

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mr Krnjajić B. Slobodan

**"ULOGA CIKADE *Scaphoideus titanus* Ball
U PRENOŠENJU FITOPLAZME ZLATASTOG
ŽUTILA VINOVE LOZE (*Flavescence dorée*)"**

- Doktorska disertacija -

Novi Sad 2008

Komisija za ocenu i odbranu
doktorske disertacije:

Članovi komisije (potpisi)

Dr Pero Štrbac, redovni profesor
- za užu naučnu oblast Entomologija,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

1. _____ mentor

Dr Veljko Gavrilović, naučni saradnik
- za užu naučnu oblast Fitopatologija,
Institut za zaštitu bilja i životnu
sredinu, Beograd

2. _____ član

Dr Thalji Ragheb, docent
- za užu naučnu oblast Entomologija,
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

3. _____ član

Srdačno se zahvaljujem Dr Peri Štrpcu, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, mentoru ovog rada, Dr Raghebu Thalhiju i Dr Veljku Gavriloviću na pruženoj pomoći, sugestijama kao i u oblikovanju teksta ove doktorske disertacije.

Zahvalan sam i kolektivu Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu iz Beograda, a posebnu zahvalnost dugujem kolegama i saradnicima iz Odseka za štetočine bilja - Biološke laboratorije u Zemunu (Mr Milani Mitrović, Mr Tatjana Cvrković, dipl.bio. Jelena Jović, dipl.bio. Anđeljku Petroviću, Slobodanu Tukešiću, Ljubivoju Driću i Radovanu Raduloviću) koji su mi bezgranično verovali, podržavali me i pomagali u višegodišnjim istraživanjima obavljenim u okviru ove doktorske disertacije.

Najveći zahvalnost dugujem Dr Ivi Toševskom na svemu (trebalo bi puno strana da se sve navede), a posebno jer je uspeo da me natera da ovu disertaciju privedem kraju.

Zahvalnost dugujem i Dr Marku Injcu, mom prvom učitelju od koga i danas još uvek učim.

Zahvaljujem se Dr Elisi Angelini (CRA - Cogneliano, Italija) na pomoći i obezbeđivanju referentnih uzoraka fitoplazmi.

Zahvaljujem takođe i svojoj porodici, Milici i Aleksandru na razumevanju i podršci da istrajem u ostvarenju programa istraživanja u ovom radu.

ULOGA CIKADE *Scaphoideus titanus* Ball U PRENOŠENJU
FITOPLAZME ZLATASTOG ŽUTILA VINOVE LOZE (*Flavescence dorée*)

Mr Slobodan B. Krnjajić

Sažetak

Cikada *Scaphoideus titanus* Ball (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) je nova štetočina u vinogradima na teritoriji Srbije. Poreklom iz Severne Amerike, ova cikada je introdukovana u Evropu krajem pedesetih godina prošlog veka. Direktna šteta koju *S. titanus* nanosi vinovoj lozi su zanemarljive, ali ova cikada ima veliki ekonomski značaj kao jedini poznati vektor fitoplazme *Flavescence dorée* (FD), prouzrokovana najdestruktivnije bolesti vinove loze - zlatastog žutila.

U vinogradima na teritoriji Republike Srbije registrovane su 32 vrste cikada, od kojih je *S. titanus* najzastupljeniji. Ova cikada je prisutna na gotovo celoj površini Republike Srbije, sa brojnošću populacija koja varira od male do izrazito velike. Dinamika širenja *S. titanus* u vinogorjima iznosi 5-10 km godišnje.

S. titanus je monofagna vrsta koja razvije završava isključivo na vinovoj lozi, dok na različitim korovskim biljkama može preživeti od 5 do 12 dana. Ima jednu generaciju godišnje, a prezimljava u stadijumu jaja. Piljenje jaja u Srbiji počinje sredinom maja i traje sve do kraja juna. Tokom razvika *S. titanus* ima pet larvenih stupnjeva. Prva imaga se javljaju u trećoj dekadi juna i prisutna su u prirodi do kraja septembra.

Molekularnim analizama FD fitoplazma detektovana je u primercima *S. titanus* iz različitih okruga u visokom procentu (12,5-45%). Zbog svoje izrazite monofagnosti, *S. titanus* utiče na brzo širenje ove fitoplazme u vinogradima. Ukupna površina zasada vinove loze u Republici Srbiji ugrožena fitoplazmom iznosi preko 40%, sa tendencijom daljeg porasta. Areal rasprostranjenja FD obuhvata Sremski, Beogradski, Podunavski, Rasinski, Nišavski, Zaječarski, Toplički i Jablanički okrug. Fitosanitarna situacija u ugroženim vinogradima je dramatična, gde je stopa zaraženosti od 70% do 100%. U pojedinim okruzima (Nišavski, Rasinski, Fruškogorski) epidemija zlatastog žutila velikih razmera pretila da u potpunosti ugrozi vinogradarsku proizvodnju.

FD je po prvi put u Srbiji detektovana u biljkama pavitine (*Clematis vitalba* L.), koja je česta na ogradama i međama u vinogradarskim područjima. Inficirane biljke pavitine pronađene su u svim regionima gde je ova fitoplazma prisutna u vinovoj lozi. Molekularnim analizama (PCR i RFLP) 3 različita regiona, utvrđeno je da je u vinovoj lozi, pavitini i *S. titanus* prisutna ista fitoplazma koja pripada podgrupi 16SrV-C.

FD je takođe po prvi put detektovana u cikadi *Dictyophara europaea* L. često prisutnoj na pavitini i vinovoj lozi u Srbiji.

Ključne reči: vinova loza, *Scaphoideus titanus*, rasprostranjenost, biologija, štetnost, cikade, vektori, *Flavescence dorée*, fitoplazme, PCR

Disertacija je odložena u Biblioteci Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

(92 stranice, 17 tabela, 4 grafikona, 57 originalnih fotografija, original na srpskom jeziku sa sažetkom na engleskom jeziku)

THE ROLE OF THE CICADA *Scaphoideus titanus* Ball IN TRANSMITTING
THE GRAPEVINE GOLDEN YELLOWING PHYTOPLASMA (*Flavescence dorée*)

M.Sc. Slobodan B. Krnjajić

Abstract

Cicada *Scaphoideus titanus* Ball (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) is a new pest in vineyards of Serbia. It originates from North America and was introduced to Europe during the past century. *S. titanus* is of great economic importance as the only known vector of the Grapevine golden yellowing phytoplasma *Flavescence dorée*.

In total, 32 cicada species were identified in vineyards of Serbia, out of which *S. titanus* was the most dominant. This cicada is present in most vineyard regions of Serbia, with a population density varying from low to extremely high. *S. titanus* spreads through vineyards 5-10 km a year.

S. titanus is a monophagous species developing on grapevine exclusively. In experimental conditions, larvae and adults were fed on different weeds and survived from 5 to 12 days. In Serbia *S. titanus* has one generation per year, overwintering in the egg stage. Larvae hatch from the second half of May till the end of June. The first adults appear in late June and are present in the field until September.

Molecular analysis confirmed presence of *Flavescence dorée* phytoplasma in *S. titanus* specimens from different vineyard regions in very high percentage (12.5-45%). *S. titanus* caused rapid spread of this phytoplasma in vineyards in short period of time. Grapevine golden yellowing is present in 40% of vineyard regions with noted tendency of increasing. Distribution area includes Sremski, Beogradski, Podunavski, Rasinski, Nišavski, Zaječarski, Toplički and Jablanički county. The phytosanitary situation in vineyards is quite dramatic, with infection rates from 70% to 100%. In the most affected counties, Nišavski, Rasinski, Fruškogorski, severe epidemics of golden yellowing threatens to completely destroy the vine production.

Flavescence dorée was detected for the first time in Serbia on the plant Old Man's Beard (*Clematis vitalba* L.), which is regularly present bordering vineyards. Infected *C. vitalba* plants were found in all regions where *Flavescence dorée* was detected in vineyards.

Molecular analysis (PCR and RFLP) of 3 different genetic regions confirmed the presence of the same strain of *Flavescence dorée* belonging to subgroup 16SrV-C in grapevines, *C. vitalba* and *S. titanus*.

Flavescence dorée was also detected for the first time in another cicada *Dictyophara europaea*, which is present on *C. vitalba* and grapevine in Serbia.

Key words: grapevine, *Scaphoideus titanus*, distribution, biology, harmfulness, cicada, vectors, *Flavescence dorée*, phytoplasmas, PCR

A copy of this thesis is placed in the Library of the Faculty of Agriculture, University of Novi Sad (93 pages, 17 tables, 4 graphs, 57 original photographs, original manuscript in Serbian with summary in Serbian and English).

S A D R Ź A J

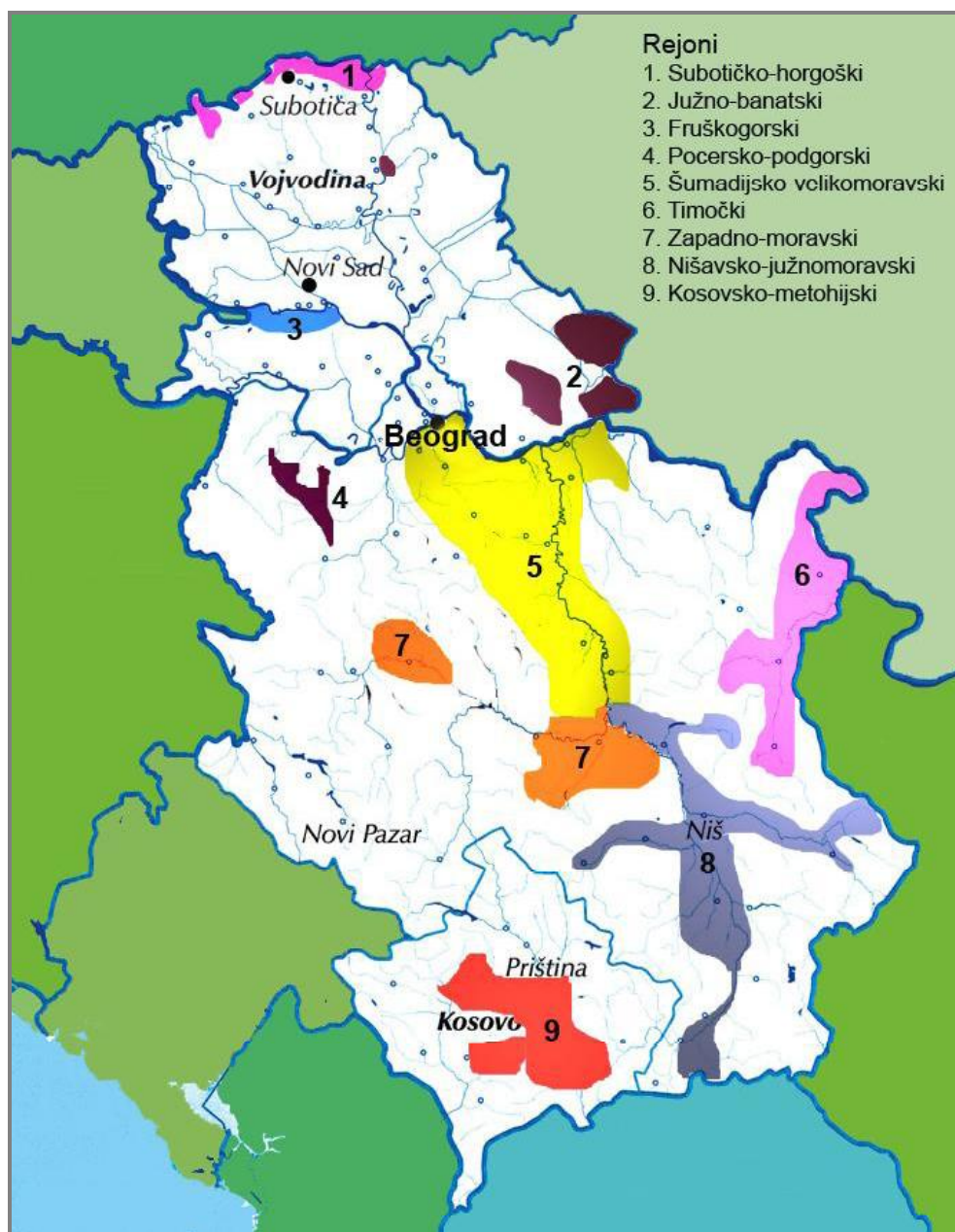
1. U V O D	1
2. P R E G L E D L I T E R A T U R E	4
2.1. Klasifikacija cikada	4
2.2. Podela cikada prema načinu života i ishrani	5
2.3. Rasprostranjenost <i>S. titanus</i> u Evropi	9
2.4. Značaj i štetnost <i>S. titanus</i> u vinogradarskoj proizvodnji u Evropi	9
2.5. Fitoplazme - taksonomija, značaj i štetnost	11
2.6. Fitoplazme - značaj i štetnost	12
2.7. Fitoplazme - simptomatologija	13
2.8. Fitoplazme na vinovoj lozi	15
2.9. Raširenost FD u Evropi	17
2.10. Načini prenošenja fitoplazmi	18
2.11. Načini usvajanja i umnožavanja fitoplazmi u cikadama	19
2.12. Interakcije cikada i fitoplazmi	20
2.13. Interakcije cikada i biljke domaćina	20
2.14. Antropogeni faktor širenja fitoplazmi i vektora	21
2.15. Načini sprečavanja širenja fitoplazmi	21
3. M A T E R I J A L I I M E T O D E	22
3.1. Rasprostranjenje <i>S. titanus</i> i registracija njegovih populacija	22
3.1.1. Vizuelna inspekcija	22
3.1.2. Metod košenja entomološkom mrežom	23
3.1.3. Identifikacija populacija <i>S. titanus</i> pomoću žutih lepljivih klopki	24
3.1.4. Metoda noćnog lova sa svetlosnim izvorom	24
3.2. Materijal za kvalitativnu i kvantitativnu analizu cikada u vinogradima sa fitoplazmatičnim simptomima	25
3.3. Materijal za bionomijska istraživanja i eksperimentalne potrebe	26
3.4. Testovi ishrane i interakcija <i>S. titanus</i> na biljkama staništa	27
3.5. Detekcija i genotipizacija FD fitoplazmi molekularnim metodama	28
3.5.1. Ekstrakcija DNK	29
3.5.1.1 Ekstrakcija DNK iz vinove loze	29

3.5.1.2. Ekstrakcija DNK iz pavitine (<i>Clematis vitalba</i>)	29
3.5.1.3. Ekstrakcija DNK iz insekata	30
3.5.2. Detekcija FD fitoplazmi umnožavanjem FD9 regiona metodom lančane reakcije polimeraze -Polymerase Chain Reaction (PCR) ..	30
3.5.3. Genotipizacija FD fitoplazmi metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i sekvencioniranjem	32
3.5.3.1. Analiza 16S-23S rRNK regiona	32
3.5.3.2. Analiza rp regiona (operona gena ribozomalnih proteina)	33
3.5.3.3. Analiza FD9 regiona	34
4. R E Z U L T A T I	35
4.1. Rasprostranjenje <i>S. titanus</i> na teritoriji Srbije	35
4.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza cikada u vinogradima sa fitoplazmatičnim simptomima	45
4.3. Bionomijska istraživanja <i>S. titanus</i>	50
4.4. Testovi ishrane i interakcija <i>S. titanus</i> sa biljkama staništa	53
4.5. Detekcija i genotipizacija FD fitoplazmi molekularnim metodama	54
4.5.1. Detekcija FD fitoplazmi umnožavanjem FD9 regiona	55
4.5.1.1. Detekcija FD fitoplazmi u vinovoj lozi	55
4.5.1.2. Detekcija FD fitoplazmi u insektima	56
4.5.1.3. Detekcija FD fitoplazmi u pavitini (<i>C. vitalba</i>)	59
4.5.2. Genotipizacija FD fitoplazmi metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i sekvencioniranjem	59
4.5.2.1. Analiza 16S-23S rRNK regiona	60
4.5.2.2. Analiza rp regiona (operona gena ribozomalnih proteina)	61
4.5.2.3. Analiza FD9 regiona	62
5. D I S K U S I J A	64
6. Z A K L J Č C I	76
7. L I T E R A T U R A	78

1. U V O D

Vinogradarstvo i proizvodnja vina na prostoru Republike Srbije imaju dugu tradiciju. Zbog povoljnih klimatskih i edafskih uslova vinova loza se 50-tih godina XX veka gajila na preko 132 000 ha. Od tada do danas površine su se smanjivale tako da se danas u Srbiji gaji između 65-70.000 ha (Avramov i sar., 1999; Republički zavod za statistiku Srbije, 2006). Zbog izvesnih klimatskih i edafskih razlika, tradicije gajenja vinove loze, različitog loznog sortimenta, kao i pripadnosti administrativno-teritorijalnim jedinicama, gajenje vinove loze na teritoriji Srbije podeljeno je na devet vinogradarskih rejona (Subotičko - Horgoški, Južnobanatski, Fruškogorski, Pocerško - Podgorski, Šumadijsko - Velikomoravski, Timočki, Zapadnomoravski, Nišavsko-Južnomoravski, i Kosovsko-Metohijski) (Milosavljević, 1998) (slika 1). U okviru nekih rejona postoje i podrejoni sa većim brojem vinogorja. Vinogorja su najmanje vinogradarske površine sa specifičnim ekološkim i ekonomskim specifičnostima.

Gajenje vinove loze sve do kraja XIX veka bilo je relativno jednostavno. Usled nepostojanja značajnih patogena i štetočina koje bi ugrožavale njeno gajenje nije bilo potrebe za primenom pesticida i drugih mera zaštite. Vinova loza se umnožavala vegetativno, ožiljavanjem reznica. Međutim, u periodu 1848-1878. godine od prve pojave filoksere (*Viteus vitifoliae* Fitch) u Evropi, način gajenja vinove loze se promenio (Dent, 2008). Pošto je u tom periodu od samo 25-30 godina uništeno više od 100.000 ha ili preko 30% vinograda, sa nesagledivim ekonomskim i socijalnim posledicama u Francuskoj (Strapazzon and Girolami, 1985) bilo je neophodno veoma brzo pronaći rešenje. Kao jedino rešenje nametnulo se kalemljenje plemenite loze na podloge poreklom od američke divlje loze. Tako je svuda moralo doći do obnove vinograda podignutih sa kalemljenom vinovom lozom (Strapazzon et al., 1986). U Srbiji filoksere je prvi put zapažena 1881. godine i za samo 30 godina svi vinogradi plemenite loze su bili uništeni.



Slika 1. Vinogradarski rejoni u Srbiji

Sa unošenjem divlje američke loze, zbog kalemljenja nažalost došlo je i do unošenja novih bolesti vinove loze (plamenjača - prouzrokovatelj *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl & De Toni i pepelnica – prouzrokovatelj *Uncinula necator* (Schw.) Burr.). Ove nove bolesti su takođe dovele do promene načina gajenja vinove loze, tako da se ona danas ne može gajiti bez intenzivne hemijske zaštite od prouzrokovatelja ovih bolesti.

Sredinom pedesetih godina XX veka u Evropu je unešena nova štetočina iz Severne Amerike koja je indirektno ugrozila gajenje vinove loze (Caudwell, 1957). To je severno-američka vrsta cikade *Scaphoideus titanus* Ball 1932 (Auchenorrhyncha, Cicadellidae), koja ne nanosi direktne štete vinovoj lozi, ali je njen značaj i štetnost u tome, što koliko je do sada poznato, jedino ona prenosi jednu od najdestruktivnijih bolesti koja se naziva "Zlatasto žutilo vinove loze", a koju izaziva fitoplazma *Flavescence dorée*.

Dosadašnja istraživanja ove bolesti u Evropi su bila obimna i detaljna. Često se ispoljavanje crvenila na vinovoj lozi pripisivalo različitim drugim faktorima ili nepoznatim bolestima (Hewitt and Bovey, 1979; Bovey and Martelli, 1992; Martelli, 2003). Tek poslednjih godina u etiološkim ispitivanjima ovog oboljenja dosta se napredovalo, zahvaljujući savremenom razvoju nauke i tehnike, posebno otkrićem i usavršavanjem metoda molekularne biologije (pre svega PCR - Polymerase Chain Reaction). Biologija *S. titanus*, kao i mogućnost njene kontrole raznim hemijskim i drugim merama je takođe dobro proučena (Boudon-Padieu, 2003). I pored primenjenih mera borbe kojima se sprečava pojava ili širenje ove bolesti i danas se gotovo redovno i iz još nepoznatih razloga pojavljuju nova žarišta bolesti. Pojava bolesti je uvek praćena propadanjem i sušenjem vinograda.

Kod nas su ova bolest i njen vektor znatno manje istraženi. Zvanično prisustvo ove bolesti i njenog vektora registrovano je tek 2004. godine (Duduk et al., 2004; Magud i Toševski, 2004). Iako su se prvi simptomi, iz iskustva proizvođača javili početkom 1990-tih godina, oni bili su pripisivani uvek nekim drugim faktorima (nepovoljni klimatski uslovi, kisele kiše, nedovoljno i neadekvatno đubrenje, nedostatak makro i mikro-elemenata, mehanička oštećenja, virusnim oboljenjima i mnogim drugim nepoznatim uzrocima) (Milosavljević, 1969; Šutić, 1995; Milosavljević, 1998; Duduk, 2005; Duduk, 2006; Kuzmanović, 2007). Prvi koji su ukazali na mogućnost da se radi o bolestima prouzrokovanim fitoplazmama bili su Ivanović i Ivanović (2000).

Zbog obima i karaktera šteta od ovog oboljenja koje su nastale poslednjih godina u Srbiji ukazala se potreba da se sveobuhvatnije istraže kako epidemiologija, etiologija i patogeneza bolesti, tako i biologija, raširenost i mogućnost suzbijanja

njenog jedinog poznatog vektora. Takođe, ukazala se i potreba ispitivanja postojanja biljaka iz lokalne flore, kao i cikada iz lokalne faune koji mogu biti uključeni u neke nove, dosada neotkrivene epidemiološke lance prenošenja i održavanja ove bolesti u našim agroekološkim uslovima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Klasifikacija cikada

Cikade, insekti iz reda Hemiptera rasprostranjene su širom sveta. Od ostalih insekatskih redova razlikuju se po prisustvu specifičnog usnog aparata za bodenje i sisanje i kod imaga i kod larvi, koji se koristi uglavnom za ishranu sokovima biljaka.

Prema najstarijoj klasifikaciji postojala su dva reda: Homoptera i Hemiptera. Kasnije klasifikacije red Hemiptera (syn. Rhynchota) dele na dva podreda: Heteroptera i Homoptera, dok je prema najnovijoj klasifikaciji (Biederman and Niedringhaus, 2004) ovaj red podeljen na 4 podreda: Heteroptera, Auchenorrhyncha, Sternorrhyncha i Coleorrhyncha. Filogenetičke veze između ova četiri podreda nisu još uvek jasno definisane, uključujući i pitanje da li je Auchenorrhyncha monofiletička grupa ili nije (Campbell i sar., 1994, 1995, Sorensen i sar., 1995, Von Dohlen i sar., 1995, Bourgoin i sar., 1997, Bourgoin i Campbell, 2002,).

Podred Coleorrhyncha obuhvata malobrojne vrste južne zemljne hemisfere, dok su predstavnici ostala tri podreda: Heteroptera, Sternorrhyncha i Auchenorrhyncha prisutni na svim kontinentima.

Podred Auchenorrhyncha Duméril, 1806 (syn. Cicadina Burmeister, 1835) u koji spada i cikada *S. titanus* vodi poreklo iz ranog Paleozoika. Ova grupa je slabo istražena, kako zbog malih dimenzija jedinki, tako i zbog teškoća u identifikaciji vrsta. Vrste koje pripadaju podredu Auchenorrhyncha veoma su rasprostranjene širom sveta, a zahvaljujući velikoj brojnosti i gustini populacije, pripadaju

najbrojnijim fitofagnim grupama i predstavljaju značajan deo kopnenih životinjskih zajednica. Sve vrste se hrane biljnim sokovima, te svojom ishranom oštećuju sprovodne sudove biljka. Pored direktnih oštećenja, neke vrste prenose biljne patogene (bakterije, viruse i fitoplazme). Njihova identifikacija vrši se na osnovu spoljnih morfoloških karaktera, kao i na osnovu izgleda genitalnog aparata. Dužina tela kod najvećeg broja vrsta ne prelazi 10 mm. Telesni omotač je čvrst. Postoji izrazita polimorfnost u izgledu pojedinih vrsta, pa čak i između predstavnika iste vrste. Pored razlika u obliku, veličini i obojenosti tela, kod vrsta podreda Auchenorrhyncha prisutna je i raznolikost u izgledu i veličini krila. U okviru iste vrste nalaze se brahpterne i makropterne forme, uglavnom u okviru jedne populacije. Većina vrsta je na prvi pogled neuglednih boja, dok se posmatranjem pod binokularom, razlike u boji i šarama jasno vide. Larve su primarne i po izgledu podsećaju na imaga. Od odraslih oblika se razlikuju po tome što kod njih nisu obrazovani nikakvi krilati dodaci, ili imaju kratke, nepokretne krilne međe, koje su povezane celom širinom svoje osnove sa toraksom. Krila imaga potpuno su obrazovana, dok su kod brahpternih oblika povezana sa telom jednim malim člankom u osnovi (Biederman and Niedringhaus, 2004). Na osnovu spoljnih morfoloških karakteristika, podred Auchenorrhyncha podeljen je u dve grupe: Fulgoromorpha (Archaeorrhyncha) i Cicadomorpha (Clypeorrhyncha).

Klasa: Insecta
 Podklasa: Pterygota
 Nadred: Condylgnatha
 Red: Hemiptera (Rhynchota)
 Podred: Sternorrhyncha
 Heteroptera
 Auchenorrhyncha
 Grupa: Fulgoromorpha
 Grupa: Cicadomorpha
 Familija: Cicadellidae
 Podfamilija: Deltocephalinae
 Tribus: Athysanini
 Rod: *Scaphoideus*
 Vrsta: *titanus*

2.2. Podela cikada prema načinu života i ishrani

Cikade (Auchenorrhyncha) imaju veliki ekonomski značaj u agroekosistemima. U glavnim vinogradarskim rejonima Evrope javlja se nekoliko desetina vrsta. Prema načinu života i ishrani cikade koje se nalaze u vinogorjima se uslovno mogu

podeliti na tri grupe: obligatne, fakultativne i slučajne vrste. Prema ovoj podeli obligatne vrste su one čije je celokupno razviće vezano isključivo za vinovu lozu; fakultativne vrste pored vinove loze za svoje razviće mogu koristiti i druge biljke; dok se slučajne vrste sreću u vinogradima samo u određenoj fazi razvića, najčešće kao adulti. Takođe, prema štetnosti koju nanose mogu se podeliti na vrste koje nanose direktne štete (hraneći se direktno floemskim sokovima) i vrste koje nanose indirektne štete (produkcija medne rose i voska ili vektorska uloga, odnosno prenošenje patogena koji izazivaju različita oboljenja vinove loze) (Alma, 2002).



Slika 2. *Empoasca vitis*

Tako, zelena lozina cikada (*Empoasca vitis* Goethe)(slika 2) spada u grupu fakultativnih vrsta koje nanose direktne štete. Ova vrsta cikade deo deo života provodi na vinovoj lozi, a deo na četinarima. Promene izazvane ishranom nimfi i imaga ogledaju se u promeni boje lisnih nerava, kovrdžanju lišća, žutilu ili crvenilu lišća, centripetalnoj nekrozi lista i prevremenom opadanju lišća (Herrmann et al., 2000).

Jedna od vrsta koja bi takođe spadala u grupu fakultativnih, ali koja nanosi indirektne štete, je *Metcalfa pruinosa* Say (slika 3). Ova vrsta je polifagna i živi na biljkama iz preko 50 različitih familija. Njena štetnost se ogleda u produkciji velike količine medne rose koja predstavlja dobar medijum za razvoj gljiva tipa čađavica (Wilson and Lucchi, 2007; Mihajlović, 2007). Osim toga, njena štetnost se ogleda i u vektorskoj ulozi u prenošenju fitoplazmi prve grupe (16Srl-B, -G) (Weintraub and Beanland, 2006).



Slika 3. *Metcalfa pruinosa*

Vrsta *Hyalesthes obsoletus* Signoret (slika 4) po ovoj podeli pripada grupi slučajnih vrsta na vinovoj lozi, jer su njeni primarni domaćini koprija (*Urtica dioica* L.) i poponac (*Convolvulus arvensis* L.) (slika 5). Ove biljne vrste su ujedno i prirodni rezervoari stolbur fitoplazme u prirodi. Ova cikada nanosi indirektnu štetu kao vektor stolbur fitoplazme, koja na vinovoj lozi izaziva bolest "crno drvo" ili Bois Noir (Maixner, 1994).



Slika 4. *Hyalesthes obsoletus*



Slika 5. *Convolvulus arvensis*
zaražen sa Stolbur fitoplazmom

Jedna od obligatnih vrsta, a koja nanosi samo indirektnu štetu na vinovoj lozi i to kao vektor najdestruktivnije bolesti vinove loze – Zlatastog žutila (ili crvenila) vinove loze, koju izaziva fitoplazma *Flavescence dorée* (FD) je *Scaphoideus titanus* Ball (Alma, 2002) (slika 6).



Slika 6. *Scaphoideus titanus* (mužjak i genitalije mužjaka)

2.3. Rasprostranjenost *Scaphoideus titanus* u Evropi

Cikada *Scaphoideus titanus* (Ball, 1932) je poreklom iz Severne Amerike. Ova nearktička vrsta (Barnett, 1977) slučajno je introdukovana u Evropu krajem pedesetih godina XX veka (Caudwell, 1957). Od tada do danas, tokom poslednjih 50 godina, širenje *S. titanus* je registrovano u mnogim delovima Evrope. Tako je danas prisutan i raširen u Francuskoj (Caudwell, 1957), Italiji (Belli et al., 1984), Austriji (Zeisner, 2005; Steffek et al., 2007), Španiji (Torres et al., 2005), Portugaliji (Quartau et al., 2001), Švajcarskoj (Gugerli, 2006), Sloveniji (Seljak, 1985), Hrvatskoj (Budinščak i sar., 2005), Mađarskoj (Der et al., 2007) i Bosni i Hercegovini (Delić et al., 2007). U Srbiji je po prvi put registrovana kao štetočina vinove loze tek 2004. godine (Magud i Toševski, 2004) (slika 7).



Slika 7. Distribucija *S. titanus* u Evropi

2.4. Značaj i štetnost *S. titanus* u vinogradarskoj proizvodnji u Evropi

Iako se u literaturi navodi da se ova vrsta u Severnoj Americi može hraniti na većem broju drvenastih biljaka (uključujući divlje i gajene loze) (Barnett, 1977;

Maixner et al. 1993; Wolf, 2004), ona je u Evropi vezana isključivo za divlju i gajenu vinovu lozu (Alma, 2004; Lessio and Alma, 2004b).

Smatra se da je danas ovo jedna od najznačajnijih štetočina vinove loze kod nas. Njena štetnost se ne ogleda u direktnim štetama, jer čak ni pri izrazito visokoj brojnosti populacija ove vrste nisu zapaženi vidljivi simptomi oštećenja. Po dosadašnjim literaturnim navodima *S. titanus* je jedini poznati vektor fitoplazme zlatastog žutila vinove loze (Schvester et al. 1963; Boudon-Padieu, 2003; Lessio and Alma, 2004b). U epidemiološkom smislu za širenje ove bolesti najznačajniji faktor su inficirani sadni materijal kao i ishrana i prirodno širenje vektora (Schvester et al. 1961, Schvester et al. 1969), koje može biti 5 - 10 km godišnje (EPPO/CABI, 1997).

Obzirom da je epidemiologija centralni problem u suzbijanju ovog fitoplazmatičnog oboljenja vinove loze i primenjene mere suzbijanja njenog vektora su do sada bile u ovom kontekstu (Boudon-Padieu, 2003, Bertaccini, 2007). Biologija, ekologija i distribucija ove cikade, kao i potencijalne interakcije ove fitoplazme sa drugim cikadama u novom okruženju na području Srbije su u potpunosti neistražene. Takođe u literaturi ne postoje podaci koji se odnose na kvalitativne i kvantitativne podatke o cikadama u agro-ekosistemima vinograda, kako kod nas tako i u svetu. Sa druge strane, diverzitet cikada u vinogorjima Srbije do sada nije detaljnije istraživao, pa time nije ni poznat potencijalni uticaj cikada staništa na nove i do sada nepoznate lance u epidemiologiji širenja *Flavescence dorée* u vinogorjima Srbije. Činjenica da se i pored intenzivnih mera prevencije i zaštite koje se sprovode u zemljama zapadne Evrope pogođenim epidemijom FD fitoplazme, ova bolest i dalje pojavljuje u formi fokalnih žarišta, ukazuje da nije u potpunosti rasvetljena epidemiologija FD-a u vinogradima.

U Evropi cikada *S. titanus* se nalazi na A2 listi karantinskih štetočina, kao vektor fitoplazme *Flavescence dorée*. U Srbiji ova štetočina se takođe nalazi na A2 listi karantinskih štetočina. Rasprostranjenost ove cikade u Srbiji do sada nije bila precizno utvrđena, iako se radi o karantinskoj štetočini u našim vinogradima.

Dramatičnu fitosanitarnu situaciju u vinogradima zahvaćenim epidemijom FD dodatno komplikuje i to što je prisustvo bolesti po prvi put potvrđeno u autohtonoj

flori, prvo u Italiji (Angelini et al., 2004), a potom i kod nas i to u pavitini (*Clematis vitalba* L., Ranunculaceae) (Mitrović i sar., 2006; Krnjajić i sar. 2007a; Fillipin et al., 2007). Pavitina (pavit, obična pavit, obična pavitina, obična vinjaga, gužva, bela loza) je invazivna, višegodišnja, drvenasta lijana koja često raste na ivicama svetlih šuma, pored puteva i između međa u vinogradarskim regionima. Kao višegodišnja biljka može predstavljati stalni prirodni rezervoar ove fitoplazme u prirodi. Biljke pavitine inficirane sa FD pronađene su u svim regionima gde je ova fitoplazma prisutna u vinovoj lozi u Srbiji kao i u regionima u kojima nema FD fitoplazme pa čak i u regionima u kojima nema ni vinove loze, što dodatno komplikuje fitosanitarnu situaciju (Fillipin et al. 2007, Krnjajić i sar. 2007a). Ovaj nalaz predstavlja realnu mogućnost za stvaranje novih epidemioloških lanaca sa cikadama lokalnog staništa, kao i za obnavljanje žarišta FD, ukoliko se pored krčenja zaražene vinove loze, ne suzbija i pavitina. Zbog toga je posebna pažnja posvećena sakupljanju i analizi cikade *Dictyophara europaea* L., čestoj vrsti na pavitini. U Italiji je prvi put registrovana FD fitoplazma i u ovoj vrsti (Angelini i sar., 2004). U uzorcima *D. europaea* sakupljenim na vinovoj lozi na različitim lokalitetima u Srbiji, utvrđeno je prisustvo fitoplazme FD. Procenat inficiranih primeraka cikade *D. europaea* u vinogradima je značajan i ukazuje na njenu moguću ulogu kao vektora, što dodatno ukazuje na kompleksne epidemiološke lance fitoplazmatičnih oboljenja na vinovoj lozi (Cvrković i sar., neobjavljeni podaci).

2.5. Fitoplazme - taksonomija

Fitoplazme su otkrivene 1967. godine od strane japanskih istraživača (Doi et al. 1967) koji su ih nazvali mikoplazmama slični organizmi (MLOs). Fitoplazme su dobile današnji naziv na Internacionalnoj Konferenciji Sistematizacije Bakterija održanoj 1996. godine na Floridi, USA (Seemüller et al., 1998). To su isključivo intracelularni mikroorganizmi koji nastanjuju floemske sitaste ćelije biljaka kao i ćelije više tkiva insekata vektora (cikade i psile). One predstavljaju monofiletsku grupu u klasi Mollicutes i od ostalih predstavnika ove klase se razlikuju po veoma maloj veličini (0,3-0,5 μm) i nedostatku ćelijskog zida (Agrios, 1997; Hogenhout, 2004). Takođe ono što ih čini jedinstvenim među bakterijama je i ranije pomenuta činjenica da uspešno nastanjuju ćelije organizama dva različita carstva (Bai et al.,

2006). Usled nedostatka ćelijskog zida nemaju stalan oblik. Na bazi sekvencionih analiza nekoliko konzervativnih gena fitoplazme su podeljene na 15 podgrupa (IRPCM, 2004). Novi taksonomski status još uvek nije definisan, pa su pojedine vrste, grupe i podgrupe opisane u statusu "*Candidatus Phytoplasma*" (Lee et al., 2004; IRPCM, 2004; Firrao et al., 2005).

Do razvoja molekularne dijagnostike, fitoplazme su klasifikovane na osnovu bioloških karakteristika, kao što su simptomatologija kod obolelih biljaka, krug domaćina i interakcija sa vektorom. Danas se klasifikacija i karakterizacija fitoplazmi zasniva na preciznim molekularnim metodama analize DNK, jer je dokazano da određenu bolest na biljci na osnovu simptomatologije možemo povezati sa nekoliko fitoplazmi iz različitih, filogenetski udaljenih grupa. Takođe, ista fitoplazma može izazvati različite simptome na različitim biljkama domaćinima, pa je jedino analizom DNK moguće utvrditi koja je fitoplazma u pitanju. Zbog toga su molekularne metode primarni kriterijum za klasifikaciju fitoplazmi, a biološki karakteri služe kao mehanizmi za tumačenje etiologije i epidemiologije bolesti (Lee et al., 2000).

2.6. Fitoplazme - značaj i štetnost

Do sada je utvrđeno da fitoplazme prouzrokuju preko 700 oboljenja različite simptomatologije na nekoliko stotina biljnih vrsta iz 98 familija, uključujući biljke spontane flore, ratarske i povrtarske kulture, voćke i druge drvenaste biljke (Weintraub i Beanland, 2006). Tako npr. fitoplazma Aster Yellow nanosi značajne štete na povrću i ukrasnim biljkama; Peach Yellow na kajsiji; Peach X disease na breskvi, kajsiji i trešnji; *Flavescence dorée* na vinovoj lozi; Pear decline, European stone fruit yellows i Apple proliferation na voćkama; Beet leafhopper-transmitted virescence na šećernoj repi; Stolbur fitopazme na krompiru, vinovoj lozi (Bois Noir) i Maize redness na kukuruzu (McCoy et al., 1989; Kirkpatrick, 1992; Lee et al., 2000; Trivelone et al., 2005; Milićević i sar., 2006; Jovic et al., 2007).

Ekonomske štete koje fitoplazme nanose gajenim kulturama se kreću od parcijalne redukcije u prinosu i kvalitetu, do potpunih gubitaka prinosa u biljnoj proizvodnji (Lee et al., 2000; Weintraub i Beanland, 2006). Fitoplazma Elm yellow je skoro u potpunosti uništila proizvodnju bresta u Evropi i Severnoj Americi, a

fitoplazma Pear decline proizvodnju kruške u Italiji (Bertaccini, 2007). Fitoplazma *Flavescence dorée* je ugrozila proizvodnju vinove loze u Italiji i Francuskoj, gde je polovinom prošlog veka, u rejonu Armagnac i Chalosse (Francuska) uništeno 100% vinograda, a u oblasti Venetto (Italija) 70% vinograda (EPPO/CABI, 1997). Određeni broj fitoplazmi je već uključen u liste karantinskih patogena, 6 se nalazi na A1, a 4 na A2 listi (EPPO/CABI, 1997). U cilju prevencije daljeg širenja i introdukcije ovih fitoplazmi u nove regione, promet biljnog materijala je ograničen međunarodnim fitosanitarnim regulativama.

2.7. Fitoplazme - simptomatologija

Simptomi koje ispoljavaju fitoplazmama zaražene biljke mogu biti veoma raznoliki i mogu se ispoljiti u vidu: žutila ili crvenila lišća (slika 8), skraćivanja internodija, smanjenja veličine lišća (redukcija lisne površine), proliferacija grana koje daju oblik "veštičijih metli", filodije (slika 9), virescencija (slika 10), sterilni cvetovi, nekroza floemskog tkiva, izumiranje grančica ili drvenastog dela biljke (McCoy et al., 1989; Kirkpatrick, 1992; Agrios, 1997). Obzirom da fitoplazme ostvaruju sistemčnu zarazu i sve navedene promene su uvek sistemske promene i zahvataju delove ili čitave biljke.



Slika 8. Crvenilo kukuruza izazvano Stobur fitoplazmom (simptomi na listu i klipu)



Slika 9. Filodije kao simptom prisustva fitoplazme na perivinki (*Catharanthus roseus*)



Slika 10. Virescencija kao simptom prisustva fitoplazme na perivinki (*Catharanthus roseus*)

2.8. Fitoplazme na vinovoj lozi

Fitoplazmatična oboljenja vinove loze (Grapevine yellows – GY) su oboljenja koja su poznata poslednjih 50 godina. Posle prvih otkrića *Flavescence dorée* u jugozapadnoj Francuskoj 50-tih godina prošlog veka (Caudwell, 1957) slična oboljenja su zapažana i u vinogradima kako u Evropi tako i u Severnoj Americi, Aziji i Australiji. Sva ova oboljenja dovođena su u vezu sa fitoplazmama, ali su često nazivana generalno kao žutila vinove loze (grapevine yellows – GY) sve dok nije proučena i objašnjena njihova priroda (Boudon-Padieu, 2003). Obzirom da se fitoplazme ne mogu odgajiti *in vitro*, a samim tim ni morfološki definisati, njihova detekcija i karakterizacija zbog nedostatka odgovarajuće metodologije nije bila moguća, pa su dugi niz godina bolesti koje one prouzrokuju pripisivane mikoplazmama (Bertaccini, 2007). Tek poslednjih 15-tak godina, zahvaljujući savremenim molekularnim analizama, moguće je ih je tačno razlikovati. Ranije se, takođe, često za ova oboljenja smatralo da su ona posledica fizioloških poremećaja, sve dok se ove promene nisu dokazale u eksperimentalnim uslovima kalemljenjem i prenošenjem vektorima (Schvester et al., 1961).

Na vinovoj lozi se javljaju sedam različitih fitoplazmi i sve izazivaju slične simptome i nazivaju se zajedničkim imenom žutila vinove loze. To su fitoplazme iz grupa 16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII, 16SrX i 16SrXII (Gibb et al., 1999; Varga et al., 2000; Boudon-Padieu, 2003). U Evropi su na vinovoj lozi dosada registrovane fitoplazme iz četiri grupe i to 16SrV (*Flavescence dorée* i Palatinate GY), 16SrXII-A (Stolbur ili Bois Noir), 16SrX (Apple proliferation) i 16SrI-A grupa (Aster Yellows) (Maixner, 2006). Kod nas je registrovano prisustvo tri grupe fitoplazmi i to 16SrV (*Flavescence dorée* i Palatinate GY), 16SrXII-A (Stolbur ili Bois Noir), i 16SrX (Apple proliferation)(Duduk, 2005).

Prvi simptomi se ogledaju u tome što pupoljci na zaraženim čokotima u proleće kreću kasnije ili uopšte ne kreću (Doi et al., 1967; Credi et al., 1990; Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Ovakve simptome često mogu prouzrokovati i brojni drugi faktori (izmrzavanje, nepovoljni ekološki uslovi u vreme formiranja okaca, kao i prisustvo drugih patogena) (Krake et al., 1999). Veliki broj autora je opisao simptome na lastarima koji se ispoljavaju u skraćenosti internodija, zaostajanju u porastu, nedovoljnom odrvenjavanju i izmrzavanju tokom zimskog perioda.

Simptomatologija fitoplazmatičnih oboljenja na vinovoj lozi praćena je delimićnom promenom boje lista i pojavom nekroze između glavnih nerava (slika 11) a u kasnijoj fazi, uoćljivim savijanjem lista po obodu prema nalićju. Kod sistemski izmenjenih biljaka, boja listova je varijabilna i zavisi od sorte vinove loze (slika 12). Inficirani listovi su tamno ljubićaste do svetlo crvene boje kod crnih sorti, a svetlo Źuti do zlatno Źute boje kod belih sorti. Ovi simptomi se mogu lako prepoznati i pouzdani su znak pogoršane fitosanitarne situacije u vinogradu. Često dolazi i do nekroze cvasti tako da nema formiranja grozdića, a ako se oni i formiraju oni su rehuljavi, smeŹurani i lošeg kvaliteta (Caudwell et al., 1957, Bovey and Martelli, 1992; Girolami et al., 1989; Quacquarelli and Barba, 1992; Martelli and Caudwell, 1993; Boudon-Padieu, 1999; Krake et al. 1999). Ovi simptomi su skoro identićni kod svih fitoplazmi na vinovoj lozi i ne mogu se razlikovati. Zbog toga se jedino PCR metodoma mogu mećusobno razlikovati i ove metode se za sada koriste kao najpouzdanija metoda detekcija fitoplazmi do vrsta (Caudwell et al., 1971; Daire et al., 1993; Bartaccini et al., 1995; Batlle et al., 2000; Boudon-Padieu, 2003; Angelini et al., 2001).



Slika 11. Nekroza lista vinove loze između glavnih nerava



Slika 12. Varijabilnost simptoma u zavisnosti od sorte vinove loze

2.9. Raširenost FD u Evropi

Ulogu fitoplazmi u etiologiji zlatastog žutila vinove loze dokazao je eksperimentalno Caudwell et al., 1971. U ovom momentu raširenost zlatastog žutila vinove loze se uglavnom poklapa sa raširenošću njenog vektora, osim u SAD gde je *S. titanus* čest, ali za sada nije dokazano da ova cikada može biti

vektor fitoplazmi na američkoj lozi, niti je dokazano prisustvo FD fitoplazmi u SAD (Maixner et al., 1993).

Nakon prve pojave u Francuskoj (Caudwell, 1957) FD fitoplazma se raširila i u: Italiji (Belli et al., 1984), Austriji (Zeisner, 2005), Španiji (Torres et al., 2005), Portugaliji (Quartau et al., 2001), Švajcarskoj (Gugerli, 2006), Sloveniji (Seljak, 1985) i Hrvatskoj (Seljak, 1987; Budinščak i sar., 2005) i Srbiji (Duduk, 2004). Raširenost FD fitoplazme u vinogradima u Evropi je direktno povezana sa istovremenim prisustvom njenog vektora cikade *S. titanus*.

2.10. Načini prenošenja fitoplazmi

Do sada su dokazana tri načina zaražavanja biljaka fitoplazmama i to su:

- a) vegetativno ili kalemljenjem zaraženog biljnog materijala (Boudon-Padieu, 2003);
- b) prenošenje parazitskim cvetnicama iz roda *Cuscuta* spp. (Dale and Kim, 1969) i
- c) prenošenje vektorima (Schvester et al., 1961).

Postoje i opisi četvrte mogućnosti prenošenja fitoplazmi semenom (kod lucerke i kokosa), ali nisu još uvek eksperimentalno dokazani i potvrđeni (Khan et al., 2002; Cordova et al., 2003).

Vektori fitoplazmi su insekti iz reda Homoptera, psile (Sternorrhyncha: Psyllidae) i cikade (Auchenorrhyncha: Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae, Dystiopharidae i dr.). Među njima je veliki broj vrsta, od monofagnih do polifagnih koje mogu prenositi jednu ili više fitoplazmi (Weintraub i Beanland, 2006). Kako su fitoplazme isključivo intracelularni mikroorganizmi koji nastanjuju floemske ćelije, jedino insekti koji se hrane sokovima iz floema mogu ih potencijalno usvojiti i prenositi. Međutim ni među njima ne mogu svi biti vektori fitoplazmi.

Pri otkriću neke nove bolesti koja je prouzrokovana fitoplazmama veoma malo se zna o njenog epidemiologiji, jer se najčešće nije utvrđen njen vektor. Da bi se utvrdili njeni vektori potrebno je pre svega proučiti entomofaunu iz neposredne okoline zaraženih biljaka. Moraju se sprovesti ispitivanja tokom cele sezone

(Weintraub i Beanland, 2006). Najčešće metode su postavljanje lepljivih klopki raznih boja u neposrednoj blizini obolelih biljaka (Weintraub and Orenstein, 2004). Metode sakupljanja pomoću entomoloških mreža (Pilkington et al., 2004) i usnog aspiratora (Weintraub and Orenstein, 2004) koriste se za sakupljanje živih insekata za dalja proučavanja. Takođe, metode za sakupljanje živih insekata sa visokih biljaka su otresanje u velike entomološke mreže (Carraro et al., 2004) i malezeove klopke (Irwin et al., 2000). Kako se obično sakupi veliki broj vrsta insekata, neophodno je predhodno povezati brojnost i učestalost neke vrste u okruženju bolesnih biljaka, što može ukazati na potencijalne vektore. Od svih insekata najuspešniji vektori fitoplazmi su cikade. Nakon toga neophodno ih je testirati na prisustvo fitoplazmi, jer samo vrste koje u sebi imaju fitoplazme mogu biti i vektori. Na kraju eksperimentalno prenošenje fitoplazmi u kontrolisanim uslovima jedino može potvrditi pravu vektorsku ulogu nekog insekta u epidemiološkom lancu (Tedeschi et al., 2002).

2.11. Načini usvajanja i umnožavanja fitoplazmi u cikadama

Cikade se hrane floemskim sokovima biljaka i pasivno unose fitoplazme u svoj organizam. Potrebno vreme da se unese dovoljna količina inokuluma naziva se akvizicijski period i ono se može kretati od nekoliko minuta do nekoliko sati (Purcell, 1982; Bressan et al., 2005b). Vreme koje je potrebno da prođe od vremena unošenja fitoplazmi do mogućnosti da ih cikada prenese na drugu biljku naziva se latentni period ili period inkubacije (Nagaich et al., 1974). Latentni period uglavnom zavisi od temperature i kreće se od nekoliko do 80 dana (Murrall et al., 1996). Kod *S. titanus* period inkubacije iznosi 21 dan za FD fitoplazmu. U telu insekata, fitoplazma se može umnožavati u pljuvačnim žlezdama, srednjem crevu, malpigijevim cevima, masnom tkivu, nervnom tkivu i reproduktivnim organima (Lherminier et al., 1990; Nakashima and Hayashi 1995; Lefol et al., 1994; Kawakita et al. 2000). Proučavajući interakcije FD i njenih vektora (kod *S. titanus* i *Euscelidius variegatus* Kbm. u laboratorijskim uslovima) Lefol et al. (1993) su našli da se fitoplazme vezuju sa crevni trakt, hemolimfu i pljuvačne žlezde cikada. Samo prisustvo fitoplazmi u cikadama ne mora značiti i da su one sposobne da budu vektori (Vega et al., 1993; Vega et al., 1994). Da bi se fitoplazme prenele mora da prođu nekoliko membrana pljuvačnih žlezda i umnožiti se u određenim,

specifičnim ćelijama zadnjeg acinusa pljuvačnih žlezda (posterior acinar cells) (Kirkpatrick, 1992).

2.12. Interakcije cikada i fitoplazmi

Interakcije fitoplazmi i cikada mogu biti veoma kompleksne i raznovrsne. Mnoge fitoplazme (Aster Yellows, Western X) mogu biti prenošene sa više vektora (Ebbert et al., 2001; Lee et al., 1996), a takođe jedan vektor može preneti dve ili više vrsta fitoplazmi (Lee et al., 1996). Za sada nema podataka da vektor selektivno može usvojiti jednu fitoplazmu iz biljke koja je zaražena sa više fitoplazmi (Zhang et al., 2004). Smatra se da se fitoplazme ne mogu prenositi na potomstvo. U nekim radovima istraživanja pojedinih autora ukazivala su na izvesne mogućnosti transovarialnog prenošenja fitoplazmi (Alma et al., 1997; Kawakita et al. 2000), ali ona nisu opšte prihvaćena i dokazana. Uticaj fitoplazmi na vektore može biti pozitivan, štetan i neutralan. Poznati su primeri gde je produžena dužina života i povećana plodnost ženki *Macrosteles quadrilineatus* Forbes koje su u sebi imale Aster Yellow (Beanland et al., 2000). Štetan uticaj X-disease fitoplazmi na svog vektora domaćina *Paraphlepsius irroratus* samo na nižim temperaturama saopštili su Garcia-Salazar et al. (1991). Takođe Bressan et al. (2005a) navode da FD fitoplazme mogu imati negativan uticaj na *S. titanus*. Najčešći je slučaj kada fitoplazme nemaju nikakav uticaj na svoje domaćine (Fletcher et al., 1998).

Interakcije fitoplazmi i vektora takođe mogu zavisi i od pola cikade. Tako su Chiykowski and Sinha (1970) i Swenson (1971) utvrdili razlike u akviziciji i dinamici prenošenja fitoplazmi u zavisnosti od pola cikade.

2.13. Interakcije cikada i biljke domaćina

Interakcije između vektora i biljke domaćina takođe imaju veliku ulogu u širenju fitoplazmi. Polifagne cikade imaju mogućnost da inficiraju veći krug domaćina (Marzachi et al., 1998., Ebbert et al., 2001). U laboratorijskim eksperimentima je potvrđeno da i cikade koje se u prirodnim uslovima ne hrane na nekoj biljci mogu usvojiti i preneti fitoplazme (Lefol et al., 1994). Takođe postoje i primeri kada se

neke biljke mogu inficirati fitoplazmama, ali ne mogu biti dalji izvor zaraze, odnosno cikade koje se hrane na njima ne mogu se inficirati. Takve biljke se nazivaju poslednjim domaćinima (dead-end host). Tako je ciklama (*Cyclamen persicum* L.) poslednji domaćin za Aster Yellows (Alma et al., 2000), a celer za Chrysanthemum Yellows (Bosco et al., 1977b). Vinova loza je takođe poslednji domaćin za Stolbur fitoplazmu koju prenosi cikada *H. obsoletus* (Weintraub i Beanland, 2006). Mehanizmi zbog čega su neke biljke poslednji domaćini za neke fitoplazme nisu proučeni. Neki autori ukazuju da inficirane biljke koje ispoljavaju hlorozu ili žutilo mogu biti atraktivnije za cikade i tako dodatno uticati na širenje bolesti (Tod et al., 1990).

2.14. Antropogeni faktor širenja fitoplazmi i vektora

Jedan od važnih faktora koji utiču na širenje kako fitoplazmatičnih oboljenja tako i cikada je antropogeni faktor. Veliki je broj primera širenja fitoplazmi, posebno u cvećarstvu. Tako su neke fitoplazme (16SrIII-H) iskorišćene da bi se dobile neobične i dekorativne biljne hibride *Euphorbia pulcherrima* Wild, poznatija kao božićno drvo (Lee et al., 1995). Fitoplazme se takođe često koriste za dobijanje dekorativnih formi biljne vrste *Euphorbia lactea* Hort.. Ovakve biljke mogu biti izvor inokuluma i mogu predstavljati potencijalno izvorište novih epidemioloških lanaca ove bolesti. Tako je slučajnim unošenjem nove štetočine na vinovoj lozi endemična bolest *F. dorée* postala epidemijska u svim reonima gde se raširio i njen vektor *S. titanus* (Weintraub i Beanland, 2006).

2.15. Načini sprečavanja širenja fitoplazmi

U kontroli fitoplazmatičnih oboljenja, primarna stvar je sprečavanje daljeg širenja, što se postiže hemijskim suzbijanjem vektora i uništavanjem potencijalnih izvora fitoplazmi (napušteni usevi i zasadi, biljke autohtone flore), uspostavljanjem regiona za biljnu proizvodnju bez prisustva patogena i vektora (tzv. Pest free area, OEPP/EPPO, 2002) i proizvodnjom zdravog sadnog i reproduktivnog biljnog materijala. Za izradu programa integralne zaštite koja će obezbediti uspešno suzbijanje i prevenciju fitoplazmatičnih bolesti, neophodno je u potpunosti istražiti

njihovu etiologiju i epidemiologiju. Koliko je ova problematika kompleksna potvrđuju gore navedeni primeri sa FD o više potencijalnih vektora fitoplazmi, među kojima ima i polifagnih vrsta, kao i autohtona flora kao prirodni izvor i rezervoar fitoplazmi i novih epidemija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Rasprostranjenje *S. titanus* i registracija njegovih populacija

Sakupljanje insekata vršeno je u periodu 2004.-2007. od početka maja do kraja septembra u proizvodnim vinogradima i na populacijama divlje loze. Materijal za kvalitativne i kvantitativne studije je sakupljan u intervalima od 15 dana koristeći sledeće metode: (i) vizuelna inspekcija i sakupljanje cikada usnim aspiratorom, (ii) košenje entomološkom mrežom sa biljaka, (iii) postavljanje lepljivih žutih klopki i (iv) noćni lov sa svetlosnim izvorom.

3.1.1. Vizuelna inspekcija

Pregled i sakupljanje podataka vizuelnom metodom u vinogradima i na populacijama divlje vinove loze vršena je od početka piljenja nimfi (L_1 - L_3 larveni stupanj), od polovine maja do sredine juna do pojave imaga (slike u prilogu - 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 i 20). Pregledom su bili obuhvaćeni naličje listova u donjem delu čokota, u neposrednoj blizini višegodišnjih lastara. Brojanje nimfi vršeno je na 5 listova po čokotu, u transektu koji je polazio od jednog ugla vinograda, a završavao dijagonalno, na suprotnom uglu vinograda, kako kod piramidalnih tako i kod špalirskih zasada vinove loze. Transektom je obuhvaćeno 10 čokota, odnosno ukupno 50 listova. U slučaju velikih parcela, sakupljanje insekata je vršeno na dijagonalnom transektu dužine od oko 50 metara, pri čemu su pregledani čokoti koji su međusobno bili udaljeni 5 - 10 metara. U kvantitativnom smislu, sakupljeni materijal je ocenjivan na sledeći način: od 1-10 larvi - populacija je ocenjena kao populacija niske brojnosti (+), od 11 - 50 larvi - srednje brojnosti (++), 51 - 100 larvi

- populacija visoke brojnosti (+++) i preko 100 larvi - populacija izuzetno visoke brojnosti (++++).

3.1.2. Metod košenja entomološkom mrežom

Ovaj metod sakupljanja insekata primenjen je za sakupljanje imaga cikada na vinovoj lozi. Zbog specifičnih bionomijskih karakteristika vrste *S. titanus*, ovaj metod je modifikovan u skladu sa ponašanjem adulta na biljci domaćinu. Imaga *S. titanus* pokazuju izrazitu noćnu aktivnost (Lessio and Alma, 2004a), dok danju uglavnom miruju, zaklonjeni listovima vinove loze. Zbog toga, metod košenja je modifikovan upotrebom dve entomološke mreže istovremenim udarcima po listovima čokota sa dve naspramne strane čime je sprečen beg adulta koji su bili prisutni na biljci. Ulovljeni adulti su zatim usisani usnim aspiratorom, a zatim prebačeni u krio-tubice 4,5 x 1 cm (Sarsted, Nemačka) sa 96% etil-alkoholom. Tubice sa sakupljenim insektima su na terenu čuvane na temperaturi od 7-11°C u poljskom frižideru.



Slika 21. Sakupljanje imaga entomološkom mrežom
u FD inficiranim vinogradima u Tulešu

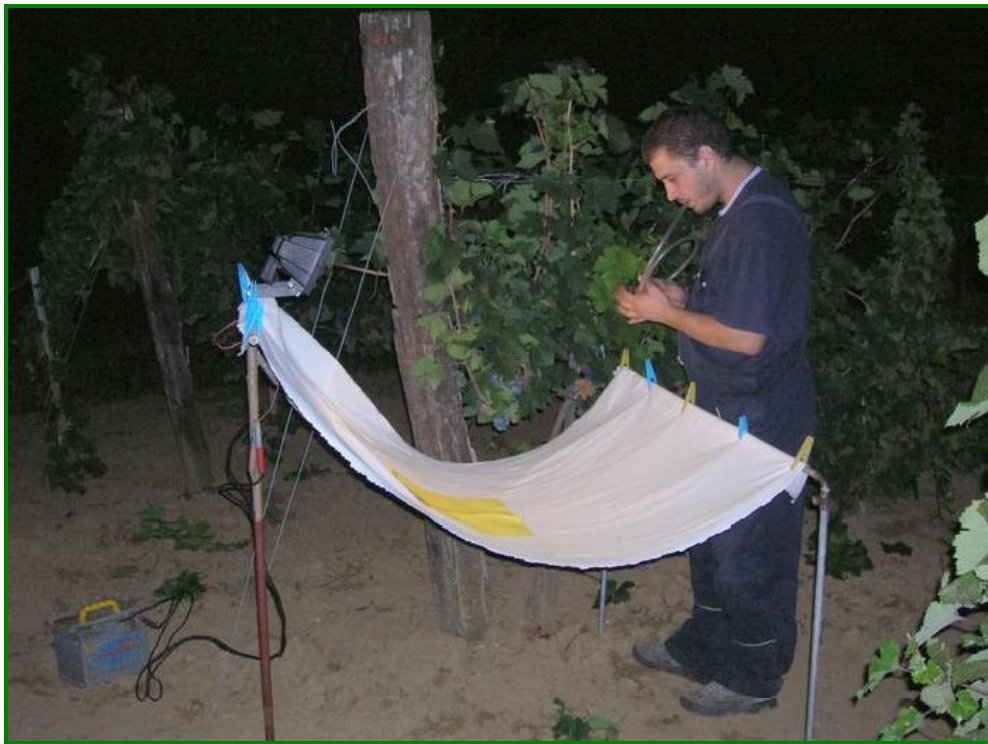
Sakupljeni materijal je čuvan u laboratoriji na temperaturi od -20 °C. U kvantitativnom smislu, sakupljeni materijal je ocenjivan na sledeći način: na ulovljenih 1-5 adulta populacija je ocenjena kao niske brojnosti (+), od 6 - 20 srednje brojnosti (++), 21 - 50 populacija visoke brojnosti (+++) i preko 50 adulta populacije izuzetno visoke brojnosti (++++)(slika 21).

3.1.3. Identifikacija populacija *S. titanus* pomoću žutih lepljivih klopki

Ovaj metod je primenjen u cilju sveobuhvatnijeg sagledavanja populacija *S. titanus* na širem području teritorije Srbije, a naročito u područjima gde su prisutni ekstenzivni zasadi vinove loze, odnosno na populacijama divlje vinove loze između značajnih vinogorja. Žute lepljive klopke (tipa Csalomon, Mađarska) su postavljane od početka jula meseca, kada počinje rojenje adulta, odnosno njihova pojačana aktivnost, kako unutar zasada tako i između zasada vinove loze. Klopke su menjane svakih 15 do 20 dana, u najmanje 2, a najviše 4 intervala zamene čime je pokriven period najveće aktivnosti adulta. U zavisnosti od konfiguracije terena i veličine zasada, postavljeno je najmanje 2, a najviše 4 klopke po lokalitetu na visini od 1 -1,5 m. Determinacija i brojanje zalepljenih primeraka vršena je vizuelnim pregledom pod binokularnom lupom Leica MS5 u laboratorijskim uslovima. U kvantitativnom smislu, sakupljeni materijal je ocenjivan na sledeći način: 1 - 5 adulta populacija je ocenjena kao populacija niske brojnosti (+), od 6 - 20 - populacija srednje brojnosti (++), 21 - 50 populacija visoke brojnosti (+++) i preko 50 adulta populacija izuzetno visoke brojnosti (++++).

3.1.4. Metoda noćnog lova sa svetlosnim izvorom

Ova metoda je korišćena za masovno sakupljanje živih imaga *S. titanus* iz vinograda sa njenom brojnijom populacijom, a koji su kasnije korišćeni u eksperimentima. Korišćen je pokretni električni izvor energije (akumulator za kola) i halogene lampe. Lampe su postavljane iznad belog ili žutog platna. Privučene cikade i drugi noćni insekti su sakupljeni usnim aspiratorom (slika 22).



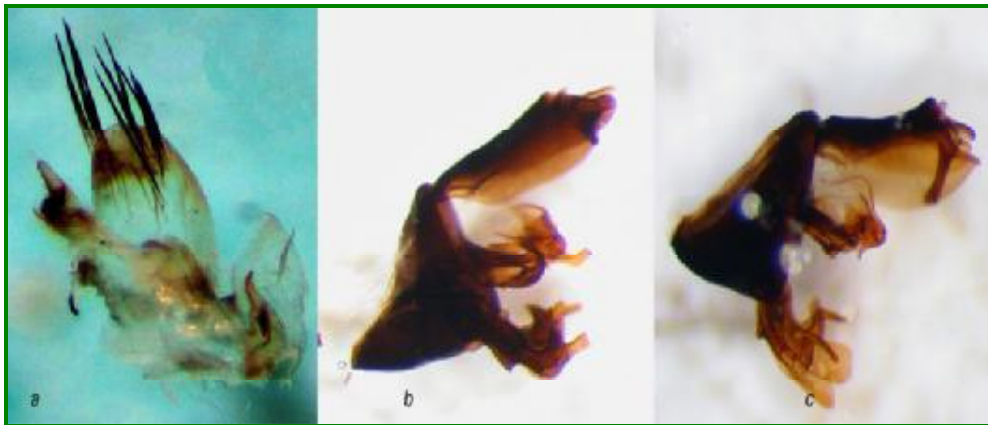
Slika 22. Noćni lov cikada - masovno sakupljanje cikada iz FD zaraženih vinograda na Fruškoj Gori

3.2. Materijal za kvalitativnu i kvantitativnu analizu cikada u vinogradima sa fitoplazmatičnim simptomima

Sakupljanje cikada za ova istraživanja vršena su u četiri reprezentativna vinograda na lokalitetima Aleksandrovac, Umčari i Mutalj u 2004. godini, odnosno Aleksandrovac, Mutalj i Jasenovik (Sićevo) u 2005. i 2006. godini. Za sakupljanje cikada korišćen je metod obostranog košenja entomološkom mrežom u trajanju od 15 minuta. U 2004. godini cikade su lovljene počev od 15. jula do 1. oktobra u 2004. u intervalima od oko 15 dana, dok su u 2005. i 2006. godini cikade sakupljane od 15. maja do 1. oktobra.

Vrste su determinisane na osnovu ključeva sačinjenih za centralno evropske vrste (Holzinger et al., 2003; Biedermann and Niedringhaus, 2004). Sve vrste su determinisane na osnovu pregleda genitalne armature (slika 23). U nejasnim slučajevima, determinaciju je potvrdio dr Pavel Laitatuter (Brno, Češka Republika).

Sakupljeni primerci su preparovani i nalaze se u zbirci Odseka za štetočine bilja u Zemunu, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu Beograd.



Slika 23. Genitalije mužjaka (a - *S. titanus*; b - *R. panzeri*; c - *R. quinquecostatus*)

3.3. Materijal za bionomijska istraživanja i eksperimentalne potrebe

U cilju istraživanja fenologije *S. titanus* sakupljani su 2-4 godine stari lastari vinove loze sa lokaliteta gde je registrovana visoka brojnost ove cikade u prethodnoj godini. Veličina uzorka je određena dužinom sakupljenih lastara koja je iznosila 100 ± 10 dužnih metara biljnog materijala. Po 25 metara lastara stavljeno je u četiri kaveza dimenzija 90 x 60 x 70 cm (slika 24), pri čemu su dva bila izložena većim dnevnim temperaturnim promenama (temperaturni režim unutar staklare), a druga dva manjim promenama (postavljeni su u mrežasti inсектарijum zaštićen od sunca).

U metodološkom smislu, na ovaj način su simulirane temperaturne promene koje su prisutne i u vinogradima, jer se po pravilu, vinogradi nalaze na kserotermnim staništima sa velikim promenama dnevnih temperatura. Temperature unutar kaveza su svakodnevno merene digitalnim termometrom pri čemu su registrovane maksimalne i minimalne dnevne temperature. U centralnom delu kaveza je bila postavljena loza zasađena u saksiji sa 3-4 lista za agregaciju ispiljenih L₁ nimfi.



Slika 24: Kavez za praćenje piljenja jaja *S. titanus*

Svakodnevno su L_1 nimfe sakupljane usnim aspiratorom i prebrojavane između 15-17^h. Ispiljene larve su delom stavljene u 96% etanol, a delom za potrebe eksperimenata i praćenja dinamike razvića, prebacivane u plastične cilindre sa zasađenom lozom na gajenje. Dinamika piljenja je praćena u dve eksperimentalne godine, a materijal za gajenje je u prvoj godini (sezona 2005) sakupljen na lokalitetu selo Tuleš (GPS: N 43° 30' 005"; EO 21° 06' 513"; nm.=340m) (župsko vinogorje), drugoj godini (sezona 2006) sa lokaliteta selo Gornji Matejevac (GPS: N 43° 20' 870"; EO 21° 57' 842"; nm.=318m) (matejevačko-sićevačko vinogorje).

3.4. Testovi ishrane i interakcija *S. titanus* na biljkama staništa

U cilju istraživanja potencijalnih trofičkih odnosa između biljaka staništa i vrste *S. titanus* vršeni su testovi ishrane i preživljavanja L_1 , L_3 i adulta na biljkama koje su često prisutne kao korovske vrste unutar i oko loznih zasada (*Partenocisus*

tricuspidata Siebold and Zuccarini, *Partenocissus quinquefolia* L., *Bilderdykia convonvulus* L., *Chenopodium album* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., *Setaria glauca* (L.) Beauv., *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *Cissus rhombifolia* Vahl., *Ballota nigra* L., *Stelaria media* (L.) Vill., *Convonvulus arvensis* L., *Clematis vitalba* L.). Testiranje preživljavanja jedinki na drugim biljnim vrstama je vršeno u uslovima „bez izbora“ - jedinkama se nudi za ishranu samo jedna biljna vrsta, pri čemu je kontrola originalna biljka domaćin, u ovom slučaju vinova loza. Po 12 jedinki, različitog stepena razvića (L₁, L₃ i imago) su bili obuhvaćeni ovim testom u 4 ponavljanja, na ukupno 14 biljnih vrsta. Ocena testa je vršena u zavisnosti od prihvatanja biljke od strane testiranih jedinki tako što je početkom testa prvog dana pregled vršen na svakih 60 minuta, a kasnije jedan put dnevno. Test je realizovan u plastičnim cilindrima (35 cm x 10 cm), sa unapred pripremljenim biljkama koje su bile zasađene u plastične saksije, koje su činile donji deo cilindra. Površina zemlje u saksijama je bila posuta slojem peska (gradacija br. 2) debljine oko 2 cm kako bi se sprečila preterana vlaga unutar cilindra. Za svaku biljnu vrstu, iskazana je srednja vrednost preživljavanja u satima ili danima u zavisnosti od perioda preživljavanja.

3.5. Detekcija i genotipizacija FD fitoplazmi molekularnim metodama

U periodu od 2004.-2006. godine sakupljani su uzorci biljnog i insekatskog materijala za detekciju fitoplazmi molekularnim metodama. Uzorci su sakupljani u 25 okruga u kojima su vizuelnom metodom detektovani simptomi fitoplazmatičnih oboljenja vinove loze. Na svim lokalitetima sakupljan je materijal simptomatskih biljaka vinove loze i cikade *S. titanus*. Uzorci pavitine (*C. vitalba*) su sakupljani sa više lokaliteta na teritoriji Srbije. U cilju utvrđivanja potencijalnih novih epidemioloških lanaca FD fitoplazme, na lokalitetu Jasenovik u Niškom vinogorju tokom 2005. sakupljane su i druge prisutne cikade u cilju utvrđivanja prisustva FD fitoplazme u njima. Definisane tipa FD fitoplazme prisutnih u biljnom i insekatskom materijalu urađeno je analizom tri genomska regiona ove fitoplazme

3.5.1. Ekstrakcija DNK

3.5.1.1 Ekstrakcija DNK iz vinove loze

Ukupne nukleinske kiseline izolovane su iz svežih listova i lisnih nerava svakog pojedinačnog uzorka vinove loze. Izolacija je urađena po CTAB (cethyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolu izolacije opisanom od strane Angelini i sar. 2001.

Jedan gram lisnih nerava svakog uzorka usitnjen je u tečnom azotu pomoću tučka i avana i homogenizovan u 3%-tnom CTAB puferu za ekstrakciju DNK (3% CTAB, 100mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 1,4M NaCl, 0,2% β-marcaptoethanol). Jedan mililitar ove suspenzije prebačen je u Eppendorf tubicu zapremine 2ml i inkubiran 20 minuta na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije u tubicu je sipana jednaka količina hloroforma (1ml) i DNK izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 rpm u vidu supernatanta koji je prebačen u novu Eppendorf tubicu zapremine 1,5ml. U izdvojenu DNK dodata je jednaka količina izopropanola (0,75ml) a zatim iz rastvora istaložena centrifugiranjem 15 minuta na 11000 rpm. Izolovana DNK isprana je 96% etanolom, osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru i rastvorena u 100μl TE pufera (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6).

3.5.1.2. Ekstrakcija DNK iz pavitine (*Clematis vitalba*)

Ukupne nukleinske kiseline izolovane su iz svežih listova i lisnih nerava svakog pojedinačnog uzorka pavitine. Izolacija je urađena po modifikovanom CTAB (cethyl-trimethyl-ammonium bromide) protokolu izolacije opisanom od strane Angelini i sar. (2001).

Koristeći protokol za izolaciju DNK, opisan u poglavlju 3.5.1.1., dobijena je DNK sa visokim sadržajem inhibitornih materija. Da bi se dobila čistija DNK, posle izolacije sprovedeno je prečišćavanje, koje je više puta ponovljeno sve dok se nije dobila čista DNK. Prečišćavanje je urađeno postupkom potpunog rastvaranja "prljave", skoro crne DNK u 700 μl molekularne vode i dodavanjem jednake količine izopropanola. Prečišćena DNK je iz rastvora istaložena centrifugiranjem 15 minuta

na 11000 rpm. Posle ove procedure većina inhibitornih substanci, ili čak sve, ostajale su rastvorene u tečnoj fazi tako da je dobijena kvalitetnija DNK. Kod izolata kod kojih su se inhibitorne materije teže rastvarale ova procedura je ponavljana 4 do 5 puta ili dok DNK ne bi bila čista. Evidentno je da se u ovoj proceduri jedan, mada ne značajan, deo DNK izgubio, ali je čistoća prečišćene DNK bila značajno poboljšana. Detekcija fitoplazmi u prečišćenim uzorcima bila je moguća u razređenju 1:10, dok pre prečišćavanja to nije bilo moguće sem ukoliko su uzorci razređeni 10.000 puta.

3.5.1.3. Ekstrakcija DNK iz insekata

Ukupne nukleinske kiseline ekstrahovane su iz svakog pojedinačnog insekta po modifikovanom CTAB protokolu ekstrakcije opisanom od strane Angelini i sar. (2001).

Svaki pojedinačni insekt usitnjen je u tečnom azotu u Eppendorf tubici zapremine 2 ml korišćenjem Eppendorf Micropistille. Usitnjeni uzorak homogenizovan je u 0,4 ml 2%-tnog CTAB pufera (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2% β -marcaptoethanol) i inkubiran 30 minuta na 65°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije u tubicu je sipana jednaka količina hloroforma (0,4 ml) i DNK je izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 rpm na 4°C. Supernatant je prebačen u novu Eppendorf tubicu zapremine 1,5ml i proces ekstrakcije DNK hloroformom još jednom ponovljen. Izdvojena DNK je istaložena dodavanjem jednake količine izopropanola (0,4 ml) i centrifugiranjem 15 minuta na 12000 rpm na 4°C. Izolovana DNK isprana je 96% etanolom, osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru i rastvorena u 50 μ l TE pufera.

3.5.2. Detekcija FD fitoplazmi umnožavanjem FD9 regiona metodom lančane reakcije polimeraze - Polymerase Chain Reaction (PCR)

U cilju utvrđivanja prisustva FD fitoplazme u biljnom i insekatskom materijalu primenjena je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR). Korišćenjem specifičnih prajmera, ova metoda omogućava specifično umnožavanje delova genoma ove

fitoplazme i time detekciju njenog prisustva. Spisak svih korišćenih prajmera dat je u Tabeli 1.

Za specifičnu detekciju FD fitoplazme u vinovoj lozi, pavitini i cikadama umnožavan je FD9 region neribozomalnog fragmenta DNK fitoplazmi Elm yellows (EY) grupe (16S rRNK V-grupa) u nested PCR proceduri. FD9 region obuhvata gen za sintezu ribozomalnog proteina *l15* (*rp/l15* gen) i gen koji kodira ribozomalni protein *l15* (*rp/l15* gen) i gen koji kodira protein translokazu (SecY gen) i prepoznatljivo je drugačiji kod fitoplazmi 16S rRNK V-grupe u odnosu na sve druge do sada opisane fitoplazme. Uspešna sinteza ovog regiona ukazuje na prisustvo FD fitoplazme u analiziranom materijalu.

Za direktni PCR korišćeni su FD9f2 (Angelini i sar., 2001) i FD9r (Daire i sar., 1997) prajmeri, a za nested PCR FD9f3 i FD9r2 (Angelini i sar., 2001) prajmeri koji umnožavaju segment finalne dužine 1150 bp. Umnožavanje DNK u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja: *Taq* pufer (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 na 25°C), 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40) (1x), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (300 µM), prajmeri (750 nM), *Taq* polimeraza (Fermentas) 0.0375U/µl i 1 µl 1:10 razređene DNK uzorka. Da bi se eliminisala mogućnost da je tokom pripreme uzoraka došlo do unakrsne kontaminacije između njih, na svakih 10 uzoraka stavljana je negativna kontrola. Negativnu kontrolu je predstavljala dodatna tubica sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 µl uzorka sipan 1 µl molekularne vode. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler[®]ep po sledećem protokolu za direktni PCR: inicijalna denaturacija 92°C 90 sec; denaturacija 92°C 30 sec, elongacija 46°C 40 sec, ekstenzija 72°C 90 sec (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 5 min. Protokol za nested PCR je bio modifikovan višom temperaturom elongacije (47°C 30 sec) i skraćenim vremenom ekstenzije (72°C 75 sec). Ukupno je primenjeno 39 ciklusa.

Da bi se utvrdilo u kojim uzorcima je umnožen specifični region FD fitoplazme, 5 µl PCR produkta svakog uzorka uključujući i negativne kontrole pušteno je na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom.

3.5.3. Genotipizacija FD fitoplazmi metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i sekvencioniranjem

Analiza tipa FD fitoplazme urađena je na tri genomska regiona: 16S-23S rRNK regionu, FD9 regionu (rpl15 i SecY gen) i rpV regionu (rpl22 i rps3 gen).

3.5.3.1. Analiza 16S-23S rRNK regiona

Region 16S-23S ribozomalne RNK (16S-23S rRNK) umnožen je metodom lančane reakcije polimeraze u nested PCR proceduri. Za direktni PCR korišćeni su P1 (Deng i Hiruki, 1991) i P7 (Smart i sar., 1996) prajmeri koji umnožavaju ceo 16S rRNK region, 16S-23S rRNK međuprostor i početak 23S rRNK, ukupne dužine 1800 bp. Za nested PCR korišćeni su 16r758f (Gibb i sar., 1995) i M23Sr (Padovan i sar., 1995) prajmeri koji obuhvataju deo 16S rRNK, 16S-23S rRNK međuprostor i početak 23S rRNK region u ukupnoj dužini od 1050 bp. PCR umnožavanje u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja: *Taq* pufer (1x), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (300 µM), prajmeri (600 nM), *Taq* polimeraza (Fermentas) 0.0375 U/µl i 1 µl 1:10 razređene ekstrahovane DNK uzorka. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler®ep po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija 94°C 90 sekundi; denaturacija 94°C 1 min, elongacija 50°C 2 min, ekstenzija 72°C 3 min (34 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 10 min. Da bi se utvrdilo prisustvo fitoplazme i procenila količina sintetisanog produkta, posle završenog umnožavanja 5 µl PCR produkta svakog uzorka pušteno je na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom.

Posle uspešnog umnožavanja PCR produkt 16S-23S rRNK uzoraka podvrgnut je digestiji sa *TaqI* restrikcionom endonukleazom (Fermentas). Digestija je urađena u ukupnoj zapremini od 15 µl RFLP smeše sadržaja: 1 x pufer za digestiju, 1U enzima, 1-5 µl PCR produkta u zavisnosti od količine sintetisanog PCR produkta i 8-12 µl Molecular Biology Grade Water (Eppendorf). U cilju potpune digestije PCR produkata ona je trajala 16 sati. Temperatura digestije je bila 65°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Produkti digestije su razdvojeni elektroforetski na 13%

poliakrilamidnom gelu u TBE (Tris-Borate 90mM, EDTA 1mM) puferu, obojeni etidijum bromidom i vizualizirani pod UV transiluminatorom.

3.5.3.2. Analiza rp regiona (operona gena ribozomalnih proteina)

Region operona gena ribozomalnih proteina (rp) EY grupe fitoplazmi (rpV) umnožen je PCR metodom u nested PCR proceduri. Za direktni PCR korišćen je par prajmera specifičan za umnožavanje ribozomalnih proteina EY grupe fitoplazmi: rp(V)F1(Lee i sar., 1998) i rpR1 (Lim i Sears, 1992). Za nested PCR korišćen je drugi par prajmera specifičan za umnožavanje rp regiona fitoplazmi EY grupe: rp(V)F1A i rp(V)R1A (Lee i sar., 2004). Produkt nested PCR-a sa ovim prajmerima dužine je oko 1200 bp i obuhvata region koji kodira ribozomalne proteine *s3* (*rps3*) i *l22* (*rpl22*). PCR umnožavanje u obe reakcije, direktnoj i nested, urađeno je u 20 µl zapremini PCR smeše sadržaja: *Taq* pufer (1x), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (300 µM), prajmeri (600 nM), *Taq* polimeraza (Fermentas) 0.0375 U/µl i 1 µl 1:10 razređene ekstrahovane DNK uzorka. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler[®]ep po protokolu istom kao i za umnožavanje 16S-23S rRNK regiona.

Da bi se utvrdilo prisustvo fitoplazme i procenila količina sintetisanog produkta, posle završenog umnožavanja 5 µl PCR produkta svakog uzorka pušteno je na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom.

Posle uspešnog umnožavanja PCR produkt rp regiona uzoraka stavljen je na digestiju sa *Tru1I* restrikcionom endonukleazom (Fermentas). Digestija je urađena u ukupnoj zapremini od 15µl RFLP smeše sadržaja: 1x pufer za digestiju, 1U enzima, 1-5 µl PCR produkta u zavisnosti od jačine sintetisanog produkta na agaroznom gelu i 8-12 µl Molecular Biology Grade Water (Eppendorf). U cilju potpune digestije PCR produkata ona je trajala 16 sati. Temperatura digestije je bila 37°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Produkti digestije su razdvojeni elektroforetski na 13% poliakrilamidnom gelu u TBE (Tris-Borate 90 mM, EDTA 1 mM) puferu obojeni etidijum bromidom i vizualizirani pod UV transiluminatorom.

3.5.3.3. Analiza FD9 regiona

FD9 region obuhvata gen koji kodira ribozomalni protein *l15* (*rp15* gen) i gen koji kodira protein translokazu (*SecY* gen) umnožen je po protokolu opisanom u poglavlju 3.5.2. Posle završenog umnožavanja 5 µl PCR produkta svakog uzorka pušteno je na 1% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom. Posle uspešnog umnožavanja PCR produkt FD9 regiona uzoraka stavljen je na digestiju sa *TaqI* restrikcionom endonukleazom (Fermentas) po protokolu opisanom u poglavlju 3.5.3.1.

U cilju detaljnije analize FD fitoplazmi prisutnih u uzorcima vinove loze, pavitini i cikadama, FD9 region, koji je najvarijabilniji od 3 analizirana regiona, je sekvencioniran. Posle provere uspešnosti sinteze FD9 regiona, PCR produkti uzoraka određenih za sekvencioniranje prečišćeni su pomoću QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit-a prateći upustvo proizvođača. Prečišćeni uzorci ponovo su pušteni na 1% agaroznom gelu da bi se proverila čistoća uzoraka, njihova molekularna težina i količina DNK u svakom uzorku poređenjem sa markerom (SERVA DNA 100 Bp DNA Ladder).

Tabela 1. Spisak korišćenih prajmera

Region	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru
FD9	FD9f2	GCTAAAGGTGATTTAAC
	FD9r	TTTGCTTTCATATCTTGTATCG
	FD9f3*	GGTAGTTTTATATGACAAG
	FD9r2*	GACTAGTCCCGCCAAAAG
16S-23S rRNK	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT
	16r758f*	GTCTTTACTGACGCTGAGGC
	M23Sr*	TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG
rpV	rp(V)F1	TCGCGGTCATGCAAAAGGCG
	rpR1	ACGATATTTAGTTCTTTTTGG
	rp(V)F1A*	AGGCGATAAAAAAGTTTCAAAA
	rp(V)R1A*	GGCATTAAACATAATATATTATG

*prajmeri za nested PCR protokol

Reakcije sekvencioniranja urađene su u BMR Genomics (Padova, Italy) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvencionatoru. Umnoženi FD9 region

uzoraka sekvencioniran je u oba smera upotrebom oba prajmera korišćena za umnožavanje DNK.

Poravnanje sekvenci (alignment) urađen je u CLUSTAL W Multiple Sequence Alignments programu verzija 1.81 (<http://align.genome.jp/>).

4. R E Z U L T A T I

4.1. Rasprostranjenje *S. titanus* na teritoriji Srbije

U periodu od 15.07.-5.10. 2004. ukupno je pregledano 116 vinograda na području Župe Aleksandrovac, Velike Drenove, Vršca, Bele Crkve, okoline Beograda i Fruške Gore. Na nekim lokalitetima u Župi Aleksandrovac (okolina sela Tuleš) početkom septembra, zabeležena je izuzetno visoka brojnost *S. titanus* u vinogradima zaraženim fitoplazmom. Broj primeraka nije mogao da se kvantifikuje, jer je u pojedinim zamasima mreže bilo registrovano na stotine primeraka (slika 25). Takođe zabeležen je i veliki broj egzuvija na naličju lista, što ukazuje na njihovu veliku brojnost i može da pomogne u identifikaciji prisustva ove cikade u vinogradu (slika 26).

Na svim pregledanim lokalitetima u 2004. godini (tabela 2) registrovano je prisustvo *S. titanus*. Njihove populacije su na lokalitetima u južnom Banatu ocenjene kao niske (Vršac, Bela Crkva) do umerene (okolina Beograda, Slankamen, Mandelos, Sremski Karlovci, Stalać). U pregledanim vinogradima, koji su po pravilu pokazivali visok procenat simptoma tipičnih za prisustvo fitoplazme, populacije *S. titanus* su ocenjene kao visoke (Banstol) ili kao izuzetno visoke (Tuleš, Velika Drenova, Kukljin, Medveđa, Umčari, Mutalj).



Slika 25. Velika brojnost imaga *S. titanus* na listu vinove loze



Slika 26. Velika brojnost egzuvija *S. titanus* na naličju lista

Tabela 2: Pregled vinograda u Srbiji na prisustvo *S. titanus* u periodu od 15.07-5.10.2004

Lokaliteti	Broj pregledanih vinograda	<i>S. titanus</i> brojnost populacije u pregledanim vinogradima	GPS koordinate potesa	Status zasada	Detekcija FD**	
					u lozi	u vektoru
Višnjica Beograd	2	++	-	proizvodni zasad	-	-
Banatsko Novo Selo	1	++	-	okućnica	-	-
Tuleš * Aleksandrovac	12	++++	N 43°30'005" EO 21°06' 513"	proizvodni zasad	+	+
Tuleš, Aleksandrovac	17	++++	N 43°30'025" EO 21°07'488"	proizvodni zasad	+	+
Grocka	6	++	N 44°41'755" EO 20°40'353" elev:177m	proizvodni zasad	-	-
Pudarce	2	++	N 44°36'055" EO20° 43' 550; elev:244m	proizvodni zasad	-	-
Umčari*	1	++++	N 44°34.963 EO 20° 44' 863 elev:141m	proizvodni zasad	-	-
Vršački vinogradi	5	+	-	proizvodni zasad	-	-
Bela Crkva	4	+	-	proizvodni zasad	-	-
Slankamen	15	++	N 45°09'198" EO 20°13'047"	proizvodni zasad	-	-
Banstol	13	+++	N 45°08'632" EO 19°58'539" elev. 227m	proizvodni zasad	-	-
Mandelos	5	++	N 45°06'351" EO 19°38'184" elev. 173 m	proizvodni zasad	-	-
Mutalj*	4	++++	N 45°06' 364" EO19°42'225" elev. 200 m	proizvodni zasad	+	+
Sr. Karlovci	4	++	N 45°11' 433" EO 19°55'961" elev. 129m	proizvodni zasad	-	-
Ribnik	4	++++	N 43°35'836" EO 21°03'478" elev. 171m	proizvodni zasad	-	-
Medveđa	6	++++	N 43°37' 912" EO 21°03'624" elev. 198m	proizvodni zasad	+	+
V. Drenova	6	++++	N 43°38' 164" EO 21°09'520" elev. 203m	proizvodni zasad	+	+
Kukljin	8	++++	N 43°36'225" EO 21°14'195" elev. 203m	proizvodni zasad	+	+

Stalać	1	++	N 43°36'561" EO 21°18'913" elev. 150m	proizvodni zasad	-	-
Ukupno	116					

+ - populacija niske brojnosti; ++ - srednje brojnosti; +++ - visoke brojnosti; ++++ - izuzetno visoke brojnosti

* lokaliteti na kojima je sakupljen materijal za kvalitativnu i kvantitativu analizu cikada u vinogradima

U 2005. godini detaljnije su pregledani i regioni koji nisu bili obrađeni u 2004. godini. Tako je ukupno pregledano novih 127 vinograda, okućnica i divljih loza pored glavnih puteva. Prema rezultatima prikazanim u tabeli 2 vidi se da je u svim pregledanim regionima Srbije registrovano prisustvo *S. titanus*. U severnim delovima zemlje (Palić, Sanad, Čoka, Bačko Gradište, Biserno Ostrvo) registrovana je niska brojnost populacije, osim u Horgošu na divljim lozama gde je registrovana srednja brojnost. U vršačkom regionu takođe je registrovana niska brojnost cikada, kao i u Deliblatskoj peščari (Kajtasovo, Gaj). Generalno u većini vinograda u istočnoj Srbiji registrovana je niska do srednja brojnost, dok je u Fruštogorskom i beogradskom regionu registrovana srednja do visoka brojnost *S. titanus* (samo u nekim vinogradima, Umčari i Irig-Tursko brdo, registrovana je izuzetno visoka brojnost). U centralnim i južnim delovima Srbije (kruševački region – Brus, Medveđa, Velika Drenova, Konjuh i niški region – Gornji Matejevac, Gornja Vrežina) uglavnom su cikade prisutne u visokoj i izuzetno visokoj brojnosti (tabela 3).

Tabela 3: Pregled vinograda u Srbiji na prisustvo *S. titanus* u 2005. godini

Lokaliteti	Broj pregledanih vinograda	<i>S. titanus</i> brojnost populacije u pregledanim vinogradima	GPS koordinate potesa	Status zasada	Detekcija FD**	
					u lozi	u vektoru
Vranjaš	1	++	N 45°08'635" EO 19°8'606" elev. 213 m	proizvodni zasad	-	-
Rivica	1	+++	N 45°05'847" EO 19°48'548" elev. 221 m	proizvodni zasad	-	-
Irig - Tursko Brdo	4	++++	N 45°06'849" EO 19°51'310" elev. 237 m	proizvodni zasad	+	+
Krušedol	2	++	N 45°06'856" EO 19°57'382" elev. 192 m	proizvodni zasad	-	-
Smederevo	3	++	N 44°37'065" EO 20°54'050"	proizvodni zasad	-	-

			elev. 206 m			
Novi Slankamen	2	++	N 45°09'216" EO 20°13'051" elev. 229 m	proizvodni zasad	-	-
Vršac	2	+	N 45°06'449" EO 21°19'730" elev. 136 m	proizvodni zasad	-	-
Kajtasovo	1	+	N 44°50'485" EO 21°16'206" elev. 48 m	divlja loza	-	-
Gaj	1	++	N 44°48'010" EO 21°05'337" elev. 53 m	divlja loza	-	-
Mutalj*	3	+++	N 45°06'364" EO 19°42'225" elev. 200 m	proizvodni zasad	+	+
Beška	12	+++	N 45°09'158" EO 20°03'414" elev. 158 m	proizvodni zasad	-	-
Umčari	2	++++	N 44°34'963" EO 20°44'863" elev. 141 m	proizvodni zasad	+	+
Brestovik	1	++	N 44°38'861" EO 20°45'775" elev. 213 m	proizvodni zasad	-	-
Zemun	2	++	N 44°50'389" EO 20°24'377" elev. 84 m	okućnica	-	-
Tuleš* Aleksandrovac	6	++++	N 43°30'005" EO 21°06'513" elev. 340 m	proizvodni zasad	+	+
Brus	2	++++	N 45°25'201" EO 21°03'265" elev. 509 m	proizvodni zasad	+	+
Medveđa	3	++++	N 43°37'891" EO 21°03'629" elev. 180 m	proizvodni zasad	+	+
Gornji Ribnik	1	++++	N 43°35'755" EO 21°03'438" elev. 160 m	proizvodni zasad	+	+
Velika Drenova	4	++++	N 43°37'589" EO 21°07'813" elev. 154 m	proizvodni zasad	+	+
Konjuh	2	++++	N 43°38'248" EO 21°11'354" elev. 241 m	proizvodni zasad	+	+
Niš - Gornja Vrežina	4	++++	N 43°19'268" EO 21°59'278" elev. 247 m	proizvodni zasad	+	+
Grdelica	6	++++	N 42°56'001" EO 22°05'469" elev. 375 m	proizvodni zasad	+	+
Gornji Matejevac	3	++++	N 43°20'870" EO 21°57'842" elev. 318 m	proizvodni zasad	-	-
Požarevac	1	++	N 44°35'328" EO 21°13'769" elev. 92 m	proizvodni zasad	-	-
Sremski Karlovci	1	++	N 45°11'433" EO 19°55'973" elev. 96 m	proizvodni zasad	-	-

Sremski Karlovci - vinogradi Navipa	1	+	N 45°12'518" EO 19°52'234" elev. 171 m	proizvodni zasad	-	-
Novi Slankamen	1	++	N 44°07'865" EO 20°15'333" elev. 161 m	proizvodni zasad	-	-
Surduk	2	++	N 45°04'264" EO 20°19'295" elev. 122 m	proizvodni zasad	-	-
Kuzmin	2	++	N 45°08'640" EO 19°58'605" elev. 213 m	proizvodni zasad	-	-
Erdevik	1	++	N 43°48'660" EO 21°53'262" elev. 327 m	divlja loza	-	-
Divoš	1	+++	N 43°59'633" EO 22°18'085" elev. 222 m	proizvodni zasad	-	-
Palić	6	+	N 46°05'997" EO 19°45'838" elev. 92 m	proizvodni zasad	-	-
Horgoš	4	++	N 46°07'003" EO 19°48'559" elev. 102 m	divlja loza	-	-
Sanad 1	1	+	N 46°00'396" EO 20°06'025" elev. 84 m	divlja loza	-	-
Sanad 2	1	+	N 45°58'349" EO 20°07'257" elev. 84 m	divlja loza	-	-
Čoka	2	+	N 45°57'123" EO 20°08'241" elev. 90 m	divlja loza	-	-
Bačko Gradište	1	+	N 45°32'2223" EO 20°03'941" elev. 84 m	divlja loza	-	-
Biserno ostrvo	1	+	N 45°33'192" EO 20°04'017" elev. 88 m	proizvodni zasad	-	-
Gornji Ribnik	1	++++	N 43°21'330" EO 22°01'901" elev. 352 m	proizvodni zasad	+	-
Medveđa	2	++++	N 43°21'356" EO 22°02'754" elev. 190 m	proizvodni zasad	+	+
Velika Drenova	2	++++	N 43°21'426" EO 22°02'081" elev. 343 m	proizvodni zasad	+	+
Kukljin	1	++++	N 43°21'875" EO 22°01'705" elev. 401 m	proizvodni zasad	+	+
Jasika	1	++++	N 43°21'914" EO 22°01'699" elev. 407 m	proizvodni zasad	+	+
Paraćin	3	++	N 43°22'365" EO 22°02'441" elev. 463 m	proizvodni zasad	-	-
Umčari	2	++++	N 43°20'610" EO 22°03'551" elev. 440 m	proizvodni zasad	-	-
Sićevo *	4	++++	N 43° 20.642'	proizvodni	+	+

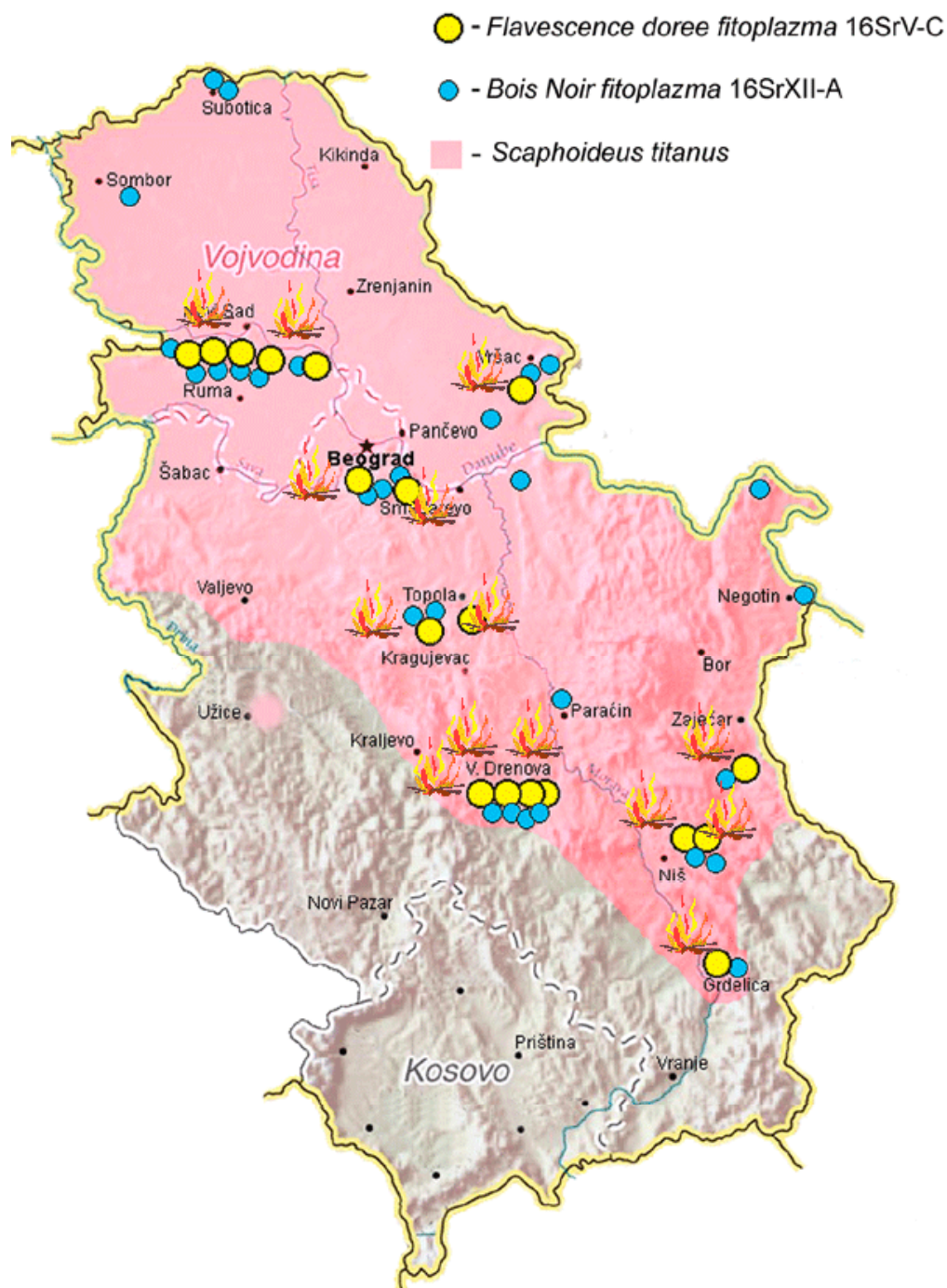
Jasenovik			EO22 ⁰ 03.719' elev. 452 m	zasad		
Despotovac	1	++++	N 43 ⁰ 45'140" EO 21 ⁰ 26'617" elev. 141 m	proizvodni zasad	-	-
Ćičevac	1	++	N 43 ⁰ 44'856" EO 21 ⁰ 27'719" elev. 157 m	proizvodni zasad	-	-
Grabovica	2	++	N 44 ⁰ 31'768" EO 22 ⁰ 41'433" elev. 61 m	proizvodni zasad	-	-
Kladovo	1	+	N 44 ⁰ 18'637" EO 22 ⁰ 30'217" elev. 108 m	proizvodni zasad	-	-
Milutinovac	1	+	N 44 ⁰ 32'644" EO 22 ⁰ 39'868" elev. 45 m	proizvodni zasad	-	-
Negotin	1	++	N 44 ⁰ 15'648" EO 22 ⁰ 38'299" elev. 49 m	proizvodni zasad	-	-
Paraćin	1	+	N 43 ⁰ 46'558" EO 21 ⁰ 26'313" elev. 187 m	proizvodni zasad	-	-
Pojate	1	+	N 43 ⁰ 45'547" EO 21 ⁰ 26'405" elev. 153 m	proizvodni zasad	-	-
Tamnič-Rajac	3	++	N 44 ⁰ 05'277" EO 22 ⁰ 31'429" elev. 81 m	proizvodni zasad	-	-
Rajac	2	++	N 44 ⁰ 06'071" EO 22 ⁰ 34'199" elev. 70 m	proizvodni zasad	-	-
Čajetina	1	++	N 43 ⁰ 75'073" EO 19 ⁰ 72'109" elev. 931 m	okućnica	-	-
Đurđevac, Mionica	1	+	-	okućnica	-	-
Šabac	1	+	-	okućnica	-	-
Ukupno	127					

+ - populacija niske brojnosti; ++ - srednje brojnosti; +++ - visoke brojnosti; ++++ - izuzetno visoke brojnosti

* lokaliteti na kojima je sakupljen materijal za kvalitativnu i kvantitativu analizu cikada u vinogradima

Pregledima novih vinograda u 2006. godini potvrđeno je prisustvo *S. titanus* u 23 od ukupno 29 regiona u Srbiji (osim u Vranju i na Kosovu i Metohiji) (slika br. 27; tabele 4 i 5). Krajnja tačka na jugu Srbije gde je registrovano prisustvo cikade bila je u Grdelici gde je brojnost bila izuzetno visoka. Takođe, pregledani su i severno-zapadne delove Srbije, koji nisu izrazito vinogradarski regioni (Apatin, Sombor, Kljajićevo), ali su i tamo redovno pronalazene cikade u niskoj brojnosti, čak i u centralnim delovima naselja pri okućnicama. Detaljnijim pregledima u pojedinim regionima, gde su i predhodnih godina nalažene cikade potvrđena je njihova visoka i izrazito visoka brojnost u kruševačkom regionu – Trstenik, Medveđa;

niškom regionu—Jasenovik, Malča; fruškogorskom regionu—Irig, Mutalj, Banstol. U šumadijskom regionu (Kragujevac, Topola) zabeležena je takođe visoka brojnost u mnogim vinogradima.



Slika 27. Distribucija žutila vinove loze i cikade *S. titanus* u Srbiji u 2007.god.

Tabela 4: Pregled vinograda u Srbiji na prisustvo *S. titanus* u 2006. godini

Lokaliteti	Broj pregledanih vinograda	<i>S. titanus</i> brojnost populacije u pregledanim vinogradima	GPS koordinate potesa	Status zasada	Detekcija FD**	
					u lozi	u vektoru
Vranje	12	-	-	proizvodni zasad	-	-
Grdelica	8	++++	-	proizvodni zasad	+	+
G. Zuniće	5	+++	-	proizvodni zasad	+	+
Apatin Sombor	6	+	-	okućnica	-	-
Del. Pesak	6	+	-	proizvodni zasad	-	-
Banatsko Novo Selo	3	++	-	proizvodni zasad	-	-
Kljajićevo	2	+	-	proizvodni zasad	-	-
Apatin	3	+	-	okućnica	-	-
Mutalj	2	+++	N 45°06'336" EO 19°41'137" ELEV. 212 m	proizvodni zasad	+	+
Topola, Trnava	6	+++	-	proizvodni zasad	+	+
Malča	2	+++	-	proizvodni zasad	+	+
Jasenovik	2	+++	-	proizvodni zasad	+	+
Topola, Vinča	3	+	N 44°13'532" EO 20°40'224" ELEV. 298 m	proizvodni zasad	-	-
Jagodina	9	+	-	proizvodni zasad	-	-
Umčari	4	++	-	proizvodni zasad	-	-
Beška	2	+	N 45°09'172" EO 20°03'358" elev. 147 m	proizvodni zasad	-	-
Banstol	3	++	N 45°08'612" EO 19°58'607" elev. 220 m	proizvodni zasad	-	-
Banstol	3	+	N 45°08'631" EO 19°58'586" elev. 223 m	proizvodni zasad	-	-
Banstol	2	++	N 45°08'607" EO 19°58'694" elev. 221 m	proizvodni zasad	-	-
Irig	2	++	N 45°07'092" EO 19°51'158" elev. 252 m	proizvodni zasad	+	+
Irig	2	+++	N 44°51'325" EO 20°22'628" elev. 99 m	proizvodni zasad	+	+
Irig	2	+++	-	proizvodni zasad	+	+

Banistol, Brdež	3	++	N 45°08'776" EO 19°58'549" elev. 230 m	proizvodni zasad	+	+
M. Zuniče	3	+++	N 43°36'210" EO 22°16'944" elev. 278 m	proizvodni zasad	+	+
Rajac	2	+	N 44°07'298" EO 22°34'334" elev. 65 m	proizvodni zasad	-	-
Žarkovo	1	++	N 45°09'164" EO 20°03'412" elev. 154 m	proizvodni zasad	+	+
S.Slankamen	3	+	N 45°09'216" EO 20°13'051" elev. 229 m	proizvodni zasad	-	-
S.Slankamen	2	+	N 45°09'156" EO 20°11'445" elev. 64 m	proizvodni zasad	-	-
S.Slankamen	3	+	N 45°08'992" EO 20°13'844" elev. 188 m	proizvodni zasad	-	-
S.Slankamen	3	+	N 45°08'666" EO 20°13'726" elev. 96 m	proizvodni zasad	-	-
S.Slankamen	3	+	N 45°08'633" EO 20°14'573" elev. 140 m	proizvodni zasad	-	-
S.Slankamen	2	+++	N 45°09'075" EO 20°11.403' 55m	proizvodni zasad	+	+
S.Slankamen	2	++	N 45°08'610" EO 20°14'572" elev. 139 m	proizvodni zasad	-	-
Vrljak	2	+	N 75°14'213" EO 48°32'503" elev. 237 m	proizvodni zasad	-	-
Kragujevac	3	+++	N 75°10'417" EO 48°32'731" elev. 230 m	proizvodni zasad	+	+
Trstenik	10	++++	-	proizvodni zasad	+	+
Medveđa	3	++++	N 75°04'191" EO 48°31'747" elev. 212 m	proizvodni zasad	+	+
Stragari	2	+++	N 75°12'558" EO 48°33'938" elev. 230 m	proizvodni zasad	+	+
Bogdanje	2	+++	N 75°03'403" EO 48°33'055' elev. 313 m	proizvodni zasad	+	+
Lukinac	2	+++	N 75°01'567" EO 48°33'135" elev. 321 m	proizvodni zasad	+	+
Grocka	2	++	-	proizvodni zasad	-	-
Ukupno	142					

+ - populacija niske brojnosti; ++ - srednje brojnosti; +++ - visoke brojnosti; ++++ - izuzetno visoke brojnosti

Tabela 5: Status i distribucija *S. titanus* na teritoriji Republike Srbije

OKRUG	ZASADI VINOVE LOZE (ha)	PRISUSTVO <i>S. titanus</i>
Severno Bački	1,179	+
Srednje Banatski	303	+
Severno Banatski	382	++
Južno Banatski	2,869	+++
Južno Bački	1,945	+++
Sremski	2,473	++++
Mačvanski	113	+
Kolubarski	16	++
Podunavski	2,556	++++
Braničevski	5,676	++++
Šumadijski	3,349	+
Pomoravski	4,821	+++
Borski	6,188	++
Zaječarski	5,359	++
Moravički	10	+
Raški	35	++++
Rasinski	8,411	++++
Nišavski	7,535	++++
Toplički	360	+++
Pirotski	2,585	+
Jablanički	5,152	++++
Beograd	1,125	++++
Pčinjski		-

+ - populacija niske brojnosti; ++ - srednje brojnosti; +++ - visoke brojnosti; ++++ - izuzetno visoke brojnosti

4.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza cikada u vinogradima sa simptomima fitoplazmatičnih oboljenja

Registrovane vrste cikada, njihova brojnost i procentualna zastupljenost su prikazane u tabelama 6, 7 i 8. Lokalitet u Umčarima obrađen je samo u 2004. godini, jer su čokoti tokom zime 2005. godine velikim delom stradali od fitoplazme, pa je zbog toga ovaj vinograd početkom leta 2005. godine iskrčen.

Tabela 6: Zbirni rezultati zastupljenosti cikada u vinogradima na teritoriji Srbije (Jul-Oktobar, 2004)

2004								
Aleksandrovac (selo Tuleš)			Umčari			Mutalj		
Vrsta cikade	Broj primeraka	%	Vrsta cikade	Broj primeraka	%	Vrsta cikade	Broj primeraka	%
Scaphoideus titanus	417	71,9	Scaphoideus titanus	388	79,2	Scaphoideus titanus	311	76,8
Cixius wagneri	8	1,4	Cixius wagneri	4	0,8	Cixius wagneri	12	3,0
Reptalus panzeri	0	0	Reptalus panzeri	0	0	Reptalus panzeri	4	1,0
Platymetopius major	1	0,2	Platymetopius major	0	0	Platymetopius major	0	0
Dicranotropis hammata	1	0,2	Dicranotropis hammata	0	0	Dicranotropis hammata	2	0,5
Dictyophara europaea	12	2,1	Dictyophara europaea	6	1,2	Dictyophara europaea	1	0,2
Stictocephala bisonia	4	0,7	Stictocephala bisonia	6	1,2	Stictocephala bisonia	9	2,2
Philenus spumarius	2	0,3	Philenus spumarius	5	1,0	Philenus spumarius	6	1,5
Aphrophora alni	3	0,5	Aphrophora alni	1	0,2	Aphrophora alni	0	0
Cicadella viridis	2	0,3	Cicadella viridis	14	2,9	Cicadella viridis	1	0,2
Fieberiella septemtrionalis	37	6,4	Fieberiella septemtrionalis	6	1,2	Fieberiella septemtrionalis	2	0,5
Neoliturus fenestratus	2	0,3	Neoliturus fenestratus	0	0	Neoliturus fenestratus	0	0
Mocytia crocea	3	0,5	Mocytia crocea	2	0,4	Mocytia crocea	6	1,5
Psammotettix alienus	30	5,2	Psammotettix alienus	42	8,6	Psammotettix alienus	36	8,9
Euscelis incisus	4	0,7	Euscelis incisus	0	0	Euscelis incisus	3	0,7
Empoasca cf. vitis	54	9,3	Empoasca cf. vitis	16	3,3	Empoasca cf. vitis	12	3,0
Ukupno	580		Ukupno	490		Ukupno	405	

Tabela 7: Zbirni rezultati zastupljenosti cikada u vinogradima na teritoriji Srbije (Maj-Oktobar, 2005)

2005								
Aleksandrovac (selo Tuleš)			Mutalj			Jasenovik		
Vrsta cikade	Broj primeraka	%	Vrsta cikade	Broj primeraka	%	Vrsta cikade	Broj primeraka	%
Scaphoideus titanus	623	78,7	Scaphoideus titanus	455	74,7	Scaphoideus titanus	497	69,0
Cixius wagneri	0	0	Cixius wagneri	4	0,7	Cixius wagneri	0	0
Cixius similis	0	0	Cixius similis	0	0	Cixius similis	2	0,3
Reptalus			Reptalus			Reptalus		

panzeri	0	0	panzeri	7	1,1	panzeri	4	0,6
Reptalus quinquecostatus	0	0	Reptalus quinquecostatus	2	0,3	Reptalus quinquecostatus	0	0
Platymetopius major	1	0,1	Platymetopius major	0	0	Platymetopius major	0	0
Dicranotropis hammata	4	0,5	Dicranotropis hammata	0	0	Dicranotropis hammata	3	0,4
Dictyophara europaea	22	2,8	Dictyophara europaea	6	1,0	Dictyophara europaea	21	2,9
Asiraca clavicornis	0	0	Asiraca clavicornis	0	0	Asiraca clavicornis	4	0,6
Stictocephala bisonia	7	0,9	Stictocephala bisonia	6	1,0	Stictocephala bisonia	12	1,7
Issus coleoptratus	9	1,1	Issus coleoptratus	17	2,8	Issus coleoptratus	2	0,3
Philenus spumarius	12	1,5	Philenus spumarius	19	3,1	Philenus spumarius	16	2,2
Aphrophora alni	12	1,5	Aphrophora alni	4	0,7	Aphrophora alni	12	1,7
Cicadella viridis	5	0,6	Cicadella viridis	10	1,6	Cicadella viridis	0	0
Fieberiella septemtrionalis	3	0,4	Fieberiella septemtrionalis	2	0,3	Fieberiella septemtrionalis	3	0,4
Neoaliturus fenestratus	3	0,4	Neoaliturus fenestratus	0	0	Neoaliturus fenestratus	23	3,2
Anaceratagallia ribauti	3	0,4	Anaceratagallia ribauti	4	0,7	Anaceratagallia ribauti	3	0,4
Jassargus obtusivalvis	2	0,3	Jassargus obtusivalvis	6	1,0	Jassargus obtusivalvis	16	2,2
Mocydia crocea	5	0,6	Mocydia crocea	2	0,3	Mocydia crocea	8	1,1
Psammotettix alienus	42	5,3	Psammotettix alienus	42	6,9	Psammotettix alienus	64	8,9
Psammotettix confinis	0	0	Psammotettix confinis	0	0	Psammotettix confinis	2	0,3
Euscelis incisus	6	0,8	Euscelis incisus	0	0	Euscelis incisus	2	0,3
Laodelphax striatella	0	0	Laodelphax striatella	0	0	Laodelphax striatella	5	0
Agalmatium flavescens	0	0	Agalmatium flavescens	0	0	Agalmatium flavescens	1	0
Mocydiopsis intermedia	0	0	Mocydiopsis intermedia	0	0	Mocydiopsis intermedia	1	0
Cosmottetix panzeri	0	0	Cosmottetix panzeri	0	0	Cosmottetix panzeri	1	0
Empoasca cf. vitis	33	4,2	Empoasca cf. vitis	23	3,8	Empoasca cf. vitis	26	3,6
Ukupno	792		Ukupno	609		Ukupno	728	

Tabela 8: Zbirni rezultati zastupljenosti cikada u vinogradima na teritoriji Srbije (Maj-Oktobar, 2006)

2006								
Aleksandrovac (selo Tuleš)			Mutalj			Jasenovik		
Vrsta cikade	Broj primeraka	%	Vrsta cikade	Broj primeraka	%	Vrsta cikade	Broj primeraka	%
Scaphoideus titanus	655	76,2	Scaphoideus titanus	371	70,5	Scaphoideus titanus	565	71,7
Cixius wagneri	0	0	Cixius wagneri	4	0,8	Cixius wagneri	0	0
Cixius similis	0	0	Cixius similis	0	0	Cixius similis	2	0,3
Reptalus			Reptalus			Reptalus		

panzeri	0	0	panzeri	0	0	panzeri	4	0,5
Reptalus quinquecostatus	0	0	Reptalus quinquecostatus	5	1,0	Reptalus quinquecostatus	0	0
Reptalus cuspidatus	6	0,7	Reptalus cuspidatus	0	0	Reptalus cuspidatus	0	0
Hyalesthes obsoletus	1	0,1	Hyalesthes obsoletus	0	0	Hyalesthes obsoletus	4	0,5
Platymetopius major	0	0	Platymetopius major	0	0	Platymetopius major	0	0
Asiraca clavicornis	0	0	Asiraca clavicornis	0	0	Asiraca clavicornis	3	0,4
Dicranotropis hammata	6	0,7	Dicranotropis hammata	3	0,6	Dicranotropis hammata	3	0,4
Dictyophara europaea	26	3,0	Dictyophara europaea	11	2,1	Dictyophara europaea	26	3,3
Stictocephala bisonia	6	0,7	Stictocephala bisonia	8	1,5	Stictocephala bisonia	12	1,5
Issus coleoptratus	11	1,3	Issus coleoptratus	16	3,0	Issus coleoptratus	2	0,3
Philaenus spumarius	12	1,4	Philaenus spumarius	14	2,7	Philaenus spumarius	16	2,0
Aphrophora alni	3	0,3	Aphrophora alni	2	0,4	Aphrophora alni	12	1,5
Cicadella viridis	5	0,6	Cicadella viridis	2	0,4	Cicadella viridis	0	0,0
Fieberiella septemtrionalis	1	0,1	Fieberiella septemtrionalis	0	0,0	Fieberiella septemtrionalis	3	0,4
Anaceratagallia ribauti	12	1,4	Anaceratagallia ribauti	10	1,9	Anaceratagallia ribauti	5	0,6
Jassargus obtusivalvis	17	2,0	Jassargus obtusivalvis	4	0,8	Jassargus obtusivalvis	0	0
Errastunus ocellaris	23	2,7	Errastunus ocellaris	3	0,6	Errastunus ocellaris	2	0,3
Neoliturus fenestratus	0	0	Neoliturus fenestratus	0	0	Neoliturus fenestratus	23	2,9
Mocycdia crocea	7	0,8	Mocycdia crocea	5	1,0	Mocycdia crocea	8	1,0
Psammotettix alienus	23	2,7	Psammotettix alienus	34	6,5	Psammotettix alienus	64	8,1
Psammotettix confinis	0	0	Psammotettix confinis	0	0	Psammotettix confinis	2	0,3
Euscelis incisus	5	0,6	Euscelis incisus	4	0,8	Euscelis incisus	2	0,3
Euscelis distinguendus	0	0	Euscelis distinguendus	0	0	Euscelis distinguendus	2	0,3
Enantiocephalus cornutus	0	0	Enantiocephalus cornutus	0	0	Enantiocephalus cornutus	12	1,5
Empoasca cf. vitis	41	4,8	Empoasca cf. vitis	30	5,7	Empoasca cf. vitis	16	2,0
Ukupno	860		Ukupno	526		Ukupno	788	

Na svim lokalitetima koji su bili obuhvaćeni istraživanjima, kao najbrojnija vrsta u sve tri istraživačke godine bila je *S. titanus*. Zastupljenost ove cikade na sva tri obrađena lokaliteta u tri istraživačke sezone bila je između 76,8-79,2 % u 2004., 69,0-78,7% u 2005. i 70,5-76,2% u 2006. godini.

Od drugih cikada prisutnih u svim ispitivanim lokalitetima ukupno je registrovano 32 vrste, iz 9 familija i 23 roda:

fam. Cixiidae:

Cixius wagneri China, 1942 (slika 28 - u prilogu)
Cixius similis Kirschbaum, 1868 (slika 29 - u prilogu)
Reptalus panzeri Löw, 1883 (slika 30 - u prilogu)
Reptalus quinquecostatus Dufour 1833 (slika 31 - u prilogu)
Reptalus cuspidatus Fieber 1876 (slika 32 - u prilogu)
Hyalesthes obsoletus Signoret 1865
Platymetopius major Kirschbaum 1868 (slika 33 - u prilogu)

fam. Delphacidae:

Asiraca clavicornis Fabricius 1794 (slika 34 - u prilogu)
Dicranotropis hamata Boheman 1847 (slika 35 - u prilogu)
Laodelphax striatella Fallén 1826 (slika 36 - u prilogu)

fam. Dictyopharidae:

Dictyophara europaea Linnaeus 1767 (slika 37 - u prilogu)

fam. Membracidae:

Stictocephala bisonia Kopp & Yonke 1977 (slika 38 - u prilogu)

fam. Issidae:

Issus coleoptratus Fabricius 1781 (slika 39 - u prilogu)

Agalmatium flavescens Olivier 1791

fam. Cercopoidea:

Philaenus spumarius Linnaeus 1758 (slika 40 - u prilogu)

fam. Aphrophoridae

Aphrophora alni Fallén 1805 (slika 41 - u prilogu)

fam. Cicadellidae

pod-fam. Typhlocybinae

Empoasca cf. vitis Göthe 1875

fam. Cicadellidae

pod-fam. Deltocephalinae:

Scaphoideus titanus Ball 1932 (slika 20 - u prilogu)
Cicadella viridis Linnaeus 1758 (slika 42 - u prilogu)
Fieberiella septentrionalis Wagner 1963 (slika 43 i 44 - u prilogu)
Anaceratagallia ribauti Ossiannilsson 1938 (slika 45 - u prilogu)
Jassargus obtusivalvis Kirschbaum 1868 (slika 46 - u prilogu)
Errastunus ocellaris Fallén 1806 (slika 47 - u prilogu)
Neoliturus fenestratus Herrich-Schäffer 1834 (slika 48 - u prilogu)
Mocydia crocea Herrich-Schäffer 1837 (slika 49 - u prilogu)
Psammotettix alienus Dahlbom 1850 (slika 50 - u prilogu)
Psammotettix confinis Dahlbom 1850 (slika 51 - u prilogu)
Mocydropsis intermedia Remane 1961
Euscelis incisus Kirschbaum 1858 (slika 52 - u prilogu)
Euscelis distinguendus Kirschbaum 1858 (slika 53 - u prilogu)
Enantiocephalus cornutus Herrich-Schäffer 1838
Cosmotettix panzeri Flor 1861

Od cikada koje su bile prisutne na sva tri lokaliteta, sa visokom gustom populacija, treba napomenuti vrstu *Mocydia crocea* (čija se brojnost kretala do

1,5%), *Aphrophora alni* (do 1,7%), *Jassargus obtusivalvis* (do 2,0%), *Stictocephala bisonia* (do 2,2%), *Errastunus ocellaris* (do 2,7%), *Cicadella viridis* (do 2,9%), *Issus coleoptratus* (do 3,0%), *Cixius wagneri* (do 3,0%), *Philenus spumarius* (do 3,1%), *Dictyophara europaea* (do 3,3%), *Fieberiella septemtrionalis* (6,4%), *Psamotettix alienus* (do 8,9%) i *Empoasca cf. vitis* (do 9,3%).

Poznati vektor stolbur fitoplazme na vinovoj lozi *Hyalesthes obsoletus*, bio je retko prisutan na istraženim lokalitetima, odnosno, samo nekoliko primeraka ove vrste je registrovano na lokalitetima Tuleš (Aleksandrovac) i Jasenovik (Sićevo) u 2006. godini (tabela 8).

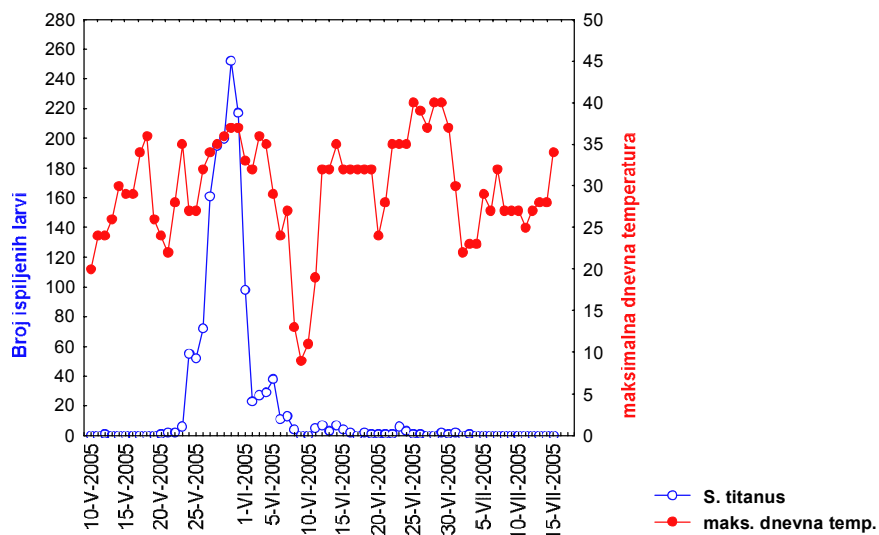
4.3. Bionomijska istraživanja *S. titanus*

Piljenje *S. titanus* predstavlja najvažniju kariku u sagledavanju dinamike populacije ove cikade. Dinamika piljenja determiniše prevenciju pojave odnosno širenje fitoplazme FD unutar vinograda i u direktnoj je korelaciji sa određivanjem termina za suzbijanje ove cikade.

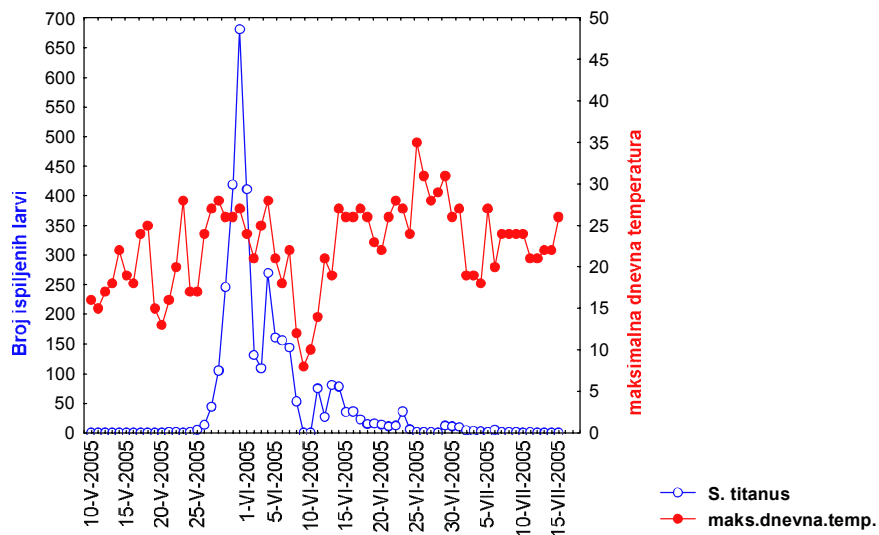
Neuobičajeno niske temperature tokom aprila i prve polovine maja 2005. godine uticale su na dinamiku pojave svih štetočina u agro-ekosistemima, ovakve vremenske prilike uslovile su kašnjenje vegetacije. Prvo piljenje larvi *S. titanus* na višem temperaturnom režimu registrovano je 12. maja (grafikon 1), a na nižem režimu 23. maja 2005. god (grafikon 2). Pad temperature u periodu između 13. i 19. maja naknadno je usporio piljenje larvi. Broj ispilelih larvi počeo je da raste posle 23. maja da bi između 24. maja i 2. juna postigao maksimum na višem i između 27. maja i 8. juna na nižem režimu. U tom periodu ispilelo se 87,7% odnosno 81.6% jaja.

Period početka piljenja u 2006. godini je bio neznatno kasniji nego u 2005. godini. Na višem temperaturnom režimu piljenje je počelo 4 dana, a na nižem temperaturnom režimu svega 1 dan kasnije. U periodu od 19. do 25. maja postignut je maksimum piljenja na višem temperaturnom režimu, kada se ispilelo 76,25% jaja (grafikon 3). Na nižem temperaturnom režimu, u periodu kada je trebalo očekivati da će se ostvariti maksimum piljenja došlo je do naglog pada

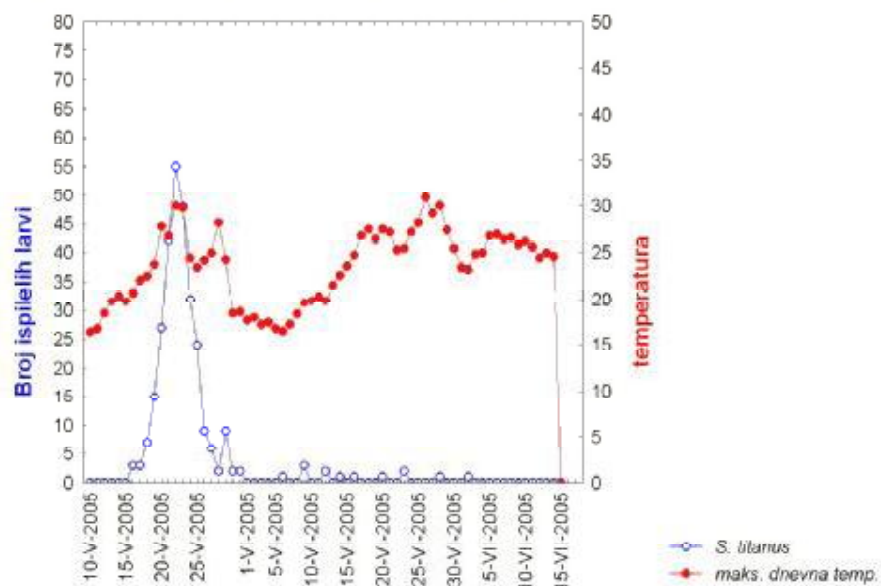
temperatura (grafikon 4). Tako je u periodu od 30. maja do 15. juna došlo je do pada temperatura u proseku za oko 7°C i došlo je praktično do zaustavljanja piljenje jaja *S. titanus*. Do tada se ispilo 63,19 % jaja. Nakon ovog perioda piljenje jaja se nastavilo sve do 30.06.2006.god.



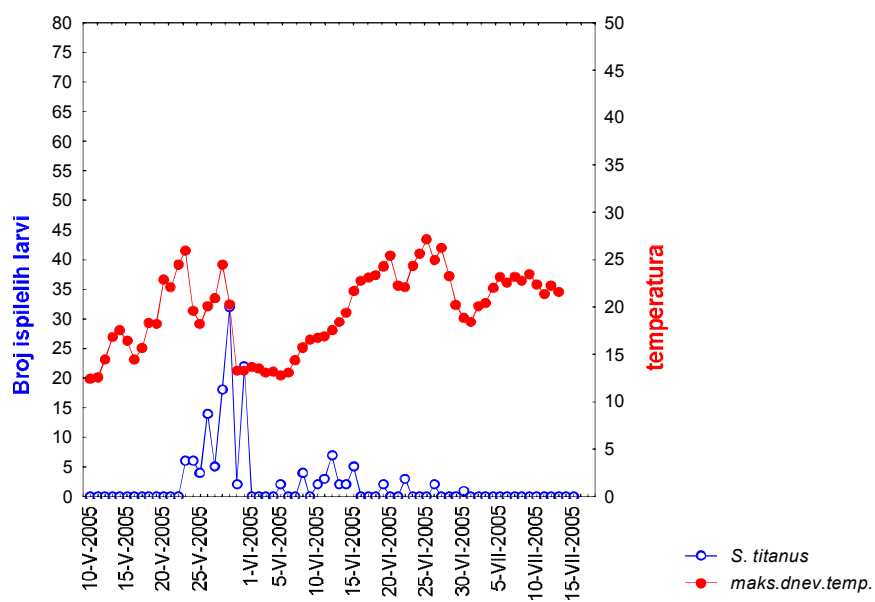
Grafikon 1. Piljenje jaja *S. titanus* u 2005. god.(viši temperaturni režim)



Grafikon 2. Piljenje jaja *S. titanus* u 2005. god.(niži temperaturni režim)



Grafikon 3. Piljenje jaja *S. titanus* u 2006. god. (viši temperaturni režim)



Grafikon 4. Piljenje jaja *S. titanus* u 2006. god. (niži temperaturni režim)

4.4. Testovi ishrane i interakcija *S. titanus* sa biljkama staništa

Kao što se vidi po rezultatima u tabeli 9 u uslovima gladovanja, bez dopunske ishrane larve L₁ *S. titanus* su sve uginule u intervalu između 6 i 7 časova. Jedinke koje su se hranile na raznim korovskim i gajenim biljkama živele su do 2 dana na pšenici, *Panicum cruss-galli*, *Setari glauca*, *Balota nigra* i *Stelaria media*. Istovremeno su se *Partenocissus tricuspidata*, *Partenocissus. quinquefolia*, *Bilderdykia convonvulus*, *Chenopodium album*, *Zea mays* - kukuruz, *Cissus rhombifolia*, *Convonvulus arvensis* i *Clematis vitalba* pokazale kao neznatno bolji domaćini i na njima su larve živele 3 dana. Najpovoljnija biljka, na kojoj su larve živele do 5 dana bila je *B. dioica*.

Larve trećeg stupnja su neznatno duže živele u uslovima gladovanja u odnosu na mlađe larve (6-8 časova). Samo su na pšenici živele 2 dana. Na *P. tricuspidata*, *B. convonvulus*, *Ch. album*, *Z. mays*, *B. nigra* i *S. media* su živele do 3 dana. Na ostalim biljkama (*S. glauca*, *P. cruss-galli*, *C. arvensis*, *C. rhombifolia*, *P. quinquefolia* i *B. dioica*) su živele najduže i to 5 dana (tabela 10).

Imaga su živela neznatno duže od larvi u uslovima gladovanja (6-10 časova). Pri ishrani na većini biljaka živela su do 4 dana. Na *P. quinquefolia* i *C. rhombifolia* su živela 5 dana, na *C. vitalba* 6 dana, *Ch. album* 8 dana, a najduže na *B. convonvulus* do 12 dana (tabela 11).

Tabela 9. Preživljavanje L₁ larvi *S. titanus* na alternativnim domaćinima

Biljna vrsta	Procenat uginulih larava larava L ₁ <i>S. titanus</i> nakon ishrane u časovima na biljkama																
Sati	1	2	3	6	7	8	10	11	12	24	48	72	96	120	144	168	192
Bez hrane (gladovanje)			0	16,7	100												
<i>P. tricuspidata</i>										0	8,3	91,7	100				
<i>B. convonvulus</i>										0	58,3	91,7	100				
<i>Ch. album</i>									0	16,7	33,3	66,7	100				
<i>B. dioica</i>									0	0	0	8,3	16,7	75,0	100		
Pšenica										0	58,3	100					
Kukuruz									0	16,7	58,3	83,3	100				
<i>S. glauca</i>										0	58,3	100					
<i>P. cruss-galli</i>										0	83,3	100					
<i>P. quinquefolia</i>										0	50,0	83,3	100				
<i>C. rhombifolia</i>										0	50,0	83,3	100				
<i>B. nigra</i>										0	83,3	100					
<i>S. media</i>									0	25,0	58,3	100					
<i>C. arvensis</i>										0	33,3	66,7	100				
<i>C. vitalba</i>										0	33,3	66,7	100				

Tabela 10. Preživljavanje L₃ larvi *S. titanus* na alternativnim domaćinima

Biljna vrsta	Procenat uginulih larava larava L ₁ <i>S. titanus</i> nakon ishrane u časovima na biljkama																
Sati	1	2	3	6	7	8	10	11	12	24	48	72	96	120	144	168	192
Bez hrane (gladovanje)			0	16,7	66,6	83,3	100										
<i>P. tricuspidata</i>										0	56,3	83,3	100				
<i>B. convonvulus</i>										0	66,7	83,3	100				
<i>Ch. album</i>									0	16,7	50,0	83,3	100				
<i>B. dioica</i>									0	0	0	16,7	33,3	66,7	100		
Pšenica										0	50,0	100					
Kukuruz									0	25,0	41,7	75,0	100				
<i>S. glauca</i>									0	8,3	33,3	58,3	83,3	100			
<i>P. cruss-galli</i>										0	66,7	83,3	91,7	100			
<i>P. quinquefolia</i>										0	16,7	50,0	66,7	83,3	100		
<i>C. rhombifolia</i>										0	25,0	58,3	66,7	83,3	100		
<i>B. nigra</i>										0	66,7	83,3	100				
<i>S. media</i>									0	16,7	41,7	66,7	100				
<i>C. arvensis</i>										0	25,0	58,3	91,7	100			
<i>C. vitalba</i>										0	16,7	33,3	58,3	83,3	100		

Tabela 11. Preživljavanje imaga *S. titanus* na alternativnim domaćinima

Biljna vrsta	Procenat uginulih larava larava L ₁ <i>S. titanus</i> nakon ishrane u časovima na biljkama																		
Sati	3	6	7	8	10	11	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312
Bez hrane (gladovanje)	0	16,7	33,3	66,7	83,3	100													
<i>P. tricuspidata</i>						0	8,3	16,7	75,0	83,3	100								
<i>B. convolvulus</i>							0	8,3	8,3	25,0	25,0	25,0	41,7	41,7	41,7	41,7	50,0	166,7	100
<i>Ch. album</i>							0	16,7	58,3	58,3	66,7	66,7	75,0	83,3	100				
<i>B. dioica</i>							0	8,3	50,0	83,3	100								
Pšenica							0	8,3	50,0	83,3	100								
Kukuruz							0	8,3	50,0	83,3	100								
<i>S. glauca</i>							0	8,3	50,0	83,3	100								
<i>P. cruss-galli</i>							0	8,3	50,0	83,3	100								
<i>P. quinquefolia</i>							0	66,7	66,7	75,0	83,3	100							
<i>C. rhombifolia</i>							0	16,7	58,3	75,0	83,3	100							
<i>B. nigra</i>							0	8,3	50,0	83,3	100								
<i>S. media</i>							0	8,3	50,0	83,3	100								
<i>C. arvensis</i>							0	8,3	50,0	83,3	100								
<i>C. vitalba</i>							0	8,3		50,0	66,7	83,3	100						

4.5. Detekcija i genotipizacija FD fitoplazmi molekularnim metodama

Uzorci vinove loze i cikade *S. titanus* sakupljeni su i analizirani u 25 od ukupno 30 okruga Srbije. Ovim istraživanjima nije obuhvaćeno samo 5 okruga koji se nalaze na Kosovu i Metohiji. Na prisustvo FD fitoplazme ukupno je analizirano 346 uzoraka vinove loze i 654 primerka *S. titanus*. Prisustvo FD fitoplazme u drugim cikadama faune vinograda praćeno je na jednom lokalitetu (Jasenovik - Niš). Uzorci pavitine sakupljeni su u 9 okruga i 118 uzoraka je analizirano na prisustvo FD fitoplazme.

4.5.1. Detekcija FD fitoplazmi umnožavanjem FD9 regiona

4.5.1.1. Detekcija FD fitoplazmi u vinovoj lozi

Uspešno je ekstrahovano i analizirano PCR metodom, 346 uzoraka vinove loze. Umnožavanjem FD9 regiona fitoplazme *Flavescence dorée* njeno prisustvo je utvrđeno u 174 uzorka vinove loze iz 8 okruga (tabela 12, slika 54). Prisustvo FD fitoplazme u vinovoj lozi utvrđeno je u: Sremskom, Beogradskom, Podunavskom, Rasinskom, Nišavskom, Zaječarskom, Topličkom i Jablaničkom okrugu. U uzorcima vinove loze sa simptomima fitoplazmatičnog oboljenja sakupljenim u ovih 8 regiona, FD fitoplazma je utvrđena u 72,0 - 100%.

Tabela 12. Prisustvo FD fitoplazme u vinovoj lozi u Srbiji

Okrug	Broj analiziranih uzoraka vinove loze	Broj FD pozitivnih uzoraka vinove loze	Procenat FD pozitivnih uzoraka vinove loze
Zapadno Bački	6	0	0
Severno Bački	12	0	0
Severno Banatski	15	0	0
Južno Bački	9	0	0
Srednje Banatski	5	0	0
Južno Banatski	11	0	0
Sremski	30	30	100
Mačvanski	12	0	0
Beogradski	28	26	92,9
Kolubarski	6	0	0
Podunavski	25	18	72,0
Braničevski	10	0	0
Borski	11	0	0
Šumadijski	8	0	0
Zlatiborski	13	0	0
Moravički	7	0	0
Pomoravski	9	0	0
Raški	12	0	0

Rasinski	32	32	100
Nišavski	26	26	100
Zaječarski	15	13	86,7
Toplički	12	9	75,0
Pirotski	7	0	0
Jablanički	20	20	100
Pčinjski	5	0	0
Ukupno	346	174	50,3

4.5.1.2. Detekcija FD fitoplazmi u insektima

U svim regionima u kojima je sakupljana vinova loza za analizu, sakupljani su i primerci cikade *S. titanus*, osim u Pčinjskom okrugu u kome do sada nije utvrđeno prisustvo ove cikade. Uspešno je ekstrahovano i analizirano PCR metodom 654 primeraka cikade *S. titanus*. Inficiranost *S. titanus* FD fitoplazmom utvrđeno je umnožavanjem FD9 regiona fitoplazme *Flavescence dorée*. Prisustvo FD fitoplazme u ovoj cikadi utvrđeno je u 8 regiona u kojima je ova fitoplazma detektovana i u vinovoj lozi (slika 54). Procenat inficiranosti primeraka *S. titanus* unutar njegovih lokalnih populacija kretao se od 10,0 - 40,5% (tabela 13).

Tabela 13. Prisustvo FD fitoplazme u *S. titanus* u Srbiji

Okrug	Broj analiziranih <i>S. titanus</i>	Broj FD inficiranih <i>S. titanus</i>	Procenat FD inficiranih <i>S. titanus</i>
Zapadno Bački	25	0	0
Severno Bački	21	0	0
Severno Banatski	23	0	0
Južno Bački	20	0	0
Srednje Banatski	22	0	0
Južno Banatski	24	0	0
Sremski	48	11	22,9
Mačvanski	20	0	0
Beogradski	32	4	12,5
Kolubarski	20	0	0
Podunavski	38	5	13,2
Braničevski	21	0	0
Borski	22	0	0
Šumadijski	23	0	0
Zlatiborski	20	0	0

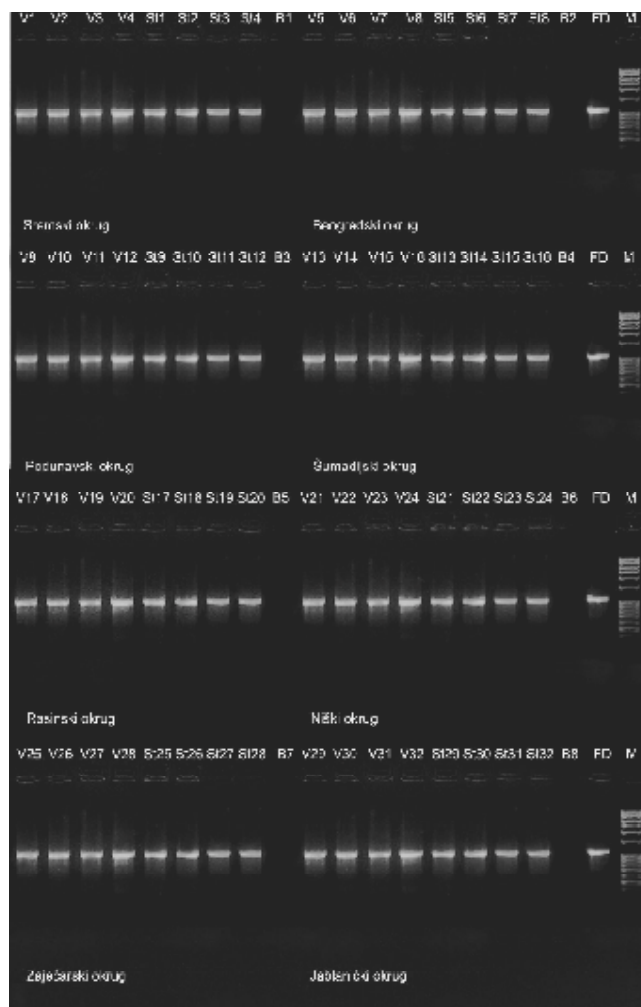
Moravički	21	0	0
Pomoravski	21	0	0
Raški	22	0	0
Rasinski	36	6	16,7
Nišavski	42	17	40,5
Zaječarski	40	4	10,0
Toplički	38	4	10,5
Pirotski	22	0	0
Jablanički	33	4	12,1
Pčinjski	-	-	-
Ukupno	654	55	8,4

Na lokalitetu Jasenovik u Nišavskom okrugu tokom 2005. godine sakupljeno je 20 vrsta cikada koje su analizirane na prisustvo FD fitoplazme (tabela 14). Uspešno je ekstrahovano 387 primeraka ovih cikada i PCR metodom analizirano na prisustvo FD fitoplazme. U 18 vrsta analiziranih cikada prisustvo FD fitoplazme nije utvrđeno. U 14 od 102 analizirana primerka cikade *S. titanus* sa ovog lokaliteta detektovana je FD fitoplazma. U 2 od 89 analiziranih primeraka cikade *D. europaea* detektovano je prisustvo FD fitoplazme.

Tabela 14. Prisustvo FD fitoplazme u cikadama lokalne faune na lokalitetu Jasenovik (Nišavski okrug) u 2005. godini.

Lokalitet / godina	Vrste insekata	Broj analiziranih primeraka	Broj FD inficiranih	Procent FD inficiranih
Jasenovik - 2005	<i>Cixius similis</i>	3	0	0
	<i>Hyalesthes obsoletus</i>	16	0	0
	<i>Asiraca clavicornis</i>	3	0	0
	<i>Stenocranus major</i>	2	0	0
	<i>Laodelphax striatella</i>	5	0	0
	<i>Dictyophara europaea</i>	89	2	2,2
	<i>Philaenus spumarius</i>	27	0	0
	<i>Issus coleoptratus</i>	3	0	0
	<i>Agalmatium flavescens</i>	1	0	0
	<i>Aphrophora alni</i>	37	0	0
	<i>Fieberiella septentrionalis</i>	1	0	0
	<i>Neoaliturus fenestratus</i>	3	0	0
	<i>Mocydia crocea</i>	8	0	0
	<i>Mocydiopsis intermedia</i>	1	0	0

	<i>Euscelis incisus</i>	25	0	0
	<i>Psamottetix alienus</i>	38	0	0
	<i>Scaphoideus titanus</i>	102	14	13,7
	<i>Jassargus obtusivalvis</i>	21	0	0
	<i>Cosmottetix panzeri</i>	1	0	0
	<i>Enantiocephalus cornutus</i>	1	0	0
	Ukupno	387	16	4,1



Slika 54. Analiza uzoraka vinove loze i *S. titanus* na prisustvo FD fitoplazme po regionima. Analiza je urađena umnožavanjem FD9 regiona fitoplazme u nested PCR protokolu sa FD9 f2r i FD9 f3r2 prajmerima. Simboli: V- vinova loza, St- *Scaphoideus titanus*, FD- pozitivna kontrola FD fitoplazme, B- negativna kontrola, M- marker 100 bp (SERVA)

4.5.1.3. Detekcija FD fitoplazmi u pavitini (*C. vitalba*)

Uzorci pavitine (*C. vitalba*) sakupljeni su na 9 lokaliteta u 9 okruga Srbije i analizirani na prisustvo FD fitoplazme. Uspešno je ekstrahovano i PCR metodom analizirano 118 uzoraka pavitine. Prisustvo FD fitoplazme utvrđeno je u 31 uzorku iz 6 okruga (tabela 15). Prisustvo FD fitoplazme u pavitini utvrđeno je u sledećim okruzima: Nišavskom, Rasinskom, Beogradskom, Šumadijskom, Braničevskom i Jablaničkom. Procenat inficiranih biljaka od ukupnog broja analiziranih uzoraka kretao se od 20 – 100%.

Tabela 15. Prisustvo FD fitoplazme u pavitini u Srbiji

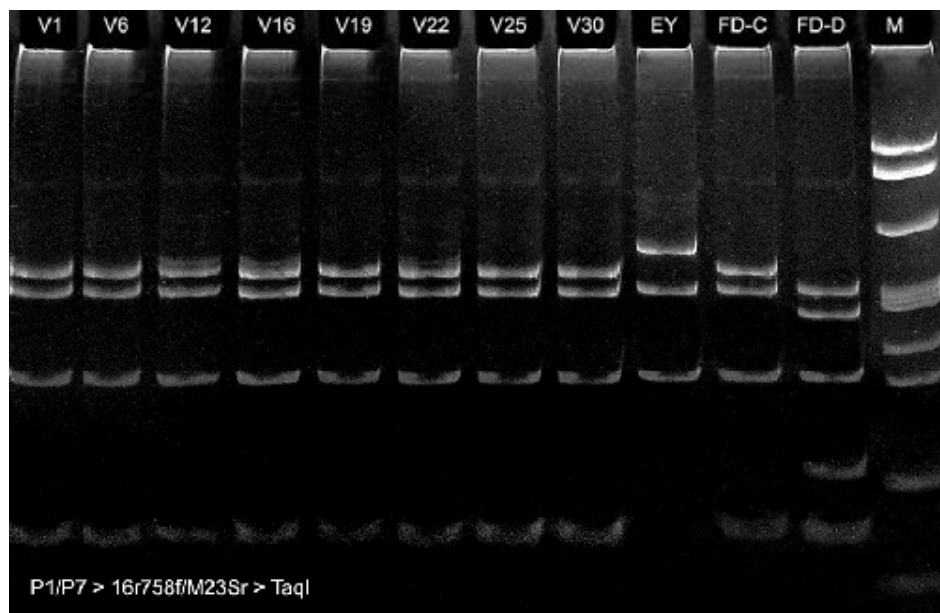
Okrug	Broj analiziranih uzoraka pavitine	Broj pozitivnih uzoraka pavitine	Procenat pozitivnih uzoraka pavitine	Tip FD fitoplazme detektovan u pavitini
Nišavski	81	16	19,8	FD-C
Rasinski	14	8	57,1	FD-C
Beogradski	1	1	100	FD-C
Šumadijski	5	2	40,0	FD-C
Braničevski	5	1	20,0	FD-C
Borski	5	0		/
Jablanički	5	3	60,0	FD-C
Pčinjski	1	0	0	/
Sremski	1	0	0	/
Ukupno	118	31	26,3	

4.5.2. Genotipizacija FD fitoplazmi metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i sekvencioniranjem

Analiza tipa FD fitoplazme urađena je na tri genomska regiona: 16S-23S rRNK regionu, FD9 regionu (*rp15* i *SecY* gen) i *rpV* regionu (*rp22* i *rps3* gen).

4.5.2.1. Analiza 16S-23S rRNK regiona

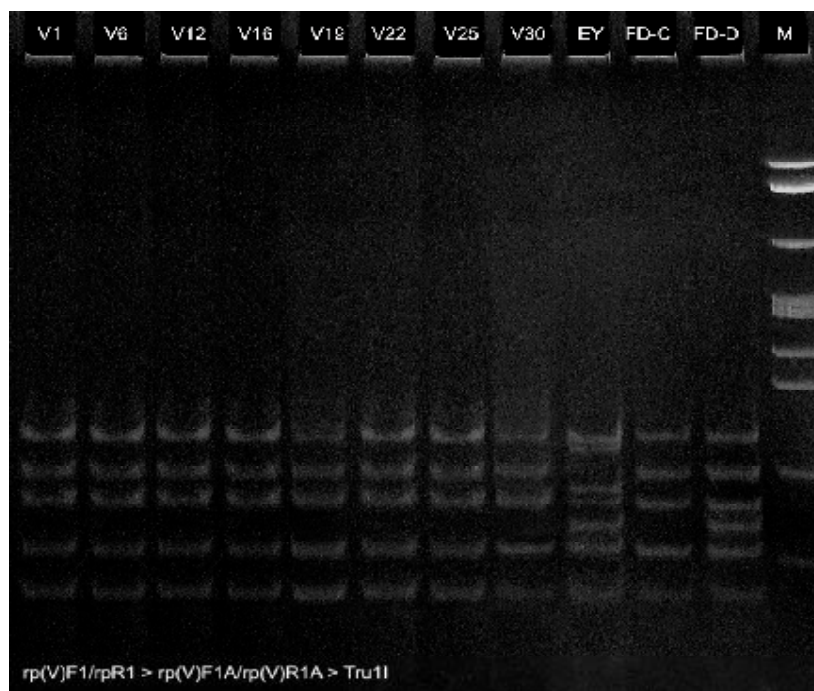
Uspešno su digestovani PCR produkti 16S-23S rRNK uzoraka vinove loze i *S. titanus* iz svih 8 regiona Srbije u kojima je detektovano prisustvo FD fitoplazme. RFLP analiza 16S-23S regiona ribozomalne RNK sa *TaqI* enzimom pokazala je da svi analizirani uzorci imaju isti način sečenja, odnosno pokazuju isti RFLP obrazac (slika 55). RFLP obrazac uzoraka upoređen je sa referentnim izolatima EY fitoplazme (elm yellows fitoplazma održavana u perivinkama (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don)), koju je obezbedio W.A. Sinclair, New York), FD-C fitoplazme (prirodno inficirana vinova loza FD-C fitoplazmom iz Veneto regiona, obezbedila E. Angelini, Conegliano, Italija) i FD-D fitoplazme (prirodno inficirana vinova loza FD-D fitoplazmom iz Veneto regiona, obezbedila E. Angelini, Conegliano, Italija). Poređenje sa RFLP obrascima referentnih izolata pokazalo je prisustvo FD-C fitoplazme 16S rRNK V-C podgrupe u svim uzorcima vinove loze i *S. titanus*.



Slika 55. RFLP analiza 16S-23S regiona FD fitoplazme iz uzoraka vinove loze, umnoženog u nested PCR protokolu sa 16r758/M23Sr prajmerima i digestovanog sa *TaqI* restrikcionim enzimom. Simboli: V- vinova loza, EY- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-A grupe, FD-C- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-C grupe, FD-D- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-D grupe, M- marker ΦX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), Fermentas

4.5.2.2. Analiza rp regiona (operona gena ribozomalnih proteina)

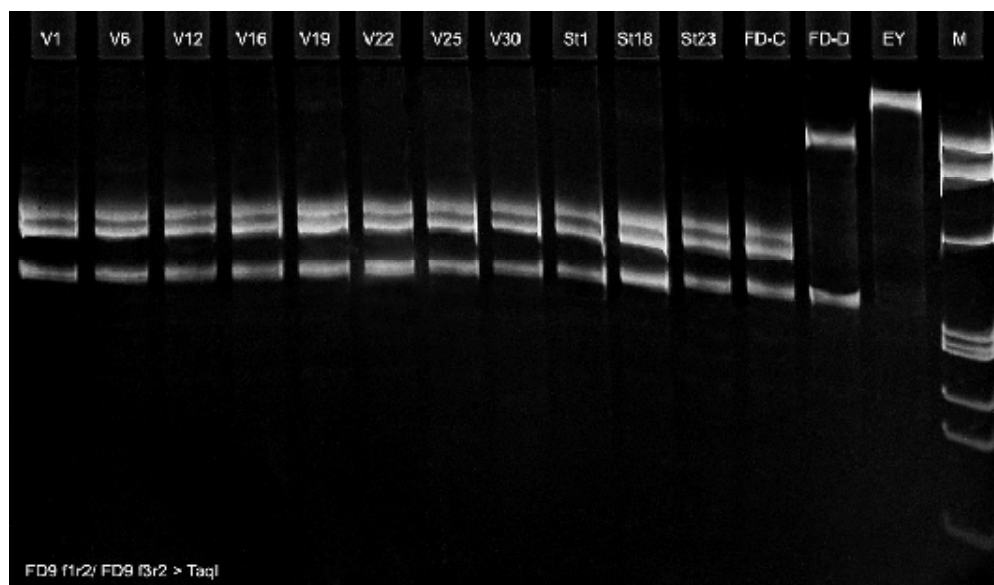
Uspešno su digestovani PCR produkti rp regiona uzoraka vinove loze i *S. titanus* iz svih 8 regiona Srbije u kojima je detektovano prisustvo FD fitoplazme. RFLP analiza regiona operona gena ribozomalnih proteina sa *Tru1I* enzimom pokazala je da svi analizirani uzorci imaju isti način sečenja (slika 56). RFLP obrazac uzoraka upoređen je sa referentnim izolatima EY, FD-C i FD-D fitoplazme. Poređenje sa RFLP obrascima referentnih izolata pokazalo je prisustvo FD-C fitoplazme grupe V, podgrupe C.



Slika 56. RFLP analiza rp regiona FD fitoplazme iz uzoraka vinove loze, umnoženog u nested PCR protokolu sa rp(V)F1A/rp(V)R1A prajmerima i digestovanog sa *Tru1I* restrikcionim enzimom. Simboli: V- vinova loza, EY- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-A grupe, FD-C- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-C grupe, FD-D- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-D grupe, M- marker ΦX174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), Fermentas

4.5.2.3. Analiza FD9 regiona

Uspešno su digestovani PCR produkti FD9 regiona uzoraka vinove loze i *S. titanus* iz svih 8 regiona Srbije u kojima je detektovano prisustvo FD fitoplazme. RFLP analiza FD9 regiona koji obuhvata gen koji kodira ribozomalni protein *l15* (*rp15* gen) i gen koji kodira protein translokazu (*SecY* gen) sa *TaqI* enzimom pokazala je da svi analizirani uzorci imaju isti RFLP obrazac (slika 57). RFLP obrazac uzoraka upoređen je sa referentnim izolatima EY, FD-C i FD-D fitoplazme. Poređenje sa RFLP obrascima referentnih izolata pokazalo je prisustvo FD-C fitoplazme.



Slika 57. RFLP analiza FD9 regiona FD fitoplazme iz uzoraka vinove loze, umnoženog u nested PCR protokolu sa FD9f3r2 prajmerima i digestovanog sa *TaqI* restrikcionim enzimom. Simboli: V- vinova loza, St- *Scaphoideus titanus*, EY- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-A grupe, FD-C- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-C grupe, FD-D- pozitivna kontrola fitoplazme 16Sr RNK V-D grupe, M- marker Φ X174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*), Fermentas

Uspešno je sekvencionirano 1164bp FD9 regiona uzorka vinove loze, *S. titanus* i pavitine sa lokaliteta Jasenovik u Nišavskom okrugu. Poravnanje između ove tri nukleotidne sekvence sa referentnim izolatom FD-C fitoplazme iz Veneto regiona,

Italija pokazalo je da su one međusobno identične i da imaju istovetan raspored nukleotida kao i referentni izolat (tabela 16).

Tabela 16. Poravnanje sekvenci FD izolata iz vinove loze (V24_FD9f3r2), *S. titanus* (St22_FD9f3r2), pavitine (CL3_FD9f3r2) i vinove loze iz Veneto regiona, Italija (FD-C Italy FD9f3r2).

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

V24_FD9f3r2      GGTAGTTTTATATGACAAGATTAATTAATTTTTTTAGTAGATAAAAAAAAAACAATTAAAA
St22_FD9f3r2      GGTAGTTTTATATGACAAGATTAATTAATTTTTTTAGTAGATAAAAAAAAAACAATTAAAA
FD-C_Italy_FD9f3r2 GGTAGTTTTATATGACAAGATTAATTAATTTTTTTAGTAGATAAAAAAAAAACAATTAAAA
CL3_FD9f3r2      GGTAGTTTTATATGACAAGATTAATTAATTTTTTTAGTAGATAAAAAAAAAACAATTAAAA
*****

V24_FD9f3r2      AAATTTTTTTCACCTTTATTTATTTTGGTTTATGTTATTGGTACTAGAATTTATATTC
St22_FD9f3r2      AAATTTTTTTCACCTTTATTTATTTTGGTTTATGTTATTGGTACTAGAATTTATATTC
FD-C_Italy_FD9f3r2 AAATTTTTTTCACCTTTATTTATTTTGGTTTATGTTATTGGTACTAGAATTTATATTC
CL3_FD9f3r2      AAATTTTTTTCACCTTTATTTATTTTGGTTTATGTTATTGGTACTAGAATTTATATTC
*****

V24_FD9f3r2      CTTTTTTAGACAAATCTTACTATTACCCCTCAAATACCGCCAGATTTAAATTTTTGG
St22_FD9f3r2      CTTTTTTAGACAAATCTTACTATTACCCCTCAAATACCGCCAGATTTAAATTTTTGG
FD-C_Italy_FD9f3r2 CTTTTTTAGACAAATCTTACTATTACCCCTCAAATACCGCCAGATTTAAATTTTTGG
CL3_FD9f3r2      CTTTTTTAGACAAATCTTACTATTACCCCTCAAATACCGCCAGATTTAAATTTTTGG
*****

V24_FD9f3r2      AATCAATATTTAGTAGTAATCCTTCTTTATGTATTTTATCTTTGGGAGTTATGCCTTATG
St22_FD9f3r2      AATCAATATTTAGTAGTAATCCTTCTTTATGTATTTTATCTTTGGGAGTTATGCCTTATG
FD-C_Italy_FD9f3r2 AATCAATATTTAGTAGTAATCCTTCTTTATGTATTTTATCTTTGGGAGTTATGCCTTATG
CL3_FD9f3r2      AATCAATATTTAGTAGTAATCCTTCTTTATGTATTTTATCTTTGGGAGTTATGCCTTATG
*****

V24_FD9f3r2      TTACTGCTTCTATTGTTATTCAATTGAGTCAAAGGTATTTCCCTTTTATGAAAGAATGGC
St22_FD9f3r2      TTACTGCTTCTATTGTTATTCAATTGAGTCAAAGGTATTTCCCTTTTATGAAAGAATGGC
FD-C_Italy_FD9f3r2 TTACTGCTTCTATTGTTATTCAATTGAGTCAAAGGTATTTCCCTTTTATGAAAGAATGGC
CL3_FD9f3r2      TTACTGCTTCTATTGTTATTCAATTGAGTCAAAGGTATTTCCCTTTTATGAAAGAATGGC
*****

V24_FD9f3r2      AAGAACAAGGAGAAAAAGGAAACGTAATAATTAATATATGGACTAGAATTTTGACTATTT
St22_FD9f3r2      AAGAACAAGGAGAAAAAGGAAACGTAATAATTAATATATGGACTAGAATTTTGACTATTT
FD-C_Italy_FD9f3r2 AAGAACAAGGAGAAAAAGGAAACGTAATAATTAATATATGGACTAGAATTTTGACTATTT
CL3_FD9f3r2      AAGAACAAGGAGAAAAAGGAAACGTAATAATTAATATATGGACTAGAATTTTGACTATTT
*****

V24_FD9f3r2      TGTATCTTTTAGGTCATGGATGGACATTTATTCAAATGAATCCCATCATTTATTATCAT
St22_FD9f3r2      TGTATCTTTTAGGTCATGGATGGACATTTATTCAAATGAATCCCATCATTTATTATCAT
FD-C_Italy_FD9f3r2 TGTATCTTTTAGGTCATGGATGGACATTTATTCAAATGAATCCCATCATTTATTATCAT
CL3_FD9f3r2      TGTATCTTTTAGGTCATGGATGGACATTTATTCAAATGAATCCCATCATTTATTATCAT
*****

V24_FD9f3r2      CTAATTTTATATTTTGAACACTCTTTTTTTTAAACAGTCGGCGTTTTTATATCTGTTGGT
St22_FD9f3r2      CTAATTTTATATTTTGAACACTCTTTTTTTTAAACAGTCGGCGTTTTTATATCTGTTGGT
FD-C_Italy_FD9f3r2 CTAATTTTATATTTTGAACACTCTTTTTTTTAAACAGTCGGCGTTTTTATATCTGTTGGT
CL3_FD9f3r2      CTAATTTTATATTTTGAACACTCTTTTTTTTAAACAGTCGGCGTTTTTATATCTGTTGGT
*****

V24_FD9f3r2      TAGCTGATTTAATAACTTCTAAGGGATTAGGAAATGGAATTTCTATATTAATAGCTATAG
St22_FD9f3r2      TAGCTGATTTAATAACTTCTAAGGGATTAGGAAATGGAATTTCTATATTAATAGCTATAG
FD-C_Italy_FD9f3r2 TAGCTGATTTAATAACTTCTAAGGGATTAGGAAATGGAATTTCTATATTAATAGCTATAG
CL3_FD9f3r2      TAGCTGATTTAATAACTTCTAAGGGATTAGGAAATGGAATTTCTATATTAATAGCTATAG
*****

V24_FD9f3r2      GGATGGCAGATAAATTATATAAACTTTTGAATATTTGTTATTACAAATGGTTCAGAAA
St22_FD9f3r2      GGATGGCAGATAAATTATATAAACTTTTGAATATTTGTTATTACAAATGGTTCAGAAA
FD-C_Italy_FD9f3r2 GGATGGCAGATAAATTATATAAACTTTTGAATATTTGTTATTACAAATGGTTCAGAAA
CL3_FD9f3r2      GGATGGCAGATAAATTATATAAACTTTTGAATATTTGTTATTACAAATGGTTCAGAAA
*****

V24_FD9f3r2      TACAACGTATATTAATTTTAATTTCTTATTTTATTTATTAATATTAACAATATCTTAT

```

St22_FD9f3r2	TACAACGTATATTAATTTTAATTTCTTATTTTATTTATTAATATTAACAATTATCTTAT
FD-C_Italy_FD9f3r2	TACAACGTATATTAATTTTAATTTCTTATTTTATTTATTAATATTAACAATTATCTTAT
CL3_FD9f3r2	TACAACGTATATTAATTTTAATTTCTTATTTTATTTATTAATATTAACAATTATCTTAT

V24_FD9f3r2	CTTCAGCTTATTTAAAAATTCCTATTAATTACGCTATAAATAGAAATAATGATAAAATTG
St22_FD9f3r2	CTTCAGCTTATTTAAAAATTCCTATTAATTACGCTATAAATAGAAATAATGATAAAATTG
FD-C_Italy_FD9f3r2	CTTCAGCTTATTTAAAAATTCCTATTAATTACGCTATAAATAGAAATAATGATAAAATTG
CL3_FD9f3r2	CTTCAGCTTATTTAAAAATTCCTATTAATTACGCTATAAATAGAAATAATGATAAAATTG

V24_FD9f3r2	ATAAATACATTCCTATTAATTAATTAATACATCTGGTATTTTACCAATTATTTTGCAGATG
St22_FD9f3r2	ATAAATACATTCCTATTAATTAATTAATACATCTGGTATTTTACCAATTATTTTGCAGATG
FD-C_Italy_FD9f3r2	ATAAATACATTCCTATTAATTAATTAATACATCTGGTATTTTACCAATTATTTTGCAGATG
CL3_FD9f3r2	ATAAATACATTCCTATTAATTAATTAATACATCTGGTATTTTACCAATTATTTTGCAGATG

V24_FD9f3r2	CTTTTTTAAATTTAATAAAACAAATATCAGTATTTTTCTCTAAAAATGGAACATTTTCGA
St22_FD9f3r2	CTTTTTTAAATTTAATAAAACAAATATCAGTATTTTTCTCTAAAAATGGAACATTTTCGA
FD-C_Italy_FD9f3r2	CTTTTTTAAATTTAATAAAACAAATATCAGTATTTTTCTCTAAAAATGGAACATTTTCGA
CL3_FD9f3r2	CTTTTTTAAATTTAATAAAACAAATATCAGTATTTTTCTCTAAAAATGGAACATTTTCGA

V24_FD9f3r2	GATATATTGATATTTTTGTAAGATCGCGATCAGAATTAGGAATATATTTTTTGTGTTATG
St22_FD9f3r2	GATATATTGATATTTTTGTAAGATCGCGATCAGAATTAGGAATATATTTTTTGTGTTATG
FD-C_Italy_FD9f3r2	GATATATTGATATTTTTGTAAGATCGCGATCAGAATTAGGAATATATTTTTTGTGTTATG
CL3_FD9f3r2	GATATATTGATATTTTTGTAAGATCGCGATCAGAATTAGGAATATATTTTTTGTGTTATG

V24_FD9f3r2	TTTTTATTAATTATGTTATTTCTTTTTTTTCATCTTTTATGACTATCAATCCGAAAGATG
St22_FD9f3r2	TTTTTATTAATTATGTTATTTCTTTTTTTTCATCTTTTATGACTATCAATCCGAAAGATG
FD-C_Italy_FD9f3r2	TTTTTATTAATTATGTTATTTCTTTTTTTTCATCTTTTATGACTATCAATCCGAAAGATG
CL3_FD9f3r2	TTTTTATTAATTATGTTATTTCTTTTTTTTCATCTTTTATGACTATCAATCCGAAAGATG

V24_FD9f3r2	TAGCGGAACATTTGTCAAAACAAAATGCTTATTTAAAGATGTTCAACCTGGATTGCCTA
St22_FD9f3r2	TAGCGGAACATTTGTCAAAACAAAATGCTTATTTAAAGATGTTCAACCTGGATTGCCTA
FD-C_Italy_FD9f3r2	TAGCGGAACATTTGTCAAAACAAAATGCTTATTTAAAGATGTTCAACCTGGATTGCCTA
CL3_FD9f3r2	TAGCGGAACATTTGTCAAAACAAAATGCTTATTTAAAGATGTTCAACCTGGATTGCCTA

V24_FD9f3r2	CTGTTAAAAAATAGTTCGCGAAATGTTTAAATTAATTTCTTGGTAGTTGTTTTTTGA
St22_FD9f3r2	CTGTTAAAAAATAGTTCGCGAAATGTTTAAATTAATTTCTTGGTAGTTGTTTTTTGA
FD-C_Italy_FD9f3r2	CTGTTAAAAAATAGTTCGCGAAATGTTTAAATTAATTTCTTGGTAGTTGTTTTTTGA
CL3_FD9f3r2	CTGTTAAAAAATAGTTCGCGAAATGTTTAAATTAATTTCTTGGTAGTTGTTTTTTGA

V24_FD9f3r2	CTTTATTAGCTGCTACTCCTGATATAATTAATTATCTAGCAGGAAGTGAATATCTCAAA
St22_FD9f3r2	CTTTATTAGCTGCTACTCCTGATATAATTAATTATCTAGCAGGAAGTGAATATCTCAAA
FD-C_Italy_FD9f3r2	CTTTATTAGCTGCTACTCCTGATATAATTAATTATCTAGCAGGAAGTGAATATCTCAAA
CL3_FD9f3r2	CTTTATTAGCTGCTACTCCTGATATAATTAATTATCTAGCAGGAAGTGAATATCTCAAA

V24_FD9f3r2	AAATTACTTTTGGCGGGACTAGTC
St22_FD9f3r2	AAATTACTTTTGGCGGGACTAGTC
FD-C_Italy_FD9f3r2	AAATTACTTTTGGCGGGACTAGTC
CL3_FD9f3r2	AAATTACTTTTGGCGGGACTAGTC

5. DISKUSIJA

Od kada je prvi put registrovana na Evropskom kontinentu, na teritoriji Francuske sredinom XX veka (Caudwell and Dalmaso, 1985), cikada *Scaphoideus titanus* se brzo proširila i zahvatila areal od preko 2.500 x 1.500 km. U Severnoj Americi ova vrsta je rasprostranjena između 30° i 50° severne geografske širine, tačnije u

južnoj Kanadi i 38 zemalja USA (Alma, 2002). U Evropi, ova cikada odomaćila u većini zemalja umereno-kontinentalnog regiona. Tako je njeno prisustvo potvrđeno u 11 zemalja (Francuska - Caudwell, 1957; Italija - Belli et al., 1984; Slovenija - Seljak, 1985; Portugalija - Quartau et al., 2001; Srbija – Magud i Toševski, 2004; Austrija - Zeisner, 2005; Španija - Torres et al., 2005; Švajcarska - Gugerli, 2006; Hrvatska - Budinščak i sar., 2005; Mađarska – Der et al. 2007 i Bosna i Hercegovina – Delić et al., 2007). Sve ove zemlje se nalaze između 40 i 47° severne geografske širine.

Zbog sve očiglednijih klimatskih promena može se očekivati da će se areal rasprostranjenja ove cikade u Evropi još više proširiti. U Nemačkoj je već zabeleženo povećanje srednje dnevne temperature u vinogradarskim regionima. Ove promene već sada utiču i na fenologiju vinove loze. Zbog intenzivne međunarodne trgovine sadnim materijalom mogući su i akcidentni (slučajni) unosi ovog vektora i u nemačke vinograde. Opravdano se strahuje da u južnim vinogradarskim regionima već sada postoje povoljni uslovi za preživljavanje takvih populacija ovog vektora. Zbog toga su u Nemačkoj preduzete mere konstantnog monitoringa kako bi se na vreme mogle preduzeti mere eradikacije *S. titanus* (Maixner, 2005).

U Francuskoj je takođe zabeleženo povećanje areala rasprostranjenosti *S. titanus*. Tako su danas u severnoj Burgundiji registrovane značajne populacije ovog vektora, iako se 1990-tih smatralo da su ovo regioni nepovoljni za *S. titanus* (Boudon - Padieu, 2000).

Iako je kod nas prisustvo utvrđeno tek 2004. godine (Magud i Toševski, 2004) rezultati istraživanja u okviru ove disertacije su pokazali da je ova cikada raširena na teritoriji cele Srbije. Obzirom da se ova cikada može prirodno širiti 5-10 km godišnje (EPPO/CABI, 1997), ovaj podatak ukazuje da stvarno prisustvo cikade *S. titanus* na teritoriji naše zemlje datira mnogo ranije, ali da nije bilo zvanično registrovano.

Do sada *S. titanus* je jedini poznati vektor fitoplazme FD, jedne od najdestruktivnijih bolesti na vinovoj lozi (Schvester et al. 1962; Vidano, 1964; Boudon-Padieu, 2002; Lessio and Alma, 2004b). Raširenost FD bolesti je uvek

povezana i sa prisustvom njenog vektora, ali samo prisustvo vektora ne mora značiti i prisutvo bolesti (Maixner et al., 1993; Boudon-Padieu, 2003; Projekat TITANUS, 2004-2006; Krnjajić i sar., 2006; Weintraub and Beanland, 2006; Bressan et al., 2006; Cvrković i sar., 2007; Krnjajić et al., 2007b; Bertaccini, 2007; Steffek et al., 2007). Ova fitoplazma širena svojim vektorom je prouzrokovala velike epidemije sa teškim ekonomskim posledicama u vinogradarskoj proizvodnji u tim zemljama (Martini et al., 1999; Bertaccini et al., 1997; Boudon-Padieu, 2000; Krnjajić i sar., 2006; Cvrković i sar., 2007; Bertaccini, 2007).

Kao posledica epidemijskog širenja FD došlo je i do ugrožavanja proizvodnje vinove loze i vina u Italiji i Francuskoj, gde je polovinom prošlog veka, u rejonu Armagnac i Chalosse (Francuska) uništeno 100% vinograda, a u oblasti Venetto (Italija) 70% vinograda, što je takođe značajno ugrozilo i proizvodnju vina (EPPO/CABI, 1997). Slične posledice od ove bolesti su i u Srbiji, jedino se razmere šteta do sada nisu sagledale u potpunosti. Vinogradarska proizvodnja u tri velika rejona (Zapadnomoravskom, Nišavsko - južnomoravskom i Fruškogorskom) je ugrožena i znatno smanjena. Proizvodnja loznog sadnog materijala u Velikoj Drenovi i okolini direktno je ugrožena. Zbog toga su veliki proizvođači sadnog materijala, kao i proizvođači vina pokušali da izmeste svoju proizvodnju u druge regione. Međutim, što zbog neznanja što zbog neobaveštenosti, proizvodnju su izmeštali u područja Aleksinca i Fruške Gore, u kojima je osim što je raširen vektor prisutna i FD fitoplazma.

Zbog ozbiljnosti situacije u Francuskoj i Italiji su preduzete sve raspoložive mere borbe sa ciljem zaustavljanja epidemije ove bolesti, a time i propadanja vinograda. Pre svega, na državnom nivou su doneti zakoni i uredbe o obaveznoj borbi protiv ove bolesti svih proizvođača vinove loze u tim zemljama. Krčenje i eliminacija svih zaraženih čokota je uvedena kao obavezna mera. Praćenje i pojava vektora sa preporukama rokova za tretmane hemijskim insekticidima protiv larava i imaga *S. titanus* izdignuto je na nivo od nacionalnog interesa. Uz donete mere prevencije i zaštite Francuska i Italija su uvele rigoroznu kontrolu matičnih zasada loznih podloga i matičnih zasada umatičenih sorti na prisustvo fitoplazmatičnih biljaka kako vizuelnom detekcijom, tako i primenom molekularnih analiza. Obaveza o vodenom tretmanu na visokim temperaturama u cilju suzbijanja FD fitoplazme u loznim kalemima pre sadnje, predstavlja najradikalniju meru koja je uvedena u

Francuskoj i dokaz je o prirodi ove destruktivne bolesti, odnosno pokušaja njene eliminacije iz proizvodnih zasada. Zahvaljujući ovako preduzetim merama, kao i visokoj svesti proizvođača o pridržavanju neophodnih mera suzbijanja, epidemije izazvane fitoplazmom FD su zaustavljene (Barba, 2005; EPPO/CABI, 1997).

Kao i kod nas, prve štete od fitoplazme FD u Francuskoj i Italiji su bile pripisivane drugim faktorima. Spekulisalo se sa mogućim uzrocima propadanja vinograda kao što su posledica suše, pogrešnog i neadekvatnog đubrenja, nedostatka mikro i makro elemenata, kiselih kiša, nepovoljnih klimatskih uslova, virusnih oboljenja, mehaničkim oštećenjima i mnogim drugim nepoznatim uzrocima (Hewitt and Bovey, 1979; Bovey and Martelli, 1992; Martelli, 2003).

U Srbiji do sada nema preciznih i zvaničnih podataka o razmerama šteta od ove bolesti. Iako su se prvi simptomi uočeni znatno ranije (Ivanović i Ivanović, 2000), identifikacija uzroka sušenja i propadanja vinograda u aleksandrovačkom i niškom regionu usledila je znatno kasnije (Duduk et al., 2004, Kuzmanović et al., 2004), kada su već iskrčeni ili oboleli veliki kompleksi pod vinovom lozom. Kao u Francuskoj i Italiji, uzroci su često pripisivani drugim razlozima kao što je široka lepeza biotičkih i abiotičkih faktora (Milosavljević, 1998; Ivanović i Ivanović, 2000).

Zbog toga se ukazala potreba da se sveobuhvatnije istraže kako epidemiologija ove bolesti, tako i biologija, raširenost i uloga njenog vektora u ovom problemu. Pojava novih žarišta (u Francuskoj i Italiji) i u regionima u kojima se sprovode rigorozne mere kontrole, takođe su ukazala i na potrebu proučavanja i drugih biljaka potencijalnih alternativnih domaćina, kao i drugih cikada iz lokalne faune koji bi mogli biti uključeni u nove epidemiološke lance prenošenja i održavanja ove bolesti u agroekosistemima.

Tek prve zvanične podatke o pojavi ove bolesti i njenog vektora navode Duduk et al. (2004), Kuzmanović i sar. (2004) i Magud i Toševski (2004). Odmah nakon ovih nalaza reagovalo je Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije pokretanjem istraživačkih projekata sa ciljem rešavanja ovog problema. Istovremeno, izdate su tri uredbe Ministarstva o obaveznim merama suzbijanja ove bolesti i njenog vektora (Službeni glasnik br. 25/2005, Službeni glasnik br.48/2005, Službeni glasnik br. 114/2005). Takođe, preduzete su i

konkretna akcija organizovanog hemijskog suzbijanja *S. titanus* u dva najveća žarišta (u Aleksandrovcu i Nišu). Cilj ovih akcija je bio da se proizvođačima vinove loze u najugroženijim područjima ukaže da se uz odgovarajuće mere borbe može sprovesti uspešna proizvodnja vinove loze i pored prisustva bolesti i njenog vektora u okruženju. Zbog toga je država dve godine finansirala i nabavku odgovarajućih insekticida kako bi se proizvođači u najugroženijim područjima uverili u njihovu efikasnost i mogućnost stavljanja epidemije bolesti pod kontrolu (Desančić i Krnjajić, 2005). Slične obavezujuće mere sa rigoroznom kaznenom politikom preduzimane su i u Italiji, gde se i danas, nakon zaustavljanja epidemije i dalje sprovode mere suzbijanja *S. titanus* primenom hemijskih insekticida, kao i uklanjanje svih zaraženih ili sumnjivih čokota (Barba, 2005).

Istraživanja sprovedena u ovom radu u periodu 2004. – 2007. godine pokazala su da je *S. titanus* rasprostranjen u svih 8 vinogradarskih rejona Srbije (osim Kosovsko - Metohijskom), koji obuhvataju 23 od 29 regiona (osim u Vranjanskom regionu i Kosovu i Metohiji) (Krnjajić i sar. 2006; Krnjajić i sar. 2007b, Cvrković i sar. 2007). Tokom istraživanja u periodu od 2004. do 2006. godina pregledano je ukupno 385 vinograda na teritoriji Srbije. U 2004. godini pregledano je 116 vinograda sa područja Župe Aleksandrovačke, V. Drenove, Vršca, Bele Crkve, okoline Beograda i Fruške Gore, a u 2005 godini predledom je obuhvaćeno 127 novih vinograda iz istih područja ali i iz šireg regiona Niša, Palića, Sanada, Čoke, Bačkog Gradišta, Bisernog Ostrva, Deliblatske peščare. Tokom 2006. godine pregledano je novih 142 vinograda čime su bila obuhvaćena i područja južne i istočne Srbije kao i severo-zapadni delovi zemlje koji nisu izrazito vinogradarski regioni (Apatin, Sombor, Kljajićevo).

Rezultati istraživanja jasno ukazuju da je ova cikada, zbog brojnosti njene populacije i distribucije na širokom prostoru republike Srbije, bila prisutna u vinogradima mnogo ranije nego što je prvi put zvanično potvrđena (Magud i Toševski, 2004). Sprovedena intenzivna istraživanja dinamike populacije *S. titanus*, kako u proizvodnim vinogradima tako i na divljim lozama, ukazala su da je ova cikada prisutna u visokoj brojnosti u većini vinogradarskih regiona, pogotovo tamo gde su veći vinogradarski kompleksi. Niža brojnost je bila u nekim područjima Vojvodine, u subotičkom i vršačkom regionu. Do sličnih rezultata o brojnosti cikada u našim vinogradima došao je i Kuzmanović (2007). Isti autor

navodi da je sorta Plovdina najpovoljnija sorta za razviće i umnožavanje *S. titanus* (Kuzmanović et al., 2006), ali na osnovu rezultata ovog rada nije moguće zaključiti da je sorta Plovdina ili bilo koja druga sorta povoljnija za razviće cikada. Takođe, nije literaturno poznato da je neka sorta manje ili više pogodna za ishranu i preživljavanje same cikade. Međutim, različita osetljivost sorti prema FD i drugim fitoplazmama je poznata u literaturi. Refati et al. (1992) navode da su sorte kao što su Chardonnay, Pinot blanc, Perreira i Pinot gris najčešće napadnute u jačem intenzitetu od drugih sa FD u severo-istočnom regionu Italije (Fruli - Venecija). U EPPO/CABI (1997) navode se takođe sorte Chardonnay i Baco 22 kao osetljivije od drugih sorti. U regionima gde se tradicionalno i redovno primenjuju insekticidi za suzbijanje grozdovog smotavca (*L. botrana*), brojnost svih cikada, a pogotovo *S. titanus* je znatno smanjena, podjednako na svim sortama (Refatti et al., 1992; Alma, 2002; Lessio and Alma, 2004b).

S. titanus je široko rasprostranjen u Srbiji i u većini regiona se nalazi u srednjoj i visokoj brojnosti, čime je ostvarena pretpostavka o epidemijskoj pojavi FD fitoplazme. Tokom istraživanja iz svih gore navedenih vinograda su pored cikada sakupljani i simptomatični uzorci vinove loze za PCR analize na prisustvo fitoplazmi. Prema rezultatima drugih domaćih autora, FD fitoplazma je prisutna jedino na području Aleksandrovca i sela Vrela kod Niša (Duduk, 2005; Jevremović i Paunović, 2005; Duduk, 2006; Duduk et al. 2006; Kuzmanović i sar., 2004, Jošić et al., 2006; Kuzmanović, 2007). Sprovedena istraživanja su pokazala da je fitosanitarna situacija u vinogradima Srbije dramatično drugačija.

Primenom molekularnih metoda prisustvo fitoplazmatičnih oboljenja vinove loze registrovano je u svim vinogradarskim regionima Republike Srbije. Prisustvo *Flavescence dorée* registrovano je u 8 vinogradarskih regiona (Sremskom, Beogradskom, Podunavskom, Rasinskom, Nišavskom, Zaječarskom, Topličkom i Jablaničkom okrugu) kako u vinovoj lozi tako i u cikadi *S. titanus*. Pozitivan nalaz u biljkama je uvek bio u korelaciji sa brojnim populacijama vektora u tom području.

Poslednjih godina intenziviran je rad na epidemiologiji fitoplazmi koje su prisutne na vinovoj lozi u širem smislu, a u cilju iznalaženja potencijalnih epidemioloških lanaca sa fitoplazmama 16SrV grupe koje su filogenski bliske sa FD fitoplazmom (Arnaud et al., 2007). U Nemačkoj oblasti poznatoj po gajenju vinove loze

Rhineland-Palatinate, prisutna je na lozi fitoplazma pod nazivom žutilo loze Palatinate ili PGY (Palatinate Grape Yellows). Ova fitoplazma, kao i FD fitoplazma na lozi, pripadaju 16SrV-C podgrupi, međutim originalna biljka domaćin ove fitoplazme joha (*Alnus glutinosa*). Na osnovu poznate epidemiologije (Maixner et al., 1995), ovu fitoplazmu između joha prenosi cikada *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Cicadellidae). Takođe, isti vektor može preneti ovu fitoplazmu i na vinovu lozu. Interesantno je napomenuti da su nedavno na teritoriji Srbije identifikovane još dve fitoplazme iz 16SrV grupe i to, fitoplazma na johi iz 16SrV-C podgrupe (Cvrković i sar., 2008) i na brestu 16SrV-A (Jović i sar., 2008). Treba istaći da fitoplazma na johi, kojoj inače pripada patogen koji izaziva bolest loze PGY u jugozapadnoj Nemačkoj, može dodatno uticati na epidemiološku situaciju po pitanju žutila vinove loze u Srbiji. Sa druge strane fitoplazma 16SrV-A podgrupe je izuzetno destruktivna i odgovorna je sušenje za bresta u severnoj Americi, Francuskoj i Italiji.

Međutim, istraživanja na epidemiološkom i molekularnom nivou koja su direktno pokrenuta u cilju sagledavanja interakcije između prisustva fitoplazme 16SrV-C grupe u pavitini (*Clematis vitalba*) i FD fitoplazme na vinovoj lozi rezultirala su otkrićem potpuno nepoznatog epidemiološkog lanca. Molekularne analize na 16S-23S rRNK, FD9 (*rpl15* i *SecY* gen) i *rp5* (*rpl22* i *rps3* gen) regionu koji su od značaja za sistematiku fitoplazmi 16SrV-C podgrupe, pokazale su da je na teritoriji Srbije ova fitoplazma potpuno identična u svim oblastima koje su zahvaćene epidemijom FD, kako u obolelim biljkama vinove loze, tako i u pavitini i cikadama *S. titanus* i *Dictyophara europaea*. Od najvećeg značaja je činjenica da je ova fitoplazma registrovana u pavitini u oblastima gde FD na vinovoj lozi nije prisutna (Braničevski okrug) ili u oblastima gde nije prisutan *S. titanus* i fitoplazma FD, kao na primer u Makedoniji (Fillipin et al., 2007). Ovo jasno ukazuje da je fitoplazma FD prisutna autohtono u pavitini, i da je ova biljka permanentni izvor inokuluma, a da je specifični vektor koji prenosi fitoplazmu sa pavitine na pavitinu, verovatno cikada *D. europaea*. Naime, *D. europaea* je jedina cikada u kojoj je FD fitoplazma dokazana tokom sprovedenih molekularnih analiza i često je prisutna na vinovoj lozi i pavitini. U tom kontekstu, pavitina kao veoma čest korov iz neposrednog okruženja loznog zasada, predstavlja biljku visokog rizika za izbijanje epidemije, naročito ako je u vinogradu prisutna populacija cikade *S. titanus*.

Proučavanjem dinamike leta i disperzije cikada kao vektora fitoplazmatičnih bolesti bavili su se mnogi autori (Power, 1992; Jermini et al., 1993; Nestel and Klein, 1995; Bosco et al., 1997a; Lehmann et al., 2001; Lessio and Alma, 2004b). U trogodišnjem proučavanju faune cikada u vinogradima u Srbiji, dominantna vrsta bila je *S. titanus*. Brojnost ove vrste se kretala i do 79,2% u odnosu na ukupnu brojnost drugih cikada, a populacije najčešće ocenjene kao izuzetno visoke, naročito u vinogorjima centralne Srbije i severnog Srema.

Ekspozicija i način postavljanja žutih klopki može biti od značaja za registrovanje brojnosti *S. titanus* u vinogradima. Prema rezultatima Lessio and Alma (2004a) adulti *S. titanus* se retko hvataju na klopka iznad 2,4 m, odnosno na klopka postavljenim iznad biljaka. Taylor (1974) navodi da kod različitih cikada postoje granične visine u kojima one lete, pa bi ovakva detaljnija istraživanja trebalo sprovesti i za *S. titanus*, kako bi se utvrdila optimalna visina za postavljanje klopki. Lehmann et al. (2001) navode da prva generacija *Empoasca vitis* živi na nižim delovima biljke, dok druga generacija živi u višim delovima biljke. Takođe, njihova brojnost može zavisi i od broja biljaka po jedinici površine i od blizine drugih vinograda. Kod cikada prisutnih u vinogradima Jermini et al. (1993) i Bosco et al. (1997a) su utvrdili da ukoliko je brojnost čokota veća i ukoliko je u blizini veći broj vinograda, veća je i brojnost cikada. Međutim Castro et al. (1992) i Power (1992) navode suprotne primere gde je cikada *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), vektor žbunaste zakržljivosti kukuruza (Maize bushy stunt phytoplasma), manje brojna u gušćim usevima kukuruza (Nault and Ammar, 1989; Oliveira et al. 1998).

Za praćenje dinamike populacija cikada na širem području Srbije korišćene su žute lepljive klopke Csalomon – Mađarska. Dobijeni rezultati o brojnosti populacija odgovaraju realnom stanju na lokalitetu posle izvršenih poređenja sa drugim metodima koji su primenjivani u cilju sagledavanja brojnosti cikada. Međutim, pogodnost klopki različitih boja je dosta proučavana i u nekim ogledima za privlačenje imaga *S. titanus* boljim su se pokazale crvene lepljive klopke talasnih dužina 200-580 nm (Lessio and Alma, 2004a). Kod većine drugih cikada (*Macrostelus fascifrons* Stal., *Paraphlepsis* spp., *Erythroneura* spp., *Exitianus exitiosus* Uhler) boljim su se pokazale žute klopke u odnosu na bele, zelene, plave i crvene (Alverson et al. 1977). Do sličnih rezultata da je najatraktivnija žuta boja kod cikada *Dalbulus maidis* i *D. quinquenotatus* došli su i Todd et al. (1989). Zbog

toga bi trebalo posebno za svaku vrstu proučiti atraktivnost različitih kako boja tako čak i nijansi boja. Na ovaj način bi se za svaku vrstu mogao odabrati adekvatan tip klopke koji bi u praksi davao najbolje rezultate.

Agregaciju cikada u »žarištima«, registrovali su Nestel and Klein (1995) kod cikada *Asymmetrasca desedens* Paoli i *Edwardsiana rosae* L. u jabučnjacima. Nasuprot njima ravnomernu raširenost cikade *Scolypopa australis* Walker registrovali su Tomkins et al. (2000).

Generalno, distribucija cikada unutar staništa je direkno proporcionala stepenu njihove polifagnosti. Lehmann et al. (2001) su utvrdili veću raširenost kod polifagnih (*Empoasca vitis* Goethe i *E. fabae* Harris) u odnosu na monofagne (*S. titanus*) cikade. Međutim, ako se vinograd posmatra kao specifično stanište, istraživanja u Srbiji su pokazala da izrazito veću raširenost ima upravo monofagna *S. titanus*, čak u odnosu na sve druge cikade koje su prisutne u našim vinogradima, naravno u uslovima kada nisu primenjivani insekticidi.

Nielson (1979) u svom radu navodi da je preko 70 vrsta cikada do sada registrovano kao potencijalni vektori fitoplazmi, dok Weintraub and Beanland (2006) navode da čak 92 vrste prenose fitoplazmu.

Istraživanjima u okviru ove disertacije osim najbrojnijeg *S. titanus*, registrovan je veći broj drugih vrsta cikada na vinovoj lozi. Najznačajnije su bile *Hyalesthes obsoletus*, *Jassargus obtusivalvis*, *Asiraca clavicornis*, *Empoasca vitis*, *Fieberiella septemtrionalis*, *Psamotettix alienus*, *Stictocephala bisonia* i *Dictyophara europaea*. Osim njih, na vegetaciji u neposrednoj blizini vinograda nalažen je veliki broj drugih vrsta cikada, koje inače nisu bile prisutne u vinogradu.

Od ukupno 32 registrovane vrste u vinogradima u našoj zemlji, kao vektori ili potencijalni vektori fitoplazmi u domaćoj i stranoj literaturi registrovano je 10 vrsta (tabela 17). Od toga 5 vrsta, *H. obsoletus*, *R. quinquecostatus*, *D. europaea*, *P. spumarius* i *P. alienus* su registrovani kao vektori fitoplazmi na vinovoj lozi. Zbog toga mogu biti od značaja i cikade koje se nalaze u manjoj brojnosti u vinogradima. Njihova potencijalna uloga u eventualnoj epidemiologiji i širenju FD fitoplazme u vinogradima bi mogla razjasniti pojave novih žarišta u Italiji i

Francuskoj i to u regionima u kojima je epidemija FD suzbijena, a gde se cikade primenom hemijskih tretmana drže pod kontrolom.

Tabela 17. Cikade vektori (ili potencijalni vektori) fitoplazmi u vinogradima u Srbiji

vrsta cikade	tip fitoplazme	biljka domaćin	izvor
<i>Cixius wagneri</i>	Stolbur/16SrXII-A	jagoda	Foissac et al., 2001
<i>Reptalus panzeri</i>	Stolbur/16SrXII-A	kukuruz	Jović et al., 2007
<i>Reptalus quinqucostatus</i>	Stolbur/16SrXII-A	vinova loza	Trivellone et al., 2005
<i>Hyalesthes obsoletus</i>	Stolbur/16SrXII-A	vinova loza	Maixner, 1994
<i>Dictyophara europaea</i>	<i>Flavescence dorée</i>	vinova loza	Fillipin et al. 2007
<i>Philaenus spumarius</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	vinova loza	Purcell, 1989
<i>Fieberiella florii</i> (kod nas <i>F. septentrionalis</i>)	Apple proliferation 16SrX-A	jabuka	Krczal et al., 1988
<i>Neoliturus fenestratus</i>	Lettuce phylody	salata safflower	Salehi et al., 2007 Klein, 1992
<i>Psammotettix alienus</i>	16SrI-B, 16SrV-A, 16SrX-A	vinova loza pšenica	Vanda et al., 2006 Lapierre et al., 1991
<i>Euscelis incisus</i>	Phylody Stolbur/16SrXII-A	Rubus krompir	Brcak, 1999

Takođe, potrebno je istaći da i cikada *S. bisonia* može da napravi oštećenja na lastarima vinove loze, nakon čega se na listu ispoljavaju simptomi slični onima koje izazivaju fitoplazme. Međutim, pažljivim vizuelnim pregledom mogu se uočiti oštećenja od cikada. Slična zapažanja navodi i Zorloni (2007), uz napomenu da obično takva oštećenja u Italiji nisu ekonomski značajna.

Bosco et al. (1997a) navode da su u vinogradima u Italiji u regionu Piemonte registrovali 32 vrste cikada iz različitih familija (Macropsinae, Agalliinae, Penthimiinae, Aphrodinae, Cicadellinae, Typhlocybinae i Deltocephalinae). Među ovim vrstama mnoge su poznate i kao mogući vektori nekih fitoplazmi na drugim kulturama (Cattaneo and Arzone, 1983; Klein, 1992; Alma et al., 1993).

Početak piljenja jaja *S. titanus* u 2005. i 2006. godini koji je praćen na dva temperaturna režima pokazalo je da piljenje počinje između 12. i 24. maja. Maksimumi piljenja su se kretali između 24. maja i 2. juna u 2005. godini, odnosno 19. do 25 maja u 2006. godini. Ovi rezultati su od velikog praktičnog značaja, jer se na osnovu njih mogu odrediti termini suzbijanja larvi *S. titanus*. Pošto je period akvizicije fitoplazme FD za larve *S. titanus* oko 3-4 nedelje (Alma 2002; Bressan et al., 2005b), prvi tretman u našim uslovima treba sprovesti početkom juna meseca,

a drugi tretman 15 do 20 dana kasnije. Međutim, treba imati u vidu da vreme piljenja zavisi od mikroklimatskih prilika i da ono varira svake godine u zavisnosti od temperaturnih prilika. Očigledan uticaj promene vremenskih prilika na *S.titanus* se može videti iz grafikona 1, 2, 3 i 4. Iz ovih razloga neophodno je konstantno praćenje kako bionomijskih karakteristika tako i stanja populacija *S.titanus* na području Srbije. Ovakav monitoring je neophodan radi pravovremenog alarmiranja vlasnika vinograda o tačnom vremenu suzbijanja ove štetočine.

Slično kao i u Srbiji, u Italiji piljenje jaja takođe počinje početkom maja, a pojava prvih imaga je sredinom jula (Vidano, 1964), međutim u našim uslovima prva imaga smo registrovali već početkom jula meseca. Imaga su prisutna sve do kraja septembra i početka oktobra (Bosco et al., 1997a), što se poklapa sa rezultatima dobijenim u Srbiji, čime je potvrđeno prisustvo imaga u vinogradima u period od preko 3 meseca. Pošto su tek larve trećeg stupnja sposobne da, 28 – 35 dana nakon ishrane na zaraženim biljkama, postanu vektori FD i da prenesu fitoplazme na zdrave biljke vinove loze ne preporučuje se njihovo suzbijanje odmah nakon piljenja (Schvester et al., 1969). U Italiji se prvo suzbijanje protiv larvi preporučuje 30 dana nakon prvog piljenja larava, odnosno vreme primene insekticida je usklađeno sa biologijom štetočine i načinom prenošenja fitoplazme vektorima (Boudon-Padieu, 2003; Bressan et al., 2003; Barba, 2005).

U istraživanjima sprovedenim u toku izrade ove doktorske disertacije, larve i imaga *S. titanus* su pronalazene kako u proizvodnim tako i u matičnim zasadima američke i plemenite loze i na okućnicama. Takođe smo ih nalazili i na divljim i samoniklim lozama pored puteva, na obalama reka, u šumskim sastojinama. U literaturi se uglavnom navodi da je *S. titanus* monofagna cikada i da se hrani samo na vinovoj lozi (Vidano, 1964; Alma, 2004; Lessio and Alma, 2004b). Pojedini autori navode da se imaga alternativno mogu hraniti na nekim drvenastim biljkama u šumskim sastojinama i da odatle mogu preletati u vinograde (Barnett, 1977; Maixner et al. 1993; Wolf, 2004; Lessio et al., 2007).

U laboratorijskim (no choice) uslovima ispitivan je veći broj potencijalnih alternativnih domaćina. Biljke su uglavnom birane iz neposredne okoline vinograda (*Clematis. vitalba*, *Bryonia. dioica*, *B. convonvulus*, *C. album*, *S. glauca*, *E. crus-galli*, *B. nigra*, *S. media*, *C. arvensis*), biljke iz familije Vitaceae

(*Partenocissus tricuspidata*, *Partenocissus. quinquefolia*, *Cissus rhombifolia*), kao i neke gajene biljke koje se inače često mogu naći u neposrednoj blizini vinograda (pšenica i kukuruz). Ispitivanja su vršena na L₁, L₃ larvama i odraslim cikadama. Prema rezultatima dobijenim u toku ovog rada vidi se da *S. titanus* ne može u potpunosti da završi svoje razviće na drugim biljkama, osim na vinovoj lozi. Ovaj podatak je od izuzetne važnosti jer može objasniti prirodnu migraciju imaga *S. titanus* iz vinograda u vinograd, čak i na udaljenost od 5 – 10 km (EPPO/CABI, 1997). Imaga su aktivnija noću i često su privučena na okolna svetla pri okućnicama ili lampama uz puteve, gde inače nema biljaka vinove loze. Pri ovakvim migracijama imaga se obično slete na biljke koje su u neposrednoj blizini, a koje mogu koristiti kao alternativne biljke.

Larve su uglavnom sedalne do L₃ stupnja kada postaju znatno pokretnije, ali njihova migracija je uglavnom limitirana na susedne biljke vinove loze. U tom slučaju ako su zaražene fitoplazmom FD mogu prenositi patogen, što se oslikava kroz infekciju biljaka u redovima kod špalirskih zasada ili u krugovima kod piramidalnog načina uzgoja vinove loze. Zbog toga, pojava simptoma fitoplazmatične infekcije kod susednih biljaka, uz prisustvo vektora FD unutar zasada vinove loze, predstavlja u epidemiološkom smislu mogućnost da se radi o pojavi FD unutar zasada.

Zbog fenologije i biologije vrste *S. titanus*, i njegove široke distribucije na teritoriji Srbije, pre svega na vinovoj lozi koja se nalazi van fitosanitarne kontrole, više je nego verovatno da će problem kontrole vrste *S. titanus* biti perzistentan. Interakcija sa nespecifičnim vektorima kao što je *D. europaea* i prirodni rezervoari fitoplazme FD u pavitini (Krnjajić i sar., 2007a, Fillipin et al., 2007), dodatno komplikuju fitosanitarnu situaciju, tako da potvrđuju pretpostavljenu perzistentnost problema sa fitoplazmom FD u vinogradima Srbije. Na osnovu dosadašnjih rezultata koji su prezentovani u ovoj tezi, više od 50% postojećih zasada vinove loze u Srbiji ugroženo je fitoplazmom *Flavescence dorée*.

6. ZAKLJUČCI

Istraživanja u okviru ove disertacije sprovedena su tokom 2004.-2007. godine. Ukupno je pregledano 385 vinograda u svim vinogradarskim regionima u Srbiji. Tokom 2004. godine pregledano je 116 vinograda, u 2005. godini pregledano je 127 vinograda i u 2006. godini pregledano je 142 vinograda.

Cikada *Scaphoideus titanus* je dosada jedini poznati vektor zlatastog žutila vinove loze (fitoplazme *Flavescence dorée*) i prisutna je na gotovo celoj teritoriji Republike Srbije, u 23 od 29 regiona (osim u Vranjanskom regionu i Kosovu i Metohiji).

Severna tačka na kojoj je utvrđeno prisustvo *S. titanus* bila je Horgoš, a južna tačka je bila u Grdelici.

Izrazito visoke populacije *S. titanus* registrovane su u Rasinskom, Raškom, Braničevskom, Podunavskom, Jablaničkom i Beogradskom regionu, kako u velikim vinogradarskim kompleksima, tako i u malim vinogradima, okućnicama i divljim lozama pored puteva i šuma.

Visoke populacije *S. titanus* registrovane su u Južno Banatskom, Južno Bačkom, Pomoravskom i Topličkom regionu.

Srednje i niske populacije *S. titanus* registrovane su u Severno Bačkom, Srednje Banatskom, Severno Banatskom, Mačvanskom, Kolubarskom, Šumadijskom, Borskom, Pirotskom, Zaječarskom i Moravičkom regionu.

U vinogradima Srbije ukupno je registrovano 32 vrste cikada, iz 9 familija i 23 roda. Najbrojnija vrsta bila je *S. titanus* koja je procentualno bila zastupljena između 70,5 i 79,2% u odnosu na sve druge cikade.

Piljenje i dinamika piljenja jaja *S. titanus* direktno zavise od temperaturnih uslova u toku proleća. Piljenje u Srbiji počinje sredinom maja i traje sve do kraja juna.

Cikada *S. titanus* celokupno razviće može završiti samo na vinovoj lozi.

Larve *S. titanus* mogu preživeti 5 dana na raznim korovskim biljkama (*Setaria glauca*, *Panicum cruss-galli*, *Convolvulus arvensis*, *Cissus rhombifolia*, *Parthenocissus quinquefolia* i *Bryonia dioica*).

Imago *S. titanus* može preživeti i do 12 dana na *Bilderdykia convolvulus*.

Na prisustvo fitoplazmi ukupno je analizirano 346 uzoraka vinove loze, 118 uzoraka pavitine i 654 primeraka *S. titanus*.

Prisustvo FD fitoplazme u vinovoj lozi utvrđeno je u: Sremskom, Beogradskom, Podunavskom, Rasinskom, Nišavskom, Zaječarskom, Topličkom i Jablaničkom okrugu. Površina zasada vinove loze na ovom području iznosi preko 40 % od ukupnih površina u Republici Srbiji.

Prisustvo FD fitoplazme u *S. titanus* utvrđeno je Sremskom, Beogradskom, Podunavskom, Rasinskom, Nišavskom, Zaječarskom, Topličkom i Jablaničkom okrugu

Prisustvo FD fitoplazme u pavitini utvrđeno je u Nišavskom, Rasinskom, Beogradskom, Šumadijskom, Braničevskom i Jablaničkom okrugu.

Procenat inficiranosti primeraka *S. titanus* unutar njegovih lokalnih populacija bio je visok i kretao se od 10,0 - 40,5%.

Prisustvo FD fitoplazme utvrđeno je u cikadi *Dictyophara europaea*.

RFLP analizom 16S-23S regiona ribozomalne RNK sa *TaqI* enzimom utvrđeno je prisustvo FD-C fitoplazme u vinovoj lozi i *S. titanus*.

RFLP analiza FD9 regiona sa *TaqI* enzimom utvrđeno je prisustvo FD-C fitoplazme u vinovoj lozi i *S. titanus*.

RFLP analizom regiona operona gena ribozomalnih proteina sa *Tru1I* enzimom utvrđeno je prisustvo FD-C fitoplazme grupe V, podgrupe C u vinovoj lozi i *S. titanus*.

Sekvencioniranje 1164bp FD9 regiona uzorka vinove loze, *S. titanus* i pavitine i njihovo poravnanje sa referentnim izolatom FD-C fitoplazme iz Veneto regiona, Italija pokazalo je da su one međusobno identične i da imaju istovetan raspored nukleotida kao i referentni izolat.

7. L I T E R A T U R A

- Agrios G.N. (1997): Plant pathology. Fourth Edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Alma A. (2002): Auchenorrhyncha as pests on grapevine. In Zikaden Leafhoppers, Planthoppers and Cicadas (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha). Denisia 04: 531 – 538.
- Alma A. Conti M. (2004): Vettori dei fitoplasmi della vite. La Vite – Convegno Nazionale, Torino, 2-3. 12.2004, 1-5.
- Alma A., Arzone A., Bosco D. (1993): Grapevine MLO transmission by insects. Proceedings of 11th Meeting ICVG, Montreux, Switzerland, 6-9 September, pp. 84 - 85.
- Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Arzone A. (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. Insect Mol. Biol. 6: 115 - 221.
- Alma A., Marzachi C., d'Aquilio M., Bosco D. (2000): Cyclamen (*Cyclamen persicum* L.): a dead-end host species for 16Sr-IB and -IC subgroup phytoplasmas. Ann. Appl. Biol. 136: 173 - 78.
- Alverson D.R., All J.N., Matthews R.W. (1977): Response of with the first generation keeping closer to leafhoppers and aphids to variously colored sticky traps. Journal and the of the Georgia Entomological Society, 12, 336 - 341.
- Angelini A., Squizzato F., Gianluca L., Borgo M (2004): Detection of a Phytoplasma Associated with Grapevine *Flavescence dorée* in *Clematis vitalba*. European Journal of Plant Pathology, 110 (2): 193 - 201.
- 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.
- Arnaud G, S. Malembic-Maher, P. Salar, P. Bonnet, M. Maixner, C. Marcone, E. Boudon-

- Padieu, and X. Foissac. (2007): Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dorée Phytoplasma Strain Clusters and Group 16 SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12): 4001-4010
- Avramov L., Nakalamić A., Žunić D. (1999): Vinogradarstvo. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Beograd - Zemun.
- Bai X., Zhang J., Ewing A., Miller S.A., Jancso Radek A., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., Hogenhout S.A. (2006): Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriol.*, 188 (10): 3682 - 3696.
- Ball E. D. (1932): New genera and species of leafhoppers related to *Scaphoideus*. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 22: 9-19.
- Barba M. (2005): La lotta obbligatoria all flavescenza dorata e al suo vettore *Scaphoideus titanus*. In: Flavescenza dorata e altri giallumi della vite in Toscana e in Italia (Bertaccini A., Braccini P., eds.). Arsia Regione Toscana, Firenze, Italy, pp. 135 - 138.
- Barnett D.E. (1977): A revision of the nearctic species of the genus *Scaphoideus* (Homoptera: Cicadellidae). *Transactions of the American Entomological Society*, 102, 484 - 593.
- Beanland L., Hoy C.W., Miller S.A., Nault L.R. (2000): Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 271 - 76.
- Belli G., Rui D., Fortusini A., Pizzoli L., Torresin G. (1984) - Presenza dell'insetto vettore (*Scaphoideus titanus*) e ulteriore diffusione della flavescenza dorata in vigneti del Veneto. *Vignevisini* n. 9.
- Bertaccini A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12, 673-689.
- Bertaccini A., Vibio M., Schaff D.A., Murari E., Martini M., Danielli A. (1997): Geographical distribution of elm yellows-related phytoplasmas in grapevine *Flavescence dorée* outbreaks in Veneto (Italy). *Extended Abstracts, 12 th ICVG Meeting, Lisbon, 28 Sept./2 Oct.*, 57-58.
- Biedermann R., Niedringhaus R. (2004): Die Zikaden Deutschlands. WABV - Verlag, Scheeßel, Germany.
- Bosco D., Alma A., Arzone A. (1997a) Studies on population dynamics and spatial distribution of leafhoppers in vineyards (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of Applied Biology*, 130, 1 - 11.
- Bosco D., Minucci C., Boccardo G., Conti M. (1997b): Differential acquisition of

- chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. Entomol. Exp. Appl. 83: 219 - 24.
- Boudon-Padieu E. (1999): Grapevine phytoplasmas. First Internet conference on phytopathogenic mollicutes, [http://www. Uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.Html](http://www.Uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.Html).
- Boudon-Padieu E. (2000): Recent advances on grapevine yellows: detection, etiology, epidemiology and control strategies. Proceedings of the 13th Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG), pp. 87 - 88.
- Boudon-Padieu E. (2002): *Flavescence dorée* of the grapevine, knowledge and new developments in epidemiology, etiology and diagnosis. Atti Giornate Fitopatologiche, Baselga Di Piné-Trento (ed. by A Canova), pp. 15 - 34. CLUEB, Bologna, Italy.
- Boudon-Padieu R., (2003): The situation of grapevine yellows and current research directions: Distribution, diversity, vectors, diffusion and control. 14th ICVG Conference Locorotondo, 12-17th September, 47 - 53.
- Bourgoin T., Campbell B. C. (2002): Inferring a phylogeny for Hemiptera: Falling into the 'Autapomorphic Trap'. Zikaden. Leafhoppers, planthoppers and cicadas (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha). Denisia 4: 67-82.
- Bourgoin T., Steffen-Campbell J.D., Campbell B.C. (1997): Molecular phylogeny of Fulgoromorpha (Insecta, Hemiptera, Archaeorrhyncha). The enigmatic Tettigometridae: evolutionary affiliations and historical biogeography. Cladistics, 13(3): 207-224.
- Bovey R., Martelli G.P. (1992): Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Description, historical review and bibliography. MFCIC/ICVG, Tunis, 111.
- Brack J. (1979): Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. In Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents, eds. Maramorosch , KF Harris. London: Academic Press, pp. 97 - 146.
- Bressan A., Girolami V., Boudon-Padieu E. (2005a): Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to *Flavescence dorée* phytoplasma. Entomologia Experimentalis et Applicata 115(2): 283 - 290.
- Bressan A., Larrue J., Boudon Padieu E. (2006): Patterns of phytoplasma-infected and infective *Scaphoideus titanus* leafhoppers in vineyards with high incidence of *Flavescence dorée*. Entomologia Experimentalis et Applicata 119: 61 - 69.
- Bressan A., Spiazzi S., Capuzzo C., Girolami V., Boudon-Padieu E. (2003): Seasonal probability of *Flavescence dorée* phytoplasma transmission in relation to abundances of leafhopper vectors and source for acquisition. 14th ICVG Conference Locorotondo, 12-17th September, 107 -108.

- Bressan A., Spiazzi S., Girolami V., Boudon-Padieu E. (2005b): Acquisition efficiency of *Flavescence dorée* phytoplasma by *Scaphoideus titanus* Ball from infected tolerant or susceptible grapevine cultivars or experimental host plants. *Vitis* 44: 143 - 146.
- Budinščak Ž., Križanac I., Mikec I., Seljak G., Škorić D. (2005): Vektori fitoplazmi vinove loze u Hrvatskoj. *Glasilo biljne zaštite*, 4, 240 - 244.
- Campbell B.C., Steffen-Campbell J.D., Gill R. (1994): Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleurodidae) inferred from rDNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 3(2): 73-88.
- Campbell B.C., Steffen-Campbell J.D., Sorensen J. T., Gill, R.(1995): Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Syst. Entomol.*, 20: 175-194.
- Carraro L., Ferrini F., Ermaco P., Loi N., Martini M. (2004): *Macropsis mendax* as a vector of elm yellows phytoplasma of *Ulmus* species. *Plant Pathol.* 53:90 - 95.
- Castro V., Rivera C., Isard S.A., Gamez R., Fletcher J., Irwin M.E. (1992): The influence of weather and microclimate on *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) flight activity and the incidence of diseases within maize and bean monocultures and bicultures in tropical America. *Annals of Applied Biology*, 121, 469 - 482.
- Cattaneo E., Arzone A. (1983): Ciclo biologico di Cicadellidi Deltocelalini vettori di MLO. Atti XIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Sestriere-Torino, Italy, 27 June - 1 July, pp. 399 - 406.
- Caudwell A., (1957): Deux années d'études sur la *Flavescence dorée*, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 4, 359 - 363.
- Caudwell A.; Dalmaso A. (1985): Epidemiology and vectors of grapevine viruses and yellows diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 24, 170 - 176.
- Caudwell, A., Larrue, J., Kuszala, C., Bachelier, J.C. (1971): Pluralité des Jaunisses de la vigne. *Annales de Phytopathologie*, 3 (1): 95 - 105.
- Chiykowski L.N., Sinha R.C. (1970): Sex and age of *Macrostelus fascifrons* in relation to the transmission of the clover proliferation causal agent. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63: 1614 - 1617.
- Cordova I., Jones P., Harrison N.A., Oropeza C. (2003): *In situ* PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant. Pathol.* 4, 99 - 108.
- Cvrković T., Krnjajić S., Mitrović M., Jović J., Angelini E., Borgo M., Forte V., Toševski I. (2007): Fitosanitarna situacija u vinogradima Srbije: Ekspanzija fitoplazme *Flavescence dorée* i njenog vektora *Scaphoideus titanus*. Savetovanje: Inovacije u voćarstvu i

vinogradarstvu, Beograd, 101.

- Daire X., Clair D., Reinert W., Boudon-Padieu E. (1997): Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 103, 507 - 514.
- Daire, X., Clair, D., Larrue, J., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A. (1993): Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis*, 32, 159 - 163.
- Dale J.L. and Kim K.S. (1969): Mycoplasma-like bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathology* 59, 1765 - 1766.
- Delić D., Seljak G., Martini M., Ermacora P., Carraro L., Myrta A., Đurić G. (2007): Surveys for grapevine yellows phytoplasmas in Bosnia and Herzegovina. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 369 - 370.
- Deng S., Hiruki C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14, 53 - 61.
- Dent D.R. (2008): History of Pest Management.
<http://www.pestmanagement.co.uk/lib/history.shtml>
- Der Z., Koszor S., Zsolnai B., Ember I., Kolber M., Bertaccini A., Alma A. (2007): *Scaphoideus titanus* identified in Hungary. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 199 - 200, 2007
- Desančić M., Cvrković T., Krnjajić S. (2006): Study and Control of *Scaphoideus titanus* Vector of Grapevine Phytoplasma *Flavescence dorée*. 70th Anniversary of Plant Protection Institute and Annual Balkan Week of Plant Helath, Kostinbrod, Bulgaria, May 28 - 31, 2006 (Book of abstracts), p. 4.
- Desančić M., Krnjajić S. (2005): Strategija suzbijanja *Scaphoideus titanus*. VII Savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar 2005 (zbornik rezimea), 91 - 92.
- 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.
- Duduk B. (2005): Fitoplazme – patogeni vinove loze u Srbiji. Magistarska teza, 57 strana, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet u Zemunu.
- Duduk B. (2006): Molekularnakarakterizacija fitoplazmi - patogena voćaka, vinove loze i drugih biljaka u Srbiji. Doktorska disertacija, 91 strana, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet u Zemunu.
- Duduk B., Botti S., Ivanović M., Bertaccini A. (2006): Status of grapevine yellows in Serbia. Extended Abstracts of the 15th Meeting of ICVG, 3-7 April 2006, Stellenbosch, South

- Africa, pp.193 - 194.
- Duduk B., Botti S., Ivanovic M., Krstic B., Dukic N., Bertaccini A. (2004): Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia, *J. Phytopathology* 152 ,575 - 579.
- Ebbert M.A., Jeffers D.P., Harrison H.A., Nault L.R. (2001): Lack of specificity in the interaction between two maize stunting pathogens and field collected *Dalbulus* leafhoppers. *Entomol. Exp. Appl.* 101: 49 - 57.
- EPPO/CABI (1997) Quarantine Pests for Europe. 2nd edition. Edited by Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M. CABI International, Wallingford, UK, 1425 pp.
- EPPO-dsqp: Grapevine *Flavescence dorée* phytoplasma
http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Flavescence_doree/PHYYP64_ds.pdf
- Fauna Europaea Web Service (2004): Fauna Europaea version 1.1, Available online at <http://www.faunaeur.org> .
- Fillipin L., Jović J., Forte V., Cvrković T., Toševski I., Bogro M., Angelini E. (2007): Occurrence and diversity of phytoplasmas detected in clematis (*Clematis vitalba* L.) and their relationships with grapevine *Flavescence dorée* phytoplasmas. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 327 - 328.
- Firrao G., Gibb K., Streten C. (2005): Short Taxonomic Guide to the Genus “*Candidatus* phytoplasma”, Invited review, *Journal of Plant Pathology*, 87 (4), 249 - 263.
- Fletcher J., Wayadande A., Melcher U., Ye F. (1998): The Phytopathogenic Mollicute – Insect Vector Interface: A Closer Look. *Phytopathology*, Vol. 88, 12, 1351 - 1358.
- Foissac X., Danet J.L., Zreik L., Salar P., Verdin E., et al. (2001): “*Candidatus* Phlomobacter fragariae” is the prevalent agent of marginal chlorosis of strawberry in French production fields and it transmitted by the planthopper *Cixius wagneri* (China). *Acta Hortic.* 656: 93 - 97.
- Garcia-Salazar C., Whalon M.E., Rahardja U. (1991): Temperature-dependent pathogenicity of the X-Disease mycoplasma-like organism to its vector: *Paraphlepsius irroratus* (Homoptera: Cicadellidae). *Environ. Entomol.* 20: 179 - 84.
- Gibb K.S., Constable F.E., Moran J.R., Padovan A.C. (1999): Phytoplasmas in Australian grapevines - detection, differentiation and associated diseases. *Vitis* 38: 107-114.
- Gibb K.S., Padovan A.C., Mogen B.D. (1995): Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plants species growing in northern Australia. *Phytopathology* 85: 169 - 174.
- Girolami V., Duso C., Refatti E., Osler R. (1989): Lotta integrata in viticoltura. IRIPA–COLDIRETTI. 1 - 100 pp.

- Gugerli P., Besse S., Colombi L., Ramel M.-E., Rigotti S., Cazelles E. (2006): First outbreak of *Flavescence dorée* (FD) in Swiss vineyards. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, South Africa, 3-7 April 2006.
- Herrmann J.V., Brauns Ch., Eichler P., Böll S. (2000): Erhebungen zur Populationsdynamik der Grünen Rebzikade (*Empoasca vitis* Goethe) und ihrer Antagonisten. Mitt. Dtsch. Phytomed. Ges. 30: 29 - 30.
- Hewitt W.B., Bovey R. (1979): The viroses and virus-like diseases of the grapevine. A bibliographic report, 1971 - 1978. Vitis, 18: 316-376.
- Hogenhout S. (2004): The Phytoplasma Web Page. November 2004.
<http://www.oardc.ohio-state.edu/phytoplasma>.
- Holzinger W.E., Kammerlander I., Nickel H. (2003): The Auchenorrhyncha of Central Europe Die Zikaden Mitteleuropas. Leiden, The Netherlands, Brill.
- 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.
- Irwin M.E., Nault L.R., Godoy C., Kamp-Meier G.E. (2000): Diversity and movement patterns of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) and leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) in a heterogeneous tropical landscape. Implications for redressing the integrated pest management paradigm. In Interchanges of Insects, ed. B Ekbom, M Irwin, Y Robert, pp. 141 - 68. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Acad.
- ITIS (2008): Integrated Taxonomic Information System. <http://www.itis.gov/index.html>.
- Ivanović M., Ivanović D. (2000): Pojava simptoma sličnih fitoplazmama na vinovoj lozi u kruševačkom vinogorju. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, p. 42.
- Jermini M., D'Adda G., Baumgartner J., Lozzia G.C., Baillod M. (1993): Nombre des pièges englués nécessaires pour estimer la densité relative des populations de la cicadelle *Scaphoideus titanus* Ball en vignoble. Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura, Serie, II, 91 - 102.
- Jevremović D., Paunović S. (2005): Rezultati praćenja *Flavescence dorée* u matičnim zasadima vinove loze. VII savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar 2005, Zbornik rezimea, 91.
- Jošić D., Kuzmanović S., Stojanović S., Živković S., Aleksić G., Starović M. (2006b): Identification of phytoplasma on different cultivar of *Vitis vinifera*. IX ESA Congress, 4-7 September, 2006. Warszawa, Poland, Book of Proceedings, Part I, Volume 11, 129.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Redinbaugh M.G., Pratt R.C., Gingery R.E.,

- Hogenhout S.A., Toševski I. (2007): Roles of Stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of Maize redness in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 118, 85 - 89.
- Kawakita H., Saiki T., Wei W., Mitsuhashi W., Watanabe K., Sato M. (2000): Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90: 909 - 914.
- Khan A.J., Botti S., Paltrinieri S., Al-Subhi A.M., Bertaccini A.F. (2002): Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In Abstracts, 14th International Organization of Mycoplasma Conference Vienna, Austria, p. 149.
- Kirkpatrick B.C. (1992). Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In *The prokaryotes*, 2nd ed., pp. 4050-4067. Edited by Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. New York: Springer-Verlag.
- Klein M. (1992): Role of *Circulifer/Neoliturus* in the transmission of plant pathogens. *Advances in Disease Vector Research* 9: 151 - 193.
- Krake L.R., Scott N.S., Rezaian M.A., Taylor R.H. (1999): Graft-transmitted disease of grapevines. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Krczal G., Krczal H., Kunze L. (1988): *Fiebertella floricola* (Stal.), a vector of apple proliferation agent. *Acta Hort.* 235: 99 - 106.
- Krnjajić S., Filippin L., Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Petrović A., Forte V., Angelini E., Toševski I. (2007a): Inficiranost *Clematis vitalba* L. fitoplazmom *Flavescence dorée*. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Zlatibor 26-30.11.2007., Zbornik rezimea, 103 - 104.
- Krnjajić S., Mitrović M., Cvrković T., Jović J., Petrović A., Forte V., Angelini E., Toševski I. (2007b): Occurrence and distribution of *Scaphoideus titanus* Ball - multiple outbreaks of *Flavescence dorée* in Serbia. First International Phytoplasma Working Group Meeting, Bologna Italy, November 12-15, 2007. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 197 - 198.
- Krnjajić S., Mitrović M., Cvrković T., Milićević J., Toševski I. (2006): Rasprostranjenje *Scaphoideus titanus* Ball (*Auchenorrhyncha*, *Cicadellidae*) vektora fitoplazme vinove loze *Flavescence dorée*. VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 27.11.-01.12.2006., zbornik rezimea, 116 - 117 rezimea.
- Kuzmanović S. (2007): Fitoplazmoze vinove loze u Srbiji. Doktorska disertacija, 84 strane, Univerzitet u Novom Sadu.
- Kuzmanović S., Martini M., Ferrini F., Ermacora P., Starović M., Tošić M., Osler R. (2004): Stolbur i *Flavescence dorée* fitoplazme prisutne na vinovoj lozi u Srbiji. V Kongres zaštite bilja Zlatibor, 2004. Zbornik rezimea, 138.

- Kuzmanović S., Osler R., Tošić M., Martini M., Starović M., Stojanović S., Aleksić G. (2006): Grapevine cv. Plovdina as indicator of *Flavescence dorée*. Extended Abstracts of 15th Meeting of ICVG, 3-7, April 2006, Stellenbosch, South Africa, pp. 99 - 99.
- Lapierre H., Cousin M. T., Della Giustina W., Moreau J. P., Khogali M., Roux J., Gelie B., Ollier E. (1991): Nanisme du ble. Agent pathogene et vecteur. *Phytoma* 432: 26 - 28.
- Lee I.-M., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Bartoszyk I.M. (1996): Multiple phytoplasmas detected in two species of Homoptera feeding on pear trees with decline symptoms. *Int. Org. Mycoplasma. Lett.* 4: 199.
- Lee I.-M., Davis R. E., Gundersen - Rindal D. E. (2000): Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221 - 255.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bartoszyk I. M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1153 - 1169.
- Lee I.-M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. (2004): Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 337 - 347.
- Lee I.-M., Tiffany M., Gundersen D. E., Klopmeier M. (1995): Phytoplasma infection: A beneficial factor for production of commercial branching poinsettia cultivars? *Phytopathology* 85: 1179.
- Lefol C., Caudwell A., Lherminier J., Larrue J. (1993): Attachment of the *Flavescence dorée* pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Ann. Appl. Biol.* 123: 611 - 622.
- Lefol C., Lherminier J., Boudon-Padieu E., Larrue J., Louis C. (1994): Propagation of *Flavescence dorée* MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 285 - 293.
- Lehmann F., Schirra K.J., Louis F., Zebitz C.P.W. (2001): The green leafhopper *Empoasca vitis* Goethe - population dynamics in different zones of foliation and effects of insecticide treatments in vineyards. *IOBC WPRS Bulletin*, 24, 231 - 235.
- Lessio F., Alma, A. (2004a): Dispersal patterns and chromatic response of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera Cicadellidae), vector of the phytoplasma agent of grapevine *Flavescence dorée*. *Agricultural and Forest Entomology* (2004) 6, 121 - 127.
- Lessio F., Alma, A. (2004b): Seasonal and Daily Movement of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology*, 33 (6), 1689 - 1694.
- Lessio F., Tedeschi R., Alma, A. (2007): Presence of *Scaphoideus titanus* on American

- grapevine in woodlands, and infection with “*Flavescence dorée*” phytoplasmas. Bulletin of Insectology 60 (2): 373 - 374
- Lherminier J., Prensier G., Boudon-Padieu E., Caudwell A. (1990): Immunolabeling of grapevine Flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. J. Histochem. Cytochem. 38: 79 - 86.
- Lim P.-O., Sears B. B. (1992). Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. J. Bacteriol. 174, 2606 - 2611.
- Magud B., Toševski I. (2004). Scaphoideus titanus Ball (Homoptera, Cicadellidae) nova štetočina u Srbiji. Biljni lekar, 32, 5: 348-352.
- Maixner M. (1994): Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the plant-hopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). Vitis 33: 103 - 104.
- Maixner M, Reinert W. 1999. Oncopsis alni (Schrank) (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) as a vector of the alder yellows phytoplasma of Alnus glutinosa (L.) Gaertn. European Journal of Plant Pathology 105: 87-94
- Maixner M. (2006): Grapevine Yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting of the International Council for the Study of Virus – like Diseases of the Grapevine, Stellenbosch, South Africa, 86 - 88.
- Maixner M., Pearson R C., Boudon-Padieu E., Caudwell A. (1993): *Scaphoideus titanus*, a possible vector of grapevine yellows in New York. Plant Disease 77, 408 - 413.
- Maixner M. (2005): Risks posed by the spread and dissemination of grapevine pathogens and their vectors. In: Introduction and Spread of Invasive Species. International Symposium on Plant Protection & Plant Health in Europe. In: Plant Protection and Plant Health in Europe: Introduction and Spread of Invasive Species, Symposium Proceedings No. 81, The British Crop Production Council, Alton, Hampshire, UK, pp 141 - 146.
<http://www.bba.de/mitteil/presse/invspecies/artklimawandel.pdf>.
- Martelli G. P.(2003): Graft-Transmissible Diseases of Grapevines: Handbook for Detection and Diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome – Italy, 2003.
- Martelli G.P., Boudon-Padieu E. (2006): Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. Options Méditerranéennes, Série B: N.55, p.297.
- Martelli G.P., Caudwell A. (1993): Grapevine yellows. In: Martelli G.P. (Ed.), Grafttransmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Publication Division, Rome. pp. 103 - 105.

- Martini M., Murari E., Mori N., Bertaccini A. (1999): Identification and epidemic distribution of two *Flavescence dorée* - related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease* 83, 925 - 930.
- Marzachi C., Verati F., Bosco D. (1998): Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Ann. Appl. Biol.* 133: 45 - 54.
- McCoy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen T.-A., Chiykowski L.N., Cousin M.T., Dale J.L., DeLeeuw G.T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwithz R., Petzold H., Sinha R.C., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M. and Seemuller E. (1989): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In *The mycoplasmas*, vol. 5. pp. 546 - 640. Edited by R. F. Whitcomb and J. G. Tully, New York: Academic Press.
- Mihajlović Lj. (2007): *Metcalfa pruinosa* (Say)(Homoptera: Auchenorrhyncha) nova štetna vrsta za entomofaunu Srbije. *Glasnik šumarskog fakulteta*, 95, str. 127 - 134.
- Milićević J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Redingaugh G.M., Pratt C.R., Gingery E.R., Hogenhout A.S., Toševski I. (2006): Crvenilo kukuruza: *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) vektor Stolbur fitoplazme na kukuruzu u Srbiji. VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 27.11.-01.12.2006., zbornik rezimea, 39 - 40.
- Milosavljević M. (1969): Opšte vinogradarstvo. Poljoprivredni fakultet, Beograd – Zemun.
- Milosavljević M. (1998): Biotehnika vinove loze. Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija, Beograd.
- Mitrović M., Milićević J., Cvrković T., Krnjajić S., Borgo M., Angelini E., Toševski I. (2006): Detekcija fitoplazme zlatastog žutila vinove loze *Flavescence dorée* u populacijama pavitine *Clematis vitalba* (Vitaceae) u Srbiji. VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 27.11.-01.12.2006., Zbornik rezimea, 106 - 107.
- Murral D.J., Nault L.R., Hoy C.W., Madden L.V., Miller S.A. (1996): Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 1223 - 32.
- Nagaich B.B., Puri B.K., Sinha R.C., Dhingra M.K., Bhardwaj V.P. (1974): Mycoplasma-like organisms in plants affected with purple top-roll, marginal flavescence and witches' broom diseases of potatoes. *Phytopathol. Z.* 81:273 - 379.
- Nakashima K., Hayashi T. (1995): Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 451 - 455.
- Nault L.R., Ammar D. (1989): Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Entomol.* 34: 503 - 529.
- Nestel D., Klein M. (1995): Geostatistical analysis of leafhopper (Homoptera: Cicadellidae)

- colonization and spread in deciduous orchards. *Environmental Entomology*, 24, 1032 - 1039.
- Nielson M W. (1979): Taxonomic relationships of leafhopper vectors of plant pathogens. Leafhopper vectors mid plant disease agents. Eds K Maramorosch and K F Harris. New York: Academic Press.
- OEPP/EPPO (2002): Pest risk analysis, PM 5/2 (revised), Bulletin 32, 231–233.
- Oliveira C., Spotti Lopez J. (2000): Parasitoides de ovos da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), em Piracicaba. *Rev. Agric.* 75:263 - 270.
- Padovan A.C., Gibb K.S., Bertaccini A., Vibio M., Bonfiglioli R.E., Magarey P.A., Sears B.B. (1995): Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasmas and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 25 - 31.
- Pilkington L., Gurr G.M., Fletcher M.Y., Nikandrow A., Elliott E. (2004): Vector status of three leafhopper species for Australian lucerne yellows phytoplasma. *Aust. J. Entomol.* 43:366 - 373.
- Power A.G. (1992): Host plant dispersion, leafhopper movement and disease transmission. *Ecological Entomology*, 17, 63 - 68.
- Projekat TITANUS (2004-2006): Proučavanje i suzbijanje *Scaphoideus titanus* vektora fitoplazme vinove loze *Flavescence dorée*. www.chem.bg.ac.yu/~mario/scaphoideus/
- Purcell A.H. (1982): Insect vector relationships with prokaryotic plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20: 397 - 417.
- Purcell A.H. (1989): Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: *Advances in disease vector research*, Springer-Verlag, New York, USA, Vol. 6, pp. 243 - 266.
- Quacquarelli A., Barba M. (1992): *Flavescence dorée* and other yellows of grapevine in EEC Countries. In: Martelli G.P. (Editor), *Grapevine Viruses and Certification in EEC Countries, State of the Art. Quaderno No 3*, Istituto Agronomico Mediterraneo, Bari, Italy. 41 - 47.
- Quartau J.A., Guimaraes J.M., André G. (2001): On the occurrence in Portugal of the Nearctic *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera, Cicadellidae), the natural vector of the grapevine "Flavescence dorée" (FD). *IOBC/WPRS Bulletin, Proceedings of the meeting at Ponte de Lima (Portugal), 3 - 7 March, 2000. Vol. 24 (7), 2001, 273.*
- Refatti E., Osler R., Carraro L., Pavan F. (1992): Natural spread of a *Flavescence dorée*-like disease in north-east Italy. *Proceedings of the 10th Meeting of ICVG. Volos, Greece.*
- Republički zavod za statistiku Srbije (2006): Statistički godišnjak Srbije 2006.

- Salehi M., Izadpanah K., Nejat N., Siampour M. (2007): Partial characterization of phytoplasmas associated with lettuce and wild lettuce phyllodies in Iran. *Plant Pathology*, Vol. 56 (4), 669 - 676.
- Schvester D., Carle P., Moutous G. (1961): Sur la transmission de la *Flavescence dorée* des vignes par une cicadelle. *C.R. Acad. Agri.*, 47: 1021 - 1024.
- Schvester D., Carle P., Moutous G. (1963): Transmission de la *Flavescence dorée* de la vigne par *Scaphoideus titanus* Ball. *Ann. Epiphytes* 14, 175 - 198.
- Schvester D., Carle P., Moutous G. (1969): Nouvelles données sur la transmission de la *Flavescence dorée* de la vigne par *Scaphoideus littoralis*. Ball. *Ann. zool. ecol. anim.*, 1: 445 - 465.
- Schvester D., Moutous G., Bonfils J., Carle P. (1962): Etude biologique des cicadelles de la vigne dans le sud-ouest de la France. *Annales des Epiphyties* 13: 205 - 237.
- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A, Göschl M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80: 3 - 26.
- Seljak G. (1985): Cikada *Scaphoideus titanus* Ball (=S. *littoralis* Ball) u primorskom vinogradarskom rajonu zapadne Slovenije. *Glasnik zaštite bilja* VIII (2): 33 - 37.
- Seljak G. (1987): *Scaphoideus titanus* Ball (=S. *littoralis* Ball), novi štetnik vinove loze u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* Vol. 38 (4), 182: 349 - 357.
- Službeni glasnik br. 114 (2005): Naredba o izmeni Naredbe o proglašenju područja zaraženim karantinski štetnim organizmom uzročnika zlatastog žutila vinove loze (*Flavescence dorée*) i o preduzimanju mera njenog suzbijanja.
- Službeni glasnik br. 25 (2005): Naredba o proglašenju područja zaraženim karantinski štetnim organizmom uzročnika zlatastog žutila vinove loze (*Flavescence dorée*) i o preduzimanju mera njenog suzbijanja.
- Službeni glasnik br.48 (2005): Naredba o izmeni i dopuni Naredbe o proglašenju područja zaraženim karantinski štetnim organizmom uzročnika zlatastog žutila vinove loze (*Flavescence dorée*) i o preduzimanju mera njenog suzbijanja.
- Smart C.D., Schneider B., Blomquist C. L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K.H., Seemüller E., Kirckpatrick B.C. (1996): Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1988 - 1993.
- Sorensen J.T., Campbell B.C., Gill R.J., Steffen-Campbell J.D. (1995): Non-monophyly of Auchenorrhyncha (Homoptera), based upon 18S rDNA phylogeny: eco-evolutionary and cladistic implications within pre-heteropterodea Hemiptera (s.l.) and a proposal for new monophyletic suborders. *Pan-Pacific Entomologist*, 71 (1): 31-60.

- Steffek R, Reisenzein H, Zeisner N (2007) Analysis of the pest risk from Grapevine. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 37(1), 191 - 203.
- Strapazzon A.; Girolami V. (1985) Aspects of phylloxera infestation (*Viteus vitifoliae* (Fitch)) on European vines. Atti XIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia sotto gli auspici dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, della Societa Entomologica Italiana e della International Union of Biological Sciences, 1985, pp. 633 - 641.
- Strapazzon A.; Girolami V.; Guarnieri C. (1986) Leaf infestation of grafted *Vitis vinifera* (L.) by phylloxera (*Viteus vitifoliae* (Fitch)): injuries. Atti Giornate Fitopatologiche No. 1, pp. 225 - 229.
- Šutić D. (1995): Viroze biljaka. Nolit. Beograd.
- Swenson K. (1971): Relation of age, sex and mating of *Macrosteles fascifrons* to transmission of aster yellows. Phytopathology, 61: 657 - 659.
- Taylor L.R. (1974): Insect migration, flight periodicity and the boundary layer. Journal of Animal Ecology, 43, 225 - 238.
- Taylor L.R. (1985): Migratory behaviour in the Auchenorrhyncha. The Leafhoppers and Planthoppers (ed. by L. R. Nault and J. G. Rodriguez), pp. 259–288. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Tedeschi R., Bosco D., Alma A.. (2002): Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. J. Econ. Entomol. 95: 544 - 551.
- Todd J.L., Harris M.O., Nault L.R. (1990): Importance of color stimuli in host-finding by *Dalbulus leafhoppers*. Entomol. Exp. Appl. 54: 245 - 250
- Tomkins A.R., Wilson D.J., Thomson C., Allison P. (2000): Dispersal by passionvine hopper (*Scolypopa australis*) adults. New Zealand Plant Protection, 53, 185 - 189.
- Torres E., Botti S., Rahola J., Martin M.P., Bertaccini A. (2005): Grapevine yellows diseases in Spain: Eight year survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasmas involved. Anales del Jardin Botanico de Madrid 62 (2), 127 - 133.
- Trivellone V., Pinzauti F., Bagnoli B. (2005): *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha: Cixiidae) as a possible vector of Stolbur – Phytoplasma in a vineyard in Tuscany, Redia 88, 103 - 108.
- Vanda A.P., Sechi, Aimone T.S., Garau G., Botti R.S, Bertaccini A.(2006): New findings on phytoplasmas-affected Auchenorrhyncha populations in Sardinian vineyards. Environment Identities and Mediterranean Area, ISEIMA 2006, 622 - 624.
- Varga K., Kölber M., Martini M., Pondrelli M., Ember I., Tökés G., Lázár J., Mikulás J., Papp E., Szendrey G., Schweigert Á., Bertaccini A. (2000): Phytoplasma identification in

- Hungarian grapevines by two nested-PCR systems. 13th Meeting ICVG. Extended abstracts, 113-115.
- Vega F.E., Davis R.E., Barbosa P., Dally E.L., Purcell A.H., Lee I.-M. (1993): Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83: 621 - 624.
- Vega F.E., Davis R.E., Dally E.L., Barbosa P., Purcell A.H., Lee I.-M. (1994): Use of a biotinylated DNA probe for detection of the aster yellows mycoplasma-like organism in *Dalbulus maidis* and *Macrostelus fascifrons* (Homoptera: Cicadellidae). *Fla. Entomol.* 77 (3): 330 - 334.
- Vidano C. (1964): Scoperta in Italia dello *Scaphoideus littoralis* Ball Cicalina americana collegata alla 'Flavescence dorée' della Vite. *L'Italia Agricola* 101: 1031 - 1049.
- Von Dohlen C., Moran N.A. (1995): Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon. *J. Mol. Evol.* 41: 211-223.
- Weintraub P.G., Beanland L. (2006): Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91 - 111.
- Weintraub P.G., Orenstein S. (2004): Potential leafhopper vectors of phytoplasma in carrots. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 24:228 - 235.
- Wikipedia (2008): Auchenorrhyncha. <http://en.wikipedia.org/wiki/Auchenorrhyncha>
- Wilson S.W., Lucchi A., (2007): Feeding activity of the flatid planthopper *Metcalfa pruinosa* (Hemiptera: Fulgoroidea). *Journal of the Kansas Entomological Society* 80(2): 175 - 178.
- Wolf T., 2004: Vector Studies of North American Grapevine Yellows, <http://www.nysaes.cornell.edu/pubs/vitcon/pdf/wolf01.pdf>
- Zeisner N. (2005): Amerikanische Zikaden im Anflug. *Der Winzer*, 61(5), 20 - 21.
- Zhang J., Hogenhout S.A., Nault L.R., Hoy C.W., Miller S.A. (2004): Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. *Phytopathology* 94:842 - 849.
- Zorloni A. (2007): Malattie della vite - Cicalina Bufalo. www.tigulliovino.it/malattie/malattie_cicalina_bufalo.htm

BIOGRAFIJA MR. SLOBODANA B. KRNJAJIĆA

Mr. Slobodan B. Krnjajić, istraživač saradnik u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, rođen je 14. februara 1961. godine u Zemunu.

Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Zemunu.

Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, upisao je 1979/80 školske godine, a završio je 30.04.1985. godine sa prosečnom ocenom 8,54; diplomski rad 10 (deset).

U Institutu za zaštitu bilja u Beogradu radio je od 1986. do 1997. godine na mestu istraživača. Od 1997. do 2003. godine radi u Centru za pesticide i zaštitu životne sredine u Zemunu na mestu istraživača. a od 08.05.2003. godine na mestu istraživača saradnika. Od 01.02.2004. godine u Institutu za zaštitu životne sredine kao istraživač saradnik i šef Odseka za štetočine bilja u Zemunu.

Na poslediplomske studije iz Entomologije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu upisan je 1990/91. godine.

Magistarski radi pod nazivom: "Dinamika populacija jajnih parazitoida kupusne sovice (*Mamestra brassicae* L.) sa posebnim osvrtom na mogućnost primene *Trichogramma evanescens* Westwood u suzbijanju štetočina iz reda *Lepidoptera*" odbranjen 14. marta 2003. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu.

U toku 1988. godine boravio je u Boyce Thompson Institute i Cornell University, Ithaca, New York, U.S.A.

Učestvovao je na 13 međunarodnih i 32 domaća skupa. Objavio kao koautor jednu knjigu i objavio ili saopštio na domaćim i međunarodnim skupovima i časopisima 95 radova.

Učestvovao je na realizaciji 4 međunarodna i 12 domaćih naučno-istraživačkih projekata, a bio je rukovodilac 3 domaća projekta.



Slika 13 . Ovipozicija ženke *S. titanus*



Slika 14. Jaja *S. titanus* položena ispod kore



Slika 15. Larva L₁ *S. titanus*



Slika 16. Larva L₂ *S. titanus*



Slika 17. Larva L₃ *S. titanus*



Slika 18. Larva L₄ *S. titanus*



Slika 19. Larva L₅ *S. titanus*



Slika 20. Imago *S. titanus*



Slika 28. *Cixius wagneri*



Slika 29. *Cixius similis*



Slika 30. *Reptalus panzeri*



Slika 31. *Reptalus quinquecostatus*



Slika 32. *Reptalus cuspidatus*



Slika 33. *Platymetopius major*



Slika 34. *Asiraca clavicornis*



Slika 35. *Dicranotropis hamata*



Slika 36. *Laodelphax striatella*



Slika 37. *Dictyophara europaea*



Slika 38. *Stictocephala bisonia*



Slika 39. *Issus coleoptratus*



Slika 40. *Philaenus spumarius* (tamnija i svetlija forma)



Slika 41. *Aphrophora alni*



Slika 42. *Cicadella viridis*



Slika 43. *Fieberiella septentrionalis* (imago)



Slika 44. *Fieberiella septentrionalis* (larva)



Slika 45. *Anaceratagallia ribauti*



Slika 46. *Jassargus obtusivalvis*



Slika 47. *Errastunus ocellaris*



Slika 48. *Neolaliturus fenestratus*



Slika 49. *Mocycdia crocea*



Slika 50. *Psammotettix alienus*



Slika 51. *Psammotettix confinis*



Slika 52. *Euscelis incisus*



Slika 53. *Euscelis distinguendus*