>tuf-a</i> ¹	SB5	V3 ³	(1)
			<i>tuf-b</i>	STOL	-	(2)
			-	STOL	-	(3)
Vranjska banja (SRB)	N42 35.417 E21 59.839	4/11	<i>tuf-a</i>	SB5	V3	(2)
			-	19-25	-	(2)
Godinje (CG)	N42 13.421 E19 06.800	1/6	<i>tuf-a</i>	SB5	V3	(1)
Martinići (CG)	N42 32.245 E19 10.763	0/20	/	/	/	(0)
Podgorica (CG)	N42 26.919 E19 12.509	0/20	/	/	/	(0)
Šušunja (CG)	N42 19.3240 E19 13.3220	3/30	<i>tuf-a</i>	SB5	V3	(2)
			<i>tuf-ab</i>	19-25	V3	(1)
Hamzali (MK)	N41 29.860 E22 44.996	2/17	<i>tuf-a</i> ¹	M3	V3	(1)
			-	SB5	-	(1)
Strumica (MK)			<i>tuf-a</i>	SB5	V3	(1)
	N41 26.505 E22 39.922	6/19	<i>tuf-ab</i> ¹	19-25	V18	(1)
			-	Rpm35	-	(1)
			-	STOL	-	(3)
Aretusa (GR)	N40 45.767 E23 33.096	1/12	-	HoU437	-	(1)
Filadelfio (GR)	N40 45.246 E23 27.846	2/20	<i>tuf-a</i>	M3	V3	(1)
			-	BG4560	-	(1)
Profitis (GR)	N40 39.930 E23 17.331	3/6	<i>tuf-a</i>	M3	V3	(2)
			<i>tuf-b</i>	Rqg31	V2-TA	(1)

Simbol „-“ označava odsustvo amplifikacije određenog gena; uzorci čiji je *tuf* gen umnožen prajmerima Tuf1-f1/Tuf1-r1 i TufUf/TufU-r1 obeleženi su sa „1“; uzorci čiji je *vmp1* gen umnožen prajmerima TypH10F/TypH10R i TypH10F1/TypH10R1 obeleženi su sa „2“, a sa prajmerima TypH10F1/TypH10R1 i TypH10F2/ TypH10R2 obeleženi su sa „3“. Simbol „/“ se odnosi na populacije u okiviru kojih nisu detektovane CPs inficirane jedinke. Populacija u Šušunji (CG) je naknadno sakupljena za potrebe praćenja prirodnih puteva diseminacije '*Ca. P. solani*' u mediteranskim vinogradima i kao takva se navodi u Tabeli 11 u poglavlju 4.5.1, ali je radi opšteg pregleda CPs izolata prikazana i u ovom poglavlju.

Molekularnom identifikacijom '*Ca. P. solani*' putem specifičnog STOL11 genskog regiona, u približno 20% *H. obsoletus* jedinki *ex U. dioica* (57/332) utvrđeno je CPs prisustvo. Izuzimajući četiri neinficirane populacije, procenat infekcije po lokalitetu je varirao od 6% do 75% (Tabela 7). Multilokusna genotipizacija izolata sprovedena je kompletnom karakterizacijom tri genska regiona (*tuf*, *stamp* i *vmp1*) za 40% izolata, dok u slučaju 34/57 uzoraka nisu okarakterisani *tuf* i/ili *vmp1* gen usled neuspešne amplifikacije. Četiri CPs izolata okarakterisana su na *tuf* genu sekvenciranjem nested produkata dobijenih kombinovanom primenom novih prajmera dizajniranih u ovoj studiji i standardnih prajmera: Tuf1-f1/Tuf1-r1 u direktnoj i TufUf/TufU-r1 prajmera u nested reakciji.

Unutar populacija *H. obsoletus ex U. dioica* na teritoriji Balkana detektovana su oba *tuf*-tipa (*tuf-a* i *tuf-ab*) karakteristična za ovu asocijaciju u vidu pet MLST genotipova: *tuf-a*/SB5/V3 (9 uzoraka), *tuf-a*/M2/V3 (3), *tuf-a*/M3/V3 (4), *tuf-ab*/19-25/V3 (1) i *tuf-ab*/19-25/V18 (5). Nedoslednost uzoraka koji su na *stamp/vmp1* okarakterisani kao genotip 19-25/V3 (Crna Gora), odnosno 19-25/V18 (Srbija), što je ukazivalo na pripadnost epidemiološkoj liniji *ex U. dioica*, a zatim u RFLP analizi pripisani *tuf-b* profilu, razjašnjena je sekvenciranjem *tuf* gena. Analizom nukleotidne sekvence utvrđena je mutacija koja je rezultirala nedostatkom *HpaII* restrikcione pozicije karakteristične za *tuf-a* RFLP profil (Slika 18). Ova nukleotidna promena je specifična za intermedijerni *tuf-ab* tip koji ima RFLP profil identičan *tuf-b* tipu, ali je filogenetski bliži *tuf-a* grupi sekvenci (Slika 18).

<i>tuf</i> -tip	Acc. no. referentne sekvence	Nukleotidne pozicije razlikovanja <i>tuf</i> -a/ <i>tuf</i> -b tipa ¹	
		543 (507) ²	604 (568)
<i>tuf</i> -a	FJ441241	C	G
<i>tuf</i> -b	FJ441242	T	A
<i>tuf</i> -ab	KJ926083	T	G



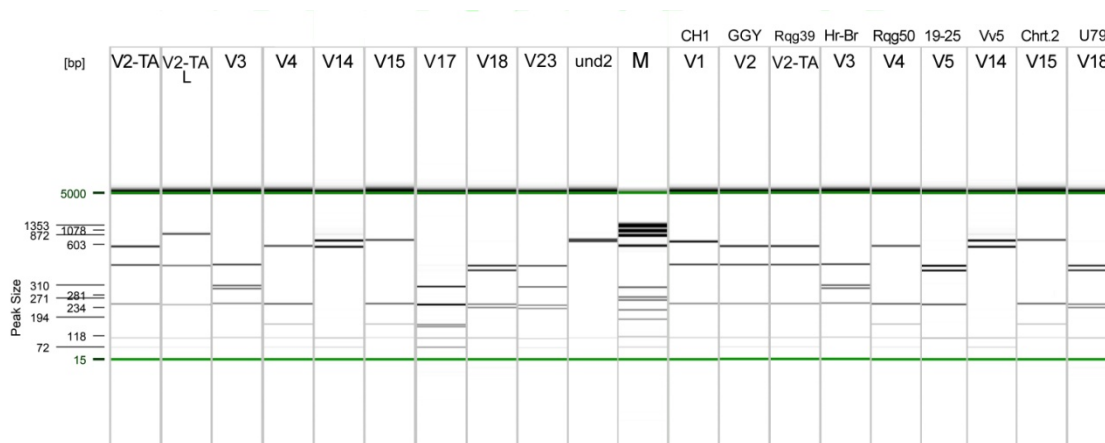
Slika 18. Nukleotidne razlike u sekvencama *tuf* gena '*Ca. P. solani*' koje određuju pripadnost *tuf*-a, *tuf*-b ili *tuf*-ab tipu i *Hpa*II restrikcioni profili *tuf* gena '*Ca. P. solani*' razdvojeni na automatskoj kapilarnoj elektroforezi QIAxcel advanced (QIAGEN).

¹ Dužina sekvence od početka mesta vezivanja forward prajmera TufAYf (TufUf)

² Mesto sečenja *Hpa*II enzima koje definiše *tuf*-a ili *tuf*-b tip prema Langer & Maixner (2004).

Pored identifikacije poznatih, ranije opisanih, *stamp* genotipova koji pripadaju *tuf*-a/*tuf*-ab epidemiologiji (19-25, SB5, M2 i M3), detektovano je 5 do sada nepoznatih izolata koji se od referentnog genotipa 19-25 (FN813267; Fabre *et al.* 2011) razlikuju u jednoj ili dve nukleotidne promene: HoU354, HoU355, HoU362, HoU448 i HoU437 (Tabela 7). Nijedan od novih *stamp* genotipova nije uspešno amplifikovan na *tuf* genu ni sa jednom od različitih kombinacija prajmera. Slična situacija je registrovana i u slučaju *vmp1* gena gde je jedino uzorak iz Srednjeva (sa *stamp* genotipom HoU448) na osnovu RFLP profila okarakterisan kao V23, a zatim je analizom nukleotidne sekvence pokazano da se u jednoj nukleotidnoj supstituciji razlikuje od referentne sekvence Vm_At2 (Aryan *et al.* 2014; Quaglino *et al.* 2016) (Slika 19). Kod dva uzorka *vmp1* profil je određen primenom jedne od sledeće dve prajmerske kombinacije: standardni prajmeri TypH10F/TypH10R u direktnoj i novodizajnirani TypH10F1/TypH10R1 u nested reakciji, ili novi prajmeri u obe reakcije, TypH10F1/TypH10R1 i TypH10F2/TypH10R2 (Tabela 7). Za sve izolate okarakterisane primenom novih prajmera utvrđeno je da pripadaju *tuf*-a ili *tuf*-ab tipu, odnosno V3 *vmp1* profilu

koji su specifično vezani za CPs MLST genotipove čiji je izvor infekcije *U. dioica* (Tabela 7, Slike 18 i 19).



Slika 19. *RsaI* restrikcioni (V) profili *vmp1* gena '*Ca. P. solani*' razdvojeni na automatskoj kapilarnoj elektroforezi QIAxcel advanced (QIAGEN). Prikazani profili (V2-TA, V2-TA-L, V3, V4, V14, V15, V17, V18, V23, und2) su detektovani u jedinkama *H. obsoletus ex U. dioica*, *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida*. Pripadnost određenom profilu je utvrđena poređenjem sa referentnim izolatima poznatog V tipa (CH1, GGY, Rqg39, Hr-Br, Rqg50, 19-25, Vv5, Chrt2, U79) preuzetim iz Cvrković *et al.* (2014), Atanasova *et al.* (2015) ili obezbeđenim od strane X. Foissac (Bordo, Francuska). U slučaju und2 profila su nested ampliconi sekvencirani i putem nukleotidne sekvence pripisani ovom profilu iz Gruzije (Quaglino *et al.* 2016). Marker korišćen u analizi je FX174/HaeIII: QX DNA size marker (QIAGEN) sa dužinama fragmenata: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72 bp.

Posebno značajan nalaz u okviru epidemiološkog ciklusa koprive je relativno česta inficiranost asociраних *H. obsoletus* jedinki CPs izolatima *tuf-b* tipa (42%) (Tabela 7). Pored MLST genotipa *tuf-b*/Rqg31/V2-TA (1 uzorak), prisutna su dva *tuf-b*/STOL izolata i 17 uzoraka koji su samo na *stamp* genu okarakterisani kao: STOL (15 izolata), Rpm35 (1) i BG4560 (1). Uz to, zabeležena su 4 nova *stamp* genotipa (HoU346, HoU302, HoU296 i HoU294) koji se razlikuju u jednoj ili dve nukleotidne promene od referentnog STOL izolata (FN813261; Fabre *et al.* 2011) (Tabela 7).

4.4.2 Genotipski diverzitet '*Ca. P. solani*' u populacijama *H. obsoletus ex C. arvensis*

Utvrđeni procenat CPs infekcije *H. obsoletus* populacija *ex C. arvensis* bio je od 20% do 66% (Tabela 8). Od ukupno 144 analizirana adulta sa 12 lokaliteta na teritoriji Balkana i Turske, 61 je bio CPs inficiran (42%) i to isključivo izolatima *tuf-b* tipa (Tabela 8). Primenom kombinacije standardnih i novodizajniranih prajmera uspešno je umnožen *tuf* gen kod 3/12 prethodno neamplifikovanih izolata. Nakon sekvenciranja utvrđeno je da ovi uzorci pripadaju *tuf-b* profilu, a da se 2/3 uzorka (MLST genotipovi iz Predejana: *tuf-b*/BG4560/- i *tuf-b*/HoCa632/-) jednim nukleotidom razlikuju od referentnog izolata *tuf-b* tipa (FJ441242). Ova razlika ne narušava karakteristično sečenje *HpaII* enzimom što je provereno virtuelnom digestijom. Karakterizacija izolata na *vmp1* genu je upotrebom novih prajmera uspešno urađena u slučaju 4/12 uzoraka (Tabela 8).

Tabela 8. Učestalost infekcije i prikaz MLST okarakterisanih izolata '*Ca. P. solani*' detektovanih u jedinkama populacija *H. obsoletus ex C. arvensis* koje su prethodno podvrgnute populaciono-genetičkim analizama (Tabela 4). Uz lokalitet je prikazana i država u zagradi sledećim skraćenicama: SRB (Srbija), Rumunija (RO), CG (Crna Gora), MK (Makedonija), GR (Grčka) i Turska (TR).

Lokalitet	GPS	broj CPs+ jedinki/ ukupan broj jedinki	<i>tuf</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i>	Broj izolata
Topola (SRB)	N44 13.532 E20 40.224	12/20	<i>tuf-b</i>	Rqg50	V4	(2)
			<i>tuf-b</i>	Rqg50	V14	(1)
			<i>tuf-b</i>	Rpm35	V14	(2)
			<i>tuf-b</i>	Rqg31	V4	(3)
			<i>tuf-b</i>	Rqg31	V14	(2)
			<i>tuf-b</i>	Rqg31	V2-TA	(1)
			<i>tuf-b</i>	M5	V4	(1)
Aleksinac (SRB)	N43 36.010 E21 40.592	2/6	<i>tuf-b</i>	Rqg50	V14	(1)
			<i>tuf-b</i>	Rqg31	V14	(1)
Predejane (SRB)	N42 49.992 E22 07.912	6/9	<i>tuf-b</i>	GGY	und1 ³ (VmGe2)	(1)
			-	GGY	-	(1)

			-	Rqg31	-	(1)
			tuf-b ¹	BG4560	-	(1)
			-	Rqg31	und1 ³ (VmGe2)	(1)
			tuf-b ¹	HoCa632	-	(1)
Petrevo selo (RO)	N45 49.528 E21 31.548	5/9	tuf-b	Rqg50	V4	(1)
			-	BG4560	-	(4)
Martinići (CG)	N42 32.245 E19 10.763	7/17	tuf-b	Rqg31	V14	(1)
			tuf-b	Rqg50	V4	(2)
			tuf-b	Rqg50	V17	(1)
			tuf-b	Rpm35	V14	(2)
			tuf-b ¹	HoCa242	V4	(1)
Podgorica (CG)	N42 26.919 E19 12.509	11/20	tuf-b	Rqg50	V4	(2)
			tuf-b	Rqg50	V17	(5)
			-	Rqg50	V17 ³	(1)
			tuf-b	Rpm35	V2-TA	(2)
			-	HoCa341	V2-TA ²	(1)
Beri (CG)	N42 26.0510, E19 10.4390	2/10	tuf-b	Rpm35	V14	(1)
			tuf-b	Rqg31	V14	(1)
Šušunja (CG)	N42 19.3240 E19 13.3220	6/20	tuf-b	Rpm35	V14	(6)
Hamzali (MK)	N41 29.860 E22 44.996	3/12	tuf-b	Rqg50	V2-TA	(1)
			tuf-b	Rqg50	V14	(1)
			tuf-b	GGY	V4	(1)
Strumica (MK)	N41 26.505 E22 39.922	3/11	tuf-b	GGY	V4	(1)
			tuf-b	Rqg50	V14	(2)
Kilkis (GR)	N40 54.984 E22 49.101	3/6	tuf-b	Vv24	V4	(1)
			tuf-b	Vv24	V4 ²	(1)
			tuf-b	HoCa278	V14	(1)
Erzincan (TR)	N39 57.253 E38 38.063	1/3	tuf-b	STOL	V15	(1)

Simbol „-“ označava neuspešnu amplifikaciju određenog gena; uzorci čiji je *tuf* gen umnožen prajmerima Tuf1-f1/Tuf1-r1 i TufUf/TufU-r1 obeleženi su sa „1“; uzorci čiji je *vmp1* gen umnožen prajmerima TypH10F/TypH10R i TypH10F1/TypH10R1 obeleženi su sa „2“, a sa prajmerima TypH10F1/TypH10R1 i TypH10F2/ TypH10R2 obeleženi su sa „3“. Simbol „/“ se odnosi na populacije u okviru kojih nisu detektovane CPs inficirane jedinke. Populacija u Šušunji (CG) je naknadno sakupljena za potrebe praćenja prirodnih puteva diseminacije '*Ca. P. solani*' u mediteranskim vinogradima i kao takva se navodi u Tabeli 11 u poglavlju 4.5.1, ali je radi opšteg pregleda CPs izolata prikazana i u ovom poglavlju.

Trogenska karakterizacija je urađena za 50 izolata koji pripadaju jednom od 16 MLST genotipova *tuf-b* epidemiologije. Potvrđeno je prisustvo 8 prethodno poznatih *stamp* genotipova (Rqg50, Vv24, Rqg31, BG4560, GGY, STOL, Rpm35 i M5), kao i četiri nova: HoCa632 (Predejane, Srbija) i HoCa242 (Martinići, Crna Gora) koji se jednim nukleotidom razlikuju od referentnog Rqg50 (KC703019; Cvrković *et al.* 2014) i HoCa341 (Podgorica, Crna Gora) sa jednom promenom i HoCa278 (Kilkis, Grčka) sa tri nukleotidne promene u odnosu na referentni Rpm35 genotip (KC703015; Cvrković *et al.* 2014) (Tabela 8). Najčešći *stamp* genotip detektovan u većini populacija (20/50 uzoraka) je Rqg50 u kombinaciji sa V2-TA, V4, V14 i V17 *vmp1* profilima. Trinaest jedinki je bilo inficirano Rpm35 genotipom uparenim najčešće sa profilom V14, ređe V2-TA (Slika 19; Tabela 8).

Pored do sada neopisanog genotipa (izolat HoCa278), u populaciji vektora iz Kilkisa (Grčka) prisutan je bio Vv24 *stamp* genotip praćen V4 *vmp1* profilom (Tabela 8). Za Srbiju i Crnu Goru karakteristično je prisustvo dve varijante izolata MLST genotipa *tuf-b*/Rqg31 i to uz V4 i V14 *vmp1* profile, dok je u Predajanima za ovaj *stamp* genotip vezan nedavno opisani VmGe2 genotip *vmp1* gena poreklom iz Gruzije čiji je restrikcioni profil nazvan und1 (Quagliano *et al.* 2016) (Tabela 8). MLST genotip *tuf-b*/GGY/V4 detektovan je u Makedoniji, dok je GGY *stamp* genotip prisutan i u dva izolata iz Predejana (Srbija) i to kao *tuf-b*/GGY/und2 i u još jednom uzorku čija preostala dva gena nisu uspešno okarakterisana (Tabela 8). Prethodni nalaz prisustva *tuf-b*/M5/V4 genotipa poreklom sa *C. arvensis* u Makedoniji (Atanasova *et al.* 2015) sada je potvrđen i u jednom adultu *H. obsoletus* u Topoli (Srbija). U primerku *H. obsoletus* sa severoistoka Turske utvrđeno je prisustvo samo za njega karakterističnog *tuf-b*/STOL/V15 MLST genotipa, dok je u četiri uzorka iz Rumunije utvrđeno prisustvo BG4560 *stamp* genotipa (Tabela 8).

4.4.3 Genotipski diverzitet '*Ca. P. solani*' u populacijama *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus*

Prisustvo '*Ca. P. solani*' u jedinkama *H. obsoletus* u asocijaciji sa *V. agnus-castus* utvrđeno je jedino u populacijama poreklom iz Crne Gore (Tabela 9). Nijedna od 64 *H. obsoletus* jedinke ex *V. agnus-castus* sa 6 lokaliteta u Grčkoj nije bila CPs inficirana (Tabela 9). Nasuprot tome, u svih 5 analiziranih populacija iz Crne Gore detektovana je CPs infekcija čija se stopa kretala od izuzetno niskih 4.5% u Berima, do 25% u Kamenarima. Iako je srednji procenat zaraženosti na nivou crnogorske metapopulacije ex *V. agnus-castus* bio 13%, ova *H. obsoletus* asocijacija se pokazala kao vektorski vrlo sposobna jer je uspešno inficirala eksperimentalne biljke u ogledima prenošenja '*Ca. P. solani*' (poglavlje 4.5.2).

Tabela 9. Učestalost infekcije i prikaz MLST okarakterisanih izolata '*Ca. P. solani*' detektovanih u jedinkama populacija *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus* koje su prethodno podvrgnute populaciono-genetičkim analizama (Tabela 4). Uz lokalitet je prikazana i država u zagradi sledećim skraćenicama: CG (Crna Gora) i GR (Grčka).

lokalitet	GPS	broj CPs+ jedinki/ ukupan broj jedinki	<i>tuf</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i>	Broj izolata
Bar (CG)	N42 07.031 E19 04.581	3/18	-	STOL	-	(2)
			<i>tuf</i> -b	STOL	-	(1)
Godinje (CG)	N42 13.421 E19 06.800	3/30	<i>tuf</i> -b	Rqg50	V17	(1)
			<i>tuf</i> -b	STOL	V2-TA	(2)
Kamenari (CG)	N42 28.591 E18 41.028	5/20	<i>tuf</i> -b	STOL	-	(1)
			-	STOL	-	(3)
Ulcinj (CG)	N41 56.515 E19 16.052	2/19	-	STOL	-	(1)
			<i>tuf</i> -b	STOL	-	(1)
Beri (CG)	N42 26.0510, E19 10.4390	1/22	<i>tuf</i> -b	Ho-Vac1	V17	(1)
Apolonija (GR)	N40 38.380 E23 29.960	0/10	/	/	/	(0)

Asprovalta (GR)	N40 45.124 E23 44.024	0/19	/	/	/	(0)
Aretusa (GR)	N40 41.616 E23 40.397	0/20	/	/	/	(0)
Larisa (GR)	N39 38.544 E22 16.981	0/7	/	/	/	(0)
Lezbos (GR)	N39 18.565 E26 8.379	0/5	/	/	/	(0)
Tasos (GR)	N 40 35.177 E 24 37.525	0/3	/	/	/	(0)

Simbol „-“ označava neuspešnu amplifikaciju određenog gena. Simbol „/“ se odnosi na populacije u okviru kojih nisu detektovane CPs inficirane jedinke. Populacija iz Beri (CG) je naknadno sakupljena za potrebe praćenja prirodnih puteva diseminacije '*Ca. P. solani*' u mediteranskim vinogradima i kao takva se navodi u Tabeli 11 u poglavlju 4.5.1, ali je radi opšteg pregleda CPs izolata prikazana i u ovom poglavlju. U okviru populacije iz Godinja je prikazan veći broj jedinki odnosu na Tabelu 4 jer je takođe naknadno uzorkovana radi dopune epidemiološke studije u mediteranskim vinogradima.

Neuspešnost umnožavanja *tuf* i *vmp1* gena je prisutna i u slučaju ove asocijacije vektora u procentu od 30% detektovanih izolata. Primena novodizajniranih prajmera nije dala rezultate usled čega je 7 uzoraka ostalo neokarakterisano na *tuf*, a 10 na *vmp1* genu. Centralni nalaz vezan za *H. obsoletus* populacije *ex V. agnus-castus*, koji se poklapa sa podacima iz Izraela (Sharon *et al.* 2015), je prisustvo isključivo *tuf*-b '*Ca. P. solani*' izolata. Svi uzorci umnoženi na *tuf* genu su i sekvencirani i potvrđeni kao identični sa referentnim *tuf*-b izolatom.

Pored dva prethodno opisana *stamp* genotipa, Rqg50 i STOL na lokalitetu Beri (Crna Gora) detektovan je do sada nepoznat *stamp* genotip označen kao Ho-Vac1 koji se za dva nukleotida razlikuje od referentnog izolata Rqg50 (KC703019; Cvrković *et al.* 2014). Analiza *vmp1* gena četiri umnožena izolata pokazala je prisustvo dva profila: V2-TA uz *tuf*-b/STOL genotip u dva uzorka u Godinju i V17 profila vezanog za *tuf*-b/Rqg50 u Godinju i *tuf*-b/Ho-Vac1 u Berima (Slika 19; Tabela 9).

4.4.4 Genotipski diverzitet '*Ca. P. solani*' u populacijama *H. obsoletus ex C. foetida* i potvrda statusa dualnog domaćina *C. foetida*

Prvobitni nalaz prisustva *tuf-b* tipa '*Ca. P. solani*' u *H. obsoletus* populacijama *ex C. foetida* (Kosovac *et al.* 2013) potvrđen je kroz znatno veći uzorak od 52 CPs izolata molekularno detektovana u 163 *H. obsoletus* jedinke sakupljene uglavnom na području istočne i jugoistočne Srbije (Tabela 10). Veoma visoka stopa infekcije, koja kod nekih populacija iznosi i preko 80%, do sada kao takva nije poznata u literaturi, niti detektovana u ovom istraživanju u slučaju preostalih asocijacija. Kroz analizirane uzorke ističe se homogenost infekcije STOL izolatom, kao jednim od 5 detektovanih *stamp* genotipova, kojem pripada više od 80% genotipiziranih izolata. Trogenska karakterizacija je uspešno urađena u slučaju 37/52 uzorka i pokazala je da većina njih (83%) pripada MLST genotipu *tuf-b*/STOL/V2-TA (Tabela 10).

Tabela 10. Učestalost infekcije i prikaz MLST okarakterisanih izolata '*Ca. P. solani*' detektovanih u jedinkama populacija *H. obsoletus ex C. foetida* koje su prethodno podvrgnute populaciono-genetičkim analizama (Tabela 4). Uz lokalitet je prikazana i država u zagradi sledećim skraćenicama: SRB (Srbija), BG (Bugarska), RO (Rumunija) i TR (Turska).

lokalitet	GPS	broj CPs+ jedinki/ ukupan broj jedinki	<i>tuf</i>	<i>stamp</i>	<i>vmp1</i>	Broj izolata
Aleksinac (SRB)	N43 36.010 E21 40.592	0/10	/	/	/	(0)
Deligrad (SRB)	N43 38.546 E21 33.444	4/20	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA- L	(1)
			<i>tuf-b</i>	STOL	-	(2)
			-	STOL	-	(1)
Požarevac (SRB)	N44 39.310 E21 11.983	6/12	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(2)
			<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA ¹	(2)
			<i>tuf-b</i>	STOL	-	(2)
Porečka reka (SRB)	N 44 24.267 E22 10.350	0/4	/	/	/	(0)
Negotin (SRB)	N44 16.604 E22 30.484	6/21	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(4)

			-	STOL	V2-TA	(1)
			<i>tuf-b</i>	STOL	-	(1)
Tamnič (SRB)	N44 04.973 E22 32.048	1/7	<i>tuf-b</i>	STOL	und2	(1)
Zaječar (SRB)	N43 50.016 E22 17.334	2/6	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(1)
			<i>tuf-b</i>	STOL	und2	(1)
Temaska (SRB)	N43 16.537 E22 31.840	1/12	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(1)
Pirot (SRB)	N43 12.880 E22 31.585	16/19	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(16)
Jasenovik (SRB)	N43 22.365 E22 02.441	5/20	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(2)
			<i>tuf-b</i>	STOL	-	(1)
			-	STOL	-	(1)
			-	HoCf23	-	(1)
Vranjska banja (SRB)	N42 34.139 E21 58.367	0/7	/	/	/	(0)
Vidin (BG)	N43 57.711 E22 51.258	5/6	<i>tuf-b</i>	Rpm35	V14	(1)
			<i>tuf-b</i>	BG4560	V4	(1)
			-	BG4560	-	(3)
Kalafat (RO)	N43 59.926 E22 58.119	5/10	<i>tuf-b</i>	Rqg31	V4	(1)
			-	Rqg31	-	(1)
			<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(1)
			-	BG4560	-	(2)
Erzindžan (TR)	N39 57.253 E38 38.063	0/8	/	/	/	(0)
Kırşehir (TR)	N39 26.021 E34 07.795	1/1	<i>tuf-b</i>	STOL	V2-TA	(1)

Simbol „-“ označava neuspješnu amplifikaciju određenog gena; uzorci čiji je *vmp1* gen umnožen prajmerima TypH10F1/TypH10R1 i TypH10F2/TypH10R2 obeleženi su sa „1”. Simbol „/“ se odnosi na populacije u okiviru kojih nisu detektovane CPs inficirane jedinke.

Dominanti STOL *stamp* genotip je u po jednom uzorku na lokalitetima Tamnič i Zaječar (Srbija) vezan za *vmp1* tip detektovan do sada u Gruziji i opisan kao und2 (Quagliano *et al.* 2016), dok je u Deligradu (Srbija) uz njega detektovan

do sada nepoznat *vmp1* profil koji je obeležen kao V2-TA-L (engl. *long*) (Slika 19; Tabela 10). Restrikcionom analizom se pokazalo da je ovaj *vmp1* genotip iz Deligrada srodan V2-TA profilu, ali da su produkti digestije duži. Nakon sekvenciranja utvrđeno je da u odnosu na referentni V2-TA *vmp1* profil (KC703023, Cvrković *et al.* 2014) poseduje inserciju u dužini od 243 bp (81 amino kiselinu).

Prethodno opisani *stamp* genotipovi: Rpm35, BG4560 i Rqg31, detektovani su u svega 9 uzoraka i to isključivo u populacijama u Bugarskoj i Rumuniji (Tabela 10). Na lokalitetu Vidin (BG) su prisutni u po jednom uzorku MLST genotipovi *tuf-b/Rpm35/V14* i *tuf-b/BG4560/V4*, dok je na lokalitetu Kalafat (RO) identifikovan genotip *tuf-b/Rqg31/V4*. U još 5 uzoraka u kojima je detektovan BG4560 *stamp* genotip (BG i RO) izolati nisu okarakterisani na druga dva gena kao i u slučaju jednog uzorka Rqg31 *stamp* tipa (RO). Jedan novi *stamp* genotip, izolat HoCf23 udaljen jednom promenom od referentnog STOL izolata, detektovan je samo u Srbiji (lokalitet Jasenovik). Po jedan uzorak svakog MLST genotipa je sekvenciran na *tuf* genu i utvrđeno je da svi pripadaju referentnom *tuf-b* izolatu (Tabela 10).

Značajan nalaz vezan za ovu asocijaciju je potvrda prisustva '*Ca. P. solani*' u prirodno inficiranim biljkama *C. foetida* uzorkovanim na lokalitetima gde je zabeleženo i prisustvo inficiranih vektora: Negotin, Pirot i Jasenovik (Tabela 10). Stepenn prirodne infekcije biljaka je bio 70%, 50% i 30%, i rezultovao je u ukupno 14 CPs izolata koji su svi pripadali MLST genotipu *tuf-b/STOL/V2-TA*, dominantno prisutnom u asociiranim *H. obsoletus* populacijama. Uspešna CPs detekcija je urađena u lisnom materijalu i podjednako uspešno u uzorcima korena *C. foetida*, što ukazuje na potencijal ove biljke kao endogejskog izvora inokuluma za larve.

4.5 Molekularna epidemiologija 'Ca. P. solani': uticaj specijalizacije vektora prema biljkama dualnim domaćinima na puteve diseminacije patogena

4.5.1 Pokazatelji prirodnih ukrštanja epidemioloških puteva diseminacije 'Ca. P. solani': slučaj mediteranskih vinograda

Rezultati *in situ* praćenja kretanja 'Ca. P. solani' genotipova kroz prirodno inficirane biljke i asociirane *H. obsoletus* populacije, pokazali su kompleksnu epidemiološku mrežu preplitanja CPs izolata na putu do vinove loze. *In situ* praćenjem 'Ca. P. solani' epidemiologije utvrđen je značaj *H. obsoletus ex V. agnus-castus* asocijacije u iniciranju i širenju *Bois noir* (BN) bolesti vinove loze kroz potvrdu inficiranosti populacija vektora asociiranih sa ovim domaćinom na 5 lokaliteta u Crnoj Gori (Tabela 11). Utvrđena je i prirodna inficiranost *V. agnus-castus* stopom infekcije od 33 do 55% na tri lokaliteta, od kojih su dva u blizini vinograda, a jedan predstavlja prirodno stanište ove biljke (Tabela 11). Pokazano je da *V. agnus-castus* predstavlja potencijalni prirodni izvor infekcije od kojeg asociirane populacije *H. obsoletus* šire 'Ca. P. solani' u mediteranskim vinogradima. Ovaj nalaz je od značaja za sve vinogradarske regione Sredozemlja gde *V. agnus-castus* raste u svom prirodnom okruženju i pruža nišu asociiranom vektoru.

Unutar svih ispitivanih vinograda bile su prisutne populacije *C. arvensis* kao potencijalnog prirodnog CPs rezervoara i izvora BN infekcije (Tabela 11). Prisustvo populacija *H. obsoletus* u asocijaciji sa *C. arvensis* nije zabeleženo samo na lokalitetu u Godinju, dok su na preostala četiri lokaliteta detektovane CPs-inficirane populacije vektora u asocijaciji sa ovim dualnim domaćinom. Na lokalitetu u Berima, uprkos tome što CPs infekcija nije detektovana u *C. arvensis* kao biljci domaćinu i potencijalnom rezervoaru patogena, utvrđeno je prisustvo inficiranih jedinki vektora. Zabeleženi nalaz je posledica asimptomatskog prisustva 'Ca. P. solani' u *C. arvensis* i jednake verovatnoće uzorkovanja inficiranih i neinficiranih biljaka za analize prisustva patogena. Procenat zaraženosti *H. obsoletus* populacija asociiranih sa *C. arvensis* je bio između 20 i 33% po lokalitetu.

U četiri vinograda su na obodu zasada bili prisutni asimptomatska *U. dioica* i asociране *H. obsoletus* populacije (Tabela 11). Uzorkovane biljke su bile CPs inficirane u Šušunji i Martinićima (8-25%), dok su insekti u Šušunji i Godinju bili CPs-pozitivni. Registrovani disbalans inficiranosti biljke domaćina i odsustva infekcije u asociranoj populaciji vektora (Martinići) se može objasniti niskom brojnošću populacija vektora, ali i niskom stopom infekcije vektora na lokalitetu. Nasuprot tome, *H. obsoletus* primerci sakupljeni na CPs-negativnoj koprivi u Godinju, bili su zaraženi fitoplazmom, slično situaciji registrovanoj u populaciji sa poponca u Berima (Tabela 11). Podaci o CPs infekciji mediteranskih vinograda (Radonjić et al. 2009) dopunjeni su dodatnim uzorkovanjima simptomatskih loza na oglednim lokalitetima čime je dostignut broj od 48 izolata poreklom iz BN-simptomatske vinove loze kao krajnjeg domaćina patogena (Tabela 11).

Tabela 11. Incidenca '*Ca. P. solani*' u vinovoj lozi, biljkama rezervoarima i asociranim *H. obsoletus* populacijama u 5 BN-inficiranih vinograda Crne Gore. Simbol „-“ ukazuje na odsustvo biljke rezervoara ili asocirane populacije vektora na određenom lokalitetu. Brojevi u zagradama u koloni „vinova loza“ predstavljaju CPs izolate preuzete iz ranijih istraživanja (Radonjić et al. 2009); skraćenice dualnih domaćina su sledeće: *C. arvensis* – *Ca*, *U. dioica* – *Ud* i *V. agnus-castus* – *Vac*.

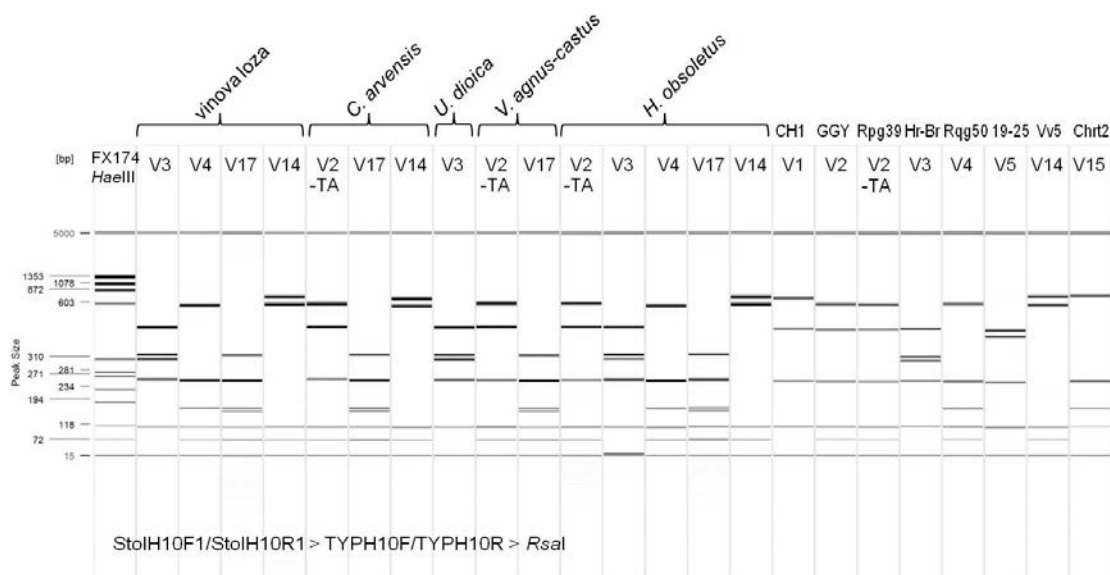
lokalitet	broj CPs+/ukupan broj analiziranih uzoraka biljaka i insekata						
	vinova loza	biljke dualni domaćini			<i>Hyalesthes obsoletus</i>		
		<i>Ca</i>	<i>Ud</i>	<i>Vac</i>	<i>Ca</i>	<i>Ud</i>	<i>Vac</i>
Šušunja	13/13 (5)	6/12	3/12	-	6/20	3/30	-
Podgorica	10/10 (4)	5/12	0/12	-	4/12	0/20	-
Martinići	10/10 (6)	4/12	1/12	-	6/30	0/20	-
Beri	9/9 (5)	0/12	-	2/12	2/10	-	1/22
Godinje	6/6 (2)	0/12	0/12	3/12	-	1/6	3/30

4.5.1.1 Genotipizacija '*Ca. P. solani*' u populacijama *H. obsoletus ex U. dioica*, *C. arvensis* i *V. agnus-castus*

U ukupno 98 uzoraka poreklom iz oglednih mediteranskih vinograda utvrđena je prirodna infekcija '*Ca. P. solani*': 48 biljaka vinove loze, 24 biljke CPs rezervoara i 26 jedinki *H. obsoletus*. Svi izolati su podvrgnuti MLST genotipizaciji u cilju epidemiološkog praćenja kretanja patogena kroz domačine., Ukupno je detektovano 12 MLST genotipova i to sva tri 3 *tuf*-tipa (a, b i ab), 8 *stamp* genotipova i 5 *vmp1* profila. Većina izolata (91/98) su RFLP analizom određeni kao *tuf-b* tip čije su izvorišne biljke *C. arvensis* i *V. agnus-castus*, dok je u ostalih 7 uzoraka detektovan *tuf-a* profil vezan za *U. dioica*. Osam uzoraka vinove loze, koprive i sa njom asociranih *H. obsoletus* individua koji su prema *stamp* i *vmp1* genima odgovarali genotipu asociranom sa koprivom, a pokazali se kao *tuf-b* RFLP profil, sekvencirani su i potvrđeni kao intermedijerni *tuf-ab* tip. Usled nedovoljne epidemiološke informativnosti RFLP analize *tuf* gena, sekvenciranje je urađeno i za sve uzorke *tuf-a* profila (7 izolata), kao i za po 10 uzoraka *tuf-b* profila vezanih za *C. arvensis* i *V. agnus-castus*. Za ovih 17 sekvenci je potvrđeno da odgovaraju prethodno okarakterisanim izolatima iz crnogorskih vinograda (FJ441241 i FJ441242; Radonjić *et al.* 2009). Kopriva se kao biljka domaćin pokazala izvorom *tuf-a* i *tuf-ab* CPs tipa koji kroz asocirane *H. obsoletus* populacije dospevaju do BN-simptomatske vinove loze, dok je preostala većina izolata *tuf-b* tipa izvirala iz druge dve biljke izvora inokuluma, *C. arvensis* i *V. agnus-castus*, i populacijama vektora vezanim za ove domačine se širila kroz vinograde.

Karakterizacija izolata na *vmp1* genu je pokazala prisutvo 5 profila: V2-TA, V3, V4, V14 i V17 (Slika 20). Četiri restrikcona V profila su od ranije poznata (Murolo *et al.* 2010; 2013 - corrigendum; Cvrković *et al.* 2014) dok je sekvenca koja odgovara V17 profilu publikovana pod nazivom „genotip Vm_At7“ (Aryan *et al.* 2014). Poređenjem virtuelnom digestijom ovog referentnog izolata (KJ469731) i sekvence profila detektovanog u 13 uzoraka u mediteranskim vinogradima, utvrđeno je da se radi o V profilu imenovanom prema SEE-ERANET nomenklaturi kao V17 (X. Foissac, INRA, Bordeaux-France, lična komunikacija). Svi izolati vezani za *U. dioica*-ciklus, odnosno pripadajući *tuf-a* i *tuf-ab* epidemiologijama, nosili su

isključivo V3 profil, dok je u okviru *tuf*-b ciklusa detektovan znatno veći diverzitet (Slika 20).



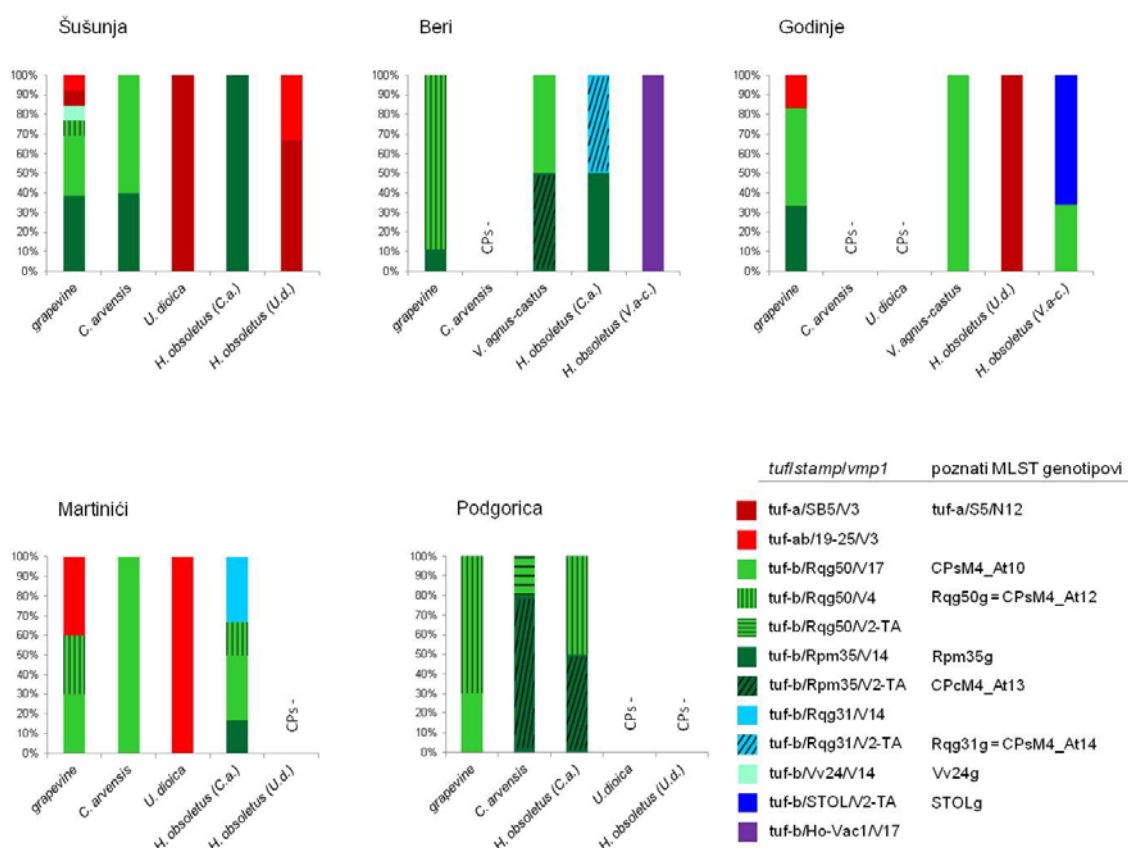
Slika 20. *RsaI* restrikcioni (V) profili *vmp1* gena '*Ca. P. solani*' razdvojeni na automatskoj kapilarnoj elektroforezi QIAxcel advanced (QIAGEN). Detektovani profili u različitim domaćinima (vinova loza, *C. arvensis*, *U. dioica*, *V. agnus-castus*, *H. obsoletus*) su prikazani uz referentne izolate poznatog V profila (CH1, GGY, Rpg39, Hr-Br, Rqg50, 19-25, Vv5, Chrt2) preuzete iz Cvrković *et al.* (2014) ili obezbeđene od strane X. Foissac (INRA, Bordo, Francuska). Marker korišćen u analizi je FX174/HaeIII: QX DNA size marker (QIAGEN) sa dužinama fragmenata: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72 bp.

Kompleksnost i diverzitet '*Ca. P. solani*' u prirodno inficiranim ekosistemima najbolje se oslikava kroz genotipizaciju *stamp* gena u vidu identifikacije 7 poznatih genotipova: SB5, 19-25, Rqg50, Rqg31, Vv24, Rpm35 i STOL, i prisustvo do sada nepoznatog genotipa Ho-Vac1 u *H. obsoletus* populaciji *ex V. agnus-castus* u Berima (Tabela 9; Slika 21). U uzorcima vinove loze su detektovana sva tri *tuf*-tipa i 5 *stamp* genotipova u direktnoj korelaciji sa izolatima detektovanim u biljkama domaćinima i vektorima (Slika 21). Genotipovi SB5 i 19-25 su vezani isključivo za koprivu i asocijane *H. obsoletus* populacije. Nasuprot tome, Rqg50, Vv24 i Rpm35 detektovani su u dva dualna domaćina: *C. arvensis* i *V. agnus-castus*, kao i sa njima asocijanim populacijama vektora, čime su ove četiri karike umrežene kao članovi *tuf*-b epidemiologije koji imaju velikog uticaja u

diseminaciji 'Ca. P. solani' i razvoju *Bois noir* bolesti vinove loze na Mediteranu (Slika 21).

4.5.1.2 Ukrštanje puteva infekcije: praćenje genotipova 'Ca. P. solani' od biljaka rezervoara, kroz populacije vektora, do obolele vinove loze

Složena epidemiološka mreža rekonstruisana u vinogradima Mediterana ukazuje na preklapanje i ukrštanje prirodnih puteva diseminacije 'Ca. P. solani' što se ogleda kroz detektovanih 12 MLST genotipova od kojih je 8 prethodno poznato (Slika 21) (Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014).



Slika 21. Grafički prikaz distribucije 12 'Ca. P. solani' MLST genotipova kroz domaće u ogledu *in situ* praćenja epidemiologije u mediteranskim vinogradima. Uz MLST genotipove prethodno poznate u literaturi dati su njihovi publikovani nazivi (Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.* 2014; Cvrković *et al.* 2014). Pet prikazanih grafika predstavlja 5 ogleđnih vinograda, dok stubovi prikazuju procentualnu prisutnost svakog od detektovanih MLST genotipova u odgovarajućem domaćinu. Simbol „CPS-“ ukazuje da određeni domaćin na datom lokalitetu nije inficiran fitoplazmom.

U vinovoj lozi kao ishodištu CPs epidemioloških puteva pronađeno je šest MLST genotipova od kojih su dva (*tuf-a/SB5/V3* i *tuf-ab/19-25/V3*) vezana za *U. dioica* kao rezervoar i asocirane *H. obsoletus* populacije koje ih prenose. Genotip *tuf-b/Rpm35/V14* (Rpm35g) je takođe prisutan u zatvorenom epidemiološkom ciklusu vezanom za *C. arvensis* i asocirane populacije vektora (Slika 21). Najčešće detektovani genotipovi u vinovoj lozi, *tuf-b/Rqg50/V4* (Rqg50g) i *tuf-b/Rqg50/V17* (CPsM4_At10), koji se razlikuju samo u *vmp1* profilu, pokazali su složene puteve kretanja kroz domaćine. Izolati *tuf-b/Rqg50* vezani za V4 tip su identifikovani u populacijama *H. obsoletus ex C. arvensis*, ali ne i u samom poponcu, dok je kombinacija sa V17 tipom prisutna u populacijama vektora dve asocijacije, *ex C. arvensis* i *ex V. agnus-castus*, kao i u obe biljke. U vinovoj lozi je takođe detektovan i genotip *tuf-b/Vv24/V14* (Vv24g) čiji izvor infekcije i vektor nisu utvrđeni u analiziranim uzorcima (Slika 21).

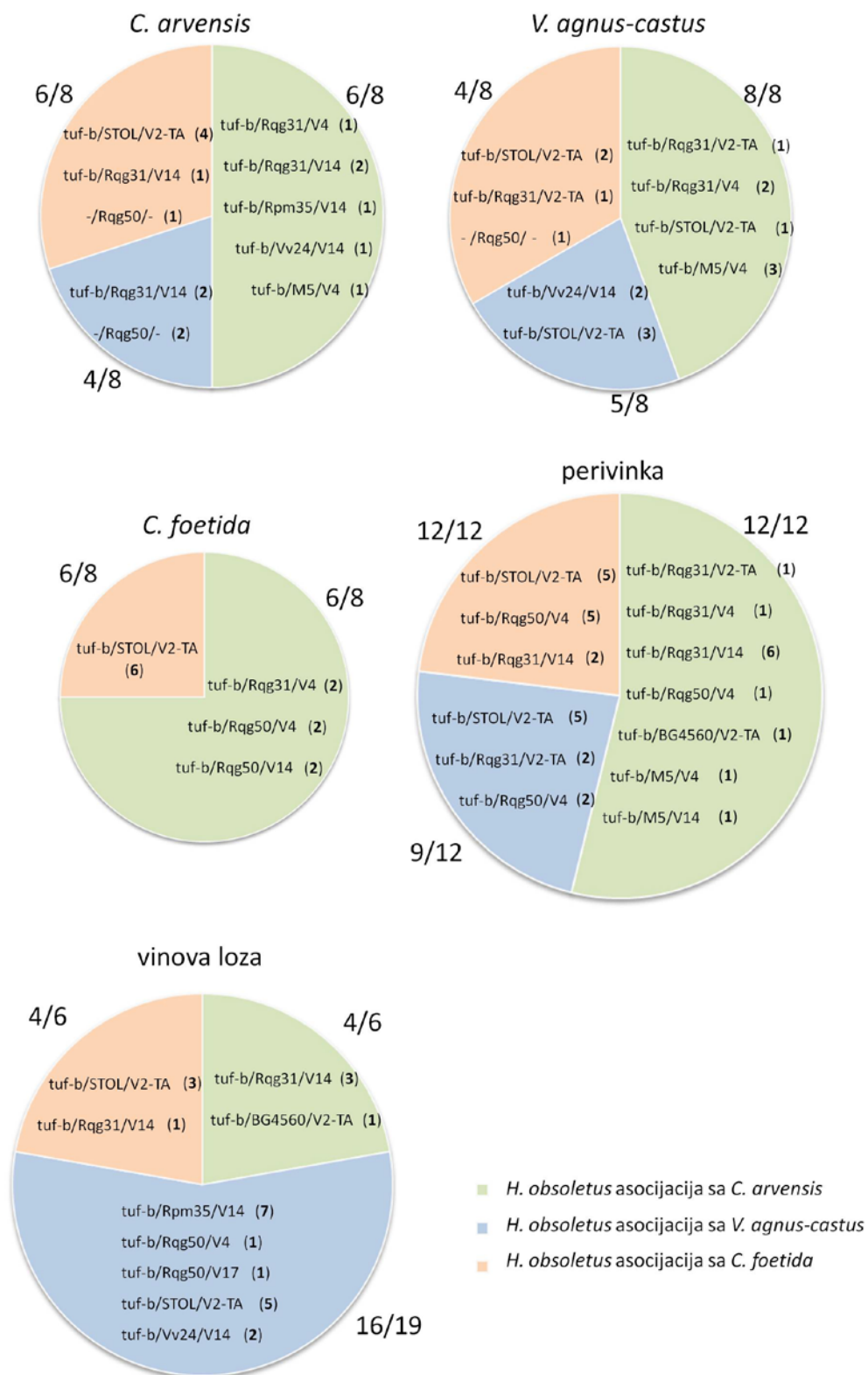
Nasuprot tome, u biljkama rezervoarima i asociranim *H. obsoletus* populacijama je pronađeno 6 MLST genotipova 'Ca. P. solani' koji nisu detektovani u vinovoj lozi. Po dva genotipa su karakteristična samo za populacije asocirane sa *V. agnus-castus* (*tuf-b/STOL/V2-TA* i *tuf-b/Ho-Vac1/V17*) i za populacije *ex C. arvensis* (*tuf-b/Rqg31/V2-TA* i *tuf-b/Rqg31/V14*). Isti fenomen specifične asocijacije CPs genotipa sa pojedinačnim domaćinom je zabeležen u slučaju genotipa *tuf-b/Rqg50/V2-TA* nađenog samo u poponcu, dok MLST genotip *tuf-b/Rpm35/V2-TA* ovaj domaćin deli sa asociranim *H. obsoletus* populacijama kao i sa još jednim rezervoarom, *V. agnus-castus* (Slika 21).

Direktna i nedvosmislena korelacija između biljke izvora infekcije, *H. obsoletus* populacija i BN obolele vinove loze, utvrđena je kroz tri MLST genotipa: *tuf-a/SB5/V3*, *tuf-b/Rpm35/V14* i *tuf-b/Rqg50/V17*. Prvi genotip je detektovan samo u Šušunji i to isključivo vezan za *U. dioica*-ciklus. Takođe samo za jednu biljku dualnog domaćina je vezan i genotip *tuf-b/Rpm35/V14* čiji je kompletan *C. arvensis*-epidemiološki ciklus detektovan u istom vinogradu, a sporadično se pojavljuje i na drugim lokalitetima. Genotip *tuf-b/Rqg50/V17* je prisutan u svim vinogradima i jasno se kreće kroz dva epidemiološka puta: (1) u Martinićima izvire iz *C. arvensis* i raznosi se asociranim populacijama vektora i (2) u Godinju otpočinje

od inficiranih biljaka *V. agnus-castus* i asociiranih *H. obsoletus* populacija koje ga unose u vinograd (Slika 21).

4.5.2 Eksperimentalni pokazatelji ukrštanja epidemioloških ciklusa i puteva diseminacije '*Ca. P. solani*'

Broj sprovedenih testiranja (replikacija) unakrsnog prenošenja '*Ca. P. solani*' na svaku od testiranih biljnih vrsta je tokom petogodišnjeg perioda istraživanja zavisio od međusezonskih promena brojnosti populacija testiranih *H. obsoletus* asocijacija i agregacije insekata. Preživljavanje inficiranih oglednih biljaka je bilo zadovoljavajuće i posebno uspešno u slučaju perivinki koje dobro podnose gajenje u kontrolisanim uslovima klima komora, dostižu visok titar patogena i jasno ispoljavaju simptome CPs infekcije. Nakon primarnih postavki eksperimenata koje su podrazumevale po 12 replikacija svake vrste, ogledi su zatvoreni manjim, ali poredivim brojem replikacija po *H. obsoletus* asocijaciji: *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* sa po 8 replikacija, 12 replikacija perivinki i 6 vinovih loza za *H. obsoletus ex C. arvensis* i *ex C. foetida*, dok je u kombinovanim *in situ* i *ex situ* eksperimentima vektorske uloge populacija *H. obsoletus ex V. agnus-castus* u mediteranskim vinogradima postavljeno 19 oglednih loza (Slika 22). Uspeh sprovedenih eksperimenata inokulacije, osim postignute stabilnosti u broju replikacija i značajnom broju CPs inficiranih biljaka (skoro 80%), ogleda se i u zabeleženom diverzitetu '*Ca. P. solani*' izolata koje su prenele prirodno zaražene *H. obsoletus* populacije tri asocijacije. Centralni nalaz postavljenih ogleda predstavlja eksperimentalno rekonstruisana epidemiološka mreža koju gradi 12 MLST genotipova, vezanih za *tuf-b* epidemiologiju: *tuf-b/Rqg31/V2-TA*, *tuf-b/Rqg31/V4*, *tuf-b/Rqg31/V14*, *tuf-b/Rqg50/V4*, *tuf-b/Rqg50/V14*, *tuf-b/BG4560/V2-TA*, *tuf-b/Vv24/V14*, *tuf-b/STOL/V2-TA*, *tuf-b/M5/V4*, *tuf-b/M5/V14*, *tuf-b/Rpm35/V14* i *stamp* genotip Rqg50 koji nije okarakterisan na *tuf* i *vmp1* genima usled izostanka amplifikacije (Slika 22).

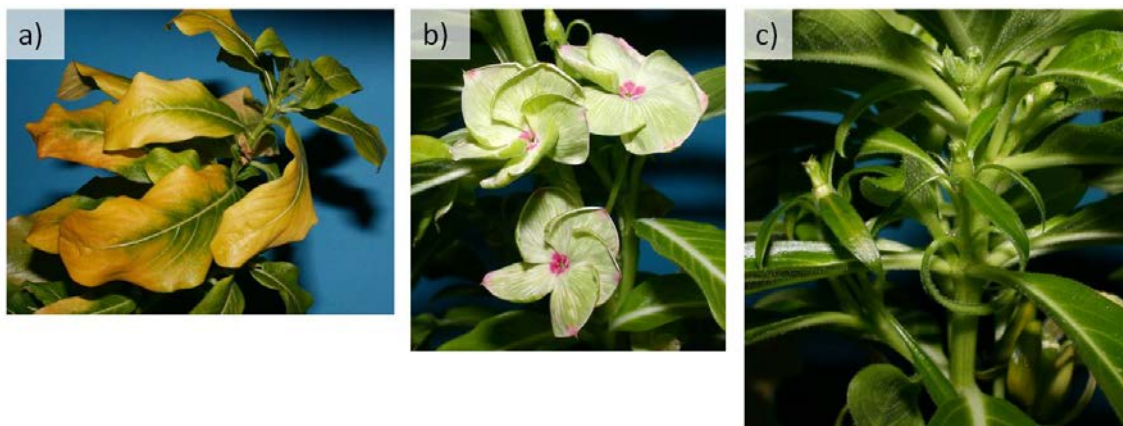


Slika 22. Kvalitativni i kvantitativni grafički prikaz diverziteta 'Ca. P. solani' genotipova eksperimentalno prenetih na ogledne biljke korišćenjem prirodno CPs inficiranih populacija tri *H. obsoletus* asocijacije. Svaki od grafika predstavlja jednu biljnu vrstu korišćenu u eksperimentima inokulacije: *C. arvensis*, *V. agnus-castus*, *C. foetida*, perivinka i vinova loza. Veličina kruga odgovara ukupnom broju izolata detektovanih u replikacijama

odgovarajuće ogleadne biljne vrste (kvantitativni prikaz). Boja polja u okviru kruga odgovara jednoj od tri *H. obsoletus* asocijacije uključene u *tuf-b* epidemiologiju: *ex C. arvensis* (zeleno), *ex V. agnus-castus* (plavo) i *ex C. foetida* (crveno). Površina obojenih polja u okviru krugova odgovara broju različitih MLST genotipova '*Ca. P. solani*' detektovanih u replikacijama date eksperimentalne biljne vrste (kvalitativni prikaz). U okviru njih prikazani su MLST genotipovi detektovanih CPs izolata i broj inficiranih replikacija u zagradi. Pored svakog obojenog polja je prikazan broj inficiranih biljaka/ukupan broj replikacija.

Detektovani CPs izolati umrežavaju tri dualna domaćina: *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* preko asocijiranih *H. obsoletus* populacija koje izuzetno uspešno inokulišu perivinke i ugroženu kulturu, vinovu lozu (Slika 22). Uopšteno gledano na nivou svih eksperimenata inokulacije biljaka, uspešnost prenošenja '*Ca. P. solani*' je bila veoma visoka i to od 66% u slučaju ogleadnih vinovih loza, do 100% inficiranih mladica konopljike i perivinki (Slika 22).

Ispoljavanje simptoma na ogleadnim biljkama je bilo moguće pratiti jedino u slučaju perivinki koje su u eksperimentima inficirane od strane tri *H. obsoletus* asocijacije sa čak 11 od 12 detektovanih MLST genotipova u okviru celog epidemiološkog ogleada (Slike 22 i 23).



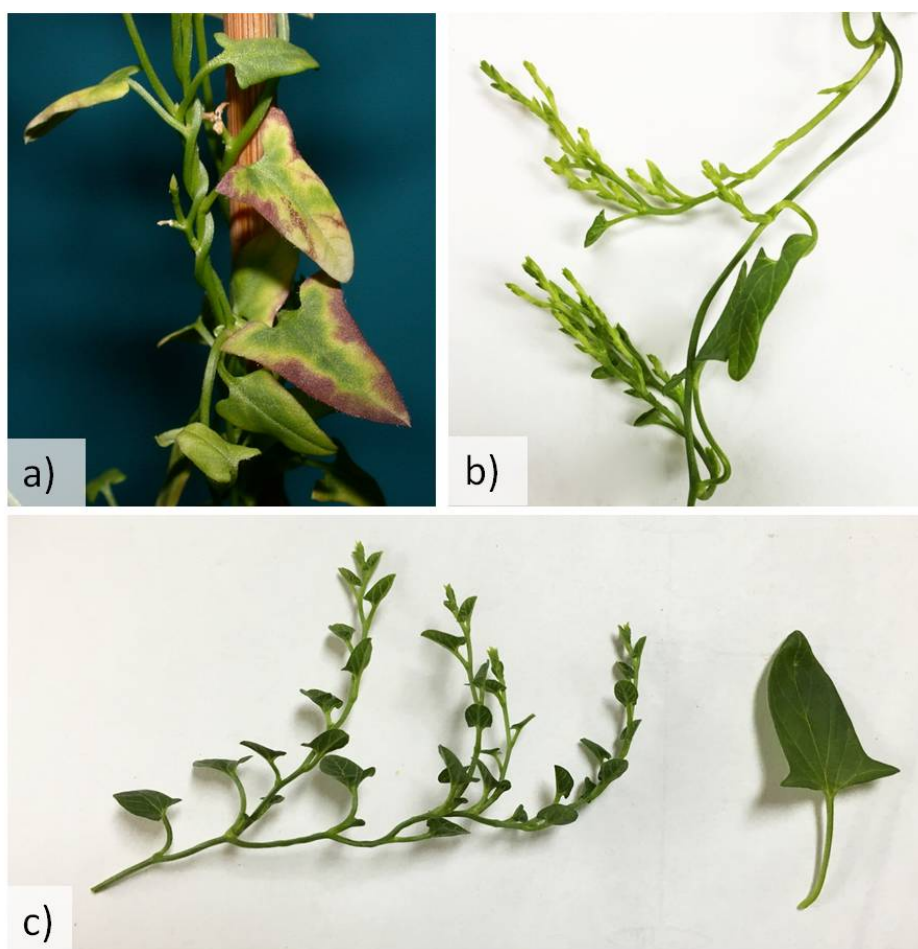
Slika 23. Simptomi eksperimentalno CPs zaraženih perivinki. a) ogleadna perivinka inficirana genotipom *tuf-b/Rqg31/V14* od strane *H. obsoletus* populacije asocijirane sa *C. arvensis* koja ispoljava simptome žutila listova i početak razvoja nekroze listova; b) ogleadna perivinka inficirana genotipom *tuf-b/Rqg31/V14* od strane *H. obsoletus* populacije asocijirane sa *C. arvensis* koja ispoljava simptome formiranja virescenci; c) ogleadna perivinka inficirana genotipom *tuf-b/STOL/V2-TA* od strane *H. obsoletus* populacije

asocirane sa *C. foetida* koja ispoljava simptome formiranja filodija i nekompletno razviće cvetova koji se suše i odumiru u fazi pupoljka.

Ogledne perivinke su pokazivale u različitom stepenu simptome žutila i nekroze listova, odumiranje izdanaka, formiranje virescenci (zelena obojenost ne zelenih delova cveta) i filodija (retrogradna metamorfoza cvetnih organa u listove) (Slika 23). Posebno brzo ispoljavanje simptoma je zabeleženo u slučaju 'Ca. P. solani' prenošenja od strane asocijacije *H. obsoletus ex C. arvensis* kada je kod inficiranih biljaka već nakon tri nedelje počelo pojavljivanje virescenci cvetova (Slika 23b), dok su perivinke inficirane *tuf-b/STOL/V2-TA* izolatom od strane populacija vektora *ex V. agnus-castus* i *ex C. foetida* najkraće opstajale u životu i prosečno nakon 6 meseci većinski odumirale usled progresivnog sušenja biljnih tkiva.

U slučaju oglednih biljaka *C. arvensis* je došlo do promene habitusa, ali samo u dva izolovana slučaja (Slika 24), dok su sve ostale eksperimentalno inficirane biljke bile asimptomatske što odgovara opservacijama iz prirode. U eksperimentima CPs inokulacije poponca od strane sa njim asocirane *H. obsoletus* populacije koji su postavljeni tokom 2012. godine, kod 1/2 tada inficirane biljke genotipom *tuf-b/Rqg31/V14*, došlo je do pojave crvenila i nekroza na rubu listova (Slika 24a) što se više nije ponovilo kroz ostale replikacije.

Tokom 2016. godine su inficirana dva poponca genotipom *tuf-b/STOL/V2-TA* od strane populacije *H. obsoletus ex C. foetida*. Jedna od biljaka je ispoljila od ranije poznat simptom sitnih listova i skraćenih internodija koji podseća na pojavu tzv. veštičije metle (Slika 24b, c). Ova individualna biljka je bila vijabilna svega mesec dana nakon pojave simptoma. Sve eksperimentalne biljke *V. agnus-castus* su nakon inokulacije nastavile normalan razvoj bez pojave simptoma. Biljke *C. foetida* su primarno analizirane iz listova, a zatim i iz korena čime su sve replikacije iskorišćene za analize. Pojava simptoma je na ovim biljkama praćena tokom tri meseca od inokulacije, i u tom periodu pojava simptoma nije zabeležena. Ukupno 24 biljke vinove loze koje su uspešno inficirane sa 'Ca. P. solani' od strane sve tri testirane *tuf-b H. obsoletus* asocijacije, ispoljile su u manjoj ili većoj meri uobičajene simptome zaraze kao što su crvenilo i klobučasto savijanje listova.



Slika 24. Simptomi koje su eksprimirale eksperimentalno CPs zaražene biljke poponca: a) ogleđna biljka poponca inficirana od strane strane *H. obsoletus* populacije asociirane sa *C. arvensis* genotipom *tuf-b/Rqg31/V14* koja ispoljava crvenilo i nekroze na rubu listova; b) i c) ogleđna biljka poponca inficirana od strane strane *H. obsoletus* populacije asociirane sa *C. foetida* genotipom *tuf-b/STOL/V2-TA* koja ispoljava formiranje sitnih listova i skraćivanje internodija.

4.5.2.1 Vektorska sposobnost i genotipovi '*Ca. P. solani*' koje prenosi *H. obsoletus* ex *C. arvensis*

Prirodno inficirane jedinice *H. obsoletus* populacija u asocijaciji sa *C. arvensis* eksperimentalno su prenele na ogleđne biljke čak 11/12 detektovanih MLST '*Ca. P. solani*' genotipova čime se ova asocijacija istakla kao nosilac najvećeg diverziteta patogena. Izuzetan kapacitet prenošenja različitih CPs izolata od strane samo jedne *H. obsoletus* populacije ogleđa se u rezultatima inficiranja eksperimentalnih

perivinki u kojima je detektovano 7 MLST genotipova uz 100% infekciju oglednih biljaka (Slika 22). Nešto manji broj '*Ca. P. solani*' genotipova (5) ova asocijacija vektora je prenela na svoju originalnu biljku domaćina, uz uspešnost inficiranja od 75%. Podjednako uspešno je pomoću jedinki *H. obsoletus ex C. arvensis* izvršena inokulacija i druge dve biljke koje su dualni domaćini drugih populacija vektora, u vidu 100% inficiranih *V. agnus-castus* biljaka i 75% oglednih biljaka *C. foetida*. Jedan CPs izolat je prenet na sva tri domaćina i perivinku, *tuf-b/Rqg31/V4*, dok je u eksperimentalno inficiranoj vinovoj lozi uz *tuf-b/Rqg31* genotip bio prisutan V14 profil. Procenat infekcije eksperimentalnih vinovih loza bio je 66% i dominirao je prethodno pomenuti *tuf-b/Rqg31/V14* MLST genotip uz samo jednu biljku inficiranu sa *tuf-b/BG4560/V2-TA* genotipom. Generalno se može reći da je *Rqg31 stamp* genotip najčešće prenet od strane ove populacije što je u skladu sa prethodno utvrđenom dominantnošću ovog genotipa u *H. obsoletus* populaciji iz Topole (poglavlje 4.4.2, Tabela 8). Ovo može biti posledica korišćenja samo jedne populacije većinski inficirane ovim izolatom koji dominira u poponcu kao izvoru infekcije na ovom lokalitetu.

Veza između asocijacija *H. obsoletus ex C. arvensis* i *ex V. agnus-castus* prethodno je posredno pokazana u studiji *in situ* praćenja '*Ca. P. solani*' epidemiologije u Mediteranu preko genotipova koji istovremeno inficiraju dualne domaćine i asociirane populacije vektora (poglavlje 4.5.1.2). U postavljenim ogledima rezultati su dopunjeni eksperimentalnom potvrdom inokulacije ove dve biljke od strane populacije *H. obsoletus ex C. arvensis* u vidu ukupno 7 CPs izolata od kojih su dva MLST genotipa preneti na oba domaćina: *tuf-b/M5/V4* i *tuf-b/Rqg31/V4*. Na svog originalnog domaćina, *C. arvensis*, ova populacija vektora je prenela i *Rqg31 stamp* genotip u kombinaciji sa V14 *vmp1* profilom, dok je na *V. agnus-castus* on prenešen uz V2-TA tip. Sličan odnos je zabeležen i prema drugom *tuf-b* domaćinu, *C. foetida*, uz dominantno prenošenje *tuf-b/Rqg50* genotipa sa V4 ili V14 *vmp1* profilom. Istim '*Ca. P. solani*' genotipom je inficirana i jedna od dvanaest perivinki izložena ishrani *H. obsoletus ex C. arvensis* (Slika 22).

4.5.2.2 Vektorska sposobnost i genotipovi '*Ca. P. solani*' koje prenosi *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus*

Asocijacija *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus* je primarno testirana u svetlu učešća u '*Ca. P. solani*' epidemiologiji u mediteranskim vinogradima kroz proveru vektorskog potencijala u inficiranju vinove loze. U skladu sa prethodno utvrđenom stopom infekcije oglednih populacija vektora, 10 replikacija je postavljeno koristeći *H. obsoletus* populaciju iz Godinja gde *V. agnus-castus* raste uz sam vinograd, dok je 9 eksperimentalnih vinovih loza izloženo ishrani *H. obsoletus* jedinki sa lokaliteta Bar na kojem konopljika raste na prirodnom staništu bez vinograda u okolini. Adulti pušteni na ogledne biljke su nakon zatvaranja eksperimenata (posle 48h) sakupljeni i u pulovima od po 3 jedinke analizirani na prisustvo '*Ca. P. solani*'. Populacija iz Godinja je uspešno inficirala 9/10 oglednih biljaka što je u skladu sa inficiranošću insekata, tačnije na jedinoj oglednoj vinovoj lozi koja nije inficirana nije bilo ni CPs pozitivnih jedinki (Tabela 12). Ista situacija je zabeležena i u slučaju eksperimentalne populacije vektora iz Bara koja je inficirala 7/9 vinovih loza. Na oba lokaliteta je procenat prirodne infekcije biljaka *V. agnus-castus* bio isti i iznosio 25%, uz prisustvo dva MLST genotipa: *tuf-b/Rqg50/V17* u Godinju i *tuf-b/STOL/V2-TA* u Baru, što ovu biljku nedvosmisleno svrstava u grupu dualnih domaćina zajedno sa *C. arvensis*, *U. dioica* i *C. foetida*.

Tri meseca nakon zatvaranja eksperimenata, sadnice vinove loze su pokazale prve simptome u vidu crvenila i diskoloracije između lisnih nerava. Molekularnim analizama uzorkovanih listova oglednih biljaka utvrđeno je da su sve simptomatske loze uspešno CPs inokulisane (9 biljaka inficiranih vektorima iz Godinja i 7 iz Bara) (Tabela 12). Tri biljke bez simptoma, kao i 12 kontrolnih biljaka koje nisu bile izložene insektima, bile su negativne. Svih 16 '*Ca. P. solani*' izolata su podvrgnuti genotipizaciji kako bi se odredili MLST profili CPs genotipova koje su na loze prenele populacije *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus*. U eksperimentalnim biljkama je ukupno detektovano 6 MLST genotipova i to: *tuf-b/Rpm35/V14* (6 replikacija), *tuf-b/STOL/V2-TA* (5), *tuf-b/Vv24/V14* (2), *tuf-b/Rqg50/V4* (1), *tuf-b/Rqg50/V17* (1) i *tuf-b/Rqg31/V14* (1) (Tabela 12).

Tabela 12. Eksperimentalno prenošenje '*Ca. P. solani*' na vinovu lozu od strane prirodno inficiranih populacija *H. obsoletus ex V. agnus-castus*. Simbol „+“ označava uspešnu inokulaciju, dok se „-“ odnosi na neuspešnu CPs transmisiju na eksperimentalne biljke. Broj pozitivnih *H. obsoletus* uzoraka se odnosi na broj pozitivnih pulova od po 3 individue/broj insekata korišćen u replikaciji.

Lokalitet	broj CPs+/ukupan broj analiziranih uzoraka konopljike	ogledna biljka	<i>H. obsoletus ex Vitex agnus-castus</i>		MLST genotip
			pozitivni	prenošenje	
Godinje	3/12 (<i>tuf-b/Rqg50/V17</i>)	1	2/30	+	<i>tuf-b/Rpm35/V14</i>
		2	3/30	+	<i>tuf-b/Rqg50/V4</i>
		3	0/30	-	-
		4	2/30	+	<i>tuf-b/Rpm35/V14</i>
		5	3/30	+	<i>tuf-b/STOL/V2-TA</i>
		6	4/30	+	<i>tuf-b/Rpm35/V14</i>
		7	2/30	+	<i>tuf-b/Rqg50/V17</i>
		8	2/30	+	<i>tuf-b/Rpm35/V14</i>
		9	2/30	+	<i>tuf-b/Rpm35/V14</i>
		10	3/30	+	<i>tuf-b/Rpm35/V14</i>
Bar	3/12 (<i>tuf-b/STOL/V2-TA</i>)	11	3/30	+	<i>tuf-b/Vv24/V14</i>
		12	4/30	+	<i>tuf-b/Vv24/V14</i>
		13	2/30	+	<i>tuf-b/STOL/V2-TA</i>
		14	3/30	+	<i>tuf-b/STOL/V2-TA</i>
		15	0/30	-	-
		16	2/30	+	<i>tuf-b/Rqg31/V14</i>
		17	3/30	+	<i>tuf-b/STOL/V2-TA</i>
		18	3/30	+	<i>tuf-b/STOL/V2-TA</i>
		19	0/30	-	-

Ogledna populacija *H. obsoletus ex V. agnus-castus* iz Godinja je dominantno prenela MLST genotip *tuf-b/Rpm35/V14* (6/9), dok su jedinice iz Bara većinski inficirale loze genotipom *tuf-b/STOL/V2-TA* (4/6). Insekti iz Godinja su preneli još tri genotipa što ukazuje na prisutan znatno veći CPs diverzitet u odnosu na inicijalnu detekciju (Tabela 12). Genotip *tuf-b/Rqg50/V17* detektovan u prirodno inficiranim biljkama *V. agnus-castus* pored izolata *tuf-b/STOL/V2-TA*, takođe je

prenet na ogledne vinove loze. Većina genotipova (4/6) prenetih u eksperimentima inokulacije na eksperimentalne vinove loze detektovani su i u prirodno zaraženim čokotima u mediteranskim vinogradima (Tabela 12; poglavlje 4.5.1.2, Slika 21,) što jasno potvrđuje vektorsku ulogu *H. obsoletus* asocijacije sa *V. agnus-castus* u epidemiologiji *Bois noir* bolesti vinove loze čime se ova zapostavljena asocijacija vektora vraća u fokus istraživanja bolesti indukovanih 'Ca. P. solani' na području Sredozemlja.

Uspešne infekcije pomoću populacija *H. obsoletus ex V. agnus-castus* su zabeležene i kod ostalih eksperimentalnih biljaka u vidu inficiranja polovine postavljenih *C. arvensis* replikacija, 5/8 oglednih biljaka svog originalnog domaćina *V. agnus-castus* i očekivano najuspešnije prenošenje 'Ca. P. solani' u ogledima inokulacije perivinki (9/12 biljaka) (Slika 22). Jedino neuspešno prenošenje 'Ca. P. solani' na nivou celog epidemiološkog ogleda, odnosi se na inficiranje eksperimentalne biljke *C. foetida* od strane *H. obsoletus* asocijacije *ex V. agnus-castus*. Ova biljka se pokazala kao vrlo osetljiva biljka na variranja temperature i vlažnosti koja se nisu mogla uvek dovoljno kontrolisati jer su kompletni testovi inficiranja biljaka od strane ove *ex V. agnus-castus* asocijacije vektora postavljeni sa populacijama iz Crne Gore što je zahtevalo boravak eksperimentalnih biljaka sa insektima u poljskim friziderima i na prirodnom dnevno/noćnom režimu tokom dela eksperimenta. Iako se ponavljanjem postavki ovog eksperimenta tokom tri godine istraživanja pokušao nadoknaditi broj izgubljenih biljaka i negativnih rezultata, i nakon većeg broja ponavljanja, ni jedna eksperimentalna biljka *C. foetida* nije bila inficirana posle inokulacije insektima poreklom sa *V. agnus-castus*.

Prethodno pokazana interakcija *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i sa njima asociраних *H. obsoletus* populacija (poglavlje 4.5.2.1) potvrđena je i u suprotnom smeru. Isti potencijal uspešnog CPs inficiranja obe biljke domaćina je pokazala i *H. obsoletus ex V. agnus-castus* populacija u vidu 50% zaraženih poponaca MLST genotipovima: *tuf-b/Rqg31/V14* i *stamp* genotipom *Rqg50*, i 60% inficiranih konopljika CPs izolatima *tuf-b/STOL/V2-TA* i *tuf-b/Vv24/V14*. Iako je ogledna populacija *H. obsoletus ex V. agnus-castus* iz Beri imala nisku stopu infekcije (5%), inokulacije 4/5 eksperimentalnih biljnih vrsta su bile veoma uspešne (Slika 22).

4.5.2.3 Vektorska sposobnost i genotipovi '*Ca. P. solani*' koje prenosi *H. obsoletus* ex *C. foetida*

Novoutvrđeni dualni domaćin, *C. foetida*, i sa njom asocirane *H. obsoletus* populacije, značajno su proširili i usložnili epidemiološku sliku kretanja '*Ca. P. solani*'. Uključivanjem u testove unakrsnog prenošenja i *C. foetida* asocijaciju vektora primarno je pokazano podjednako uspešno inficiranje druga dva domaćina, *C. arvensis* i *V. agnus-castus* i to očekivano u većini replikacija MLST genotipom *tuf-b*/STOL/V2-TA. Pored toga, po jedna replikacija oba domaćina je inokulisana Rqg50 *stamp* genotipom. *Stamp* genotip Rqg31 je takođe prenet na oba domaćina i to uz V14 *vmp1* profil na *C. arvensis* i uz V2-TA na *V. agnus-castus* (Slika 22). Imajući u vidu da su MLST genotip *tuf-b*/Rqg31/V14 na ogledne biljke *C. arvensis*, pored ex *C. arvensis* jedinki, prenele i populacije vezane za *V. agnus-castus* i *C. foetida*, može se zaključiti da prisustvo ovog '*Ca. P. solani*' izolata u poponcu u prirodnim uslovima može voditi poreklo i od populacija vektora asociranih sa druga dva dualna domaćina *tuf-b* epidemiologije koji se povremeno neselektivno hrane na ovoj „neodgovarajućoj“ biljci. Sa druge strane, ovaj genotip nije prenet na *V. agnus-castus* i *C. foetida* usled čega se može posumnjati da on opstaje samo u *C. arvensis* kao izvoru inokuluma nezavisno od vektora koji ga prenosi. Inficiranje svog domaćina od strane asocijacije *H. obsoletus* ex *C. foetida* u potpunosti je u skladu sa pojavom MLST genotipa *tuf-b*/STOL/V2-TA kao jedinog CPs izolata prisutnog u prirodno inficiranim biljkama *C. foetida* (poglavlje 4.4.4; Slika 22).

Iako je najniži diverzitet '*Ca. P. solani*' izolata zabeležen u oglednim biljkama kroz koje je utvrđen vektorski potencijal *H. obsoletus* ex *C. foetida* asocijacije, detektovanih 5 MLST genotipova su donekle neočekivani imajući u vidu stabilnu genotipsku homogenost infekcije populacija vektora vezanih za ovog dualnog domaćina na teritoriji Srbije (Slika 22; poglavlje 4.4.4, Tabela 10). Iako je većinski inokulisan MLST genotip *tuf-b*/STOL/V2-TA (60% inficiranih biljaka), pored njega su uspešno preneti i *tuf-b*/Rqg31/V2-TA, *tuf-b*/Rqg31/V14, *tuf-b*/Rqg50/V4 i dva nepotpuno okarakterisana izolata *stamp* genotipa Rqg50.

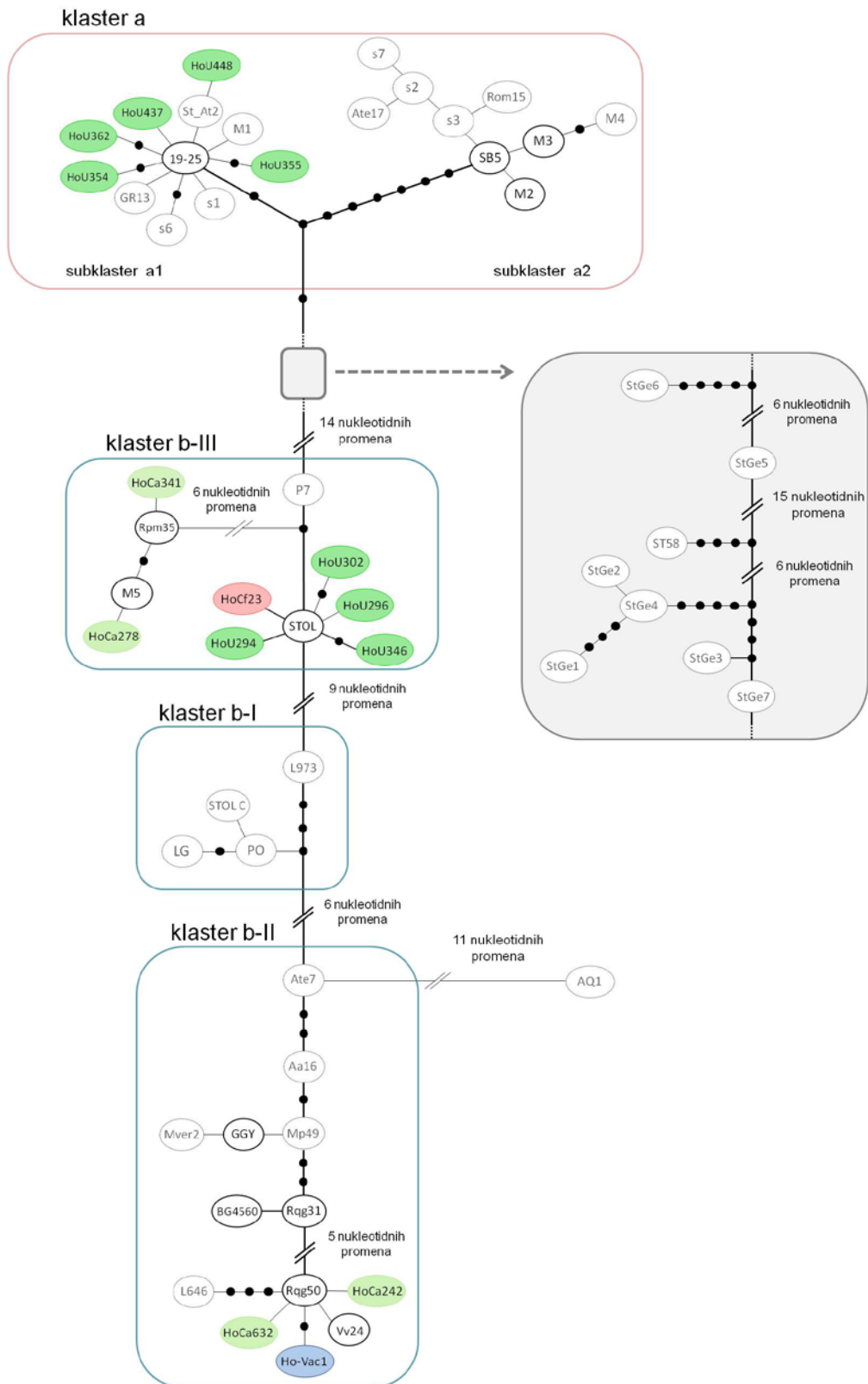
Nalaz koji se istakao u složenoj mreži rezultata epidemiologije *tuf-b* '*Ca. P. solani*' izolata, nedvojbeno je višestruko eksperimentalno dokazana vektorska uloga populacija *H. obsoletus* asociranih sa dualnim domaćinom *C. foetida* (Slika

22). Osim što je prethodno utvrđena visoka stopa infekcije svih analiziranih populacija vektora (Tabela 10), kroz transinfekcijske ogledne se pokazalo da pored inokulacije domaćina i širenja infekcije kroz svoju asocijaciju, raznošenje CPs izolata može realizovati i u okviru epidemioloških puteva koji otpočinju od druga dva dualna domaćina *tuf-b* epidemiologije, *C. arvensis* i *V. agnus-castus*. Posebno značajan rezultat predstavlja uspešna inokulacija sadnica vinove loze i to CPs izolatom *tuf-b/STOL/V2-TA*, koji je na loze uspešno prenela i asocijacija sa konopljike. Pored njega, prenet je i MLST genotip *tuf-b/Rqg31/V14* kojim je loze inficirala takođe i populacija *ex C. arvensis* (Slika 22).

Izolat *tuf-b/STOL/V2-TA*, osim za epidemiologiju *H. obsoletus ex C. foetida* asocijacije (20/32 CPs inokulisane ogledne biljke), može se smatrati dominantnim i za epidemiologiju *ex V. agnus-castus* asocijacije znajući da je više od trećine eksperimentalnih biljaka inficirano upravo ovim genotipom (13/34) (Slika 22). Populacija *H. obsoletus ex C. arvensis* je ovaj CPs genotip prenela jedino na jednu oglednu biljku *V. agnus-castus*, populacija *ex C. foetida* na dve, a insekti *ex V. agnus-castus* na tri eksperimentalne konopljike. U kontekstu '*Ca. P. solani*' epidemiologije na Mediteranu, gde *V. agnus castus* i sa njim asociirane *H. obsoletus* populacije pokreću i raznose CPs izolate, može se zaključiti da eksperimentalna i prirodna infekcija izolatom *tuf-b/STOL/V2-TA*, već detektovana u prirodno inficiranim biljkama *V. agnus-castus* na lokalitetu Bar (poglavlje 4.5.1, Tabela 11, Slika 21), mogu biti posledica ishrane bilo koje od tri testirane *H. obsoletus* asocijacije. Sa druge strane, ogledne biljke *C. foetida* je ovim MLST genotipom inficirala samo sa ovom biljkom asociirana *H. obsoletus* populacija (Slika 22) što uz prethodne nalaze implicira da u okviru ove asocijacije postoji izuzetno stabilna tri-trofičku interakcija patogena, vektora i biljke. Osim što je *H. obsoletus* populacija *ex C. foetida* prenela pomenuti genotip na svaku od 5 vrsta oglednih biljaka u vidu minimum 2 replikacije, on je inficirao gotovo sve analizirane populacije vektora vezane za ovog dualnog domaćina, od istočne Turske do Srbije (Slika 22; Tabela 10).

4.5.3 Genotipski i epidemiološki diverzitet '*Ca. P. solani*' uslovljen biljkama dualnim domaćinima patogena i vektora

Ukoliko bi se četiri *Hyalesthes obsoletus* asocijacije posmatrale kao jedinstven vektor u '*Ca. P. solani*' epidemiologiji, na osnovu prikazanih nalaza (poglavlje 4.5) ova vrsta bi se mogla smatrati najzaslužnijom za disperziju vrlo diverzitetnih CPs izolata u prirodi (Prilog 6). Zbirni rezultati genetičke raznovrsnosti '*Ca. P. solani*' koji objedinjuju: izolate prirodno inficiranih biljaka dualnih domaćina, asociраних *H. obsoletus* populacija i eksperimentalnih biljaka inficiranih od strane populacija vektora asociраних sa *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida*, u svojoj osnovi su u skladu sa centralnom epidemiološkom divergencijom na *tuf-a/tuf-ab* i *tuf-b* puteve CPs prenošenja. Opšta organizacija klastera u okviru TCS mreže koja prikazuje srodnost *stamp* genotipova nije narušena uključivanjem novoopisanih izolata (Slika 25). Od 57 izolata uključenih u konstrukciju genealoške/epidemiološke mreže, njih 27 je detektovano u okviru istraživanja sprovedenih u ovoj studiji, u insektima i biljkama domaćinima na teritoriji jugoistočne Evrope i Turske. Pored 15 novih *stamp* genotipova, 12 detektovanih CPs izolata je prethodno opisano i zajedno sa preostalim 30 referentnih sekvenci preuzeti su iz NCBI banke gena kao već opisani izolati koji potiču iz insekata vektora ili inficiranih biljaka. Očekivano izdvajanje 4 haplogrupe: klaster a (subklasteri a1 i a2), klasteri b-I, b-II i b-III, nisu poremetile nove *stamp* sekvence koje su se nedvosmisleno priključile jednoj od navedenih genetičkih grupa direktno uslovljenih odgovarajućim *tuf*-tipom koji prati dati *stamp* genotip (Slika 25). Duž linije povezivanja izolata *tuf-a/tuf-ab* i *tuf-b* epidemiologije ugrađuje se 7 uzoraka detektovanih u vinovoj lozi poreklom iz Gruzije i jedan genotip (ST58) iz vektora *R. quinquecostatus* (Bordo, Francuska) koji nisu okarakterisani na *tuf* genu (Quaglino *et al.* 2016; Chuche *et al.* 2016). Nijedan od 4 genotipa koji pripadaju klasteru b-I nije nađen u analiziranim uzorcima, što je bilo očekivano jer su ovi genotipovi geografski specifični za region zapadne Evrope. Iako *tuf* gen nije uspešno okarakterisan kod 22/55 detektovanih MLST genotipova, oni se prema genealogiji *stamp* gena jasno svrstavaju u jedan od 3 klastera haplotipske mreže koji sugerišu pripadnost odgovarajućem *tuf*-tipu (Slika 25).



Slika 25. Genealoška mreža *stamp* gena '*Ca. P. solani*' urađena u programu TCS primenom metode statističke parsimonije. U analizu je uključeno ukupno 57 genotipova od kojih su 42 genotipa prethodno opisana (Fabre *et al.* 2011b; Johannesen *et al.* 2012; Aryan *et al.*

2014; Cvrković *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015; Murolo & Romanazzi 2015; Quaglino *et al.* 2016; Chuche *et al.* 2016), dok je 15 *stamp* genotipova po prvi put detektovano tokom istraživanja u ovoj studiji. Trideset poznatih haplotipova koji nisu detektovani u analiziranom uzorku su prikazani u sivim krugovima. Dvadeset sedam haplotipova za koje je utvrđeno prisustvo na teritoriji jugoistočne Evrope i Turske su prikazani: u crnim krugovima u slučaju prethodno opisanih haplotipova ili u obojenim krugovima kod novodetektovanih *stamp* genotipova čija boja odgovara epidemiologiji vezanoj za specifičnog dualnog domaćina: tamno zelena (*U. dioica*), svetlo zelena (*C. arvensis*), plava (*V. agnus-castus*) i crvena (*C. foetida*). Crne tačke predstavljaju nepostojeće ili nesakupljene haplotipove, dok linije koje ih povezuju ukazuju na po jednu nukleotidnu promenu između detektovanih haplotipova u krajnjem nizu povezivanja. U cilju bolje preglednosti grafika, na određenim mestima je umesto prikaza tačaka nepostojećih ili nepoznatih haplotipova naveden tačan broj promena do sledećeg genotipa.

Epidemiološki posebno značajne nalaze u okviru analiziranog seta uzoraka predstavljaju izolati MLST genotipova koji nose novoopisane *stamp* haplotipove, od kojih su dva izolata uspešno okarakterisano na sva tri gena (*tuf-b*/HoCa242/V4 i *tuf-b*/HoCa278/V14, oba iz *H. obsletus* asocijacije sa poponcem) (Prilog 6). Za ostale genotipove se njihova pripadnost epidemiologiji (*tuf-a/tuf-ab* ili *tuf-b*) može naslutiti isključivo kroz genealošku mrežu *stamp* gena (Slika 25). Pored 19-25, SB5, M2 i M3 genotipova koji učestvuju u zatvorenoj epidemiološkoj mreži vezanoj za *U. dioica*, u subklaster a1 koji divergira od genotipa 19-25, priključuje se 5 novih *stamp* genotipova detektovanih u populacijama *H. obsoletus ex U. dioica*, čime se sugeriše mogućnost njihove pripadnosti *tuf-ab* tipu izolata (Slika 25; Prilog 6). Iznenadjući nalaz izolata *tuf-b* tipa u okviru epidemiologije vezane za koprivu je razbijen kroz dva kastera u haplotipskoj mreži: b-II i b-III. Četiri nova *stamp* genotipa detektovana u populacijama *H. obsoletus ex U. dioica* su se uključili u klaster b-III ukazujući na do sada nepoznatu intenzivnu divergenciju STOL genotipa (Slika 25).

Upliv izolata u suprotnom smeru, odnosno *stamp* genotipova *tuf-a/tuf-ab* tipa u *tuf-b* epidemiološke puteve, nije zabeležen (Prilog 6). Svih 6 novodetektovanih *stamp* genotipova u okviru epidemioloških puteva koji otpočinju od *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* kao dualnih domaćina, uključili su se u b-II i b-III klastere unutar haplotipske mreže što ukazuje na njihovu pripadnost *tuf-b* epidemiologiji (Slika 25). Novoopisani genotipovi HoCa632 i HoCa242 detektovani

u asocijaciji *H. obsoletus ex C. arvensis* su se uključili u klaster b-II nadograđivši se direktno na genotip Rqg50. Ovoj haplogrupi se priključio i novi genotip Ho-Vac1 poreklom iz *H. obsoletus ex V. agnus-castus* populacije (Slika 25; Prilog 6). Na STOL genotip u okviru klastera b-III, pored 4 novoopisana *stamp* genotipa iz *H. obsoletus* asocijacije sa koprivom, priključio se i genotip HoCf23 pronađen u asocijaciji *H. obsoletus ex C. foetida*. U isti klaster, samo na *stamp* genotip Rpm35 nadograđuju se i genotipovi: HoCa341 direktno, i HoCa278 preko *stamp* genotipa M5 (Slika 25). Svaki od novoopisanih *stamp* genotipova detektovanih u okviru *H. obsoletus* populacija asociiranih sa specifičnim dualnim domaćinom, prisutan je bio u analiziranom uzorku u vidu samo jednog izolata čime se može zaključiti da su ovi genotipovi retki i specifični za asocijacije u kojima su i detektovani.

5. Diskusija

Poslednjih godina, nekoliko studija je ukazalo na specijalizaciju životnog ciklusa cikade *Hyalesthes obsoletus* prema biljkama domaćinima i moguće posledice po epidemiološke cikluse i puteve prenošenja 'Ca. P. solani' (Langer & Maixner 2004; Sharon *et al.* 2005; Johannesen *et al.* 2008; 2012; Imo *et al.* 2013; Kosovac *et al.* 2013; Maixner *et al.* 2014). Ove studije su ukazale na ekološku specijalizaciju formiranja *host rasa* na severnim granicama areala *H. obsoletus* (Imo *et al.* 2013), moguću kriptičnu divergenciju populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima, kao i da ovaj takson može predstavljati kompleks sastavljen od morfološki sličnih vrsta (Kosovac *et al.* 2016b). Kompleksna genetička proučavanja populacija u asocijaciji sa četiri biljke domaćina, bazirana na analizi mitohondrijskih i nuklearnih markera, potvrdila su jasnu genetičku separaciju populacija prema biljkama domaćinima na području jugoistočne Evrope i Mediterana. Dobijeni rezultati su nedvosmisleno ukazali na postojanje tri genetička entiteta sa specifičnim bioekološkim osobenostima, čime se dovodi u pitanje taksonomski integritet cikade *H. obsoletus* kao jedinstvene vrste. Genetička diferencijacija je jasno ustanovljena za populacije ove cikade u asocijaciji sa (1) *C. arvensis* i *U. dioica*, (2) *V. agnus-castus* i (3) *C. foetida*. Diferencijacija zabeležena među ovim asocijacijama je znatno izraženija od ranije registrovane segregacije populacija u asocijaciji sa *C. arvensis-U. dioica* na granici areala u jugozapadnoj Nemačkoj (Johannesen *et al.* 2008; Imo *et al.* 2013) ili populacija u asocijaciji sa *Salvia sclarea* i *Lavandula angustifolia* u zapadnom Mediteranu (Chuche *et al.* 2018) koje obe predstavljaju skorašnji evolutivni događaj. Specijalizacija *H. obsoletus* populacija prema biljkama domaćinima na Balkanu i u istočnom Mediteranu ukazuje na nivo diferencijacije koji odgovara kriptičnim vrstama, sa dalekosežnim posledicama na širenje i epidemiologiju bolesti uzrokovanih 'Ca. P. solani'.

Promene u populaciono-genetičkoj strukturi insekata posebno dobijaju na značaju kada se detektuju unutar populacija ekonomski značajnih vrsta. U ovom slučaju, otkriće kriptične diferencijacije populacija poznate štetočine, kao što je cikada *H. obsoletus*, otvara brojna pitanja posledica po poljoprivrednu proizvodnju,

fitosanitarnu regulativu i strategije primene mera kontrole ovog organizma (Kabis & Khush 1988; Via 1990; McPheron 2000; Hunter 2002; Endersby *et al.* 2006; Tsagkarakou *et al.* 2007). Uzimajući u obzir da su fitoplazme na listama regulisanih fitokarantinskih patogena, istraživanja biljaka domaćina koje cikada koristi u svom životnom ciklusu je veoma značajno jer njihove interakcije direktno utiču na disperziju i epidemiologiju patogena (Nickel 2003; Weintraub & Jones 2010). Kada se govori o složenim odnosima koje sa biljkama ostvaruju ove pretežno stenofagne vrste, treba uzeti u obzir i prisustvo fenomena *geografske monofagije*. U ovom slučaju, neke cikade su usko vezane za jednu biljnu vrstu, ali se njihova uska asocijacija sa domaćinom menja u različitim geografskim područjima njihovog rasprostranjenja (Drosopoulos 1999; Nickel 2003). Imajući u vidu složenost interakcija između cikada i biljaka domaćina, nepreciznost prilikom sakupljanja materijala za studije je glavni uzrok neadekvatnog povezivanja insekata i biljaka što može usmeriti istraživanja u pogrešnom pravcu. Pažljivo uzorkovanje jedinki sa pojedinačnih biljaka ili manjih monodominantnih vegetacijskih sklopova je preduslov je za sagledavanje interakcija između cikada i biljaka određenog ekosistema (Nickel 2003). Kada se u ove dvosmerne relacije uključi fitoplazma, odnosi se izdižu na nivo tritrofičkih relacija koje se mogu sagledati samo detaljnim istraživanjima vektora, patogena i biljaka dualnih domaćina. Ekološke relacije različitog nivoa koje cikade ostvaruju kroz asocijacije sa biljkama domaćinima, od suštinskog su značaja za distribuciju patogena, potencijal širenja i stepen uticaja bolesti koje fitoplazme izazivaju.

Najadekvatniji pristup u istraživanju areala vektora i predviđanju uticaja fitoplazmatičnih bolesti koje vektor prenosi u agroekosistemu, predstavljaju temeljna istraživanja biljaka koje u okviru svojih prirodnih staništa okružuju obradive površine. Upravo su one centralna tačka u epidemiologiji bolesti izazvanih stolbur fitoplazmom ('*Ca. P. solani*'), jer kao domaćini vektoru, fitoplazmi ili oboma (dualni domaćini) one predstavljaju izvor širenja ili prepreku u širenju biljnih bolesti. U tom kontekstu, promene u preferentnosti populacija vektora prema biljkama domaćinima narušavaju dotadašnju mono-, oligo- ili polifagiju insekta. Ovo može pokrenuti proces segregacije populacija prema novom domaćinu, koje u kasnijoj fazi, posle akumulacije bio-ekoloških i specifičnih

genetičnih promena ulaze u proces simpatričke specijacije kao klimaksa genotipske i bihevioralne diferencijacije (Berlocher & Feder 2002; Drès & Mallet 2002; Mullen & Shaw 2014). Na tom evolutivnom putu populacije prolaze kroz niz taksonomski nejasnih stanja koja se nazivaju *ekološkim rasama* ili *biotipovima* u okviru kojih ekološki adaptirane populacije opstaju prilagođene novonastalim promenama biotičkih faktora.

5.1. Genetička divergencija populacija *H. obsoletus* kao posledica specijalizacije prema biljci domaćinu

Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije započeta su preliminarnim nalazima populacione strukture *H. obsoletus* asocijacija na području jugoistočne Evrope (Kosovac *et al.* 2013; 2014) u cilju testiranja poznatih asocijacija sa biljkama dualnim domaćinima (*C. arvensis*, *U. dioica*) i definisanju statusa zapostavljenih ili novih domaćina (*V. agnus-castus*, *C. foetida*). Literaturni podaci o biologiji i populacionoj genetici ovog vektora bili su uglavnom vezani za ekološke interakcije zapadnoevropskih populacija *H. obsoletus* asociiranih sa *C. arvensis* i *U. dioica* uz karakterizaciju 'Ca. P. solani' u biljkama i vektoru (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Imo *et al.* 2013; Johannesen & Riedle-Bauer 2014). Dosadašnje publikacije daju donekle uvid u specifične životne cikluse populacija asociiranih sa različitim domaćinima, znake ekspanzije vektora u asocijaciji sa koprivom, formiranja *host rasa* na severu areala i nagoveštaje promene genetičke strukture kod populacija u Izraelu (Johannesen *et al.* 2008). Ovaj nalaz uz skromne istočnomediteranske CPs epidemiološke studije (Sharon *et al.* 2005; 2015) ukazuje da tritrofički odnosi u kojima učestvuje *H. obsoletus* imaju znatno širi kontekst u kome je centralni događaj genetička divergencija populacija ove cikade asociiranih sa različitim biljkama domaćinima.

Genetička divergencija registrovana kod populacija *H. obsoletus* nameće pitanje da li se u okviru ovog taksona radi o kompleksu vrsta sa elementima kriptičke specijacije (Kosovac *et al.* 2016b). Realizovana istraživanja su jasno ukazala na postojanje tri genetička entiteta koji narušavaju jedinstveni taksonomski okvir ove vrste (Kosovac *et al.* 2018). Tri makromorfološki identične *H. obsoletus* metapopulacije asociirane sa (1) *C. arvensis* i *U. dioica*, (2) *V. agnus-*

castus i (3) *C. foetida*, pokazuju znatno viši stepen evolutivne populaciono-genetičke segregacije u odnosu na *host rase* (Imo *et al.* 2013; Chuche *et al.* 2018) i neophodno je njihove relacije izdignuti iznad ekoloških okvira. Između navedenih *H. obsoletus* metapopulacija postoje (1) stabilna mitohondrijska genetička divergencija populacija na gotovo celom području rasprostranjenja vrste, od istočne Turske do Francuske, bilo da su u pitanju populacije u široj simpatriji ili u struktnoj sintopiji i (2) nuklearni (mikrosatelitski) genetički diverzitet koji podržava mitohondrijsku genealogiju sugerisanjem tri genetička klastera (Evanno $\Delta K(3) = 803.72$) u koje se svaka od analiziranih populacija klastrira uz podršku od >90%. Prosečne genetičke distance od 1.1% do 1.5% između tri detektovane *H. obsoletus sensu lato* metapopulacije poredive su sa stepenom razlika sa morfološki najsirođnijom vrstom *Hyalesthes thracicus* (2.1-3.3%) približavaju kriptičkoj specijaciji detektovane procese genetičke diferencijacije između analiziranih *H. obsoletus* asocijacija. Sprovedena istraživanja su nedvosmisleno pokazala da je genetička divergencija unutar vrste *H. obsoletus* u korelaciji sa specifičnom biljkom domaćinom, što je u suprotnosti sa opšte prihvaćenim stanovištem da se radi o polifagnoj vrsti. U literaturi je polifagnošć bila jedna od glavnih osobenosti kojom se objašnjavala sposobnost *H. obsoletus* da vrši akviziciju i prenošenje fitoplazme na različite biljne vrste širom areala. Detektovane populaciono-genetičke linije su međutim, jasno asocijirane sa specifičnim biljkama domaćinima od kojih su *C. arvensis*, *U. dioica* i *V. agnus-castus*, bile poznate u literaturi, dok je preferentnost *H. obsoletus* populacija prema *C. foetida* u jugoistočnoj Evropi i Maloj Aziji kao novi nalaz, doveo do značajnog pomaka u sagledavanju biologije, ekologije i epidemiologije bolesti izazvanih stolbur fitoplazmom.

5.1.1 Genetička homogenost *H. obsoletus* u asocijacija sa *C. arvensis* i *U. dioica* u jugoistočnoj Evropi

Genetički odnosi između *H. obsoletus* populacija asocijiranih sa tradicionalnim domaćinima, *C. arvensis* i *U. dioica*, su kompleksni na teritoriji jugoistočne Evrope zbog bliskih geografskih veza sa malom Azijom kao pretpostavljenim centrom diverziteta roda *Hyalesthes* (Hoch & Remane 1985). Nedostatak divergencije između populacija vezanih za *C. arvensis* i *U. dioica*

sugeriše da *H. obsoletus* populacije mogu biti prisutne na obe biljke tokom životnog ciklusa. Genetička homogenost ovih asocijacija je potvrđena kroz sve dobijene parametre diverziteta, filogenetske analize i testiranja diferencijacije populacija (haplotipski diverzitet i genealogija mtDNK, theta (θ) parametar, indeks fiksacije, Neiove distance, populaciona struktura i klastriranje zasnovano na mikrosatelitima, bogatstvo alela, očekivana heterozigotnost i koeficijent inbridinga). U kontekstu ekspanzije *H. obsoletus* asocijacija sa koprivom, koja je detektovana u analiziranom setu uzoraka, pored nedvosmislenih parametara Fuovog i Tadžiminog testa, važno je istaći i negativne vrednosti koeficijenta inbridinga (*Fis*). One ukazuju na prekobrojnost alela, što je očekivano kod populacija koje su prošle kroz skorašnju ekspanziju (Holsinger 2012), i prisutne su u jednoj populaciji vektora asociiranoj sa *C. arvensis* kao i u 4 populacije vezane za *U. dioica* (Tabela 4). Širenje *H. obsoletus* populacija asociiranih sa koprivom je prethodno dokazano na teritoriji Nemačke i Austrije, što je za posledicu imalo povećanu stopu '*Ca. P. solani*' infekcije i epidemijsko širenje *Bois noir* bolesti vinove loze u poslednjih dvadesetak godina na navedenom području (Johannesen *et al.* 2008; Johannesen & Riedle-Bauer 2014; Aryan *et al.* 2014). Populaciono-genetički parametri vektora i karakterizacija '*Ca. P. solani*' u insektima vektorima i biljkama, ukazala je na korelaciju između prodora populacija sa koprive na sever i njihovu ekspanziju u vinogradima uz povećanu incidencu '*Ca. P. solani*' infekcije (Johannesen *et al.* 2012; Imo *et al.* 2013; Johannesen & Riedle-Bauer 2014).

Kada su pitanju populacije vektora *ex C. arvensis* i *ex U. dioica* u zapadnoj Evropi, mitohondrijski haplotip AB zauzima centralno mesto od koga divergiraju evropske „zapadna” BB i „istočna” EC haplogrupa (Johannesen *et al.* 2008; 2012; Johannesen & Riedle-Bauer 2014) što je potvrđeno i u istraživanjima sprovedenim u jugoistočnoj Evropi. Razvoj *host rasa* zabeležen je u okviru zapadnoevropske mtDNK haplotipske grupe AB, i prisutan je u područjima skorašnjeg širenja vektora u Nemačkoj i Francuskoj (Imo *et al.* 2013; Maniyar *et al.* 2013). Nasuprot tome, na teritoriji jugoistočne Evrope na kojoj su prisutni mtDNK haplotipovi „istočne” genetičke linije (EC grupa) može se zaključiti da u ovom delu areala *H. obsoletus* populacije ne formiraju *host rase* na nivou asocijacija sa poponcem i koprivom. Signal diferencijacije koji podseća na *host rase* je detektovan samo na

jednom sintopskom lokalitetu (Podgorica, Crna Gora) (poglavlje 4.3.3, Slika 17). Ovakav vid populaciono-genetičke divergencije je karakterističan za rubove areala gde sredinski biotički i abiotički faktori utiču na proces selekcije i podstiču kod populacija dalja razdvajanja, primarno na nivou genotipova. Imajući u vidu da individue ovih dveju sintopskih populacija pripadaju geografski razdvojenim genetičkim grupama, AB u slučaju poponca i EC u slučaju koprive, zabeleženo stanje može biti i posledica filogeografskog uticaja, kao u vinogorjima Austrije (Johannesen & Riedle-Bauer 2014), a ne toliko specijalizacije prema biljci domaćinu.

5.1.2 Asocijacija *H. obsoletus* sa *V. agnus-castus*

Za komparativnu analizu populacija *H. obsoletus* asociiranih sa *V. agnus-castus*, korišćeni su primerci sakupljeni na teritoriji Crne Gore i Grčke. Značaj ovih populacija vektora potrebno je dodatno istražiti duž obale mediteranskog basena gde je njeno prisustvo očekivano, ali i na osnovu dostupne literature poznato kao prethodno potvrđeno za Dalmaciju (Horvath 1891), Izrael (Sharon *et al.* 2005), Tursku (Hoch & Remane, 1985) i Bosnu i Hercegovinu (Đurić *et al.* 2017). Jedini podaci koji prethode rezultatima istraživanja disertacije po pitanju ove asocijacije potiču iz Izraela i svrstali su konopljiku u grupu domaćina vektora *H. obsoletus* (Sharon *et al.* 2005; 2015).

Na osnovu rezultata populaciono-genetičkih analiza *H. obsoletus* asocijacije sa *V. agnus-castus* na Balkanskom poluostrvu, ističu se dve geografski diferencirane haplogrupe genealoški povezane haplotipom η M: grčka haplogrupa koja divergira od YM i crnogorska sa centralnim haplotipom ZN. Nedvosmisleno klastriranje svih balkanskih haplotipova asociiranih sa konopljikom u jedinstvenu genetičku grupu sa geografskom podstrukturom, narušava neočekivana genealoška i filogenetska bliskost izraelske populacije *H. obsoletus ex V. agnus-castus* koja se klastrira sa populacijama vezanim za *C. foetida*. Međutim, Bajesova analiza individualnog i populacionog klastriranja procenjenog na osnovu mikrosatelita, identifikuje primerke iz Izraela kao pripadnike odgovarajuće asocijacije svog *a priori* domaćina, a zatim na dubljem nivou kao srodne sa grčkim jedinkama iste asocijacije (poglavlje 4.3.2, Slika 16). Dobijeni rezultati ukazuju na

proces prelaska na novog domaćina, i dalje diverzifikacije među ovim populacijama. Ovi procesi su se najverovatnije odigrali na teritoriji Bliskog istoka i bazirano na dostupnim i obrađenim podacima moglo bi se pretpostaviti da se fenomen promene domaćina odigrao u pravcu prelaska populacija iz asocijacije sa *C. foetida* ka asocijaciji sa *V. agnus-castus*. Međutim, treba uzeti u obzir da je prelazak na novu biljku veoma zahtevan proces za svakog fitofagnog insekta jer su fitohemijske barijere često neosvojiva prepreka za stabilizaciju populacija i dostizanje ravnoteže (Bernays & Chapman, 2007). Populacije koje su prošle *host shift* nastavljaju evoluciju na dva načina koji teku putem istog procesa populacionog udaljavanja koji u krajnjoj instanci vodi ka statusu vrste. Ukoliko su ancestralna i nova biljka domaćin prisutne na datom staništu (geografskom prostoru) populacije insekta ih mogu simultano koristiti i trenutno usvojiti obrazac ponašanja polifaga koji će se razvijati ka divergenciji i udaljavanju dveju asocijacija ili potpunom napuštanju polazišnog domaćina. Ukoliko je promena koja je dovela do odabira novog domaćina takva da onemogućava populacije da simultano koriste i izvornog domaćina, makar i povremeno, to se može veoma rano detektovati kroz promene adaptivne vrednosti vezane za biljku domaćina što je slučaj kod *H. obsoletus* host rase asociiranih sa *C. arvensis* i *U. dioica* (Via 1990; Bernays & Chapman 2007; Imo *et al.* 2013; Maixner *et al.* 2014; Chucho *et al.* 2018). Imajući ovo u vidu postoji mogućnost da sakupljanjem *H. obsoletus* individua koje na osnovu preferentnosti prema biljci, bihevioralno pripadaju jednom domaćinu, ali prema genetičkim karakteristikama pripadaju drugim asocijacijama što je njihova reliktna evolutivna osobina.

5.1.3 Asocijacija *H. obsoletus* sa *Crepis foetida*

Asocijaciju *H. obsoletus* sa *C. foetida* karakterišu (1) izuzetno brojne populacije, (2) populaciono-genetička stabilnost na širokom prostranstvu od istočne Turske do Dunava i Save na Balkanskom poluostrvu sa niskom stopom haplotipskog diverziteta koncentrisanog oko JH haplotipa, (3) izuzetno visoka stopa '*Ca. P. solani*' infekcije jedinki i do 80%, (4) inficiranost specifičnim '*Ca. P. solani*' MLST genotipom *tuf-b*/STOL/V2-TA u 83% okarakterisanih izolata i (5) asimptomatsko prisustvo '*Ca. P. solani*' u *C. foetida*.

Iako je analiziran mali broj primeraka iz Anatolije (Erzindžan i Kirşehir, Turska), dobijeni rezultati su ukazali na prisustvo asocijacije *H. obsoletus* sa *C. foetida* na istoku areala. Prvi podaci o prisustvu *H. obsoletus* u Turskoj navode *Vitex* sp. kao biljku domaćina (Prilog 1; Hoch & Remane 1985). Güclü i Ozbek (1988) su saopštili asocijaciju *H. obsoletus* sa *C. arvensis* iz okoline Erzuruma, (istočna Anatolija) koji je udaljen oko 150 km istočno od Erzindžana odakle su analizirani primerci u ovoj studiji. Na lokalitetu Erzindžan sintopski su registrovane *H. obsoletus* populacije asociirane sa *C. foetida* i sa *C. arvensis*. Prisustvo *H. obsoletus* u asocijaciji sa *C. foetida* je potvrđeno i na lokalitetu Kirşehir (centralna Anatolija) što ukazuje na široko rasprostranjenje ovih populacija na teritoriji Turske.

Mnoge genetičke osobenosti populacija *H. obsoletus ex C. foetida* asocijacije sugerišu na izražen stepen genetičke udaljenosti od ostalih asocijacija: (1) nizak broj privatnih alela koji ukazuje na zatvorenost ove metapopulacije i nizak broj migranata (Szpiech & Rosenberg 2011), (2) pad u bogatstvu alela u evropskim populacijama u odnosu na populaciju iz Turske što implicira na napuštanje ancestralnog područja na bliskom istoku ukazujući na Malu Aziju kao centar porekla vrste *H. obsoletus* (Johannesen *et al.* 2008) i (3) niske vrednosti heterozigotnosti u poređenju sa druge dve *H. obsoletus* genetičke linije, što se može pripisati procesima inbridinga i genetičkog drifta kao posledice ekspanzije populacija ka zapadu.

Rezultati koji se tiču '*Ca. P. solani*' detekcije i karakterizacije u prirodno inficiranim biljkama *C. foetida*, asociiranim *H. obsoletus* populacijama i eksperimentalno zaraženim biljkama, jasno ukazuju da se radi o veoma potentnom vektoru koji verovatno prednjači u epidemiologiji *stolbur fitoplazme* u ovom delu Evrope, ne samo u kontekstu bolesti koju izaziva na vinovoj lozi, već i u prenošenju na druge kulture podložne infekciji i razvoju simptoma. Visoka brojnost populacija na poponcu ili koprivi, koje su kao korovske biljke često prisutne u vinogradima zapadne Evrope, ne predstavlja iznenađenje. Međutim, izuzetno visoka brojnost populacija ove cikade asociiranih sa *C. foetida* na prirodnim staništima koja su najčešće ruderalne ili degradirane površine u sukcesiji, govore o uskoj povezanosti insekta i biljke, koja prevazilazi prepostavku oportunističkog ponašanja cikada prema biljkama domaćinima koje su bogate azotom jer rastu na obradivom

zemljištu (Olmstead *et al.* 1997). Homogenost u infekciji *C. foetida* i asociranih *H. obsoletus* populacija sa CPs genotipom *tuf-b/STOL/V2-TA*, takođe se može tumačiti kao stabilna interakcija na drugom trofičkom nivou, jer je jedini inficirani primerak iz istočne Turske (Kirşehir) takođe nosio upravo ovaj genotip.

5.2. Taksonomski status *H. obsoletus*: potreba za integrativnim pristupom

Detaljna revizija južnopalearktičkog roda *Hyalesthes*, bazirana na kladističkim analizama, ukazala je na postojanje 5 monofiletičkih grupa unutar kojih vrste pokazuju visok stepen morfološke sličnosti (Hoch & Remane 1985; Hoch 1986b; Remane & Hoch 1986). Uprkos tome, sve 33 vrste roda *Hyalesthes* se mogu nedvosmisleno identifikovati na osnovu strukture genitalija mužjaka. Jasna razlika u strukturi se vidi čak i u slučaju izuzetno sličnih i srodnih vrsta kao što su *H. obsoletus* i *H. thracicus* (Hoch & Remane 1985). U ovom slučaju jasnu razliku u genitalnoj morfologiji prati genetička divergencija od 2.6% (3.6% na genskom regionu *COI-COII*) što ukazuje na izuzetno bliske ancestralne odnose ovih taksona i njihovo skorašnje razdvajanje. Nešto niže vrednosti genetičke diferencijacije zabeležene su između analiziranih primeraka populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima unutar vrste *H. obsoletus* uz detektovanu haplotipsku divergenciju od preko 2.4% što svedoči o intenzivnim procesim diverzifikacije koji su se verovatno odigrali tokom serije Kvaternernih glacijalnih ciklusa (Hewitt 1996; 1999).

Relacije detektovane između tri *H. obsoletus* metapopulacije ukazuju na odvijanje procesa simpatričke specijacije u kojoj se evolucija odvija na populacionom nivou unutar postojeće vrste uz odsustvo geografske izolacije. Jasna genetička i bio-ekološka segregacija populaciono-genetičkih grupa uslovljenih odabirom biljke domaćina, između kojih odsustvuje protok gena, ukazuju na bliskost konceptu „operativne” vrste koji podrazumeva postojanje bioloških, ekoloških i genetičkih razlika populacija na minimum dva simpatrička lokaliteta (Berlocher & Feder 2002). Analizom *H. obsoletus* populacija sa sedam sintopskih lokaliteta, u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima pokazana je stabilna

genetička divergencija čime morfološke razlike fenotipa postaju poslednji korak pred statusom različitih vrsta. Zabeleženi stepen segregacije između tri opisane metapopulacije sugeriše da je dosadašnji taksonomski koncept ove vrste neodrživ. Promena u percepciji vrste *H. obsoletus* kao kompleksa vrsta podržava uveliko zapostavljen mehanizam morfološke statičke kladogeneze (engl. *morphologically static cladogenesis*), odnosno diverzifikacije vrsta bez fizičkih promena jer morfologija ne ide nužno u korak sa specijacijom (Bickford *et al.* 2007). Većina vrsta koje su u kriptičkom statusu su proizašle iz simpatričke specijacije koja je toliko skorašnja da morfološki karakteri ili druge fenotipske osobine još uvek nisu evoluirale (Bickford *et al.* 2007; Saez & Lozano 2005).

Kao najpoznatiji i najuspešniji vektor '*Ca. P. solani*', *H. obsoletus* dominira u epidemiološkim studijama ovog biljnog patogena, dok su ekologija i taksonomija same vrste, slabo istražene. Jedina studija koja se bavila pitanjem sistematike je doktorska teza prof. dr Hannelore Hoch koja kroz svoj istraživački rad nije uspela da dođe do tipskog primerka ove vrste uprkos višestrukim pregledima evropskih entomoloških zbirki i prateći literaturne tragove deponovanog materijala čime je s pravom donešen zaključak da je tip najverovatnije izgubljen (Hoch & Remane 1985). Međutim, na osnovu informacija koje prate dostupne jedinice tipske serije, može se zaključiti da je *H. obsoletus* opisan iz južne Francuske (*France mérid. (Grenier), Chambéry (Cartereau)*) bez navođenja podataka sa koje biljke primerci potiču. Pored toga, tipski primerak jedinog *H. obsoletus* sinonima, vrste *Liorhinus albolimbatus* Kirchbaum, 1868 (Fieber 1872), opisane iz Dalmacije je takođe najverovatnije izgubljen (Hoch & Remane 1985). Pripisivanje tipskog primerka *H. obsoletus* nekoj od asocijacija bi bilo veoma špekulativno, ali znajući da su na području tipskog lokaliteta prisutne sve četiri biljke domaćina (<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>) genetičke analize arhiviranog suvog materijala koji potiče sa juga Francuske bi bile veoma značajne jer taksonomska i nomenklatura pitanja vezana za status vrste *H. obsoletus* se ne mogu stabilizovati bez analize tipskog materijala. U slučaju kada je tipski materijal izgubljen, a stabilizacija taksonomskog statusa neke vrste neophodna, naročito kada se radi o kriptičkim vrstama od ekonomskog značaja, Međunarodni Kodeks Zoološke Nomenklature (engl. *International Code of Zoological Nomenclature*, ICZN) daje

jasne smernice o uspostavljenju novog tipa (*neotypus*), prema uslovima članka broj 75 Kodeksa.

5.3. Biogeografska istorija *H. obsoletus*

Narušavanja genetičke strukture vrsta, slična međupopulacionoj divergenciji koja se razvija unutar vrste *H. obsoletus*, nisu retkost u fauni insekata umereno kontinentalne Evrope. Promene u populaciono-genetičkoj strukturi vrsta su najčešće posledica sredinskih promena koje su se odigrale tokom poslednjih 2.6 miliona godina. Genetičke promene unutar vrsta su rezultat naizmeničnih razdvajanja populacija, tokom njihovog kretanja prema glacijalnim refugijumima i prostornog sabijanja na jugu tokom perioda glacijacija, i rekolonizacija dostupnih severnih staništa tokom interglacijalnih perioda (Hewitt 1996). Periodi glacijacija u poslednjih 2.6 miliona su dovoljno dugo trajali da bi došlo do akumulacije genetskih promena između razdvojenih populacija. Insekti su poznati po svojoj izraženoj sposobnosti visoke disperzije i kada njihove populacije podlegnu pritisku promene staništa dva scenarija se mogu odigrati: (1) nestanak vrste (ekstinkcija) ili (2) specijacija u izolovanim refugijumima prema ostrvskom modelu evolucije i kasnije asortativno parenje u novokoloniziranim staništima nakon povlačenja leda (Moritz *et al.* 2000; Knowles 2001; Coope 2004).

Centralno-atlantska ostrva (Kanarska ostrva i Madeira) i istočni Mediteran, koji se navode kao dva centra diverziteta roda *Hyalesthes* (Hoch 1986a; 1986b), bila su južni refugijumi gde su se mnoge vrste povlačile tokom post-glacijalnih perioda (Hewitt 1999; Fernández-Palacios & Whittaker 2008). Može se pretpostaviti da je uticaj ekoloških faktora na specijalizaciju i reproduktivnu izolaciju *H. obsoletus* populacija na teritoriji Balkanskog poluostrva i Male Azije, doveo do kompleksnih adaptivnih promena u preferentnosti prema biljci domaćinu u novim ili izmenjenim biotopima. Putevi diverzifikacije *H. obsoletus* populacija su verovatno posledica višestrukih simultanih događaja koji su otpočinjali u refugijumima i dalje diverzifikovali širenjem arela prateći poboljšavanje sredinskih faktora, a ne jednosmeran trend koji istorijski vuče ovu vrstu iz njenog centra areala na istoku prema granici rasprostranjenja na zapadu.

Kao posledica širenja staništa i višestruke re-kolonizacije ruta koje su korišćene tokom interglacijalnih perioda, populacije *H. obsoletus* su ili ulazile u kompleksne procese genetičke razmene ili su bile već dovoljno genetički udaljene usled prostorne i vremenske izolacije, tako da su kao nezavisne genetičke linije, nastavljale svoju evoluciju međusobnog udaljavanja.

Pridruživanje haplotipa QB genetičkoj grupi *C. arvensis* i *U. dioica* mtDNK, koji geneaološki pripada zapadnoevropskoj AB haplotipskoj grupi, a za koga je utvrđeno da potiče sa teritorije severoistočno od Azovskog mora (južna Rusija), sugeriše da je ova metaasocijacija mogla iz centra diverziteta na jugu da prođe u Rusiju na dva načina: (1) zaobilazeći Crno more duž obala ili (2) šireći svoj areal kroz Istočnoevropsku niziju nakon penetracije na evropski kontinent preko istočne Trakije. Takođe, prisustvo ovog haplotipa na istoku areala *H. obsoletus* ukazuje da je genetička karakteristika populacija specifične asocijacije sa biljkom domaćinom starija od biogeografskih kretanja i promena populacija.

Uska linija obale Sredozemnog mora bi mogla biti pojas koji je *H. obsoletus* asocijacija sa *V. agnus-castus* koristila za širenje ka severnom i zapadnom Mediteranu i vrlo verovatno i u pravcu juga prema Izraelu i južnim obalama Male Azije. Geografska distanca Crne Gore i Grčke na Balkanskom poluostrvu je krucijalni element koji stavlja zabeleženu genetičku divergenciju između ove dve linije u kontekst potencijalnih podvrsta. Međutim, fizičku razdvojenost analiziranih populacija crnogorske i grčke haplogurpe, čini skoro 250 km albanske obale, gde *V. agnus-castus* raste na svom prirodnom staništu i vrlo verovatno pruža nišu asociiranim *H. obsoletus* populacijama koje mogu predstavljati genetičku sponu ovih regiona. Ukoliko bi se pokazalo da nije tako, to bi značilo da su dve detektovane genetičke linije asociirane sa *V. agnus-castus* zapravo podvrste razdvojene masivom Pinda i okolnim planinama kao nepremostivom barijerom koja sprečava protok gena između ovih populacija.

Granice rasprostranjenja *H. obsoletus* populacija u asocijaciji sa *C. foetida* su trenutno nepoznate, ali prema analiziranim podacima i dobijenim rezultatima, ove populacije su prisutne do Erzindžana u istočnoj Turskoj, dok su Dunav i Velika Morava zapadna granica njihovog areala. Međutim, registrovana populacija *H. obsoletus ex C. foetida* na levoj obali Dunava (Calafat, Rumunija), kao i prisustvo

najčešćeg haplotipa JH u populaciji agroekosistema na lokalitetu Radovanu (Bugarska), govori u prilog šire rasprostranjenosti ove asocijacije vektora na teritoriji Rumunije. Prodor na evropski kontinent je bio moguć preko Bosfora i Dardanela ili prateći dolinu Dunava kao mnoge druge vrste koje dele ovaj Balkansko-Anatolski i Ponto-Panonijski horotip (Taglianti *et al.* 1999). Prisustvo asocijacije sa *C. foetida* na obe obale Dunava, u Bugarskoj i Rumuniji, svedoče u korist ovog ekspanzionog pravca.

5.4. Razvoj epidemioloških puteva širenja 'Ca. Phytoplasma solani' pod uticajem specijalizacije vektora

Epidemiološki segment sprovedenih istraživanja je dao kompleksne rezultate koji su u osnovi potvrdili status *H. obsoletus* kao izuzetno efikasnog vektora 'Ca. P. solani' neposredno kroz eksperimentalne dokaze inokulacije laboratorijskih biljaka od strane tri asocijacije upletene u *tuf-b* epidemiologiju. Na ovaj način je dobijen uvid u složene puteve kojima se kroz vektore i biljke dualne domaćine kreću različiti sojevi 'Ca. P. solani'. Za prisustvo *H. obsoletus* u fauni Srbije i njegov vektorski potencijal u širenju bolesti izazvanih stolbur fitoplazmom, znalo se još od šezdesetih godina prošlog veka (Aleksić *et al.* 1967), ali do podataka datih prikazanim istraživanjem, složenost epidemiologije vođena ovim vektorom nije bila poznata. Istraživanja su jasno ukazala da na teritoriji jugoistočne Evrope postoje vrlo složene i do sada nepoznate preferentnosti 'Ca. P. solani' izolata prema vektoru i testiranim biljkama.

Razumevanje ekoloških i evolutivnih odnosa između tri genetičke linije unutar vrste *H. obsoletus* koje su asocirane sa različitim biljkama domaćinima od posebnog je značaja u tri-trofičkim sistemima kakve su biljne bolesti koje se raznose vektorima. Biljke dualni domaćini predstavljaju polaznu tačku epidemioloških ciklusa koji mogu da se dodirnu, ukrste ili preklope u zavisnosti od preferentnosti vektora prema biljci na kojoj se odvija endogejsko razviće larvi. Analiza uzoraka je ukazala na određena odstupanja od očekivanog obrasca korelacije genetičkog diverziteta vektora i disperzije 'Ca. P. solani' u ekosistemima. Rezultati jasno ukazuju na (1) razvoj dva CPs epidemiološka puta, *tuf-a/tuf-ab* i

tuf-b, koji otpočinju od specifičnog domaćina koprive, odnosno poponca, uprkos genetičkoj homogenosti populacija vektora ove dvoasocijacijske metapopulacije, uz nejasno prisustvo '*Ca. P. solani*' izolata *tuf-b* epidemiologije u *H. obsoletus* adultima sakupljenim sa koprivi i (2) umrežavanje *tuf-b* ciklusa uz zajedničke izolate kao međuasocijacijsku sponu populacija tri genetičke linije vezane za različite dualne domaćine: *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* (Kosovac *et al.* 2016a; 2016c).

Metodologija odabrana za karakterizaciju CPs izolata se pokazala efikasnom i informativnom u praćenju kretanja MLST genotipova kroz oba domaćina, populacije vektora i biljke. Iako se u literaturi testiraju i koriste i drugi geni kroz koje se utvrđuje genetički diverzitet '*Ca. P. solani*' (Martini *et al.* 2007; Fialová *et al.* 2009), tri odabrana gena: *tuf*, *stamp* i *vmp1* su bili adekvatno informativni za sagledavanje preferentnosti izolata ka domaćinima koji grade epidemiološki put kojim se fitoplazma kreće. Jedna od otežavajućih okolnosti, koja je delimično prevaziđena dizajniranjem novih prajmera, je neuspešna amplifikacija *tuf* i/ili *vmp1* gena. U literaturi koja se tiče epidemiologije fitoplazmi ne postoji trend publikovanja negativnih rezultata koji bi bio značajan za molekularnu karakterizaciju ovih biljnih patogena. Iako se istraživači selektivno odlučuju za analize određenih gena, retko se prikazuju neuspešne karakterizacije obrađenih CPs uzoraka. Čak i kada se takve situacije jasno vide kroz prikazane rezultate, one se ne ističu i kao takve ostaju bez objašnjenja jer su uglavnom u vezi sa izolatima čiji su MLST genotipovi u unutrašnjem neskladu, koji je teško objasniti (Murolo & Romanzzi 2015). Stabilna karakterizacija CPs izolata na *stamp* genu je potvrdila značaj ovog markera za karakterizaciju epidemiološke pripadnosti genotipova kroz njihovu genalogiju (poglavlje 4.5.3, Slika 25). Na ovaj način je za sve novoopisane *stamp* genotipove bilo moguće utvrditi poreklo i asocijaciju sa *tuf-a/tuf-ab* ili *tuf-b* epidemiološkim putevima u prirodi, nezavisno od domaćina u kojima su detektovani. Na osnovu rezultata genotipizacije može se zaključiti da *tuf* i *vmp1* geni nisu pouzdani dijagnostički markeri jer je među CPs izolatima prisutna varijabilnosti vezana za geografsko poreklo koja onemogućava amplifikaciju prajmerima dizajniranim na osnovu zapadno evropskih genotipova. Ovo može biti

razlog nedostatka dokaza o infekciji *V. agnus-castus* u Izraelu gde su geni 16S (Lorenz *et al.* 1995) i *tuf* korišćeni za detekciju i karakterizaciju (Sharon *et al.* 2015). Nasuprot tome, *stamp* gen se u metodološkom smislu pokazao uspešnim markerom koji se u umnožio u 100% uzoraka prethodno određenih kao inficiranih putem STOL11 gena. Na osnovu analiziranog seta CPs izolata može se zaključiti da *stamp* može biti zamenski gen za inicijalnu detekciju infekcije uzoraka čime se smanjuje utrošak vremena i resursa.

Iznenadjući diverzitet '*Ca. P. solani*' od čak 15 novih *stamp* genotipova detektovanih uz 12 prethodno poznatih, novi genotip *tuf-b* tipa i jedan novi *vmp1* profil (V2-TA-L), svedoče o izuzetnom i do sada nepoznatom diverzitetu ovog obligatnog biljnog patogena u jugoistočnoj Evropi. Analiza dobijenih epidemioloških rezultata je izuzetno kompleksna jer svaka od asocijacija vektora, nastala raščlanjivanjem polifagne vrste na monofagne genetičke linije ili kriptične vrste, ispoljava složeno ponašanje prema biljci domaćinu i svom patogenu kojeg prenosi, usled čega se jedinstveni zaključak ne može ni kvalitativno ni kvantitativno doneti na nivou *H. obsoletus sensu lato*, već samo svake zasebne asocijacije.

5.4.1 Uloga *H. obsoletus ex Urtica dioica* u *tuf-b* epidemiologiji '*Ca. P. solani*'

Sa epidemiološkog stanovišta može se reći da je najznačajnija novoopisana asocijacija *H. obsoletus* sa *C. foetida*, i detaljno istražena asocijacija vektora i patogena sa *V. agnus-castus*. Međutim, dobijeni rezultati kada je u pitanju *H. obsoletus ex U. dioica*, takođe od izuzetnog značaja za epidemiologiju, jer je pored bogatog CPs diverziteta, registrovano je devet do sada nepoznatih *stamp* genotipova. Takođe prvi put je ustanovljeno da populacija vektora može biti istovremeno inficirana '*Ca. P. solani*' izolatima *tuf-a* i *tuf-b* tipa. Bazična epidemiološka CPs divergencija bazirana na *tuf* genu je do otkrića *tuf-ab* tipa (Atanasova *et al.* 2015; *tuf-b2*, Aryan *et al.* 2014) dominirala u centralnoj i zapadnoj Evropi u vidu nedvosmislenog pokazatelja porekla infekcije: *tuf-a* – *U. dioica* i *tuf-b* – *C. arvensis* (Langer & Maixner 2004). Otkriće prelaznog *tuf*-tipa uključenog u *tuf-a* epidemiologiju, samo prividno je unelo destabilizaciju u dvociklusni sistem širenja '*Ca. P. solani*' jer je nakon njegove prve detekcije u

Austriji, isti nalaz vezan za epidemiologiju koprive, potvrđen i za teritoriju Makedonije (Atanasova *et al.* 2015), a sada i za područje Crne Gore i Srbije isključivo vezan uz *stamp* genotip 19-25 subklastera a1 (poglavlje 4.5.3., Slika 25; poglavlje 4.4.1, Tabela 7). Nalazom relativno česte prisutnosti *tuf-b* izolata u populacijama *H. obsoletus ex U. dioica* narušava se dosadašnja stabilna epidemiologija stolbur fitoplazme uslovljena koprivom kao biljkom izvorom inokoluma *tuf-a/tuf-ab* CPs izolata, dok su *tuf-b* izolati do sada bili vezani samo za poponac (Langer & Maixner 2004). Detekcija izolata koji su već poznati članovi *tuf-b* ciklusa, kao i 4 nova *stamp* genotipa grupisana u klaster b-III, ukazuju da primerci *H. obsoletus* u asocijaciji sa koprivom poseduju potencijal ishrane na biljkama domaćinima drugih asocijacija ovog vektora, ili nasumične povremene ishrane na drugim biljnim vrstama koje mogu biti prirodno inficirane *tuf-b* tipom. U analiziranim uzorcima koprive iz Crne Gore prisutni su isključivo *tuf-a* i *tuf-ab* CPs izolati. Ovaj nalaz se mora tretirati sa zadržkom jer može biti lažno negativan rezultat koji zahteva detaljnije uzorkovanje koprive, posebno na lokalitetima gde *tuf-b* izolati inficiraju asociirane populacije vektora. Nedoumice po pitanju prisustva CPs izolata *tuf-b* tipa niske koncentracije u prirodno inficiranim koprivama mogla bi otkloniti RT-PCR metodologija (engl. *real time* PCR) koja omogućava detekciju i vrlo niske učestalosti ciljanog genskog regiona u analiziranom uzorku (Chabirand *et al.* 2017). Potencijalno unošenje *tuf-b* izolata u biljke koprive u prirodi se moglo realizovati na dva načina: (1) nespecifičnom ishranom na koprivi od strane *H. obsoletus* adulata iz asocijacija koje učestvuju u *tuf-b* epidemiologiji ili slučajnom ishranom nekog drugog polifagnog vektora koji nosi *tuf-b* izolate ili (2) endogejskom inokulacijom koprive preko korena od strane sa njom asociiranih *H. obsoletus* larvi koje mogu *tuf-b* izolate preuzeti iz korenskih žilica drugih biljaka i uneti ih u koprivu, ili pak slučajnom ishranom larvi drugih asocijacija ili drugih vektora. Ukoliko se pretpostavi da su *tuf-b* izolati dospeli u koprivu slučajnim događajem i ostali vijabilni u floemu u veoma niskoj koncentraciji, nakon akvizicije od strane asociiranih *H. obsoletus* populacija može se desiti da fitoplazma ove jedinice prepozna kao evolutivno podjednako odgovarajućeg domaćina u kojem dostiže visok titar kao i slučaju asocijacije sa poponcem, što bi se moglo očekivati imajući u vidu njihovu genetičku bliskost. U

skladu sa ovim, može se postaviti i hipoteza da su *H. obsoletus* adulti vezani za koprivu preuzeli *tuf-b* izolate već kao larve sa korena neke druge biljke i da su se prelaskom u naredni stadijum od njih razvili adulti, asocijacije koja *a priori* realizuje širenje *tuf-a/tuf-ab* epidemiologije, koji nespecifično nose izolate drugog epidemiološkog ciklusa kao trag endogejske ishrane. Svakako se ne sme zanemariti i potencijal povremene ishrane adulata ove asocijacije na *C. arvensis* kao drugom domaćinu ove nedeljive populaciono-genetičke linije u jugoistočnoj Evropi. U skladu sa tim je zanimljivo da ovaj fenomen nije detektovan *vice versa*, odnosno kod populacija sa poponca, ali i ostalih *H. obsoletus* asocijacija i njihovih domaćina, koji su u ovom istraživanju kao i u literaturnim podacima inficirani isključivo jasno okarakterisanim *tuf-b* izolatima.

Kada se situacija prisustva CPs izolata *tuf-b* epidemiologije spusti na nivo detektovanih nalaza, četiri *stamp* genotipa se u *H. obsoletus* jedinkama asociiranim sa koprivom pojavljuju kao spona sa drugim asocijacijama *tuf-b* ciklusa čiji se upliv u *tuf-a/tuf-ab* ciklus desio prema jednom od pretpostavljenih scenarija:

- (1) MLST genotip *tuf-b/Rqg31/V2-TA* (Profitis, Grčka); detektovan u *H. obsoletus* populaciji sa poponca na lokalitetu Beri (poglavlje 4.5.1.2, Slika 21); prethodno je opisano njegovo prisustvo u vinovoj lozi u Austriji (Aryan *et al.* 2014);
- (2) BG4560 *stamp* genotip (Filadelfio, Grčka; Tabela 7); detektovan u *H. obsoletus* asocijaciji sa *C. arvensis* (Predejane, Srbija i Petrevo selo Rumunija; Tabela 8) i u asocijaciji *ex C. foetida* (Vidin, Bugarska i Calafat, Rumunija; Tabela 9); prethodno je opisano njegovo prisustvo u vinovoj lozi u Bugarskoj (Fabre *et al.* 2011a);
- (3) STOL *stamp* genotip (Boljetin, Zaječar, Knjaževac, Vranje u Srbiji i Strumica, Makedonija); inficira sve tri *tuf-b* asocijacije kao apsolutno dominantan u populacijama asociiranim sa *C. foetida*, vrlo čest u populacijama sa *V. agnus-castus* i detektovan i u asocijaciji sa *C. arvensis* u vidu jednog izolata iz Turske vezanog za V15 *vmp1*; čak su oba zabeležena izolata, *tuf-b/STOL/-* i *-/STOL/-*, kao isti takvi nekompletno okarakterisani genotipovi prisutni i u populacijama vektora *ex V. agnus-castus* (Bar, Kamenari i Ulcinj u Crnoj Gorai; Tabela 9) i *C. foetida* (Deligrad, Požarevac i Jasenovik u Srbiji; Tabela

10) usled čega je moguće da se radi o specifičnom genotipu koji neposredno dele ove tri asocijacije; prisustvo MLST genotipa *tuf-b*/STOL/V2-TA prethodno je detektovano u vektoru *Reptalus panzeri* u Srbiji i vinovoj lozi u Srbiji i Makedoniji (Cvrković *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015);

- (4) Rpm35 *stamp* genotip (Strumica, Makedonija) takođe dele sve asocijacije uz napomenu da je izolat ovog genotipa ostao neokarakterisan na druga dva gena u slučaju asocijacije sa koprivom, dok se kod preostale tri asocijacije javlja u vidu jasnog MLST genotipa *tuf-b*/Rpm35/V14 koji je prethodno detektovan u vektoru *R. panzeri* u Srbiji (Cvrković *et al.* 2014).

Pitanje koje u skladu sa primenljivim značajem istraživanja proizilazi iz dobijenih rezultata jeste vektorski potencijal *H. obsoletus* asocijacije sa *U. dioica*. Sam nalaz prisustva biljnog patogena u insektu nije dokaz njegove vektorske sposobnosti i kapacitet prenošenja '*Ca. P. solani*' izolata *tuf-b* tipa je neophodno eksperimentalno potvrditi laboratorijskim ogledima (Maixner *et al.* 1994; Gatineau *et al.* 2001; Jović *et al.* 2007; Riedle-Bauer *et al.* 2008; Cvrković *et al.* 2014; Kosovac *et al.* 2016a; Mitrović *et al.* 2016). U ovim istraživanjima prikazan je samo pregledni diverzitet CPs izolata koji inficiraju ovu metapopulaciju vektora na području jugoistočne Evrope. Uz rezultat prisustva sva tri *tuf*-tipa u adultima vezanim za koprivu, koji se kao asocijacija u okviru vrste *H. obsoletus* nalaze u ekspanziji u centralnoj i jugoistočnoj Evropi, neophodnost testiranja vektorske uloge ove asocijacije i provera sposobnosti inokulacije biljaka izolatima *tuf-b* tipa, ističe se kao jedan od najvažnijih koraka u daljim istraživanjima.

5.4.2 Vektorska uloga *H. obsoletus* ex *V. agnus-castus* i ukrštanje *tuf-b* epidemiologije '*Ca. P. solani*' ex *V. agnus-castus* i *C. arvensis*

Ciklusi biljnih bolesti koje prenose vektori su uslovljeni sa tri promenljive: (1) preferentnošću vektora prema biljkama, (2) biljkama dualnim domaćinima i (3) sposobnošću vektora da ishranom preuzme patogena iz biljke rezervoara i inokuliše zdravu biljku. U složenim sistemima gde je više od jednog vektora i/ili jedne biljke izvora infekcije uključeno u epidemiologiju, kao što je to u slučaju *Bois noir* bolesti vinove loze, putevi prenošenja '*Ca. P. solani*' u prirodnim staništima i agroekosistemima mogu biti vrlo kompleksni i isprepletani. U tim slučajevima je

eksperimentalna potvrda porekla i puteva diseminacije patogena veoma zahtevna što se prevazilazi metodama molekularne epidemiologije koje na nivou laboratorijske detekcije i karakterizacije patogena otkrivaju pravce kretanja i širenja infekcije. Kombinacija eksperimentalnog i molekularnog pristupa ima za cilj otkrivanje svih uticaja na puteve prenošenja '*Ca. P. solani*' i kao takva je u prikazanim istraživanjima izuzetno uspešno razjasnila ulogu *V. agnus-castus* i asociраних *H. obsoletus* populacija u epidemiologiji *Bois noir* u vinogradima Crne Gore.

Prateći put kretanja kroz domaćine trogenski okarakterisanih CPs izolata detektovanih u vinovoj lozi, potvrđeno je da su *C. arvensis* i *U. dioica* domaćini vektoru *H. obsoletus* i patogenu na području Mediterana kao i u centralnoj Evropi. Pored tradicionalnih dualnih domaćina, *V. agnus-castus* je uz potvrdu prisutnosti asociраних *H. obsoletus* populacija, prvi put istaknut kao rezervoar CPs infekcije što je pokazano detekcijom fitoplazme u listovima asimptomatskih biljaka sakupljenih na terenu. Upoređujući CPs genotipove identifikovane u insektima određene asocijacije, biljkama dualnim domaćinima i vinovoj lozi, na svakom od 5 oglednih lokaliteta (vinograda), utvrđeni su prisutni epidemiološki putevi. Međutim, neki genotipovi su identifikovani samo u vinovoj lozi i/ili biljkama rezervoarima ili asociраним populacijama vektora, ali ne istovremeno u sva tri domaćina što je verovatno posledica uzorkovanja, a ne realnog odsustva fitoplazme u nekom od domaćina. Detektovani diverzitet CPs genotipova je bio znatno viši nego što bi se to očekivalo u direktnom prenošenju: biljka rezervoar → vektor → zasad. Ovakav tip direktnog puta je zabeležen samo kod genotipova vezanih za *U. dioica*, dok su MLST genotipovi vezani za *C. arvensis* i *V. agnus-castus* isprepletani. Kompleksnost epidemiologije '*Ca. P. solani*' u Mediteranu koja potiče iz tri izvora infekcije se ogleda u diverzitetu detektovanih izolata kao i u broju domaćina koje deli jedan MLST genotip.

Najčešće detektovani genotip u vinovoj lozi *tuf-b/Rqg50/V17*, nedavno okarakterisan u *Bois noir* inficiranim vinogradima Austrije (Aryan *et al.* 2014), predstavlja zajednički izolat biljaka *C. arvensis* i *V. agnus-castus*, kao i obe asocijacije vektora. Ukoliko se '*Ca. P. solani*' i *H. obsoletus* smatraju organizmima mediteranskog porekla, moglo bi se pretpostaviti da je *V. agnus-castus* zapravo

originalni domaćin ovog CPs genotipa. U ovom slučaju ograničeno područje distribucije konopljike bi onemogućilo patogenu da se širi, pa se prema tome epidemiološki put vezan za poponac može smatrati alternativnim i predstavljati ekspanziju iz Mediterana u Panonsku ravnicu i donju Austriju (Kosovac *et al.* 2016a). Sličan obrazac zajedničkog MLST genotipa je karakterističan za izolat *tuf-b/STOL/V2-TA* detektovan u *V. agnus-castus* i asociranim insektima, a prethodno poznat kao član drugog epidemiološkog ciklusa koji razvija vektor *R. panzeri* u južnom Banatu (Cvrković *et al.* 2014). Nalaz ovog genotipa u prirodno inficiranim konopljkama okolini Bara ukazuje na primarnu ulogu *V. agnus-castus* kao izvora inokuluma ovog izolata u Mediteranu. S obzirom da *R. panzeri* do sada nije detektovan u Crnoj Gori, može se pretpostaviti da su drugi vektori i biljke domaćini uključeni u razmenu izolata između dva regiona, sredozemlja na jugu i Banata i Panonske nizije na severu, nezavisno koja od ove dve oblasti je poreklo *tuf-b/STOL/V2-TA* genotipa (Kosovac *et al.* 2016a). Iako bi se moglo pretpostaviti da je *H. obsoletus* ex *C. arvensis* upravo taj intermedijerni vektor, ovaj genotip nije prisutan u *C. arvensis* asocijaciji u Crnoj Gori, niti na širem području Balkanskog poluostrva. Prema tome, drugi potencijalni vektori kao što je *R. quinquecostatus*, koji nose ovaj izolat (Cvrković *et al.* 2014), mogu biti veza između ova dva regiona. Takođe, ovaj izolat je dominantan za ciklus vezan za *C. foetida* kao dualnog domaćina i asocirane *H. obsoletus* populacije koje su njime uspešno inficirale svih pet oglednih biljaka u eksperimentima unakrsnog prenošenja (poglavlje 4.5.2, Slika 22) čime je pokazano da iako nije detektovan u crnogorskim vinogradima, predstavlja možda i glavni genotip koji se kreće kroz *tuf-b* epidemiološki ciklus na Balkanskom poluostrvu (Cvrković *et al.* 2014; Atanasova *et al.* 2015).

Drugi značajan CPs genotip u Mediteranu je *tuf-b/Rpm35/V14* detektovan u tri od pet inficiranih vinograda. U Šušunji i Berima je utvrđeno da je izvor infekcije *C. arvensis*, dok je ovaj izolat u Godinju registrovan u prirodno inficiranim biljkama *V. agnus-castus*. Ovaj nalaz se bazira na kombinaciji rezultata molekularnog praćenja epidemioloških puteva prenošenja i eksperimentalne inokulacije vinove loze. U vinogradu u Godinju analizirani uzorci poponca nisu bili CPs inficirani, dok asocirane populacije vektora nisu registrovane. Nasuprot tome, prisutne prirodno inficirane biljke konopljike su nosile ovaj genotip iako on nije detektovan u

asociranim vektorima, dok je u oglecima CPs transmisije na vinove loze upravo ovaj MLST genotip bio najčešći u okviru izolata koji su prenešeni. Iako *tufb/Rpm35/V14* nije pronađen u uzorkovanim *H. obsoletus* populacijama asociranim sa konopljkom, može se smatrati da ovaj genotip podjednako dele dve pomenute asocijacije (Kosovac *et al.* 2016a). I u ovom slučaju se asocijacija sa *C. foetida* pojavljuje kao nosilac ovog genotipa znatno severnije u Bugarskoj, ali i još jedna populacija vektora asociranog sa poponcem u Topoli. Međutim, u Crnoj Gori nije detektovana asocijacija *H. obsoletus* sa *C. foetida*, iako sama biljka jeste, što ovog vektora isključuje kao intermedijernog u slučaju ovog CPs izolata. Kao i u prethodnom slučaju, *R. panzeri* koji učestvuje u epidemiologiji *crvenila kukuruza* u Banatu je inficiran ovim genotipom, pa se takođe pretpostavlja da prelazni put širenja ovog izolata između južnih u severnih regiona ide preko alternativnih vektora.

Rezultati laboratorijski kontrolisanih oglada inokulacije vinovih loza povezuju eksperimentalne i molekularne dokaze da populacije *H. obsoletus ex V. agnus-castus* prenose '*Ca. P. solani*' na lozu, dok CPs detekcija u prirodno inficiranim asimptomatskim biljkama konopljike u okolini vinograda i u prirodnim ekosistemima potvrđuje značaj ove biljke kao izvora zaraze. Inficirani *H. obsoletus* adulti sakupljeni na konopljici i CPs inficirane biljke ukazuju da je *V. agnus-castus* u mediteranskoj zoni Crne Gore mesto primarne akvizicije patogena za asocirane populacije vektora čime se ostvaruje jednosmerni epidemiološki ciklus i konopljici pripisuje primarni značaj kao izvoru infekcije (Kosovac *et al.* 2016a). Prikazani nalazi su u suprotnosti sa prethodno registrovanim odsustvom '*Ca. P. solani*' u konopljici u Izraelu gde je patogen detektovan u vektoru i vinovoj lozi, ali ne i u *V. agnus-castus* za koju je na ovoj teritoriji dokazano da je domaćin vektora (Sharon *et al.* 2005; 2015). Za ovu nekonzistentnost nalaza postoji nekoliko modućih objašnjenja. Populaciono-genetički parametri jasno ukazuju da se asocijacija *ex V. agnus-castus* na teritoriji Grčke i Izraela razlikuje od crnogorskih populacija (Kosovac *et al.* 2018) što se može ogledati u fenotipskim i metaboličkim karakteristikama insekta (Kurbalija Novičić *et al.* 2015). U skladu sa tim je posebno zanimljivo da u Grčkoj nije detektovana '*Ca. P. solani*' infekcija niti u *H. obsoletus* adultima, niti u biljkama *V. agnus-castus* što može ukazivati da ova unutar-

asocijacijska genetička linija koju čine metapopulacije vektora iz Grčke i Izraela nema sposobnost inokulacije konopljike, dok je u Izraelu izvor infekcije adultima sa konopljike neka druga biljka kao što je to i sugerisano (Sharon *et al.* 2015). U Izraelu *H. obsoletus* ostvaruje dve generacije godišnje, dok se na jadranskoj i egejskoj obali pokazalo da *H. obsoletus ex V. agnus-castus* ima jedan produženi period letnje generacije koja počinje krajem juna, sa pikom aktivnosti sredinom jula i opadajućim trendom ka početku oktobra. Genotipovi CPs izolata karakteristični za konopljiku i asocirane *H. obsoletus* populacije u Crnoj Gori bi mogli biti različiti od izolata prisutnih u Izraelu. Međutim, izraelski 'Ca. P. solani' izolati su okarakterisani samo na *tuf* genu kao pripadnici *tuf-b* tipa što je nedovoljno za sagledavanje njihovog epidemiološkog identiteta i onemogućava zaključivanje o relacijama izolata jadranske obale i istočnog Mediterana. Svakako su neophodna dodatna istraživanja za otkrivanje potencijalnih uzroka koji dovode do nekonzistentnosti u ponašanju, infekciji i epidemiološkoj ulozi *H. obsoletus ex V. agnus-castus* kao i njegove biljke domaćina u ova dva regiona Sredozemlja.

Eksperimentalna potvrda vektorske uloge *H. obsoletus* populacija asociranih sa *V. agnus-castus* u *Bois noir* epidemiologiji u vinogradima Crne Gore ukazuje na potencijalno veću ulogu ove asocijacije na mnogo širem području Mediterana. Ovo nameće potrebu za rastevljavanjem incidence infekcije, pojavljivanja 'Ca. P. solani' u prirodno inficiranim biljkama i zasadima kao i epidemiološkog značaja jedne od najznačajnijih bolesti vinove loze u vinogradarskim regionima mediteranskih država: Španije, Francuske, Italije i Hrvatske. Praćenje puteva kretanja CPs izolata kroz molekularnu detekciju i karakterizaciju je pokazalo da začetak bolesti leži u konopljici kao izvoru infekcije čije širenje kroz ekosisteme realizuju sa njom asocirane *H. obsoletus* populacije. Ova epidemiološka studija je dala primer utvrđivanja polazišne tačke za definisanje strategija upravljanja i kontrole vektora i patogena bolesti kroz kontrolu biljaka rezervoara fitoplazme, koje su najčešće i dualni domaćini, čime se istovremeno reguliše i populacija vektora.

5.4.3 Ukrštanje *tuf-b* puteva diseminacije '*Ca. P. solani*' i vektorska uloga tri asocijacije u epidemiologiji *Bois noir* bolesti vinove loze

Kroz transinfekcijske eksperimente, koji su verodostojno preslikali puteve kretanja '*Ca. P. solani*' genotipova u prirodi, otkrivena je kompleksnost *tuf-b* epidemiološkog ciklusa kroz infekcijski umrežene tri *H. obsoletus* asocijacije i njihove dualne domaćine. Iako elementi iste epidemiologije, genetički različite populacije vektora asocirane sa *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida*, grade puteve prenošenja fitoplazme koji se selektivno ukrštaju u tačkama koje čine biljke dualni domaćini, odakle se dalje širenje razuđuje u više pravaca vođenih svakom od asocijacija. Multigenska karakterizacija '*Ca. P. solani*' izolata dala je uvid u pravac prenošenja određenog CPs genotipa, koji se čini jasno usmeren samo na začetku epidemiološkog puta, odnosno u momentu njegovog izviranja iz biljke dualnog domaćina. Već prilikom prve nespecifične ishrane vektora, fitoplazma ulazi u tokove ukrštanja i preklapanja epidemiološkog puta što utiče na samog patogena (Bai *et al.* 2006) i može biti uzrok parcijalne karakterizacije određenih izolata i epidemiološke neselektivnosti prisutne kod *H. obsoletus* asocijacije sa *U. dioica*.

Postavljeni eksperimenti su pokazali da su sve tri testirane *H. obsoletus* asocijacije efikasni vektori i da svaka od njih uspešno inficira preostala dva domaćina. Jedini izuzetak u unakrsnim infekcijama je nedostatak inokulacije *C. foetida* od strane asocijacije sa *V. agnus-castus*. Uspešnost inficiranja „tuđeg“ domaćina implicira na sposobnost preuzimanja fitoplazme sa istog u momentima slučajne neselektivne ishrane na sintopskim lokalitetima. Da bi se ovo moglo empirijski potvrditi, neophodna je dopuna eksperimenata koja bi vodila u drugom pravcu, odnosno podrazumevala ishranu laboratorijski odgajenih neinficiranih jedinki *H. obsoletus* svake od asocijacija i njihovu kontrolisanu ishranu na inficiranim biljkama dualnim domaćinima. Molekularnim analizama insekata bi se moglo utvrditi da li su populacije vektora ove tri asocijacije sposobne da preuzmu fitoplazmu sa „neodgovarajućeg“ domaćina, u kolikom procentu i kojeg genotipa, a zatim i da li preuzetim CPs izolatima mogu inficirati druge biljke. Ovakav tip eksperimenata nije jednostavan jer je laboratorijsko gajenje *H. obsoletus* veoma

zahtevno (Sforza *et al.* 1999; Cargnus *et al.* 2012). Dok se ono metodološki ne pojednostavi, rezultati praćenja MLST genotipova stolbur fitoplazme u prirodi i transinfekcijskim eksperimentima mogu se uzeti kao dokaz umreženosti koja nastaje kao posledica sposobnosti i preuzimanja i prenošenja fitoplazme od strane *H. obsoletus* asocijacija *tuf-b* epidemiologije.

Utvrđeni putevi transinfekcija su se nadovezali na rezultate molekularne epidemiologije *Bois noir* u vinogradima Mediterana i učešće *H. obsoletus* asocijacije sa *V. agnus-castus*. Genotipovi '*Ca. P. solani*' koji su detektovani u populacijama vektora, ali ne i u odgovarajućoj biljci dualnom domaćinu, poponcu i konopljici, verovatno su u prirodi ipak prisutni u biljkama, ali nisu detektovani usled nasumičnog uzorkovanja asimptomatskih biljaka rezervoara patogena. Samo špekulativno se može govoriti o njihovom potencijanom poreklu iz drugog, „neodgovarajućeg“ domaćina u kojem su detektovani. Ova hipoteza je rasvetljena ogledima unakrsnog inficiranja biljaka domaćina populacijom vektora suprotne asocijacije. Čak i ako se uzme sa zadržskom nedoumica da li su populacije sposobne da unakrsno preuzmu fitoplazmu hraneći se na „neodgovarajućem“ domaćinu, možemo zaključiti da one imaju kapacitet da nespecifičnom ishranom unesu u domaćina druge asocijacije određeni '*Ca. P. solani*' genotip prijemčiv svom „originalnom“ domaćinu. Na taj način biljka može postati rezervoar ovom genotipu koji asociirane populacije vektora mogu preuzeti i širiti u ekosistemu.

Asocijacija sa *C. foetida* zaslužuje da se istakne kao najznačajnije otkriće koje je ostvarilo suštinski pomak u istraživanju epidemiologije bolesti koje uzrokuje '*Ca. P. solani*' na širem području Balkana. U nizu izuzetno značajnih i pionirskih nalaza koje su pružili svi epidemiološki eksperimenti, u prvi plan se mogu istaći dokazi vektorske uloge *H. obsoletus* populacija asociiranih sa *C. foetida*, izuzetno visoke CPs inficiranosti populacija i dokazanog statusa ove biljke kao dualnog domaćina. Ravnopravna uloga u disperziji CPs izolata u prirodnim ekosistemima je neupitna i to se jasno pokazalo kroz najmanje podjednako uspešne inokulacije oglednih biljaka druge dve *H. obsoletus tuf-b* asocijacije kao i svog domaćina. Među genotipovima koji su preneti na ogledne biljke bilo je i izolata koji nisu prethodno detektovani ni u jednoj od prirodno inficiranih populacija, kao ni u prirodno inficiranim biljkama *C. foetida* čime se takođe može

pretpostaviti da su ih jedinke mogle preuzeti nespecifičnom ishranom iz druge dve biljke domaćina, ili iz drugih prirodno inficiranih biljaka.

Navode o bliskim interakcijama *H. obsoletus* populacija i gajenih biljaka (osim u slučaju *L. angustifolia*; Prilog 1) trebalo bi potpuno odbaciti jer jedina spona između njih je CPs infekcija. Kao na primeru *Bois noir* bolesti vinove loze, eksperimentalno je pokazano da vinova loza ne podržava razviće *H. obsoletus* (Sharon *et al.* 2015), usled čega tempo i pravac širenja infekcije diktiraju biljke dualni domaćini koje mogu biti korovske vrste unutar ili na obodu zasada, ili članovi okolnih nenarušenih biljnih zajednica. Sama vinova loza je povremeni i slučajni izvor hrane vektoru i ne predstavlja značajnu kariku u epidemiologiji bolesti jer na njoj insekt ne može izvršiti akviziciju fitoplazme već samo može inokulacijom naneti štetu ovom krajnjem domaćinu (Boudon-Padieu 2000). Posebno značajni rezultati testova prenošenja koji pokazuju da sve tri *H. obsoletus* asocijacije koje učestvuju u *tuf-b* epidemiologiji mogu izuzetno uspešno inficirati vinovu lozu (procenat inficiranih biljaka od 66% do 84%), potvrdili su reputaciju ove cikade kao najuspešnijeg vektora *Bois noir* bolesti. Poređenjem prenetih CPs genotipova se može zaključiti da iako na nivou svih analiziranih uzoraka postoji 5 jasnih MLST izolata koje dele *H. obsoletus* asocijacije sa *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* (Prilog 6), u slučaju inficiranja oglednih biljaka vinove loze nije prenet ni jedan genotip od strane sve tri asocijacije. Epidemiološka veza u CPs izolatima postoji između populacija sa *C. arvensis* i *C. foetida* (*tuf-b*/Rqg31/V14) i između populacija sa *V. agnus-castus* i *C. foetida* (*tuf-b*/STOL/V2-TA), dok *C. arvensis* i *V. agnus-castus* nisu preneli ni jedan zajednički genotip. Najveća pažnja prilikom testova inficiranja vinovih loza je svakako bila usmerena na *V. agnus-castus* kako bi se razumela epidemiologija bolesti u Mediteranu. Osim složenih puteva prenošenja kroz koje prolaze CPs izolati, pokazalo se da ova u Evropi zapostavljena *H. obsoletus* asocijacija, ne samo što ima upliv u epidemiološke puteve koji počinju od *C. arvensis* i šire se vezanim populacijama vektora, već i direktno unosi infekciju u vinograde nezavisno od ostalih biljaka dualnih domaćina i vektora. Praćenjem MLST izolata napravljena je veza između *V. agnus-castus* i sa njom asociiranih populacija vektora kroz istovremenu detekciju CPs genotipova u prirodno inficiranim biljkama i adultima vezanim za nju. Ovaj nalaz je nadograđen

eksperimentalnom potvrdom uspešnih inokulacija mladica konopljike od strane *adulata* ove asocijacije (poglavlje 4.5.2, Slika 22). Asocijacija vektora sa *C. foetida* je inficirala 66% oglednih vinovih loza uz očekivanu dominaciju MLST genotipa *tuf-b/STOL/V2-TA* čime je ova biljka dualni domaćin utvrđena kao izuzetno značajna za širenje '*Ca. P. solani*' infekcije u jugoistočnoj Evropi.

Epidemiološki segment doktorske disertacije obuhvatio je vrlo opsežna terenska sakupljanja materijala kao i kompleksne eksperimente inokulacije koji su rezultirali identifikacijom izuzetnog genetičkog bogatstva '*Ca. P. solani*' na teritoriji jugoistočne Evrope. Među *stamp* genotipovima detektovanim na ovom geografskom području veći je broj novih genotipova specifičnih za Balkan i istočni Mediteran ili specifične biljne asocijacije, u odnosu na ranije poznate genotipove prisutne u centralnoj i zapadnoj Evropi (Prilog 6). Ukoliko se pretpostavi da i vektor i patogen imaju istočnomediterransko poreklo (Foissac *et al.* 2013) može se pretpostaviti da određeni CPs genotipovi uspešno prodiru zajedno sa vektorom na prostor zapadne Evrope i na tom putu se genetički menjaju, dok se na tranzitnoj teritoriji jugoistočne Evrope i dalje mogu detektovati genotipovi koji su evolutivno stariji i vode poreklo iz centra diverziteta. Međutim, može se pretpostaviti i da bi diverzitet CPs izolata u centralnoj i zapadnoj Evropi mogao biti znatno veći u odnosu na trenutno poznati ukoliko bi se istraživanja epidemiologije premestila iz strogih ciklusa koji se ostvaruju unutar agroekosistema, u prirodne ekosisteme kao što je sprovedeno u ovom istraživanju.

6. Zaključci

Proučavanja populaciono-genetičkih odnosa između asocijacija koje sa različitim biljkama domaćinima ostvaruje cikada vektor *Hyalesthes obsoletus* na teritoriji jugoistočne Evrope i posledice specijalizacije populacija na epidemiološke puteve prenošenja biljnog patogena '*Candidatus Phytoplasma solani*' doveli su do sledećih zaključaka:

- Populacije *H. obsoletus* na teritoriji jugoistočne Evrope su u asocijaciji sa jednom od četiri biljke domaćina: *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Vitex agnus-castus* i *Crepis foetida*.
- Populaciono-genetičkim analizama mitohondrijskih i nuklearnih markera (mikrosatelita) utvrđena je kriptična diferencijacija *H. obsoletus* populacija na tri genetičke linije uslovljene biljkom domaćinom: (1) *C. arvensis* i *U. dioica*, (2) *V. agnus-castus* i (3) *C. foetida*.
- Analize diverziteta, varijabilnosti, genealogije i filogenije mitohondrijske DNK, sprovedene na dva genska regiona, pokazale su divergenciju između tri detektovane genetičke grupe od 1.1% do 1.5%.
- Genetičke distance na nivou mtDNK između *H. obsoletus* asocijacija i najsirodnije vrste *Hyalesthes thracicus*, variraju između 2.1% i 3.3%. Zabeležena divergencija uz detektovani stepen diferencijacije između asocijacija *H. obsoletus sensu lato*, ide u prilog kriptične specijacije unutar ove vrste.
- Analize populaciono-genetičke strukture *H. obsoletus* bazirane na mikrosatelitima (7 lokusa), potvrdile su razdvajanje populacija u jedan od tri genetička klastera uslovljena biljkom domaćinom uz visoku podršku (Evanno $\Delta K(3) = 803.72$) i populacioni procenat pripadnosti odgovarajućem klasteru od >90%. Isti obrazac klastiranja *H. obsoletus* populacija je pokazalo i filogenetsko stablo bazirano na četiri mikrosatelitska lokusa.
- Razdvajanje populacija *H. obsoletus* uslovljeno specijalizacijom prema biljci domaćinu zabeleženo je i na nezavisno analiziranim sintopskim lokalitetima

asocijacija *C. arvensis/C. foetida*, *U. dioica/C. foetida* i *U. dioica/V. agnus-castus*, uz populacionu pripadnost odgovarajućem klasteru od 68% do 99%.

- Populacije *H. obsoletus* asociirane sa *V. agnus-castus* pokazale su nedoslednost grupisanja prilikom mitohondrijskih i mikrosatelitskih populaciono-genetičkih analiza u zavisnosti od geografskog porekla (Crna Gora, Grčka, Izrael). Mitohondrijske DNK analize su ukazale na geneaološku srodnost populacija iz istočnog Mediterana sa haplotipovima populacija *C. foetida* asocijacije što ukazuje na proces prelaska na novog domaćina koji se najverovatnije dogodio na području Bliskog istoka.
- Vrednosti Fuovog *F_s* i Tadžiminog *D* parametra testova neutralnosti pokazali su statistički značajan signal ekspanzije populacija *H. obsoletus* asocijacije sa *U. dioica* na širem području jugoistočne Evrope.
- Za sve četiri biljke domaćina *H. obsoletus* u jugoistočnoj Evropi (*C. arvensis*, *U. dioica*, *V. agnus-castus* i *C. foetida*) i asociirane populacije insekta, utvrđena je prirodna inficiranost sa '*Ca. Phytoplasma solani*' i njihova epidemiološka uloga.
- U jedinkama *H. obsoletus* i biljkama dualnim domaćinima na teritoriji jugoistočne Evrope detektovano je ukupno 28 '*Ca. P. solani*' MLST genotipova okarakterisanih na tri gena: *tuf*, *stamp* i *vmp1*.
- U okviru izolata '*Ca. Phytoplasma solani*' koji potiču iz prirodno inficiranih jedinki *H. obsoletus*, biljaka dualnih domaćina i eksperimentalnih biljaka, utvrđeno je prisustvo sva tri *tuf* tipa (*tuf-a*, *tuf-ab* i *tuf-b*), 27 *stamp* genotipova (15 prvi put registrovanih) i 11 *vmp1* profila.
- Nekompatibilnost standardnih prajmera sa '*Ca. P. solani*' izolatima detektovanim u jugoistočnoj Evropi i delimično uspešna primena novodizajniranih prajmera i metoda analiza ukazuju na genetički diverzitet ovog biljnog patogena čije proučavanje zahteva nova metodološka rešenja.
- *Tuf-a/tuf-ab* epidemiološki tip '*Ca. P. solani*' vezan je isključivo za *U. dioica* asocijaciju vektora.

- *Tuf-ab* tip poreklom sa *U. dioica* je u jugoistočnoj Evropi vezan isključivo za 19-25 *stamp* genotip i V3 ili V18 *vmp1* profile što ukazuje na njegovu genetičku homogenost.
- *Tuf-b* epidemiološki tip '*Ca. P. solani*' vezan je za *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* asocijacije vektora čije se epidemiologije preklapaju i ukrštaju.
- Dominantni '*Ca. P. solani*' MLST genotip *tuf-b*/STOL/V2-TA identifikovan u *H. obsoletus* asocijaciji sa *C. foetida*, ukazuje na izuzetno stabilnu tritrofičku interakciju između vektora, patogena i biljke dualnog domaćina.
- Preplitanje *tuf-b* puteva prenošenja '*Ca. Phytoplasma solani*' od strane populacija *H. obsoletus ex C. arvensis* i *ex V. agnus-castus* detektovano *in situ* u mediteranskim vinogradima, dodatno je umreženo transinfekcijskim eksperimentima *H. obsoletus ex C. foetida*.
- Eksperimentima transmisije '*Ca. Phytoplasma solani*' na ogleadne biljke pokazana je vektorska uloga *H. obsoletus* asocijacija sa *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* u epidemiologiji CPs-indukovane *Bois noir* bolesti vinove loze u jugoistočnoj Evropi.

7. Literatura

- Aleksić Ž, Šutić D, Aleksić D (1967) Transmission intensity of stolbur virus by means of *Hyalesthes obsoletus* Sign. on some host plants. *Zaštita bilja*, 93–95, 67–73.
- Alford DV (2011) Plant pests (Vol. 116). HarperCollins UK.
- Alma A (2002) Auchenorrhyncha as pests on grapevine. *Denisia*, 176, 531 – 538.
- Angelini E, Clair D, Borgo M, Bertaccini A, Boudon-Padieu E (2001) *Flavescence dorée* in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40, 79 - 86.
- Aplin KP, Suzuki H, Chinen AA, Chesser RT, Have J, Donnellan SC, Austin J, Frost A, Gonzalez JP, Herbreteau V, Catzeflis F, Soubrier J, Fang YP, Robins J, Matisoo-Smith E, Bastos ADS, Maryanto I, Sinaga MH, Denys C, Van Den Bussche RA, Conroy C, Rowe K, Cooper A (2011) Multiple geographic origins of commensalism and complex dispersal history of black rats. *PloS one*, 6(11), e26357.
- Aryan A, Brader G, Mörtel J, Pastar M, Riedle-Bauer M (2014) An abundant 'Candidatus Phytoplasma solani' Stolbur tu f b phytoplasma strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 213-227.
- Aryan A, Musetti R, Riedle-Bauer M, Brader G (2016) Phytoplasma Transmission by Heterologous Grafting Influences Viability of the Scion and Results in Early Symptom Development in Periwinkle Rootstock. *Journal of Phytopathology*, 16, 631-640.
- 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*, 142, 759-770.

- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3682-3696.
- Berlocher HS, Feder JL (2002) Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology*, 47, 773–815.
- Bernays EA, Chapman RF (2007) Host-plant selection by phytophagous insects (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Bertaccini A (2007) Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12, 673-689.
- Bertin S, Picciau L, Ács Z, Alma A, Bosco D (2010) Molecular identification of the *Hyalesthes* species (Hemiptera: Cixiidae) occurring in vineyard agroecosystems. *Annals of Applied Biology*, 157, 435–445.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, Ingram K, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148-155.
- Boudon-Padieu E (2000) Recent advances on grapevine yellows: detection, etiology, epidemiology and control strategies. In: Proceedings 13th ICVG Conference, pp. 87-88.
- Boudon-Padieu E (2003) The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. In: Proceedings of the 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Locorotondo (Bari), Italy, pp. 47-53.
- Bressan A, Turata R, Maixner M, Spiazzi S, Boudon-Padieu E, Girolami V (2007) Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on nettles and transmitting a stolbur phytoplasma to grapevines: a case study. *Annals of Applied Biology*, 150(3), 331-339.

- Brown JM, Abrahamson JG, Way PA (1996) Mitochondrial DNA phylogeography of host-races of the goldenrod ball gallmaker, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution*, 50, 777–786.
- Brown JK (2004) Tracing the origin of cryptic insect pests and vectors, and their natural enemies. *Genetics, evolution, and biological control*, 113-132.
- Brunner PC, Chatzivassiliou EK, Katis NI, Frey JE (2004) Host-associated genetic differentiation in *Thrips tabaci* (Insecta; Thysanoptera), as determined from mtDNA sequence data. *Heredity*, 93 (4), 364-370.
- Cargnus E, Pavan F, Mori N, Martini M (2012) Identification and phenology of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cixiidae) nymphal instars. *Bulletin of entomological research*, 102(05), 504-514.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual review of entomology*, 45(1), 1-54.
- Chabirand A, Loiseau M, Renaudin I, Poliakov F (2017) Data processing of qualitative results from an interlaboratory comparison for the detection of “*Flavescence dorée*” phytoplasma: How the use of statistics can improve the reliability of the method validation process in plant pathology. *PloS one*, 12(4), p.e0175247.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.
- Chen H, White DJ, Caraco TB, Stratton HH (2005) Epidemic and spatial dynamics of Lyme disease in New York State, 1990–2000. *Journal of medical entomology*, 42, 899–908.
- Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in plant science*, 10, 526-535.
- Chuche J, Thiéry D (2014) Biology and ecology of the *Flavescence dorée* vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for sustainable development*, 34(2), 381-403.

- Chuche J, Danet JL, Salar P, Foissac X, Thiéry D (2016) Transmission of 'Candidatus Phytoplasma solani' by *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of Applied Biology*, 169(2), 214-223.
- Chuche J, Danet JL, Rivoal JB, Arricau-Bouvery N, Thiéry D (2018) Minor cultures as hosts for vectors of extensive crop diseases: Does *Salvia sclarea* act as a pathogen and vector reservoir for lavender decline? *Journal of Pest Science*, 91(1), 145–155.
- Cimerman A, Pacifico D, Salar P, Marzachi C, Foissac X (2009) Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2951-2957.
- Clair D, Larrue J, Aubert G, Gillet J, Cloquemin G, Boudon-Padieu E (2003) Direct sensitive diagnosis of *Flavescence dorée* and *Bois noir* using a multiplex nested-PCR assay and its use in field surveys. *Extended abstracts 14th Meeting ICVG, Locorotondo, Italy*, 13-17.
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1660.
- Constable F (2010) Phytoplasmas epidemiology: grapevines as a model. In: Weintraub GP, Jones P, eds. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 188–212.
- Coope GR (2004) Several million years of stability among insect species because of, or in spite of, Ice Age climatic instability? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1442), 209-214.
- COST action FA 0807 2014 Phytoplasma diseases and vectors in Europe and surroundings.
<http://www.costphytoplasma.ipwgnet.org/InsectVectors.htm>
- 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(6), 507-514.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- De Barro P, Ahmed MZ (2011) Genetic networking of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex reveals pattern of biological invasions. *PLoS One*, 6(10):e25579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025579> PMID: 21998669
- Diehl SR, Bush GL (1984) An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Annual review of entomology*, 29(1), 471-504.
- Doi Y, Teranaka M, Yor K, Asuyama H (1967) Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33, 259 – 266.
- Drès M, Mallet J (2002) Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 357(1420), 471-492.
- Drosopoulos S (1999) On the genus *Eurhadina* HAUPT from Greece, with description of *E. remanei* sp.n. (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha: Cicadellidae: Typlocibinae). *Reichenbachia*, 33, 131-135.
- Đurić Z, Hrnčić S, Delić D (2017) Morphological and molecular identification of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) in Herzegovina vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 67, 177–181.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.

- EFSA Panel on Plant Health (2014) Scientific Opinion on the pest categorisation of *Candidatus* Phytoplasma solani. *EFSA Journal*, 12(12), 3924.
- Elliot SL, Adler FR, Sabelis MW (2003) How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology*, 84, 2568–2574.
- Ember I, Acs Z, Munyaneza JE, Crosslin JM, Kölber M (2011) Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 130, 367-377.
- Emelyanov AF (1995) The new taxa of the tribe Pentastirini (Homoptera, Cixiidae) from Palaearctic. *Zoologicheskii Zhurnal*, 74(9), 73–89.
- Endersby NM, McKechnie SW, Ridland PM, Weeks AR (2006) Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology*. 15, 107–118.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Fabiszewski AM, Umbanhowar J, Mitchell CE (2010) Modelling landscape-scale pathogen spillover between domesticated and wild hosts: Asian soybean rust and kudzu. *Ecological Applications*, 20, 582–592.
- Fabre A, Danet JL, Foissac X (2011a) The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene *stamp* is submitted to diversifying positive selection. *Gene*, 472(1), 37-41.
- Fabre A, Balakishiyeva G, Ember I, Omar A, Acs Z, Kölber M, Kauzner L, Della Bartola M, Danet JL, Foissac X (2011b) StAMP encoding the antigenic membrane protein of stolbur phytoplasma is useful for molecular epidemiology. *Bulletin of Insectology*, 64, 21-22.

- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587.
- Felsenstein J (2010) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Fernández-Palacios JM, Whittaker RJ (2008) The Canaries: an important biogeographical meeting place. *Journal of Biogeography*, 35(3), 379-387.
- Fialová R, Válová P, Balakishiyeva G, Danet JL, Šafářová 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(2), 411-416.
- Firrao G, Gibb K, Streten C (2005) Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus* Phytoplasma'. *Journal of Plant Pathology*, 87, 249-263.
- Firrao G, Garcia-Chapa M, Marzachi C (2007) Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, 12, 1353-1375.
- Foissac X, Carle P, Fabre A, Salar P, Danet JL, STOLBUR-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, 11-13
- Fos A, Danet JL, Zreik L, Garnier M, Bové JM (1992) Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant disease*, 76(11), 1092-1096.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- 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.

- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*, 86, 485–486.
- Güçlü S, Ozbek H (1988) Erzurum kosullarrında *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Homoptera; Cixiidae) un biyolojisi hzerinde bazi calismalar. *Turkiye Entomoloji Dergisi*, 12, 103–111.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 270(1512), 313–321.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 14812–14817.
- Hebert PD, Gregory TR (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Hedin MC (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.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society*, 58, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society*, 68, 87-112.
- Hoch H (1986a) Patterns of geographic distribution in the planthopper genus *Hyalesthes* Sign. (Homoptera: Fulgoroidea Cixiidae): A phylogenetic approach. In: Drosopoulos S. (ed), Proceedings of the 2nd International Congress of Rhynchota, pp. 31–32, Mikrolimni, Greece, 1986.
- Hoch H (1986b) Acht neue Arten der Gattung *Hyalesthes* Signoret, 1865 (Homoptera Fulgoroidea Cixiidae). *Marburger Entomologische Publicationen*, 2(3), 87-122.

- Hoch H, Remane R (1985) Evolution und Speziation der Zikaden-Gattung *Hyalesthes* SIGNORET, 1865 (Homoptera Auchenorrhyncha Fulgoroidea Cixiidae). *Marburger Entomologische Publikationen*, 2, 1-427.
- Hogenhout SA, Redinbaugh MG, Ammar E (2003) Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. *Trends in Microbiology*, 11, 264–271.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, 403-423.
- Holsinger K (2012) Tajima's D, Fu's Fs, Fay and Wu's H, and Zeng E et al.'s. *Lecture notes in population genetics*, 239–244.
- Horowitz AR, Ishaaya I (2014) Dynamics of biotypes B and Q of the whitefly *Bemisia tabaci* and its impact on insecticide resistance. *Pest Management Science*, 70(10), 1568-1572. <https://doi.org/10.1002/ps.3752> PMID: 24488629
- Horvath G (1891) Hemipterološki izlet u Primorje i Plitvička jezera. *Glasnik Hrvatskoga Naravoslovnoga Društva*, 4, 29-49.
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132, 583–589.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Hunter MD (2002) Landscape structure, habitat fragmentation, and the ecology of insects. *Agricultural and Forest Entomology*. 4, 159–166.
- Imo M, Lüneburg J, Hankeln T, Seitz A, Johannesen J (2011) Highly polymorphic di- and trinucleotide microsatellite markers for the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *European Journal of Entomology*, 108(1), 161.
- 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*, 22(8), 2188-2203.

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.

Jeger M, Bragard C, Caffier D, Candresse T, Chatzivassiliou E, Dehnen-Schmutz K, Gilioli G, JaquesMiret JA, MacLeod A, Navajas Navarro M, Niere B, Parnell S, Potting R, Rafoss T, Urek G, Rossi V, Van Bruggen A, Van Der Werf W, West J, Winter S, Bosco D, Foissac X, Strauss G, Hollo G, Mosbach-Schulz O, Grégoire JC (2016) Scientific opinion on the risk to plant health of *Flavescence dorée* for the EU territory. *EFSA Journal*, 14(12), 4603, 83. doi:10.2903/j.efsa.2016.4603.

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, 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(3), 488-495.

Jović J, Cvrković T, Mitrović M, Krnjajić S, Redinbaugh MG, Pratt RC, Gingery RE, Hogenhout SA, Toševski I (2007) Roles of stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of Maize redness in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118(1), 85-89.

Jović, J, Cvrković T, Mitrović M, 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(9), 1053-1061.

- Kabis MA, Khush GS (1988) Genetic analysis of resistance to brown planthopper in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*, 100, 54–58.
- Kaul C, Seitz A, Maixner M, Johannesen J (2009) Infection of Bois-Noir tuf-type-I stolbur phytoplasma in *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) larvae and influence on larval size. *Journal of Applied Entomology*, 133(8), 596-601.
- Kessler S, Schaerer S, Delabays N, Turlings TC, Trivellone V, Kehrli P (2011) Host plant preferences of *Hyalesthes obsoletus*, the vector of the grapevine yellows disease 'bois noir', in Switzerland. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139, 60-67.
- Knowles LL (2001) Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*, 10(3), 691-701.
- Kosovac A, Johannesen J, Krstić O, Mitrović M, Cvrković T, Maixner M, Toševski I, Jović J (2013) Microsatellite and mtDNA evidence for genetic differentiation of *Hyalesthes obsoletus* populations associated with a new major host, stinking hawk's-beard (*Crepis foetida*), in Southeast Europe. *Proceedings of the 3rd European Bois Noir Workshop*, 18-19.
- Kosovac A, Jakovljević M, Krstić O, Cvrković T, Mitrović M, Toševski I, Jović J (2014) *Crepis foetida* L. – nova biljka domaćin cikade *Hyalesthes obsoletus* SIGNORET 1865 (Hemiptera: Cixiidae), vektora stolbur fitoplazme. *Zaštita bilja*, 65(1), 7-14.
- Kosovac A, Radonjić S, Hrnčić S, Krstić O, Toševski I, Jović J (2016a) Molecular tracing of the transmission routes of bois noir in Mediterranean vineyards of Montenegro and experimental evidence for the epidemiological role of *Vitex agnus-castus* (Lamiaceae) and associated *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Plant Pathology*, 65, 285-298.
- Kosovac A, Johannesen J, Krstić O, Mitrović M, Cvrković T, Toševski I, Jović J (2016b) Is *Hyalesthes obsoletus* a species complex undergoing cryptic speciation? More evidence of host-associated genetic differentiation in Southeast Europe. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 66, 24-25.

- Kosovac A, Krstić O, Jakovljević M, Cvrković T, Mitrović M, Toševski I, Jović J (2016c) Elucidation of '*Candidatus* phytoplasma solani' epidemiology through trac(k)ing transmission pathways using field, experimental and molecular data. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 66, 9-11.
- Kosovac A, Johannesen J, Krstić O, Mitrović M, Cvrković T, Toševski I, Jović J (2018) Widespread plant specialization in the polyphagous planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae), a major vector of stolbur phytoplasma: Evidence of cryptic speciation. *PLOS ONE*, 13(5), p.e0196969.
- Krstić O, Radonjić S, Hrnčić S, Cvrković T, Mitrović M, Kosovac A, Toševski I, Jović J (2012) Diverzitet faune Auchenorrhyncha u vinogradima Crne Gore. *Zaštita bilja*, 63, 107–112.
- Kurbalija Novičić Z, Immonen E, Jelić M, Anđelković M, Stamenković-Radak M, Arnqvist G (2015). Within-population genetic effects of mtDNA on metabolic rate in *Drosophila subobscura*. *Journal of Evolutionary Biology*, 28, 338–346.
- Landi L, Riolo P, Murolo S, Romanazzi G, Nardi S, Isidoro N (2015) Genetic variability of stolbur phytoplasma in *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) and its main host plants in vineyard agroecosystems. *Journal of economic entomology*, 108, 1506–1515.
- Langer M, Darimont H, Maixner M (2003) Control of phytoplasma vectors in organic viticulture. *IOBC wprs Bulletin*, 26(8), 197-202.
- Langer M, Maixner M (2004) Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43, 191–199.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM (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 IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221-55.

- Lee IM, Martini M, Bottner KD, Dane RA, Black MC, Troxclair N (2003) Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, 93(11), 1368-1377.
- Lefol C, Lherminier J, Boudon-Padieu E, Larrue J, Louis C, Caudwell A (1994) Propagation of flavescence doree MLO (Mycoplasma-Like Organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63, 285-293.
- 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(1), 97-102.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85, 771-776.
- Mahuku GS (2004) A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 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 (1994) Detection of mycoplasma-like organisms associated with a yellows disease of grapevine in Germany. *Journal of Phytopathology*, 142(1), 1-10.
- Maixner M, Langer M (2006) Prediction of the flight of *Hyalesthes obsoletus*, vector of stolbur phytoplasma, using temperature sums. *IOBC wprs Bulletin*, 29, 161-166.
- Maixner M, Johannesen J, Michel K, Lux B, Seitz A (2007) Host plant specificity of *Hyalesthes obsoletus* and consequences for "bois noir" epidemiology. *Bulletin of Insectology*, 60, 399-400.

- Maixner M (2010) Phytoplasmas epidemiological systems with multiple plant hosts. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (ed. Weintraub & Jones), CABI Publishing, Wallingford, UK, 213–232.
- Maixner M (2011) Recent advances in *Bois noir* research. *Petria*, 21, 17–32.
- Maixner M, Albert A, Johannesen J. (2014) Survival relative to new and ancestral host plants, phytoplasma infection, and genetic constitution in host races of a polyphagous insect disease vector. *Ecology and evolution*, 4(15), 3082-3092.
- Mannelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J (2012) Ecology of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS microbiology reviews*, 36, 837–861.
- Maniyar B, Kehrli P, Johannesen J (2013) Population structure and incidence of the stolbur phytoplasma vector *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae) among geographic regions in Switzerland. *Journal of Applied Entomology*, 137(8), 589–600.
- Marcone C, Ragozzino A, Seemuller E (1997) Dodder transmission of alder yellows phytoplasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). *European Journal of Forest Pathology*, 27, 347-350.
- Marcone C, Hergenbahn 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.
- Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Z, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan AJ, 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.
- McPherson BA (2000) Population genetics and cryptic species. In Tan, K.-H., (Ed). *Area wide control of fruit flies and other insect pests*. Penerbit Universiti sains Malaysia, Penang. 483–490.

- Mitrović M, Jakovljević M, Jović J, Krstić O, Kosovac A, Trivellone V, Jermini M, Toševski I, Cvrković T (2016) 'Candidatus phytoplasma solani' genotypes associated with potato stolbur in Serbia and the role of *Hyalesthes obsoletus* and *Reptalus panzeri* (hemiptera, cixiidae) as natural vectors. *European Journal of Plant Pathology*, 144(3), 619-630.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000) Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31(1), 533-563.
- Moya-Raygoza G, Nault LR (1998) Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91, 668-676.
- Mullen SP, Shaw KL (2014) Insect Speciation Rules: Unifying Concepts in Speciation Research. *Annual review of entomology*, 59, 339-361.
- Murolo S, Marccone C, Prota V, Garau R, Foissac X, Romanazzi G (2010) Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2049-2059.
- Murolo S, Marccone C, Prota V, Garau R, Foissac X, Romanazzi G (2013) Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables (corrigendum to vol 109, pg 2049, 2010). *Journal of Applied Microbiology*, 115, 631-633.
- Murolo S, Romanazzi G (2015) In-vineyard population structure of 'Candidatus Phytoplasma solani' using multilocus sequence. *Infection, Genetics and Evolution*, 31, 221-230.
- Murrall DJ, Nault LR, Hoy CW, Madden LV, Miller SA (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 RGE, Schleifer KH (1994) Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 174-176.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5269–5273.
- Nickel H (2003) The Leafhoppers and Planthoppers of Germany (Hemiptera, Auchenorrhyncha): Patterns and strategies in a highly diverse group of phytophagous insects. Pensoft Publishers, Bulgaria.
- Olmstead KL, Denno RF, Morton TC, Romeo JT (1997) Influence of Prokelisia planthoppers on amino acid composition and growth of *Spartina alterniflora*. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 303-321.
- Pacifico D, Foissac X, Veratti F, Marzachi C (2007) Genetic diversity of Italian and French "bois noir" phytoplasma isolates. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 345.
- 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(6), 711-715.
- Peccoud J, Labonne G, Sauvion N (2013) Molecular Test to Assign Individuals within the *Cacopsylla pruni* Complex. *PLoS ONE*, 8(8): e72454.
- Quaglino F, Zhao Y, Casati P, Bulgari D, Bianco PA, Wei W, Davis RE (2013) 'Candidatus Phytoplasma solani', a novel taxon associated with stolbur-and bois noir-related diseases of plants. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(8), 2879-2894.
- Quaglino F, Maghradze D, Casati P, Chkhaidze N, Lobjanidze M, Ravasio A, Passera A, Venturini G, Failla O, Bianco PA (2016) Identification and characterization of new 'Candidatus Phytoplasma solani' strains associated with bois noir disease in *Vitis vinifera* L. cultivars showing a range of symptom severity in Georgia, the Caucasus region. *Plant Disease*, 100(5), 904-915.

- 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(11-12), 682-685.
- Rambaut A (2012) FigTree version 1.4.0. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer 1.5.0. MCMC Trace Analysis Tool. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, 86, 248-249.
- Remane R, Hoch H (1986) Sechs neue Arten der Gattung *Hyalesthes* Signoret, 1865 (Homoptera Fulgoroidea Cixiidae) von den Mittelatlantischen Inseln urid aus dem Irak. *Marburger Entomologische Publicationen*, 2, 123–154.
- Rees DJ, Emerson BC, Oromi P, Hewitt GM (2001) Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the Nesotes (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Molecular Ecology*, 10, 427–434.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- 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.
- Riedle-Bauer M, Mörtel J, Pastar M, Aryan A, Bader G (2013) Mass occurrence of *Hyalesthes obsoletus* on *Urtica dioica* in Austria and sole presence of tuf-type-b stolbur phytoplasma on stinging nettles grapevine and in transmitting insects. In: Proceedings of the 3rd European Bois Noir Workshop 2013, Barcelona, Spain, pp. 26–27.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Saez AG, Lozano E (2005) Body doubles. *Nature*, 433, 111. <https://doi.org/10.1038/433111a> PMID: 15650721

- Scheffer SJ, Wiegmann BM (2000) Molecular phylogenetics of the holly leafminers (Diptera: Agromyzidae: Phytomyza): species limits, speciation, and dietary specialization. *Molecular phylogenetics and evolution*, 17(2), 244-255.
- Scheffer SJ, Lewis ML (2001) Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5), 648-653.
- Schneider B, Gibb KS, Seemüller E (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143(10), 3381-3389.
- Seemüller E, Schneider B, Mäurer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz KH, Firrao G, Avinent L, Sears B, Stackebrandt E (1994) Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 440-446.
- Seemüller E, Marcone C, Lauer U, Ragozzino A, Göschl M (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80(1), 3-26.
- Sforza R, Bourgoïn T (1998) Female genitalia and copulation of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera, Fulgoromorpha, Cixiidae). *Annales de la Société Entomologique de France (N.S.)*, 34, 63-70.
- 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 SW, 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 SD, Zahavi T, Harari A, Weintraub PG (2005) *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 1051-1063.

- Sharon R, Harari AR, Zahavi T, Raz R, Dafny-Yelin M, Tomer M, Sofer-Arad C, Weintraub PG, Naor V (2015) A yellows disease system with differing principal host plants for the obligatory pathogen and its vector. *Plant Pathology*, 64(4), 785-791.
- Singer MC, Ng D, Vasco D, Thomas C (1992) Rapidly evolving associations among oviposition preferences fail to constrain evolution of insect diet. *American Naturalist*, 139, 9–20.
- Suhov KS, Vovk AM (1949) Stolbur of solanaceous plants. USSR Academy of Sciences Publishers, 7-11.
- Suhov KS, Razvyazkina MG (1955) Biology of viruses and virus diseases of plants. Moscow: Soviet Science, 143-153.
- Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung HY, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M, Namba S (2006) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4252-4257.
- Swofford D (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA.
- Szpiech ZA, Rosenberg NA (2011) On the size distribution of private microsatellite alleles." *Theoretical population biology*, 80(2), 100-113.
- Šafářova D, Lauterer P, Korbasova S, Starý M, Válová P, Navrátil M (2011) *Hyalesthes obsoletus* a vector of stolbur phytoplasma: current situation in South Moravia, Czech republic. *Bulletin of Insectology*, 64, 127–128.
- Taglianti AV, Audisio PA, Biondi M, Bologna MA, Carpaneto GM, De Biase A, Fattorini S, Piattella E, Sindaco R, Venchi A, Zapparoli M (1999) A proposal for a chorotype classification of the Near East fauna, in the framework of the Western Palearctic region. *Biogeographia*, 20, 31-59.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437–460.

- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ (2006) Global traffic and disease vector dispersal. *PNAS*, 103, 6242–6247.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132 , 619–633.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Toth KF, Harrison N, Sears BB (1994) Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from rps3 gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 119–124.
- Toševski I, Caldara, R, Jović J, Hernández-Vera G, Baviera C, Gassmann A, Emerson BC (2011) Morphological, molecular and biological evidence reveal two cryptic species in *Mecinus janthinus* Germar (Coleoptera, Curculionidae), a successful biological control agent of Dalmatian toadflax, *Linaria dalmatica* (Lamiales, Plantaginaceae). *Systematic Entomology*, 36(4), 741-753.
- Toševski I, Caldara R, Jović J, Hernández-Vera G, Baviera C, Gassmann A, Emerson BC (2015) Host-associated genetic divergence and taxonomy in the *Rhinusa pilosa* Gyllenhal species complex: an integrative approach. *Systematic Entomology*, 40, 268-287.

- Tsagkarakou A, Tsigenopoulos CS, Gorman K, Lagnel J, Bedford ID (2007) Biotype status and genetic polymorphism of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Greece: mitochondrial DNA and microsatellites. *Bulletin of Entomological Research*. 97, 29–40.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Via S (1990) Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. *Annual Review of Entomology*. 35, 421–446.
- Wang G, Li C, Zheng W, Song F, Guo X, Wu Z, Luo P, Yang Y, He L, Zhao T (2017) An evaluation of the suitability of COI and COII gene variation for reconstructing the phylogeny of, and identifying cryptic species in, anopheline mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 28(5), 769–777.
- Weintraub PG & Beanland L (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51, 91–111.
- Weintraub PG & Jones P (Eds.) (2010) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. Cabi.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Weiver SC, Reisen WK (2010) Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85, 328–345.
- Wilkins MR, Seddon N, Safran RJ (2013) Evolutionary divergence in acoustic signals: causes and consequences. *Trends in Ecology and Evolution*, 28, 156-166.
- Wingfield M, Roux J, Wingfield B (2011) Insect pests and pathogens of Australian acacias grown as non-natives – an experiment in biogeography with far-reaching consequences. *Diversity and Distributions*, 17, 968–977.

- Zahavi T, Sharon R, Sapir G, Mawassi M, Dafny-Yelin M, Naor V (2013) The long-term effect of Stolbur phytoplasma on grapevines in the Golan Heights. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(2), 277-284.
- Zhao Y, Davis RE (2016) Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 2121–2123.
- Zhao Y, Wei W, Davis RE, Lee IM (2010) Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. In: Weintraub GP, Jones P, eds. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 64–92.

8. Prilozi

Prilog 1

Pregled literaturnih podataka o biljkama koje se dovode u vezu sa *H. obsoletus* kao pogodne za razvoj larvi, ishranu ili agregaciju adolata čime se implicira na polifagnošću ove cikade. U koloni „napomena” su prikazani detalji vezani za detektovani razvojni stadijum insekta, tipove staništa, metodologiju sakupljanja i sl. Podaci koji ukazuju na status biljaka domaćina na osnovu poklapanja izolata 'Ca. P. solani' prisutnih u biljci i jedinkama *H. obsoletus* nisu uzeti u obzir. Podebljanim slovima su prikazane biljke koje se ističu kao najčešći nalazi širom areala vrste i čije su asocijane *H. obsoletus* populacije ujedno i predmet istraživanja doktorske disertacije.

Država	Biljka	Napomena	Referenca
Rusija	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Lepidium draba</i>	larve i adulti	Sukhov & Razvyazkina 1955
	krompir (<i>Solanum tuberosum</i>)	adulti	Imo <i>et al.</i> 2013
Turska	<i>Vitex</i> sp. <i>Crataegus</i> sp. <i>Myrtus</i> sp. <i>Paliurus</i> sp. <i>Quercus coccifera</i> <i>Quercus ilex</i> <i>Rubus</i> sp. <i>Sesamum indicum</i> <i>Cistus</i> sp. paprika (<i>Capsicum anuum</i>)	adulti	Hoch & Remane 1985
	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Crambe orientalis</i> <i>Falcaria vulgaris</i> <i>Geranium tuberosum</i> <i>Isatis glauca</i> <i>Lepidium draba</i>	prezimljujući domaćini za nimfe; adulti imaju agregaciju uglavnom na <i>Medicago sativa</i> ali se mogu naći i na različitim usevima kao što su krompir, šećerna repa, crvena detelina, pasulj i ređe	Güclü & Ozbek 1988

	<i>Melilotus officinalis</i> <i>Onosuma armeneum</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Taraxacum sp.</i> lucerka (<i>Medicago sativa</i>) esparzeta (<i>Onobrichis sativa</i>)	suncokret i tikvica	
Izrael	<i>Tamarix sp.</i> <i>Gossypium sp.</i> (pamuk) krompir (<i>Solanum tuberosum</i>) kukuruz (<i>Zea mays</i>)	adulti	Hoch & Remane 1985
	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Vitex agnus-castus</i> <i>Amaranthus retroflexus</i> <i>Myrtus communis</i> <i>Olea europaea</i> vinova loza (<i>Vitis vinifera</i>)	adulti sakupljeni entomološkom mrežom i klopkama izletanja; larve su pronađene na korenu <i>V. agnus-castus</i>	Sharon <i>et al.</i> 2005
Grčka	<i>Convolvulus sp.</i> <i>Vitex sp.</i> <i>Acer campestre</i> <i>Arbutus sp.</i> <i>Arundo sp.</i> <i>Artemisia sp.</i> <i>Carpinus betulus</i> <i>Cistus sp.</i> <i>Crataegus sp.</i> <i>Cynodon sp.</i> <i>Erica arborea</i> <i>Euphorbia dendroides</i> <i>Galium sp.</i> <i>Hipparhenia hirta</i> <i>Imperata cylindrica</i> <i>Juncus sp.</i> <i>Ligustrum vulgare</i> <i>Myrtus sp.</i> <i>Oreganum sp.</i> <i>Quercus coccifera</i> <i>Quercus cerris</i>	adulti; najčešće su sakupljeni na <i>Vitex</i> sp. u obalskim staništima	Hoch & Remane 1985

	<i>Quercus ilex</i> <i>Quercus pubescens</i> <i>Paliurus</i> sp. <i>Phragmites</i> sp. <i>Platanus</i> sp. <i>Populus</i> sp. <i>Prunus spinosa</i> <i>Pteridium</i> sp. <i>Rubus</i> sp. <i>Salix</i> sp. <i>Tamarix</i> sp. <i>Ulmus</i> sp. paprika (<i>Capsicum anuum</i>) pamuk (<i>Gossypium</i> sp.) susam (<i>Sesamum indicum</i>) krompir (<i>Solanum tuberosum</i>) kukuruz (<i>Zea mays</i>)		
Kipar i grčka ostrva: Krit, Lezbos, Ikarija, Rodos	<i>Vitex</i> sp. <i>Arbutus</i> sp. <i>Arundo</i> sp. <i>Erica arborea</i> <i>Euphorbia dendroides</i> <i>Imperata cylindrica</i> <i>Juncus</i> sp. <i>Phragmites</i> sp. <i>Platanus</i> sp. <i>Pteridium</i> sp. <i>Tamarix</i> sp. <i>Quercus pubescens</i>	adulti; najčešće sakupljani na <i>Vitex</i> sp. u obalskim staništima	Hoch & Remane 1985
Rumunija	krompir (<i>Solanum tuberosum</i>)	adulti	Imo <i>et al.</i> 2013
Makedonija	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Urtica dioica</i>	adulti su sakupljeni sa ekshaustorima i entomološkim mrežama	Atanasova <i>et al.</i> 2015
Srbija	<i>Convolvulus arvensis</i>		Aleksić <i>et al.</i> 1967

	različiti korovi u vinogradu	prvi podatak o <i>Crepis foetida</i> kao članu korovske zajednice sa koje su adulti neselektivno sakupljeni	Čvrković 2010
	<i>Convolvulus arvensis</i>	adulti su sakupljeni	Kosovac <i>et al.</i>
	<i>Urtica dioica</i>	entomološkom mrežom i ekshaustorom ; izuzetno	2013
	<i>Crepis foetida</i>	brojne populacije su detektovane na <i>C. foetida</i>	
Bosna i Hercegovina	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Vitex agnus-castus</i>	adulti sakupljeni entomološkom mrežom i ekshaustorom	Đurić <i>et al.</i> 2017
Hrvatska	<i>Vitex agnus-castus</i>	vrlo često mogu biti pronađeni na <i>V. agnus-castus</i>	Horvath 1891
Slovenija	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Urtica dioica</i>	adulti sakupljeni žutim trakama ili entomološkom mrežom	Mehle <i>et al.</i> 2011
	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Urtica dioica</i>	adulti su sakupljeni na pojedinačnim biljkama ekshaustorom ili na monodominantnim vegetacijskim sklopovima entomološkom mrežom	Imo <i>et al.</i> 2013
Mađarska	<i>Urtica dioica</i>	adulti sakupljeni vakuum ekshaustorom	Palermo <i>et al.</i> 2004
Austrija	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Urtica dioica</i>	asocijacija sa <i>U. dioica</i> je dominantna	Aryan <i>et al.</i> 2014
Švajcarska	<i>Convolvulus arvensis</i>	adulti su sakupljeni ekshaustorom na koprivi;	Kessler <i>et al.</i> 2011
	<i>Urtica dioica</i>	larve su prisutne na korenu koprive u prirodi i u laboratorijskim eksperimentima su završile razviće na korenu iste biljke	
	<i>Calystegia sepium</i> <i>Cardaria draba</i> <i>Clematis vitalba</i> <i>Lepidium draba</i>	adulti su sakupljeni na žutim trakama postavljenim iznad specifične biljke	

	<i>Calystegia sepium</i> <i>Plantago lanceolata</i> <i>Polygonum aviculare</i> <i>Taraxacum officinale</i>	adulti su sakupljeni uz pomoć žutih traka pozicioniranih direktno iznad biljaka	
Nemačka	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Allium</i> sp. <i>Festuca</i> sp.	krečnjak	Hoch & Remane 1985
	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Solanum nigrum</i> vinova loza (<i>Vitis vinifera</i>)		Maixner 1994
	<i>Ranunculus bulbosus</i>		Weber & Maixner 1998
	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Urtica dioica</i> <i>Calystegia sepium</i>		Langer & Maixner 2004
Francuska	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Cardaria draba</i> <i>Calystegia sepium</i> <i>Galium verum</i> <i>Lavandula angustifolia</i> <i>Linaria striata</i> <i>Plantago cynops</i> <i>Satureia montana</i>	adulti sakupljeni košenjem enotmološkom mrežom	Sforza <i>et al.</i> 1999
	<i>Convolvulus arvensis</i> <i>Urtica dioica</i>	adulti sakupljeni vakuum eksthaustorom	Bressan <i>et al.</i> 2008
	<i>Lavandula angustifolia</i> <i>Lavandula x intermedia</i>	adulti sakupljeni žutim trakama na poljima različitih sorti lavande	Yvin <i>et al.</i> 2017
	<i>Salvia sclarea</i> <i>Convolvulus arvensis</i> <i>Lavandula hybrida</i>	larve sakupljene na korenu biljaka; adulti sakupljeni u klopkama izletanja adulti sakupljeni u klopkama izletanja	Hossard <i>et al.</i> 2018

	<i>Salvia sclarea</i>	adulti sakupljeni vakuum ekshaustorom i žutim trakama; larve sakupljene na korenu biljaka	Chuche <i>et al.</i> 2018
	<i>Convolvulus arvensis</i>	adulti sakupljeni vakuum ekshaustorom I žutim trakama	
	<i>Urtica dioica</i>		
Španija	<i>Trifolium pratense</i>		Hoch & Remane 1985
	<i>Convolvulus arvensis</i>		Sabate <i>et al.</i> 2014
Italija	<i>Convolvulus arvensis</i>	larve su pronađene na korenu <i>U. dioica</i>	Lessio <i>et al.</i> 2007
	<i>Urtica dioica</i>		
	<i>Convolvulus arvensis</i>	adulti su sakupljeni entomološkom mrežom na sve tri biljke;	Cargnus <i>et al.</i> 2012
	<i>Urtica dioica</i>		
	<i>Artemisia verlotorum</i>	larve su ručno sakupljene na korenu <i>U. dioica</i> i <i>C. arvensis</i>	
Sicilija	<i>Dactylis</i> sp.		Hoch & Remane 1985
	<i>Juncus</i> sp.		
	fam. <i>Lamiaceae</i>		
	<i>Ulmus</i> sp.		
	<i>Urtica</i> sp.		
Maroko	<i>Clematis</i> sp.		Hoch & Remane 1985
	<i>Pistacia</i> sp.		
	<i>Tamarix</i> sp		
	<i>Quercus coccifera</i>		

Literaturni izvori:

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*, 142, 759-770.
- Aleksić Ž, Šutić D, Aleksić D (1967) Transmission intensity of stolbur virus by means of *Hyalesthes obsoletus* Sign. on some host plants. *Plant Protection*, 93-95, 67-73.
- Aryan A, Brader G, Mörtel J, Pastar M, Riedle-Bauer M (2014) An abundant 'Candidatus Phytoplasma solani' Stolbur tuf b phytoplasma strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *European Journal of Plant Pathology*, 140, 213-227.
- Bressan A, Sémétey O, Nusillard B, Clair D, Boudon-Padieu E (2008) Insect vectors (Hemiptera: Cixiidae) and pathogens associated with the disease syndrome "basses richesses" of sugar beet in France. *Plant Disease*, 92(1), 113-119.
- Chuche J, Danet JL, Rivoal JB, Arricau-Bouvery N, Thiéry D (2018) Minor cultures as hosts for vectors of extensive crop diseases: Does *Salvia sclarea* act as a pathogen and vector reservoir for lavender decline? *Journal of Pest Science*, 91(1), 145-155.
- Cvrković T (2010) Diverzitet faune cikada u vinogradima Srbije i njihova uloga u prenošenju *Bois Noir* fitoplazme. PhD thesis, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, 1-101.
- Đurić Z, Hrnčić S, Delić D (2017) Morphological and molecular identification of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) in Herzegovina vineyard. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 67, 177-181.
- Güclü S, Ozbek H (1988) Some studies on the biology of *Hyalestes obsoletus* Signoret (Homoptera: Cixidae) in the conditions of Erzurum. *Turkiye-Entomoloji-Dergisi*, 12, 103-111.
- Hoch H, Remane R (1985) Evolution und Speziation der Zikaden-Gattung *Hyalesthes* Signoret, 1865 (Homoptera Auchenorrhyncha Fulgoroidea Cixiidae). *Marburger Entomologische Publikationen*, 2, 1-427.
- Horváth G (1891) Hemipterološki izlet u Primorje i Plitvička jezera. *Glasnik Hrvatskoga Naravoslovnoga Drustva (Societas historico-naturalis Croatica)*, VI (1-5), 29-49.
- Hossard L, Guimier S, Vinatier F, Barbier JM, Delmotte S, Fontaine M, Rivoal JB (2018) Source of *Hyalesthes obsoletus* Signoret planthopper (Hemiptera: Cixiidae) in

southern France and potential effects of landscape. *Bulletin of Entomological Research*, 108, 213-222.

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*, 22, 2188-2203.

Kessler S, Schaerer S, Delabays N, Turlings TC, Trivellone V, Kehrli P (2011) Host plant preferences of *Hyalesthes obsoletus*, the vector of the grapevine yellows disease 'bois noir', in Switzerland. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139, 60-67.

Kosovac A, Johannesen J, Krstić O, Mitrović M, Cvrković T, Maixner M, Toševski I, Jović J (2013) Microsatellite and mtDNA evidence of genetic differentiation in *Hyalesthes obsoletus* populations associated with a new major host, stinking hawk's-beard (*Crepis foetida*), in southeast Europe. *Proceedings of the 3rd European Bois Noir Workshop*, Barcelona, 18-19.

Kosovac A, Radonjić S, Hrnčić S, Krstić O, Toševski I, Jović J (2016) Molecular tracing of the transmission routes of bois noir in Mediterranean vineyards of Montenegro and experimental evidence for the epidemiological role of *Vitex agnus-castus* (Lamiaceae) and associated *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Plant Pathology*, 65, 285-298.

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.

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.

Maixner M (1994) Research note: Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, 33, 103-104.

- 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 vineyards. *Vitis*, 43(4), 201-203.
- Sabaté J, Laviña A, Batlle A (2014) Incidence of Bois Noir phytoplasma in different viticulture regions of Spain and Stolbur isolates distribution in plants and vectors. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 185-193.
- Sforza R, Bourgoïn T, Wilson SW, 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 SD, Zahavi T, Harari A, Weintraub PG (2005) *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 1051-1063.
- Suhov KS, Vovk AM (1949) Stolbur of solanaceous plants. USSR Academy of Sciences Publishers. 7-11.
- Weber A, Maixner M (1998) Survey of populations of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* Sign. (Auchenorrhyncha, Cixiidae) for infection with the phytoplasma causing grapevine yellows in Germany. *Journal of Applied Entomology*, 122, 375-381.
- Yvin C, Chaisse E, Fontaine M, Rivoal JB, Verdin E, Nicolè F, Jourdan P, Savarit P, Gallois P (2017) Dépérissement de la lavande et du lavandin : mise en oeuvre d'un programme de recherches appliquées afin d'apporter des solutions de lutte aux producteurs. *Innovations Agronomiques*, 55, 107-120.

Prilog 2

Lista prethodno publikovanih *H. obsoletus* mtDNK haplotipova detektovanih u Evropi i Izraelu. Oznake haplotipova se sastoje od dva alfabetska simbola koji se odnose na *COI-tRNK(Leu)-COII* i *16S-tRNK(Leu)-ND1* genske regije. Ispod oznake haplotipa naveden je pristupni broj u NCBI genetičkoj bazi, biljka domaćin i država porekla. Oznake država su: Austrija (AT), Francuska (FR), Nemačka (DE), Slovenija (SI), Italija (IT), Španija (ES), Mađarska (HU), Izrael (IL), Švajcarska (CH). Haplotipovi rednih brojeva 1–12 su opisani od strane Johannesen *et al.* (2008), 13–19 su opisani od strane Johannesen *et al.* (2012), 20–22 su opisani od strane Chucho *et al.* (2018).

R.br.	Haplotip		Biljka domaćin	Država
	<i>COI-tRNK(Leu)-COII</i>	<i>16S-tRNK(Leu)-ND1</i>		
1.	A EU155640	A EU155649	<i>U. dioica</i> <i>C. arvensis</i>	AT, FR, DE, SI
2.	A	B EU155650	<i>U. dioica</i> <i>C. arvensis</i>	AT, FR, IT, ES, SI
3.	A	F EU155654	<i>U. dioica</i>	IT
4.	B EU155641	B	<i>U. dioica</i>	FR, DE, IT, ES
5.	C EU155642	D EU155652	<i>U. dioica</i>	FR, IT
6.	D EU155643	B	<i>U. dioica</i>	FR
7.	E EU155644	C EU155651	<i>U. dioica</i> <i>C. arvensis</i>	HU, SI
8.	F EU155645	C	<i>U. dioica</i>	HU
9.	I EU155648	B	<i>U. dioica</i>	IT
10.	I	G EU155655	<i>U. dioica</i>	IT
11.	G EU155646	E EU155653	<i>V. agnus-castus</i>	IL

12.	H EU155647	E	<i>V. agnus- castus</i>	IL
13.	A	J JQ977743	<i>U. dioica</i>	IT
14.	A	D	<i>U. dioica</i>	IT
15.	T JX025163	B	<i>U. dioica</i>	SI
16.	N JX025161	B	<i>U. dioica</i>	CH
17.	O JX025162	B	<i>C. arvensis</i>	IT
18.	K JX025159	B	<i>C. arvensis</i>	IT
19.	L JX025160	B	<i>U. dioica</i>	CH
20.	ε LT841310	B	<i>C. arvensis</i>	FR
21.	ζ LT841311	B	<i>C. arvensis</i>	FR
22.	δ LT841309	B	<i>C. arvensis</i>	FR

Prilog 3

Lista novoopisanih *H. obsoletus* haplotipova *COI-tRNK(Leu)-COII* i *16S-tRNK(Leu)-ND1* genskih regiona sa navedenim odgovarajućim pristupnim brojevima u NCBI genetičkoj bazi.

Genski region	Haplotip	NCBI pristupni broj	Biljka domaćin
<i>COI-tRNK(Leu)-COII</i>	S	KY368699	<i>C. arvensis</i>
	X	KY368700	<i>C. arvensis</i>
	π (pi)	KY368701	<i>C. arvensis</i>
	ψ (psi)	KY368702	<i>C. arvensis</i>
	α (alfa)	KY368703	<i>U. dioica</i>
	β (beta)	KY368704	<i>U. dioica</i>
	ξ (ksi)	KY368705	<i>U. dioica</i>
	R	KY368706	<i>U. dioica</i>
	ρ (ro)	KY368707	<i>U. dioica</i>
	ω (omega)	KY368708	<i>U. dioica</i>
	W	KY368709	<i>U. dioica, C. arvensis</i>
	J	KY368710	<i>C. foetida</i>
	M	KY368711	<i>C. foetida</i>
	U	KY368712	<i>C. foetida</i>
	V	KY368713	<i>C. foetida</i>
	λ (lambda)	KY368714	<i>C. foetida</i>
	μ (mikro)	KY368715	<i>C. foetida</i>
	Y	KY368716	<i>V. agnus-castus</i>
	Z	KY368717	<i>V. agnus-castus</i>
	γ (gama)	KY368718	<i>V. agnus-castus</i>
η (eta)	KY368719	<i>V. agnus-castus</i>	

	σ (sigma)	KY368720	<i>V. agnus-castus</i>
	θ (teta)	KY368721	<i>V. agnus-castus</i>
	P	KY368722	nepoznata
	φ (fi)	KY368723	nepoznata
	Q	KY368724	nepoznata
<i>16S-tRNA(Leu)-ND1</i>	K	KY368692	<i>C. arvensis</i>
	L	KY368693	<i>C. arvensis</i>
	Q	KY368694	<i>U. dioica</i>
	H	KY368695	<i>C. foetida</i>
	M	KY368696	<i>V. agnus-castus</i>
	N	KY368697	<i>V. agnus-castus</i>
	O	KY368698	<i>V. agnus-castus</i>

Prilog 4

Testovi neutralnosti izračunati na nivou svake od četiri *H. obsoletus* asocijacije, združenih asocijacija sa poponcem i koprivom, kao i na nivou vrste (Ukupno). Kalkulacije su urađene na osnovu seta mtDNK haplotipova dva genska regiona: *COI-tRNK(Leu)-COII* i *16S-tRNK(Leu)-ND1*.

Asocijacija (br. jedinki)	n	Test neutralnosti	
		Tadžimin <i>D</i> test	Fuova F_S statistika
<i>Convolvulus arvensis</i> (57)	8	-0.43667 (p = 0.39500)	-0.54393 (p = 0.44400)
<i>Urtica dioica</i> (120)	9	-2.18859 (p = 0.00100)***	-8.59152 (p = 0.00000)***
<i>C. arvensis-U. dioica</i> (177)	15	-1.87421 (p = 0.00500)**	-9.59790 (p = 0.00100)***
<i>Vitex agnus-castus</i> (56)	8	1.95886 (p = 0.97300)	2.65819 (p = 0.84600)
<i>Crepis foetida</i> (83)	6	-1.04433 (p = 0.16800)	-2.56721 (p = 0.07400)
Ukupno (316)	29	-0.31990 (p = 0.38200)	-3.16897 (p = 0.30700)

n, broj haplotipova

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Prilog 5

Poređenje genetičke divergencije AMOVA i F statistikom na osnovu mikrosatelita unutar i između *H. obsoletus* populacija grupisanih prema asocijaciji sa biljkom domaćinom ili geografiji. Rezultati predstavljaju procenat ukupne međupopulacione divergencije koja se može pripisati grupi (F_{CT}) ili unutar-grupnoj varijansi (F_{SC}).

Analiza	Ukupna genetička varijansa	Unutar-grupna varijansa	Varijansa između grupa (biljka domaćin ili geografija)	% Ukupne varijanse poreklom od biljke domaćina ili geografije
	F_{ST}	F_{SC}	F_{CT}	$F_{CT}/F_{ST} \times 100\%$
50 <i>H. obsoletus</i> populacija sakupljenih u sprovedenim istraživanjima i populacija <i>ex V. agnus-castus</i> iz Izraela, grupisane na osnovu biljke domaćina	0.180***	0.047***	0.139***	77%
Populacije <i>H. obsoletus ex V. agnus-castus</i> iz Crne Gore i Grčke grupisane prema geografiji (državi)	0.097***	0.041***	0.059*	60%
Populacije <i>H. obsoletus ex V. agnus-castus</i> iz Crne Gore i Grčke i populacija <i>ex V. agnus-castus</i> iz Izraela grupisane u klastere sugerisane prema STRUCTURE analizi (poglavlje 4.3.2)	0.108***	0.064***	0.046**	42%

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Prilog 6

Uporedni prikaz diverziteta 'Ca. P. solani' MLST genotipova detektovanih u okviru četiri epidemiološka ciklusa koji otpočinju od specifične biljke domaćina. Podaci koji se odnose na *U. dioica* obuhvataju CPs isolate detektovane u asociiranim *H. obsoletus* populacijama i prirodno inficiranim biljkama. Podaci koji se odnose na *C. arvensis*, *V. agnus-castus* i *C. foetida* obuhvataju CPs isolate detektovane u asociiranim *H. obsoletus* populacijama, prirodno inficiranim biljkama i genotipove koje je *ex situ* na eksperimentalne biljke prenela ogledna populacija vektora svake od tri asocijacije. Grupisanje izolata je urađeno prateći odgovarajući *tuf* tip i klastiranje *stamp* genotipova u genealoškoj mreži (Slika 25). Redosled gena u okviru MLST genotipa je *tuf/stamp/vmp1*. Simbolom „-“ su u okviru MLST genotipa označeni odgovarajući geni koji se nisu amplifikovali, i nisu okarakterisani. Simbolom „#“ je označeno odsustvo određenog MLST genotipa u okviru odgovarajućeg epidemiološkog ciklusa.

	<i>Urtica dioica</i> epidemiološki ciklus	<i>Convolvulus arvensis</i> epidemiološki ciklus	<i>Vitex agnus-castus</i> epidemiološki ciklus	<i>Crepis foetida</i> epidemiološki ciklus
Subklaster a1	<i>tuf-ab/19-25/V3</i>	#	#	#
	<i>tuf-ab/19-25/V18</i>	#	#	#
	<i>-/19-25/-</i>	#	#	#
	<i>-/HoU354/-</i>	#	#	#
	<i>-/HoU355/-</i>	#	#	#
	<i>-/HoU362/-</i>	#	#	#
	<i>-/HoU448/V23</i>	#	#	#
<i>-/HoU437/-</i>	#	#	#	
Subklaster a2	<i>tuf-a/SB5/V3</i>	#	#	#
	<i>-/SB5/-</i>	#	#	#
	<i>tuf-a/M2/V3</i>	#	#	#

	<i>tuf-a/M3/V3</i>	#	#	#
Klaster b-I	#	#	#	#
Klaster b-II	#	<i>tuf-b/Rqg50/V2-TA</i>	#	#
	#	<i>tuf-b/Rqg50/V4</i>	<i>tuf-b/Rqg50/V4</i>	<i>tuf-b/Rqg50/V4</i>
	#	<i>tuf-b/Rqg50/V14</i>	#	#
	#	<i>tuf-b/Rqg50/V17</i>	<i>tuf-b/Rqg50/V17</i>	#
	#	<i>-/Rqg50/V17</i>	#	#
	#	#	<i>-/Rqg50/-</i>	<i>-/Rqg50/-</i>
	#	<i>tuf-b/Vv24/V4</i>	#	#
	#	<i>tuf-b/Vv24/V14</i>	<i>tuf-b/Vv24/V14</i>	#
	#	<i>tuf-b/HoCa242/V4</i>	#	#
	#	<i>tuf-b/HoCa632/-</i>	#	#
	#	#	<i>tuf-b/Ho-Vac1/V17</i>	#
	<i>tuf-b/Rqg31/V2-TA</i>	<i>tuf-b/Rqg31/V2-TA</i>	<i>tuf-b/Rqg31/V2-TA</i>	<i>tuf-b/Rqg31/V2-TA</i>
	#	<i>tuf-b/Rqg31/V4</i>	#	<i>tuf-b/Rqg31/V4</i>
	#	<i>tuf-b/Rqg31/V14</i>	<i>tuf-b/Rqg31/V14</i>	<i>tuf-b/Rqg31/V14</i>
	#	<i>-/Rqg31/und1</i>	#	#
	#	<i>-/Rqg31/-</i>	#	<i>-/Rqg31/-</i>
	#	<i>tuf-b/BG4560/V2-TA</i>	#	#
	#	#	#	<i>tuf-b/BG4560/V4</i>
	#	<i>tuf-b/BG4560/-</i>	#	#
	<i>-/BG4560/-</i>	<i>-/BG4560/-</i>	#	<i>-/BG4560/-</i>
#	<i>tuf-b/GGY/V4</i>	#	#	
#	<i>tuf-b/GGY/und1</i>	#	#	
#	<i>-/GGY/-</i>	#	#	

Klaster b-III	#	<i>tuf-b</i> /STOL/V2-TA	<i>tuf-b</i> /STOL/V2-TA	<i>tuf-b</i> /STOL/V2-TA
	#	<i>tuf-b</i> /STOL/V15	#	#
	#	#	#	<i>tuf-b</i> /STOL/und2
	#	#	#	<i>tuf-b</i> /STOL/V2-TA-L
	<i>tuf-b</i> /STOL/-	#	<i>tuf-b</i> /STOL/-	<i>tuf-b</i> /STOL/-
	#	#	#	-/STOL/V2-TA
	-/STOL/-	#	-/STOL/-	-/STOL/-
	-/HoU346/-	#	#	#
	-/HoU302/-	#	#	#
	-/HoU296/-	#	#	#
	-/HoU294/-	#	#	#
	#	#	#	-/HoCf23/-
	#	<i>tuf-b</i> /Rpm35/V2-TA	<i>tuf-b</i> /Rpm35/V2-TA	#
	#	<i>tuf-b</i> /Rpm35/V14	<i>tuf-b</i> /Rpm35/V14	<i>tuf-b</i> /Rpm35/V14
	-/Rpm35/-	#	#	#
	#	<i>tuf-b</i> /M5/V4	#	#
#	<i>tuf-b</i> /M5/V14	#	#	
#	<i>tuf-b</i> /HoCa278/V14	#	#	
#	-/HoCa341/V2-TA	#	#	

BIOGRAFIJA AUTORA

Andrea Kosovac je rođena 26. juna 1986. godine u Beogradu. Nakon završene osnovne škole i gimnazije u Beogradu, školske 2005/2006 upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Ekologija i zaštita životne sredine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.11 i odbranjenim diplomskim radom pod nazivom „Distribucija i ugroženost vrsta roda *Althaea* L. u Srbiji”. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je 2010. godine upisala doktorske studije, prvobitno smera Ekologija, a zatim od 2011. smera Biologija, modula Morfologija, sistematika i filogenija životinja, podmodul Entomologija.

Od 2012. godine je stipendista Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja, a od 2013. je zaposlena u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za štetočine bilja u Zemunu, kao istraživač-saradnik u okviru nacionalnog projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. III43001 - „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“, podprojekat „Diverzitet i dinamika biljnih patogena i njihovih insekatskih vektora u agroekosistemima Srbije“.

U periodu od 2013. do 2018. godine, Andrea Kosovac je učestvovala u realizaciji tri međunarodna projekta bilateralne saradnje, a zatim i SCOPES Joint research projects, projekta finansiranog od strane Swiss National Science Foundation (*Epidemiology and management strategy of stolbur phytoplasma in agroecosystems*).

Oblast naučnog interesovanja Andree Kosovac su populaciona genetika insekata, interakcije insekata i biljaka i epidemiologija fitoplazmatičnih bolesti.

Publikovala je 21 rad, od čega 7 u naučnim časopisima međunarodnog značaja.

Изјава о ауторству

Потписана Андреа Косовац

Број индекса Е3008/2010

Изјављујем

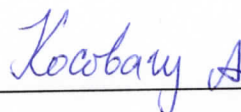
да је докторска дисертација под насловом

Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора
Hyalesthes obsoletus Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве
преношења '*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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 08.06.2018.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Андреа Косовац

Број индекса Е3008/2010

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве преношења '*Candidatus Phytoplasma solani*'

Ментори проф. др Жељко Томановић и др Јелена Јовић

Потписана Андреа Косовац

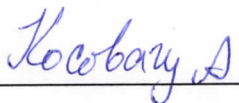
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 08.06.2018.



Изјава о коришћењу

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

Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора *Hyaesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве преношења ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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, 08.06.2018.

Косовац Д.

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.