

FITOPLAZMOZE LEKOVITIH BILJAKA

MIRA STAROVIĆ¹, SNEŽANA PAVLOVIĆ², SAŠA STOJANOVIĆ¹, DRAGANA JOŠIĆ³

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

² Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd

³Institut za zemljište, Beograd

REZIME

Lečenje lekovitim biljem staro je koliko i čovečanstvo. Čak i danas, lečenje biljem ima svoju primenu i neprestano se razvija. Lekovite biljke predstavljaju skupoceno blago prirode kao sirovina za lečenje, kao hrana i predmet trgovine. U oblasti proučavanja prirodnih lekovitih sirovina postignuti su, do sada, veoma značajni rezultati, koji su uticali na povećanje interesovanja njihovog korišćenja u proizvodnji lekova. Gotovo da nema oblasti u savremenoj terapiji gde fitofarmaka nema primenu. Fitoterapija u širem smislu reci podrazumeva terapiju svim preparatima na bazi bilja. To mogu biti razni ekstraktivni preparati ili drugi galenski oblici definisanog sastava: kapsule, tablete, masti, sirupi i dr. Zastupljenost vrsta lekovitog bilja u Srbiji čini oko 700 vrsta, što predstavlja preko 19 % od ukupne flore Srbije. Zvanično je registrovano oko 420 vrsta lekovitog bilja, a u prometu se nalazi oko 300 vrsta, od kojih najveći deo raste spontano u prirodi, a manji broj se gaji plantažno. Vrednost proizvodnje lekovitog i aromatičnog bilja procenjuje se na oko sedam miliona, a izvoz na oko četiri miliona dolara. Raznovrsnost, brojnost i sve veći ekonomski značaj lekovitih biljaka, nameće potrebu proučavanja njihovih bolesti, među kojima fitopatogene gljive zauzimaju značajno mesto, a poslednjih desetak godina sve veći značaj preuzimaju fitoplazmoze. Fitoplazme su obligatni intracelularni mikroorganizmi koji nastanjuju floem i to ćelije sitastih cevi različitih biljnih vrsta. U prirodi ih prenose insekti, vektori iz grupe cikada na perzistentan način. Fitoplazme su uglavnom okruglastog, ali promenljivog oblika i veličine (50-1000 nm u prečniku), koja im omogućava prolaz kroz sitaste ploče floema. Vidljive su pod elektronskim mikroskopom. Predstavljaju najsitnije prokariotske mikroorganizme, bez ćelijskog zida, a obavijene su oмотаčem, po čemu se i razlikuju od bakterija. Sadrže ribosome sa ribonukleinskim kiselinama i dvospiralnu dezoksiribonukleinsku kiselinu. Imaju najmanji genom, koji je poznat, kod prokariotskih organizama (680-1600 kb). Ni jedna fitoplazma nije, do sada, odgajena kao čista kultura na veštačkoj podlozi, pa je zbog toga njihova identifikacija još uvek nesigurna i neprihvaćena. Najviše citiran i široko prihvaćen je sistem na osnovu sličnosti u sekvencama njihovog 16S ribozomalnog gena i bioloških osobina. Fitoplazmoze karakteriše niz patoloških promena, a mogu se ispoljiti kroz četiri tipična tipa simptoma: (1) filodija, (2) žutilo i crvenilo, (3) ozelenjavanje ili virescencija i (4) proliferacije vršnih pupoljaka ili „veštičine megle“. Na lekovitim vrstama u Srbiji tipični fitoplazmozni simptomi utvrđeni su na: *Ehinacea purpurea*, *E. Angustifolia*, *Hypericum perforatum*, *H. barbatum*, *Plantago major*, *Saponaria officinalis*, *Digitalis purpurea*, *Origanum vulgare*, *Levisticum officinale*, *Carum carvi*, *Trigonella foenum greacum*, *Melisa officinalis*, *Petroselinum sativum*, *Apium graveolens*, *Valeriana officinalis*, *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus*, *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Cichorium intybus*, *Salix alba* i *Chamomilla recutita*. Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je prisustvo fitoplazmi u 5 vrsta lekovitih biljaka, a u ostalim vrstama primenom tehnika molekularne identifikacije. Dve vrste fitoplazmi su utvrđene na lekovitim biljkama u Srbiji: Stolbur fitoplazma (16SrXII grupa) i Clover yellow edge (16SrIII-B), na više od dvadeset vrsta lekovitih biljaka. Podaci o kvantitativnim i kvalitativnim promenama sekundarnih metabolita fitoplazmozni lekovitih biljaka su oskudni, pa ih treba podspešiti.

Ključne reči: fitoplazmoze, lekovito bilje, simptomi, identifikacija

UVOD

Lečenje lekovitim biljem staro je koliko i čovečanstvo. Čak i danas, lečenje biljem ima svoju primenu i neprestano se razvija. Lekovite biljke predstavljaju skupoceno blago prirode kao sirovina za lečenje, kao hrana i predmet trgovine (Amidžić i sar., 1999).

Od 250.000 viših biljaka na zemlji, preko 80.000 su lekovite. Lekovi se dobijaju ili iz cele biljke, ili iz različitih oragana (lišća, stabljika, kora, koren, cvet, seme). U Srbiji raste veliki broj različitih biljnih vrsta sa lekovitim svojstvima, koje pripadaju grupi ekonomski najznačajnijih biljaka i čine 19 % vrsta ukupne flore Srbije (Sarić i sa., 1989).

Lekovite biljke treba da budu bez prisustva mikroorganizma generalno, a naročito gljiva, jer u većini slučajeva gljive zaražavaju lišće, što direktno utiče na fotosintezu reducirajući produktivnost i formiranje sekundarnih metabolita (Singh i Dubey, 2012).

Bolesti lekovitih biljaka koje prouzrokuju patogeni mikroorganizmi mnogo su manje proučavane u odnosu na bolesti gajenih biljaka. Najviše podataka je vezano za gljive, mali broj odnosi se na viruse, dok o bakterijama kao prouzrokovateljima bolesti lekovitih biljaka skoro da nema podataka. Od pre petnaestak godina počinju istraživanja fitoplazmi kao prouzrokovaca bolesti lekovitih biljaka.

FITOPLAZMOZE: ISTORIJAT, GRADA, PRENOŠENJE, SIMPTOMI I EKONOMSKI ZNAČAJ

Fitoplazme prouzrokuju bolesti na više od 200 različitih vrsta voćaka, vinove loze i brojnih jednogodišnjih i višegodišnjih zeljastih biljaka. Domaćini fitoplazmi mogu biti široko zastupljene korovske i lekovite vrste, koje su i najčešći izvori zaraze (Lee i sar., 2000; Martelli i Boudon-Padieu, 2006). Bolesti koje fitoplazme uzrokuju (fitoplazmoze) su raširene širom sveta, često u epidemijском obimu i od karantinskog su značaja.

Prvi podaci o fitoplazmama potiču iz 1967. godine, kada su nazvane »mikoplazmama slični organizmi« (MLO), a opisane su kao prouzrokovatelj biljnih bolesti, za koje se smatralo da su virozne prirode (Doi i sar., 1967; Ishiie i sar., 1967; Nasu i sar., 1967). I MLO i mikoplazme pripadaju klasi *Mollicutes* (Razin i Tully, 1975). Termin »fitoplazma« je postao ime roda tek 1997. godine, kao patogen biljaka u privremenom taksonomskom statusu *Candidatus* (Firrao, 2004).

Fitoplazme su obligatni intracelularni mikroorganizmi koji nastanjuju floem i to ćelije

sitastih cevi različitih biljnih vrsta. U prirodi ih prenose insekti, vektori iz grupe cikada na perzistentan način (Lefol i sar., 1994). Fitoplazme su uglavnom okruglastog, ali promenljivog oblika i veličine (50-1000 nm u prečniku), koja im omogućava prolaz kroz sitaste ploče floema. Vidljive su pod elektronskim mikroskopom. Predstavljaju najsitnije prokariotske mikroorganizme, bez ćelijskog zida, a obavijene su omotačem, po čemu se i razlikuju od bakterija (Šutić, 1995). Imaju najmanji genom, koji je poznat, kod prokariotskih organizama (680-1600 kb). Međutim, i pored toga, njihov genom je nedovoljno poznat, jer fitoplazme nemaju sposobnost razvoja na hranljivim podlogama. Ovi organizmi, upravo zbog tako malog genoma, nemaju potrebne komponente za sintezu jedinjenja neophodnih za opstanak, pa ih koriste od domaćina, biljaka ili insekata (Bai i sar., 2006). Ni jedna fitoplazma nije, do sada, odgajena kao čista kultura na veštačkoj podlozi, pa je zbog toga njihova identifikacija još uvek nesigurna i neprihvaćena. Najviše citiran i široko prihvaćen je sistem na osnovu sličnosti u sekvencama njihovog 16S ribozomalnog gena i bioloških osobina (Boudon-Padieu, 2005).

Fitoplazme se kreću u sitastim ćelijama kroz pore sitastih ploča nošene strujanjem biljnih sokova. Kretanje fitoplazmi je sporo, a njihova distribucija u biljci je neravnomerna (Martelli i Boudon-Padieu, 2006). Prisustvo fitoplazmi utvrđeno je i u cvetnim delovima, plodu, semenu, dok u meristemskom tkivu nisu nikad nađene (Pracros i sar., 2006).

Vektori fitoplazmi su insekti iz reda *Homoptera* (serija *Auchenorrhyncha*), uglavnom cikade iz familija *Cicadellidae*, *Fulgoridae* i *Psyllidae*, hraneći se u tkivu floema inficiranih biljaka, u čijim se sitastim ćelijama nalaze u najvišoj koncentraciji. Fitoplazme su perzistentne u vektorima, ali se ne prenose na potomstvo inficiranjem gravidnih ženki ili se to dešava vrlo retko (Martelli i Boudon-Padieu, 2006). Period od usvajanja fitoplazmi do postizanja infektivnog titra naziva se latentnim periodom, on može trajati od nekoliko časova do nekoliko nedelja i za brojne odnose insekt - fitoplazma nije tačno utvrđen (Bertaccini, 2007). Vektori fitoplazmi mogu biti mono ili polifagni, što uslovljava i potencijalni krug domaćina patogena koga prenose.

Dve vrste fitoplazmi koje su utvrđene na lekovitim biljkama u Srbiji: Stolbur fitoplazma (16SrXII grupa) i Clover yellow edge (16SrIII-B) prenosi u prirodi veći broj vektora. U Evropi je od 12 poznatih vrsta vektora Stolbur fitoplazme - 16Sr-

XII grupa (COST Action FA0807, 2012), dokazano u Srbiji prisustvo *Macrosteles laevis* (Duduk i sar., 2008), *Reptalus panzeri*, *R. quinquecostatus* (Jović i sar., 2009), *Anaceratagallia ribauti* (Drobnjaković i sar., 2009) i *Hyalesthes obsoletus* (Cvrković, 2009) i 5 vrsta vektora fitoplazme Clover yellow edge - 16SrIII-B, dokazano u Srbiji prisustvo samo *Macrosteles laevis* (Duduk i sar., 2008).

Vilina kosica (*Cuscuta* sp.) može preneti fitoplazme sa zaraženih na zdrave biljke (Raju i sar., 1983; Marcone i sar., 1999). U eksperimentalnim uslovima je potvrđeno prenošenje više vrsta fitoplazmi ovim vektorom. Novija istraživanja ukazuju na mogućnost prenošenja fitoplazmi semenom i to u slučaju žutog sušenja kokosa (Cordova i sar., 2003), kao i fitoplazmi iz ribozomalnih grupa 16SrI, 16SrII i 16SrXII semenom limuna i paradajza (Khan i sar., 2002, Batti i Bertaccini, 2006). Značajan i rasprostranjen način širenja fitoplazmi je i putem kalemljenja inficiranih biljaka na zdrave kod vegetativnog razmnožavanja vinove loze i voćaka.

Prisustvo različitih fitoplazmi, do sada, je u svetu dokazano u gajenim vrstama lekovitih biljaka: *Galega officinalis* L., *Digitalis lutea* L., *Hyssopus officinalis* L., *Parietaria officinalis* L., *Tagetes patula* L., *Spartium junceum* L., *Vinca rosea* L. (Lee i sar., 2000; Lawson i Hsu, 2006). Ash Yellow fitoplazma je dokazana na *Hypericum perforatum* L. (Bruni i sar., 2005), »*Candidatus Phytoplasma asteris*« na *Plantago lanceolata* (Franova i Simkova, 2009a), fitoplazma iz Aster Yellow grupe na *Plantago major* (Borth i sar., 2006), *Marticularia perforata* L. (Khadhair i sar., 1998), *Echinacea purpurea* (Hwang i sar., 1997, Stanosz i sar., 1997, Radisek i sar., 2008, Franova i sar., 2009b), *Valeriana officinale* (Khadhair i sar., 2008), *Tagetes erecta* (Rojas-Martínez 2003). Fitoplazma Stolbur tipa potvrđena je na *Plantago lanceolata*, *Taraxacum officinale*, *Mentha arvensis*, *Malva sylvestris*, *Salix alba* (Credi i sar., 2006). Wu i saradnici (2011) su utvrdili prisustvo dve vrste fitoplazmi iz Stolbur i iz Elm yellows grupe („*Candidatus Phytoplasma australiense*“) na *Senna surrattensis*. „*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*“ je nađena na *Plantago lanceolata* L. (Alhudaib i sar., 2009) i *Calendula officinalis* (Esmailzadeh-Hosseini i sar., 2011).

Na borovnici (*Vaccinium* spp.) je u Severnoj Americi dokazano prisustvo Blueberry stunt fitoplazme (Chen 1971, Hartman i sar., 1972; Tozzi i sar., 1993), zatim fitoplazme Cranberry false blossom (lažnocvetna fitoplazma) (Chen, 1971; Xu i Chen, 1996) i na kraju fitoplazme *Vaccinium witches' broom* (veštičije metle) u Evropi (Bos, 1960; Kegler i

sar., 1973), kao i fitoplazma X disease (Valiunas i sar., 2004). Na kupini su utvrđene X disease fitoplazma u Velikoj Britaniji (Davies, 2000), ali i Elm yellows fitoplazma u Severnoj Americi (Van der Meer 1987), Velikoj Britaniji (Davies 2000), Italiji (Vindimian i sar., 2004), Turskoj (Sertkaya i sar., 2004), kao i „*Candidatus Phytoplasma asteris*“ u Velikoj Britaniji (Reeder i sar., 2009) i Pakistanu (Fahmeed i sar., 2009).

Simptom crvenila na lekovitim biljkama, koji ukazuje na prisustvo fitoplazmi, u Srbiji je prvi put uočen početkom ovoga veka u plantažnim zasadima kantariona u lokalitetu Pančevo. Nakon nekoliko godina, ovaj simptom je primećen i na plantažama lekovitih biljaka kod brojnih kooperanata. Elektronskom mikroskopijom ultratanjih preseka lisnih nerava obolelih biljaka, kantariona, ehinacea, bokvice i selena, utvrđene su strukture, koje su po svom obliku i dimenzijama ukazivale na prisustvo fitoplazmi (Pavlović i sar., 2004a; 2004b; 2004c; 2005; 2010a; 2012a; Jošić i sar., 2012a). Ovo su bili prvi ohrabrujući rezultati, nakon kojih su usledila brojna, prvo terenska istraživanja prisustva i raširenosti simptoma (Pavlović i sar., 2004a), a zatim i laboratorijska (Jošić i sar., 2009; 2010a; 2012; 2013; 2014; Kuzmanović i sar., 2011; Pavlović i sar., 2004c; 2010a; 2010b; 2011; 2012b,c; d; 2014a; 2014b; Starović i sar., 2012; 2013) koja su bila ciljano usmerena na identifikaciju patogena.

Fitoplazmozni simptomi. Tip simptoma na obolelim biljkama zavisi od vrste domaćina, insekta vektora i uslova spoljašnje sredine. Filodija su tipičan simptom koji se manifestuje preobražavanjem delova cveta u lišće, kao posledica poremećaja normalnog nivoa regulatora rasta. Prisutan kod brojnih domaćina fitoplazmi tipa Stolbur i mnogi ga smatraju dijagnostičkim. On se manifestovao na *Echinacea purpurea* u lokalitetima Pančevo, Indija i Stara Pazova (Sl.1, 2, 3). Prva pojava filodija uočena je u fazi punog cvetanja, tokom jula u drugoj godini gajenja (Pavlović i sar., 2010a). Obolele biljke umesto generativnih organa cveta razvijaju listove (Sl. 24, 25, 26). Biljke ne plodonose, ne donose seme i potpuno su neupotrebljive za preradu i primenu.

Žutilo, crvenilo i uvijanje lišća su najrašireniji tipovi simptoma, prouzrokovani promenama u sintezi i transportu ugljenih hidrata i fotosinteze (Bertamini i Neduchezhain, 2001). Poremećaji u transportu ugljenih hidrata nastaju zbog prenamnoženih fitoplazmi u floemu, čime je onemogućeno kretanje sokova.

Žutilo i crvenilo su najrasprostranjeniji tip simptoma obolelih lekovitih biljaka kod nas i



Sl.1 *E. purpurea*: simptomi tipa filodija.
Fig.1. *E.purpurea*: phyllody symptom.



Sl.2. *E. purpurea*: simptomi filodija.
Fig. 2. *E.purpurea*: phyllody symptom.



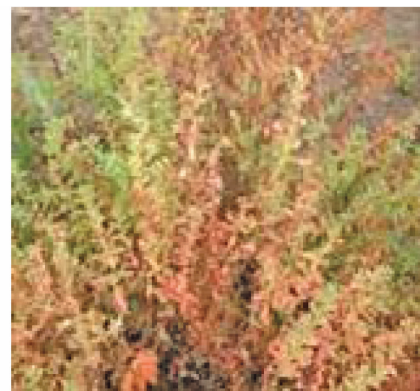
Sl.3. *E. purpurea*: simptomi filodije cvetovi.
Fig. 3. *E. purpurea*: flower phyllody.



Sl.4. *E. angustifolia*: intenzivnija pojava crvenila na listnim drškama i listovima.
Fig.4. *E. angustifolia*: reddening on the leaves.



Sl.5. *E. purpurea*: crvenilo lišća.
Fig.5. *E. purpurea*: reddening on the leaves.



Sl.6. *H.perforatum*: žuto-crvena obojenost lišća.
Fig. 6. *H.perforatum*: yellowing and reddening.



Sl.7. *H. barbatum*: intenzivno ispoljeno crvenilo lišća.
Fig. 7. *H. barbatum*: reddening on the leaves.



Sl.8. *P. major*: crvenilo i klobudžavost lišća, bez formiranja cvasti.
Fig. 8. *P. major*: reddening and leafroll of the leafes.



Sl. 9. *S. officinalis*: crvenilo cvetnih drški, deformacija i početna nekroza cvasti.
Fi.g 9. *S. officinalis*: reddening of the flower stalk.

registrovani su na velikom broju vrsta: ehinacei (*Echinacia angustifolia*) (Sl. 4), (*E. purpurea*) (Sl. 5), kantarionu (*Hypericum perforatum*) (Sl. 6), (*H. barbatum*) (Sl. 7), bokvici (*Plantago major*) (Sl. 8), sapunjači (*Saponaria officinalis*) (Sl. 9), naprsku (*Digitalis purpurea*), oreganu (*Origanum vulgare*) (Sl. 10), selenu (*Levisticum officinale*) (Sl. 11), kimu (*Carum carvi*), grčkom semenu (*Trigonella foenum greacum*), matičnjaku (*Melisa officinalis*) (Sl. 12), peršunu (*Petroselinum sativum*) (Sl. 13), celeru (*Apium graveolens*) i valerijani (*Valeriana officinalis*) (Sl. 14) u lokalitetima: Pančevo, Indija, Stara Pazova, Kovin i Vrdnik. Pojava hloroze lišća koje prelazi u blago, pa intezivno crvenilo zapažena je u zasadima kupine (*Rubus fruticosus*) u lokalitetima Sićevo, Tuleš i Ljubava (Sl. 15). U zasadima borovnice (*Vaccinium myrtillus*) u okolini Arandelovca, u drugoj godini gajenja, uočeni su slični simptomi (Sl. 16). Obolelo lišće se suši i opada, plodovi su gumozni, smežurani i komercijalno neupotrebljivi.

Ozelenjavanje (virescencija) je jedan tip metaplazmatskih transformacija tkiva u kojem se jedna vrsta ćelija preobraća u drugu, pri čemu novonastale ćelije u potpunosti menjaju svoju građu i funkciju. Prouzrokovali ozelenjavanja uzrokuju promene na čašičnim listićima, koji se izdužuju, međusobno srastaju i grade često nekoliko puta veću čašicu od normalne, zatvarajući unutrašnje delove cveta koji nastavljaju da se nepravilno razvijaju. Prašnici i tučak ozelenjavaju, umanjeni su i izobličeni, što dovodi do sterilnosti cvetova (Lee i sar., 2000). Istovremeno, ozelenjavanje se može smatrati i citohormonskom promenom, jer naročito citokinini, a mogu i drugi hormoni učestvovati u ozelenjavanju (virescenciji) nezelenih biljnih delova (Doi i sar., 1967). Fitoplazma stolbur tipa najčešće uzrokuje ovakve simptome izazivajući ozelenjavanje cvetova paradajza, duvana, jagode, maline, cvetno zelenilo suncokreta i dr. Simptom tipa ozelenjavanja cvetova uočen je na *Echinacea purpurea* kod koje krunični listići dobijaju, umesto ružičaste, intenzivno zelenu boju (Sl. 17). Oblik cveta je izmenjen i u slučaju jače zaraze i prašnici ozelenjavaju, a cvet u celini ne liči na cvet zdrave biljke (Sl. 18). Blago ozelenjavanja prašnika brđanke (*Arnica montana*), uočeno je u Nacionalnom parku „Tara“ i na planini Povlen (Sl. 19).

Proliferacije vršnih pupoljaka („veštičine metle“), su takođe čest i tipičan simptom, koji može ukazati na prisustvo fitoplazmi. Fitoplazme, kao prouzrokovali sistemskih zaraza, deluju na razvoj mladara pojačanom deobom njihovih ćelija i nenormalnim grananjem. Ovaj tip simptoma se

ispoljava usled gubljenja dominacije vršnog temenog pupoljka, zbog čega se razvija mnogo bočnih izdanaka koji podsećaju na „veštičine metle“. Ove simptome prati i netipična dužina internodija. Oboljenja koja se manifestuju proliferacijom ukazuju na hormonske poremećaje zaraženih biljaka, a najčešća su „veštičine metle“ trešnje, štira, metličavost lastara jabuke, stolbur poponca, metličavost bele deteline i dr. (Šutić, 1995, Musetti i sar., 2010).

Blagi simptomi proliferacije vršnih pupoljaka uočeni su kod brđanke (Sl. 20) na planinama Tara i Povlen.

Tipični simptomi proliferacije vršnih pupoljaka zapaženi su na nevenu (*Calendula officinalis*) (Sl. 21) u lokalitetu Pančevo. Bujna stimulacija cvetnih pupoljaka poprima izgled „veštijinih metli“ (Sl. 22).

Proliferacija stabla (Sl. 23) i cvetova (Sl. 24) primećena je na samoniklim biljkama vodopije (*Cichorium intybus*) u lokalitetu Obrenovac. Stabljika je deformisana, spljoštena, spiralno uvijena sa izdiferenciranim velikim brojem bočnih lisnih pupoljaka iz kojih izbijaju nitavi listići. Stablo je gumasto, cvet je izobličeni i poprima izgled lep-eze.

Tipični simptomi proliferacije vegetativnih pupoljaka i „veštičinih metli“ uočeni su na granama bele vrbe (*Salix alba*) u okolini Obrenovca i Beograda (Sl. 25). Ovi simptomi se ispoljavaju na cvastima, u vidu mnoštva novih blede crvenih, izduženih kruničnih listića, tako da ne podsećaju na cvasti zdravih biljaka (Sl. 26).

Simptomi proliferacije cvetova primećeni su na kamilici (*Marticaia chamomilla*) u lokalitetu Pančevo (Sl. 27, 28). Cvetne glavice su deformisane sa mnoštvom novoizdiferenciranih glavica na njima. One su nekoliko puta većih dimenzija i izobličene su u odnosu na zdrave biljke. Krunični listići zaostaju u razvoju. Promene na obolelim biljkama nisu vidljive do faze punog cvetanja.

Fitoplazme, takođe mogu izazvati pojavu brojnih atipičnih simptoma, koje se najčešće pripisuju reakciji biljke na ekstremne uslove spoljašnje sredine (stres).

Ekonomski značaj. Hemijski sastav sekundarnih metabolita lekovitih biljaka značajno je promenjen usled prisustva fitoplazmi (Bruni i saradnici, 2005). Utoliko su fitoplazme štetniji mikroorganizmi za lekovite biljke od svih drugih, jer pored značajnog smanjenja prinosa – koji je zajednički ekonomski pokazatelj štetnosti patogena, promena hemijskog sastava sekundarnih metabolita, dovodi do smanjenja ili gubljenja le-



Sl. 10. *O. vulgare*: crvenilo lišća.
Fig. 10. *O. vulgare*: reddening of the leaves.



Sl. 11. *L. officinale*: intenzivnija hloroza i crvenilo lišća.
Fig. 11. *L. officinale*: chlorosis and reddening of the leaves.



Sl. 12. *M. officinalis*: crvenilo lišća.
Fig. 12. *M. officinalis*: reddening of the leaves.



Sl. 13. *P. sativum*: biljke po rastućem stepenu intenziteta simptoma crvenila.
Fig. 13. *P. sativum*: from left – growing level of symptoms intensity.



Sl. 14. *V. officinale*: žutilo i purpurno crvenilo lišća.
Fig. 14. *V. officinale*: yellowing and reddening of the leaves.



Sl. 15. *R. fruticosus*: crvenilo lišća, neujednačena dozrelost plodova.
Fig. 15. *R. fruticosus*: reddening of the leaves and uneven maturity of fruit.



Sl. 16. *V. myrtillus*: intenzivno crvenilo lišća.
Fig. 16. *V. myrtillus*: reddening of the leaves.

kovitih svojstava. Količina etarskog ulja dobijena iz kantariona (*Hypericum perforatum* L.) zaraženih fitoplazmom Stolbur tipa, smanjena je i do 50% u poređenju sa zdravim biljkama gajenim u istim uslovima (Bruni i Sacchetti, 2005). Bruni i saradnici (2005) su RH-HPLC analizom ekstrakta metanola, dokazali značajno smanjenje flavonoida u zaraženom kantarionu. Otporne biljke domaćini na fitoplazme, mogu razviti specifične varijacije metabolizma u izmenjenim tkivima inhibirajući put biosinteze flavonoida na račun povećanja biosinteze kafeinske kiseline i cinaminskih derivata. Destilacijom nadzemnog dela zdravih i fitoplazmoznih biljaka kantariona dobijeno je iz zaraženih biljaka 7 puta manja količina etarskog ulja. U zaraženom uzorku pokazano je niže prisustvo monoterpeneske frakcije, za 52.35%, ali više prisustvo seskviterpena za 12,7%. Promene β -karioflena (+15,5%), β -elemena (+15,7) i germacrema D (+12,1), bile su evidentne. Slične podatke, ovi autori, dobili su i iz

fitoplazmозnih biljaka lavande. Navedeni podaci o promenama hemijskog sastava sekundarnih metabolita na primeru ove dve biljke, autori dovode u vezu sa nedostatkom adekvatnih hranljivih materija u cvetovima, zbog nefunkcionalnosti sprovodnih sudova.

Podaci o promeni hemijskog sastava sekundarnih metabolita obolelih lekovitih biljaka, vrlo su oskudni, a njihova istraživanja nedovoljna i u svetu i kod nas, pa ih je potrebno podstaknuti.

IDENTIFIKACIJA FITOPLAZMI

U detekciji fitoplazmi koriste se različite laboratorijske metode. Vrlo zastupljene su serološke reakcije, kao što su ELISA i Western-blot test, uz primenu poliklonskih i monoklonskih antitela proizvedenih na različite fitoplazme (Lee i sar., 1992), kao i na fitoplazme prouzrokovaoče zlatastog žutila (*flavescence dorée*) i Stolbur fitoplazme (Fos i sar., 1992). Međutim, i pored visoke specifičnosti antitela, serologija omogućava vrlo ograničene informacije o međuosobnim odnosima fitoplazma-biljka domaćin.

Na lekovitim vrstama u Srbiji tipični fitoplazmozni simptomi utvrđeni su na: dve vrste ehinacea i kantariona, bokvici, sapunjači, naprsku, oreganu (vranilovka), selenu, kimu, grčkom semenu, matičnjaku, peršunu, celeru, valerijani, kupini, borovnici, brđanki, nevenu, vodopiji, beloju vrbi i kamilici. Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je prisustvo fitoplazmi u 5 vrsta lekovitih biljaka, a u ostalim vrstama primenom tehnika molekularne indentifikacije.

Transmisionoelektronska mikroskopska detekcija fitoplazmi

Elektronska mikroskopija ultratankih preseca obolelih biljnih tkiva, jedna je od metoda kojom je moguće dokazati prisustvo fitoplazmi u određenim tkivima. Ova metoda istovremeno omogućava i proučavanje njihovog oblika i građe, kao i promena koje one uslovljavaju u elementima floema (McCoy, 1979; Franova i sar., 2003; Iriti i sar., 2008; Lebsky i sar., 2010; Museti i sar., 2010, 2011).

Elektronska mikroskopija dokazala je ulogu parazitne cvetnice – viline kosice (*Cuscuta*) u prenošenju fitoplazmi, čineći vidljivim fitoplazme u njenim haustorijama (Lebsky i sar., 2010). Uz pomoć elektronske mikroskopije, naučno je potvrđen fenomen „oporavka“ – supresije simptoma fitoplazmозnih biljaka. Na ultratankim presecima obolelih, pa zatim oporavljenih biljaka jabuke, (Museti

i sar., 2010) i duvana (Lherminer i sar., 2003) dokazano je prisustvo i lokalizacija jona Ca^{2+} , agregacija floemskih proteina Pp i taloženja kaloze (specifično ugljenohidratno jedinjenje), koji se mogu naći i u zdravim ćelijama, gde predstavljaju prepreku za dalje širenje fitoplazmi zatvarajući plazmodezme između zaraženih i nezaraženih ćelija.

Na ultratankim presecima kroz lisne nerve obolele jabuke i vinove loze Museti i saradnici (2010, 2011), konstatovali su taloženje kaloze unutar sitastih ploča, a Iriti i saradnici (2008), nekroze ćelija pratilica. Ovi autori su utvrdili prisustvo enzima kalusne sintetaze u jabuci, koja sintetizuje floemski protein (Pp) koji stvara čepiće u porama sitastih cevi, omogućavajući kretanje biljnih asimilativa, a sprečavajući prolazak fitoplazmi u nove ćelije. Neravnomerna distribucija fitoplazmi u sitastim ćelijama upravo može da se objasni efektom sintetisanih proteina (Lebsky i sar., 2010). Ćelije inficirane fitoplazmama reaguju promenama protoplasta, imaju smanjenu vakuolu, a u citoplazmi se smanjuje broj ribozoma, mitohondrije su manje i imaju uvećane membrane u unutrašnjem prostoru, pomerajući se ka ćelijskom zidu ili jedru (Bertaccini i Marani, 1980). Često mitohondrije isčezavaju u ćelijama koje su zaražene fitoplazmama. Veličina hloroplasta se značajno smanjuje, a tilakoidi skoro nestaju. Navedene promene uslovljavaju i poremećaj propustljivosti u ćeliji i van nje, što dalje dovodi do promene turgora (unutrašnjeg pritiska) na kojem se zasniva koloidno stanje protoplasta i celine ćelijskih sastojaka. Dalje, promene u građi remete normalan promet energije, koji je u zdravim ćelijama na savršenom nivou. Patološke promene u ćelijama u direktnoj su proporciji sa brojem fitoplazmi u njima. Tako da ćelije sa manjim brojem fitoplazmi imaju nepromenjene protoplazmatične strukture u odnosu na zdrave biljke.

Početni materijal za elektronskomikroskopska istraživanja prikupljen je u lokalitetu Pančevo sa obolelih ehinacea, kantariona i selena. Uzorkovane su lisne peteljke i glavni lisni neravi sa po 2 vrste ehinacea (*Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*) i kantariona (*Hypericum perforatum*, *H. barbatum*) i selena (*Levisticum officinale*), koje su ispoljavale prisustvo fitoplazmозnih simptoma. Ultratanki preseci su nakon bojenja posmatrani na elektronskom mikroskopu pod uvećanjem od 6.000-22.000 puta.

Na ultratankim presecima pripremljenim iz zone sprovodnih sudova isečenih iz listova obolelih *Echinacea purpurea* (Sl. 29), *Echinacea angustifolia* (Sl. 30), (Pavlović i sar., 2004a,b,c; 2010a; 2011), selena (Sl. 31), kantariona – *H. perforatum* (Sl. 32)



Sl.17. *E. purpurea*: ozelenjavanje krunicnih listića – rana zaraza.

Fig. 17. *E. purpurea*: greening of the flowers – early infection.



Sl.18. *E. purpurea*: ozelenjavanje prašnika – kasna zaraza.

Fig. 18. *E. purpurea*: greening of the flowers – late infection.



Sl.19. *A. montana*: ozelenjavanje prašnika.

Fig. 19. *A. montana*: greening of the flower.

(Pavlović i sar., 2012b), utvrđeno je prisustvo tvorevina, koji po obliku, veličini i strukturi odgovaraju fitoplazmama. Kao što se na slikama može videti strukture su bez organizovanog i okruženog jedra sa ćelijskom organizacijom sličnom bakterijama, pleomorfnog oblika. Nemaju ćelijski zid, ali zato je vidljiva troslojna membrana. Dimenzije nađenih tvorevina, različite su i kreću se od 0,15 x 0,25 do 0,6 x 1,2 μm .

Elektronska mikroskopija ne može dati precizne odgovore o vrsti fitoplazme. Za dobijanje odgovora na pitanje kojim fitoplazmama su zaražene biljke, pribegava se primeni metoda molekularne biologije.

Molekularna detekcija i identifikacija fitoplazmi

Lančana reakcija polimeraze (Polimerase Chain Reaction - PCR) je najviše zastupljena tehnika koja se danas koristi u dokazivanju fitoplazmi (Lee i sar., 1992; Prince i sar., 1993; Bertaccini i sar., 1995; Alma i sar., 1996; Daire i sar., 1997; Marcone i sar., 1997; Seemuller i sar., 1998; Botti i Bertaccini, 2003...). Analiza dužine restrikcionih fragmenata - RFLP (restriction fragment length polymorphism) PCR-umnožene ribozomalne DNK je poslužila efikasnoj klasifikaciji fitoplazmi na molekularnoj osnovi (Lee et al., 1998), s obzirom da 16S rRNK geni kod prokariota sadrže konzervativne i varijabilne regione, što ih čini pogodnim za taksonomske studije. Važeća klasifikacija fitoplazmi je bazirana na RFLP i analizi sekvenci PCR-amplifikovane ribozomalne DNK (Seemuller i sar., 1998; Lee i sar., 1998, 2000). Dodatna karakterizacija fitoplazmi vrši se na osnovu PCR amplifikacije i obrade ne-ribozomalnih gena.

PCR metoda je omogućila lakšu i pouzdaniju detekciju fitoplazmi, jer njome može da se detektuje DNK u malom broju kopija (niskoj koncentraciji). Stalnim unapređenjem metodologije omogućeno je uspešno otkrivanje prisustva fitoplazmi i pri vrlo niskom stepenu infekcije biljaka, često i pre pojave simptoma. Razvijene su brojne metode za ekstrakciju DNK, uključujući proceduru "obogaćivanja" pre ekstrakcije DNK (Kirkpatrick i sar., 1987; Ahrens i Seemuller, 1992; Prince i sar., 1993; Daire i sar., 1992; Bertaccini i sar., 1995). Daire i sar. (1997) objavili su CTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) protokol, a njegovu modifikaciju predložili su Angelini i sar. (2001).

PCR amplifikacija delova genoma fitoplazmi

Amplifikacija ribozomalnih regiona DNK. Korišćenjem PCR metode odabranim prajmerima umnožava se DNK fitoplazmi i tako dobijen veliki broj kopija može se vizuelizirati. Dizajnirano je više setova prajmera pogodnih za umnožavanje delova genoma koji obuhvataju ribozomalne gene. Oligonukleotidne prajmere P1/P7, koje su dizajnirali Deng i Hiruki (1991) i Schneider i sar. (1997) koristili su brojni autori u direktnim PCR reakcijama za amplifikaciju fragmenata dužine 1.8 kb, a koji obuhvataju 16S rRNK gen, 16S–23S intergenski (spacer) region i 5' kraj 23S rRNK gena. Ovaj set prajmera korišćen je i pri detekciji fitoplazmi lekovitih biljaka poreklom iz Srbije: kupine (sl. 33a) (Kuzmanović i sar., 2011), kantariona (Pavlović i sar. 2012a), bokvice (Jošić i sar., 2012a) itd. U direktnim PCR reakcijama često se koristi kombinacija prajmera P1 (Deng and Hiruki, 1991) i 16S-SR (Lee i sar., 2004a), koja rezultira produktima veličine 1.5 kb. Iako prva kombinacija prajmera rezultira amplifikacijom ribozomalnih delova genoma ne samo fitoplazmi, već i drugih bakterijskih vrsta, brojni autori ove prajmere nazivaju "fitoplazma-univerzalnim" jer se mogu primeniti na sve vrste fitoplazmi. Drugi set prajmera je daleko specifičniji, pa je više korišćen u našim istraživanjima na lekovitim biljkama kao što su *ehinacea* (sl. 33b) (Pavlović i sar., 2011), *saponarija*, *selen*, *kim*, *brđanka*, *naprstak*, *vrba*, *vodopija* i *peršun*.

Direktnim PCR nije uvek moguće utvrditi prisustvo fitoplazmi u biljnom materijalu, pogotovu ako su koncentracije vrlo niske ili postoje materije koje ometaju PCR reakciju, što predstavlja čest slučaj kod lekovitih biljaka. Problem je prevaziđen korišćenjem nested (umetnutog) PCR, koji kao matricu koristi produkte direktnog PCR, što značajno povećava polazni broj željenih molekula za amplifikaciju. Ovakav metod daje odlične rezultate čak i u slučajevima kada se produkti direktnog PCR ne mogu vizuelizirati. Prajmere R16F2n/R16R2(R16F2n/R2), koji su korišćeni u taksonomskim istraživanjima za RFLP analizu i omogućili formiranje prihvaćene taksonomske šeme (Lee i sar., 1998), dizajnirali su Gundersen i Lee (1996). Ovi prajmeri se često koriste u nested PCR i amplifikuju 1.2 kb dug fragment 16S rRNK gena (sl. 33c) unutar regiona od 1.8 kb dobijenog amplifikacijom P1/P7 ili od 1.5 kb regiona posle amplifikacije prajmerima P1/16S-SR.

Amplifikacija *tuf* gena. Pored amplifikacije ribozomalnih gena i identifikacije fitoplazmi na osnovu njih, mogu se amplifikovati i brojni ne-ribozomalni geni, čijom analizom se dobijaju informativni

podaci za identifikaciju i molekularnu karakterizaciju fitoplazmi. Brojni geni sa izraženim konzervativnim sekvencama su korišćeni pri karakterizaciji fitoplazmi: ribozomalni proteinski (*rp-rpsC*, *rpl22*, *rps3*,...) geni, *seqY*, *recA*, *carA*, *vmp*, *map*, *degV*, *uvrB*... (Angelini i sar., 2001; 2003; Lee i sar., 2004b; Arnaud i sar., 2007). Na osnovu ne-ribozomalnih regiona dizajnirani su i specifični prajmeri za pojedine grupe fitoplazmi, na primer FD9 (Daire i sar., 1992; 1997) za FD fitoplazme, kao i STOL4 i STOL11 za Stolbur fitoplazme. Ovi setovi prajmera korišćeni su i za simultanu detekciju obe vrste fitoplazmi u istom uzorku kod mešane infekcije korišćenjem multipleks PCR (Daire i sar., 1997; Clair i sar., 2003). PCR metodom mogu se umnožiti i fragmenti *tuf* gena koji kodiraju fitoplazma elongacioni faktor Tu (EF-Tu). Direktnom PCR reakcijom pomoću seta prajmera *Tuf1f/Tuf1r* (*Tuf1f/r*) amplifikuju se fragmenti *tuf* gena dužine oko 1050bp, akoristeći set prajmera *TufAyf/TufAyf* (*TufAyf/r*) (Langer i Maixner, 2004) u nested PCR, amplifikuju se fragmenti od č 940 bp, što je prikazano na sl. 34 na primeru *Saponaria officinalis*. Obrada ovih fragmenata RFLP analizom ili sekvenciranjem doprinosi boljoj karakterizaciji pojedinih fitoplazmi.

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata - RFLP (restriction fragment length polymorphism). Enzimi restrikcione endonukleaze poseduju sposobnost sečenja DNK sa specifičnom sekvencom, što rezultira dobijanjem prepoznatljivih i reproducibilnih profila. Restrikcionoj analizi može biti podvrgnuta kako ukupna DNK, tako i molekuli amplifikovani PCR metodom. Pri identifikaciji fitoplazmi koristi se više restrikcionih enzima, čiji se produkti digestije vizuelizuju na agaroznim ili poliakrilamidnim gelovima. Produkti amplifikacije ribozomalne DNK mogu se izložiti digestiji brojnih restrikcionih endonukleaza, ali su najviše korišćeni: *AluI*, *TruI*, *KpnI*, *RsaI*, *HpaI*, *HpaII*, *HhaI*, *TaqI*, *MboI*, *BfaI*, *DraI*, *HaeIII* i *BamHI*, zavisno od prajmera korišćenih u amplifikaciji i vrste fitoplazme. Prema Lee i sar. (1998), da bi se identifikovala vrsta fitoplazme, delimična sekvenca 16S rDNK (č.1.2 kb) amplifikovana nested PCR metodom korišćenjem seta prajmera R16F2n/R2 podvrgava se digestiji restrikcionim endonukleazama. Od vrste fitoplazmi zavisi broj restrikcionih enzima koji moraju biti primenjeni da bi se obezbedilo nedvosmisleno identifikovanje fitoplazmi. U PCR-RFLP analizi fitoplazmi detektovanih na lekovitom bilju u Srbiji, u našim istraživanjima amplifikovani fragmenti R16F2n/R2 prajmerima korišćeni su za identifikaciju pomoću *AluI*, *KpnI*, *HpaII*, *HhaI* i *TruI* restrikcionih enzima, zavisno od vrste fitoplazme. Dobi-



Sl. 20. *A. montana*: stimulacija bočnih pupoljaka.
Fig. 20. *A. montana*: formation of the lateral buds.



Sl. 21. *C. officinalis*: proliferacija cvetnih pupoljaka, temeni potpuno zakržljao.
Fig. 21. *C. officinalis*: proliferation of axillary buds.



Sl. 22. *C. officinalis*: proliferacija cvetova (u polju).
Fig. 22. *C. officinalis*: proliferation of the flowers (in the field).



Sl. 23. *C. intybus*: spljošteno, izuvijano stablo, proliferacija bočnih pupoljaka.
Fig. 23. *C. intybus*: proliferation of the lateral buds.



Sl. 24. *C. intybus*: deformisano, stablo, listovi i cvet.
Fig. 24. *C. intybus*: deformation of the stem, leaf and flower.



Sl. 25. *S. alba*: „veštičine metle“.
Fig. 25. *S. alba*: „witches' broom symptoms“.



Sl. 26. *S. alba*: proliferacija cvasti (dole), nepromenjena cvast zdrave biljke (gore).
Fig. 26. *S. alba*: proliferation of the flower cluster.

jeni restrikcioni profili fitoplazmi koje su inficirale ispitivane lekovite biljke upoređivani su sa restrikcionim profilima kontrolnih uzoraka fitoplazmi kao referentnih: STOL, FD-C, PoiBI, CYE i AY. Pomoću RFLP metode identifikovano je prisustvo 16SrXII-A (Stolbur) fitoplazme kod ehinacee (Pavlović i sar., 2011) (sl. 35), kupine (Kuzmanović i sar., 2011), kantariona (Pavlović i sar. 2012a), bokvice (Jošić i sar., 2012a), brđanke (Pavlović i sar., 2012c), sapunjače (Jošić i sar., 2013) itd.

Restrikcijom analizom PCR produkata od 1.2 kb, dobijenih R16F2n/R2 prajmerima iz uzoraka arnike i lucerke, u nezavisnim digestijama endonukleazama *Alu* I, *Tru* I, *Hpa* II i *Hha* I dokazano je prisustvo fitoplazme podgrupe 16SrIII-B, tj. Clover yellow edge (CYE). Kao referentni izolati korišćeni su uzorci Stol, AY, FD-C, PoiBI i CYE fitoplazme, a RFLP profili iz svih uzoraka *A. montana* poreklom sa Tare (sl. 36) i uzoraka lucerke L39-L41 bili su identični CYE profilima (Pavlović i sar., 2012b; Starović i sar., 2012). Sekvenciranje. Prilikom identifikacije fitoplazmi poželjno je korišćenje 2 nezavisne metode, kako bi se potvrdili dobijeni rezultati. U detekciji fitoplazmi lekovitog bilja u našim istraživanjima rezultati dobijeni RFLP analizom potvrđivani su sekvenciranjem određenih delova genoma. Sekvenciranje fragmenata DNK amplifikovanih odabranim prajmerima i deponovanje sekvenci u bazama podataka nukleotidnih sekvenci (NCBI; EMBL,...) omogućava njihovo upoređivanje. Ovi podaci pružaju važne informacije i o diverzitetu i evoluciji fitoplazmi.

Brojni su primeri korišćenja različitih tehnika, iako je sekvenciranje zadržalo primat. Istraživanja bazirana na HMA (heteroduplex mobility assay) potvrđena su analizom sekvenci intergenskog regiona 16/23S prilikom detekcije 16SrVII grupe, subgrupe II fitoplazme kod *E. purpurea* u Kanadi (Wang i Hiruki, 2001; Olivier i sar., 2009). Kod iste biljne vrste u južnoj Bohemiji, u Češkoj Republici, detektovane fitoplazme iz ribozomalne podgrupe 16SrI-C, dodatno su okarakterisane na osnovu ribozomalnih proteinskih gena (*rplC* podgrupa) i gena za elongacioni faktor Tu (*tufIc* podgrupa) (Franova i sar., 2009b).

Sekvenciranje ribozomalnih gena. Sekvenciranjem 16S rRNK gena, 23S rRNK gena, a naročito intergenskog regiona 16S-23S dobija se informativna sekvenca koju je moguće uporediti sa jako velikim brojem već deponovanih sekvenci, što je posebno značajno pri identifikaciji mikroorganizama, a samim tim i fitoplazmi.

16SrXII-A podgrupa (Stolbur) fitoplazma. RFLP analiza 16S rRNK gena, koji je umnožen setom

prajmera R16F2n/R2 u nested PCR, ukazala je da uzorci velikog broja lekovitih vrsta sa ispoljenim simptomima imaju isti profil kao referentni STOL (Jošić i Starović, 2012b; Pavlović i sar., 2012b,c). Prisustvo Stolbur fitoplazme kod reprezentativnih izolata nekih lekovitih biljaka potvrđeno je sekvenciranjem istog gena, a sekvencesu deponovana u NCBI GenBank databazi: *Medicago sativa* L42 - JQ951960 (Starović i sar., 2012), *Vacciniumcorymbosum* - KC960486 (Starović i sar., 2013), *Saponaria officinalis* - JX866951 (Jošić i sar., 2013), *Calendula officinalis* - KJ174507 (Pavlović i sar., 2014a), *Cichorium intybus* - KF661322 (Pavlović i sar., 2014b), itd. Ove sekvence pokazuju visok nivo sličnosti sa delimičnim sekvencama 16S rRNK gena velikog broja STOL fitoplazmi: Stolbur-Rubus-Bg (Bulgarian 'Rubus fruticosus') fitoplazme (Bobev i De Jonghe, 2011), sa Italijanskim 'Bois noir' sojem CH-1 fitoplazme iz periwinkle (Kube i sar., 2010), Ruskim Stolbur-Rus sojem fitoplazme Rus93 (Lee i sar., 2010) itd.

16SrIII-B podgrupa (Clover yellow edge) fitoplazma. Pri identifikaciji uzročnika pojave fitoplazmatičnih simptoma na *Arnica montana* L. poreklom sa Tare upotrebljeni su prajmeri P1/P7, P1/16S-SR i R16F2n/R2 čiji su produkti amplifikacije bili očekivanih dužina: 1.8, 1.5 i 1.2 kb, respektivno. Poređenjem 16S rDNK sekvence reprezentativnog izolata Am4 sa izraženim simptomima, deponovanog pod brojem JX297491 u NCBI GenBank sa ostalim fitoplazmama iz baze podataka, utvrđen je stepen homologije od 99% sa članovima 16SrIII-B fitoplazma podgrupe: Clover yellow edge phytoplasma strain CYE (JQ944798.1) (Franova i Cermakova, 2012), 'Euscelidius variegatus' phytoplasma strain AP-I (HQ589197.1) (KubeM i sar., 2010), Clover phylloidy phytoplasma strain CP (HQ589196.1) (Kube, i sar., 2010.), itd. Ovo je prvi slučaj prirodne infekcije i detekcije bilo koje fitoplazme na *A. montana* L. i kod nas i u svetu. Kod 5% uzoraka *Medicago sativa* sa simptomima fitoplazmi na lokalitetu Tuleš detektovana je CYE fitoplazma. Sekvenca ove fitoplazme reprezentativnog uzorka L41 - JQ951959 (Starović i sar., 2012) pokazala je najveći stepen sličnosti sa *Ranunculus* sp. virescence phytoplasma (Kube i sar., 2010). Ova fitoplazma je detektovana ranije kod *Cirsium arvense* (Rancic i sar., 2005) i kruške (Duduk i sar., 2008) u Srbiji.

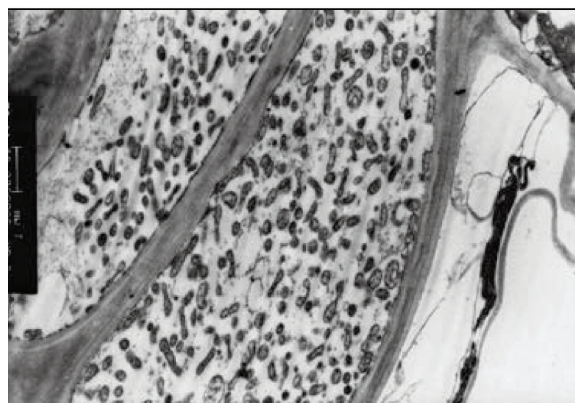
Sekvenciranje *tuf* gena. Parcijalne (delimične) sekvence *tuf* gena, dobijene su primenom nested PCR koristeći setove prajmera Tuf1f/r i TufAyf/r za amplifikaciju fragmenta od oko 940 bp. Parcijalna sekvenca elongacionog faktora Tu (EF-Tu) od 666 bp iz uzorka kupine Ks1



Sl. 27. *M. chamomilla*: proliferacija cvetne glavice.
Fig. 27. *M. chamomilla*: proliferation of the flower head.

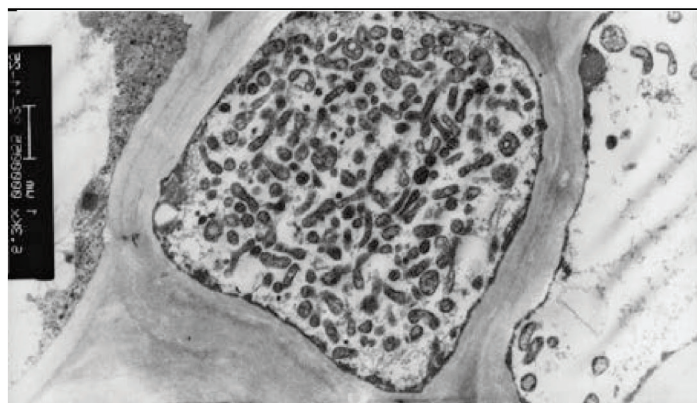


Sl. 28. *M. chamomilla*: levo-proliferacija, desno-zdrava biljka.
Fig. 28. *M. chamomilla*: left - proliferation, right - healthy plant.



Sl. 29. Ultratanki presek kroz lisne nerve obolelih biljaka *E. purpurea* sa fitoplazmoznim simptomima - fitoplazmorne partikule u ćelijama sitastih cevi (razmernik= 1 μ m).

Fig. 29. Ultra-thin section of a sieve tube cell of *E. purpurea* (ratio - 1 μ m).



Sl. 30. Ultratanki presek kroz sprovodni sud obolelih biljaka *E. angustifolia* - pleomorfni oblik fitoplazmatičnih struktura (razmernik=1 μ m).

Fig. 30. Ultra-thin section of a sieve tube cell of *E. angustifolia* (ratio - 1 μ m).

sa jako izraženim simptomima deponovana je u NCBI GenBank pod brojem JN808109 (Kuzmanović i sar., 2011). Ova sekvenca pokazuje visok stepen sličnosti (99.85%) sa FJ394552.1 *Candidatus* Phytoplasma solani izolatom R47/5 (Bergeri sar., 2009), EU552455.1 *Candidatus* Phytoplasma solani izolatom 1-38-40 (Franovai sar., 2009a) i GU220565.1 - GU220562.1 Phytoplasma sp. (sojevi BN-Si238, BN-Ma202, BN-Op40 i BN-Op437, respektivno) (Quaglino i sar., 2010). Sekvenca FJ394552.1 reprezentuje Stolbur tuf-tip II fitoplazmu izolovanu sa vinove loze, a sekvenca EU552455.1 Stolbur tuf-tip II fitoplazmu izolovanu iz crvene deteline (*Trifolium pretense*). Se-

kvenca JN808109 duga 666bp pokazuje visok stepen homologije sa navedenim sekvencama, tako da se može izvesti zaključak da se radi o Stolbur tuf-tip II fitoplazmi, ali sa neophodnošću daljeg ispitivanja, s obzirom na izvesne razlike u ostalom delu sekvence do 919bp (neobjavljeni podaci).

Primenom molekularne detekcije fitoplazmi, infekcija Stolbur fitoplazmom tokom protekle dekade utvrđena je kod različitih biljaka, uključujući ekonomski značajne kulture kao vinovu lozu (Duduk i sar., 2004; Kuzmanović i sar., 2008; Jošić i sar., 2010b), kukuruz (Duduk i Bertaccini, 2006), krušku (Duduk i sar., 2008), tako i divlju populaciju, npr. *Cirsium arvense* (Rančić i sar., 2005). U

Crnoj Gori utvrđeno je prisustvo 2 tipa Stolbur fitoplazmi u uzorcima vinove loze (Radonjić i sar., 2009). Nekoliko poslednjih godina naša istraživanja su bila usmerena ka detekciji fitoplazmi kod lekovitih biljaka sa ekonomskim značajem, kao i kod divlje populacije istih vrsta. Stolbur fitoplazma je detektovana kod ehinacea - *E. purpurea* i *E. angustifolia* (Pavlović i sar., 2010a; 2011), kupine *Rubus fruticosus* (Kuzmanović i sar., 2011), bokvice *Plantago major* (Jošić i sar., 2012a), kantariona *Hypericum perforatum* i *H. barbatum* (Pavlović i sar., 2012b), sapunjače *Saponaria officinalis* (Jošić i sar., 2013), nevena *Calendula officinalis* (Pavlović i sar., 2014a), vodopije *Cichorium intybus* (Pavlović i sar., 2014b), borovnice *Vaccinium corymbosum* (Starović i sar., 2012), turskog karanfila *Dianthus barbatus* (Jošić i sar., 2014), uskolisnog božura *Paeonia tenuifolia* (Adamović i sar., 2014a), žutog noćurka *Oenothera biennis* (Adamović i sar., 2014b), itd.

U Srbiji, CYE fitoplazma koja pripada filogenetskoj grupi 16SrIII-B identifikovana je kod *Cirsium arvense* (Rančić i sar., 2005), kruške (Duduk i sar., 2008), lucerke (Starović i sar., 2012), a kod arnike poreklom sa Tare prvi put je detektovana ova vrsta fitoplazmi ne samo u Srbiji, već i u svetu (Pavlović i sar., 2012).

KONTROLA ŠIRENJA – MERE BORBE

Jednom zaražene biljke fitoplazmama, ostaju zaražene trajno. Kontrola širenja i pojave može biti teoretski moguća suzbijanjem vektora fitoplazmi ili smanjivanjem brojnosti patogena u zaraženim biljkama primenom antibiotika, uglavnom tetraciklina ili nekih drugih hemikalija. Obe navedene mere daju nedovoljno efikasne rezultate u poljskim uslovima: prva, zato što je nemoguće eliminisati sve vektore u okruženju, i druga zato što je primena antibiotika vrlo skupa i nedozvoljena u mnogim zemljama, pa i kod nas. Do sada testirani antibiotici (tetraciklini, oksitetraciklini, streptomycin, eritromicin A) su omogućili supresiju fitoplazoznih simptoma i usporeno umnožavanje fitoplazmi, ali ipak nisu blokirali pojavu fitoplazmoznih infekcija (McManus i sar., 2002).

Rangaswami i Bagyaraj (2005) su ukazali na mogućnost kontrolisanja zaraze breskve fitoplazmom X-disease, primenom vodenog rastvora kvinhidrona (engdogenog radikala), bez negativnog uticaja na samu biljku, a Sticker i saradnici (1997) su slične rezultate dobili primenom fosetil aluminijskoga.

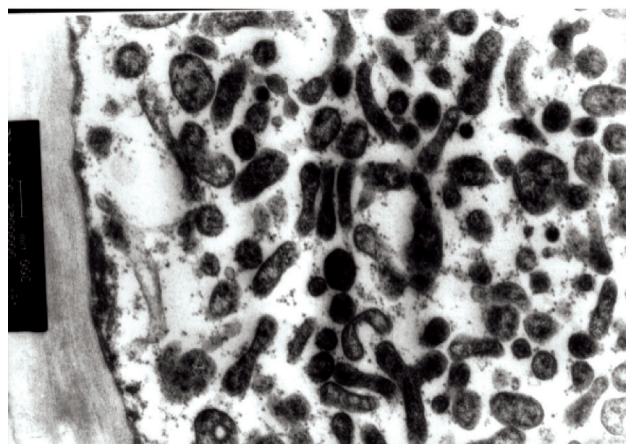
Suzbijanje fitoplazmoza pokušano je prime-

nom sekundarnih metabolita gljiva (cerkosporin, kladosporil i spirolaksin) i biljaka (pulegon i karvon), koji imaju antibiotske aktivnosti (Assante i sar., 2006, Bava i sar., 2006, Chiesa i sar., 2007). Ova istraživanja su dovela do jedinstvenog zaključka da se na međudnosu biljka-fitoplazma-jedinjenje mora više raditi, da bi se rasvetlile fiziološke modifikacije u floemskim komponentama, kao i u ravnoteži regulatora rasta.

Lherminier i saradnici (2003) su postigli izvesne efekte u prevenciji širenja fitoplazmoznih infekcija na duvanu, primenom criptogena (izolovan iz *Phytophthora cryptogea*) i oligandrina (izolovan iz *Phytium oligandrum*), stimulišući sintezu P proteina i akumulaciju kaloze u sitastim cevima floema, što je dovelo do ometanja širenja fitoplazmi iz ćelije u ćeliju. Ohrabreni postignutim rezultatima, ovaj istraživački tim, čak predlaže moguću primenu navedenih proteina, u stimulaciji rezistencije biljaka prema fitoplazmama.

Savremene tendencije u sprečavanju pojave, širenja i suzbijanja fitoplazmi koncipirane su kroz brojne naučne projekte, pa se tako u okviru međunarodnog projekta „Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems“ (COST Action FA0807, 2012), između ostalog, predlaže da razvoj borbe protiv fitoplazmi bude zasnovan na principima:

1. Pronalaženja i gajenja biljnih sorata koje su otporne na fitoplazme, što podrazumeva prethodno prikupljanje podataka o osetljivosti različitih sorti i podloga, kao i razvoj novih otpornih sorata dobijenih oplemenjivanjem;
2. Ispitivanja uticaja biotičkih i abiotičkih ekoloških faktora na razvoj bolesti i simptoma, analize efikasnosti bioaktivnih supstanci, analize fizioloških parametara i uticaja klimatskih faktora na razvoj simptoma;
3. Unapredjenja kontrole vektora, sa posebnim osvrtom na smanjenje koncentracije primenjenih insekticida i broja tretmana. Razvoja novih ekološki održivih strategija kontrole vektora;
4. Definisana mera kontrole i sprečavanja unošenja novih fitoplazmi u određene regione (karentin).
5. Moguće kontrole fitoplazmi korišćenjem endofitnih mikroorganizama. Kolekcionisanju podataka o mikroorganizmima koji poseduju inhibitorni efekat na fitoplazme i
6. Ispitivanja mogućnosti primene blagih sojeva fitoplazmi koji mogu zaštititi biljke od infekcije virulentnim, agresivnim sojevima fitoplazmi (premunicija). Prikupljanja podataka o blagim sojevima sa potencijalnim zaštitnim dejstvom.



Sl. 31. Ultratanki presek kroz sprovodni sud obolelih biljaka selena (*Levisticum officinale*) (razmernik = 300 nm).

Fig. 31. Ultra-thin section of a sieve tube cell of *Levisticum officinale* (ratio - 300 nm).

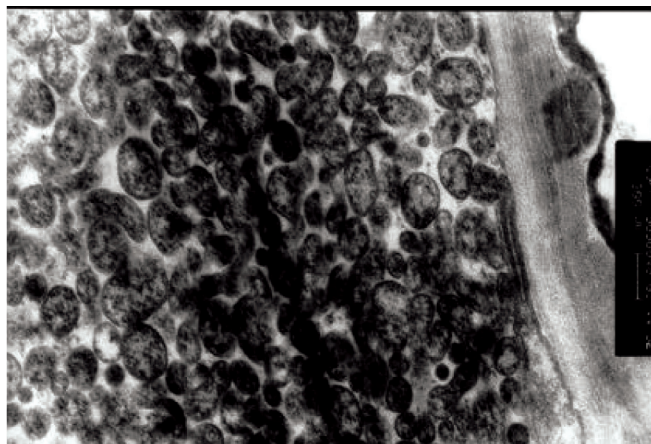
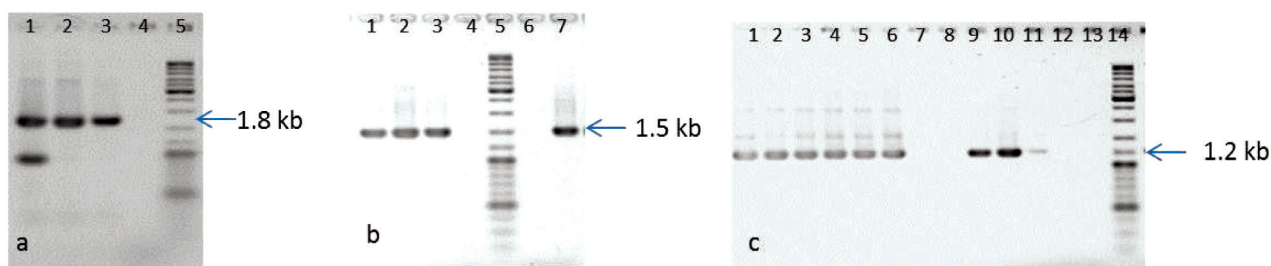


Fig. 32. Ultra-thin section of a sieve tube cell of *H. perforatum* (ratio=300 nm).

Sl. 32. Ultratanki presek lisnog nerva obolelih biljaka kantariona *H. perforatum* (razmernik=300 nm).



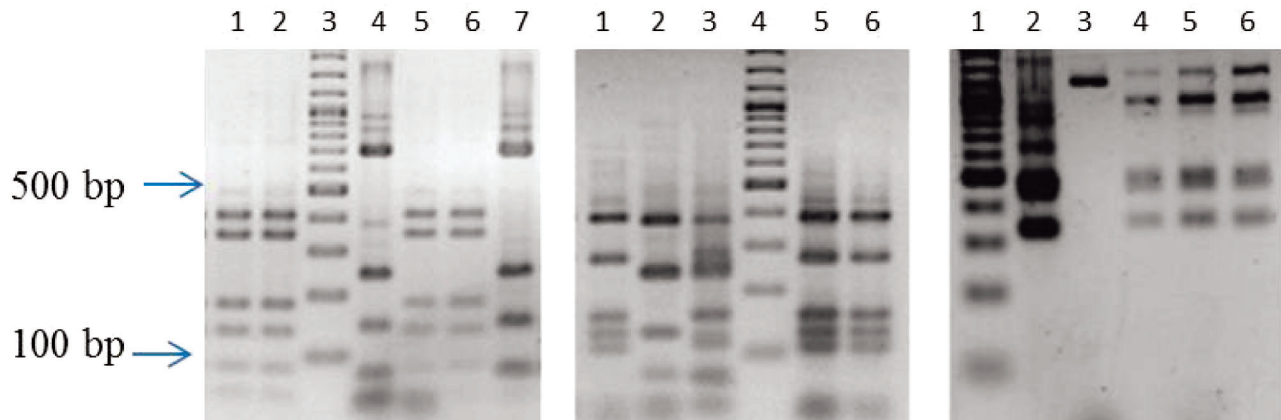
Sl. 33. PCR amplifikacija 16S ribozomalne DNK korišćenjem (a) P1/P7 seta prajmera: linije 1-3. uzorci kupine sa simptomima Ks1, Kt12, Klj7, 4. kupina bez simptoma Ks16; M- marker; (b) P1/16S-SR seta prajmera: linije 1-3. *E. angustifolia* sa simptomima; 4. *E. angustifolia* bez simptoma; 5. Marker; 6. *E. purpurea* bez simptoma; 7. *E. purpurea* sa simptomima; (c) nested PCR 16S rDNK korišćenjem R16F2n/R2 prajmera (produkti 1.2 kb) koji kao matricu koriste produkte amplifikacije P1/16S-SR seta prajmera kod bokvice: linije 1-13: Pc1; Pc2; Pc15; Pc16; Vd 22; Vd 23; Vd 25; Vd 26; Ko31; Ko32; Ko35; Ko36; Ko 38; 14. M; Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).

Fig 33. PCR amplification of 16S ribosomal DNA using (a) P1/P7 primers: lane 1-3. Symptomatic blackberry samples Ks1, Kt12, Klj7, lane 4. Asymptomatic blackberry sample Ks16; M - marker; (b) P1/16S-SR primers: lane 1-3. Symptomatic *E. angustifolia*; 4. Asymptomatic *E. angustifolia*; 5. Marker; 6. Asymptomatic *E. purpurea*; 7. symptomatic *E. purpurea*; (c) nested PCR 16S rDNK using R16F2n/R2 primers (product 1.2 kb) followed by primers P1/16S-SR in plantain: lane 1-13: Pc1; Pc2; Pc15; Pc16; Vd 22; Vd 23; Vd 25; Vd 26; Ko31; Ko32; Ko35; Ko36; Ko 38; 14. M; Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).



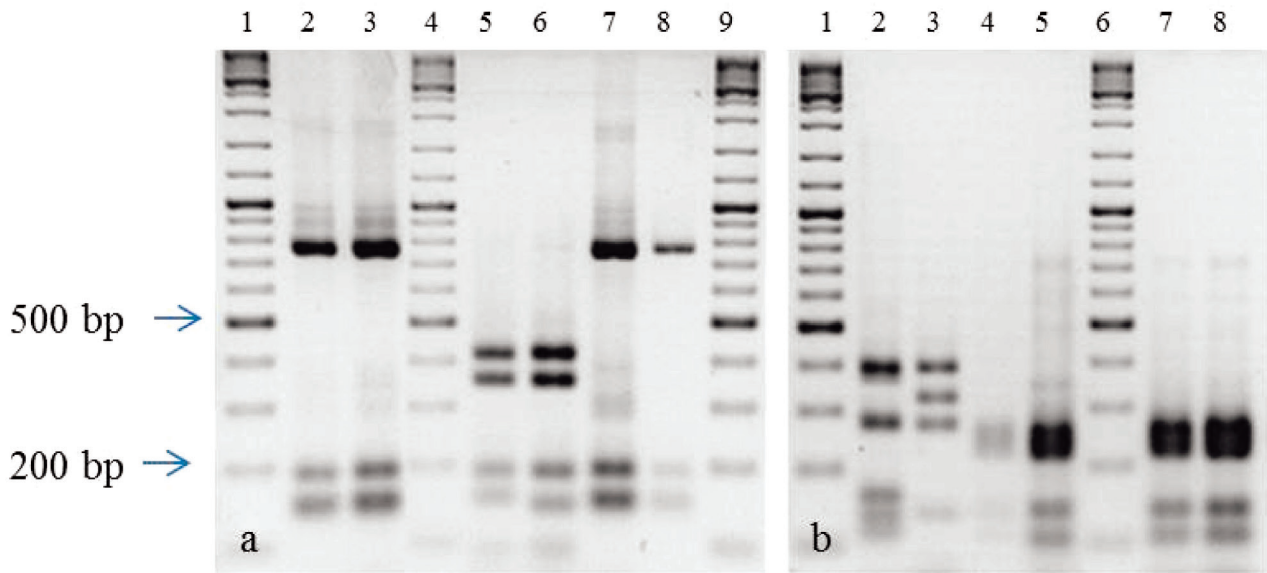
Sl. 34. Amplifikacija *tuf* gena u uzorcima *Saponaria officinalis* korišćenjem setova prajmera (a) Tuf1f/r (1050bp) i (b) TufAyf/r (940 bp); Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).

Fig. 34. Amplification *tuf* gen in *Saponaria officinalis* samples using primers (a) Tuf1f/r (1050bp) i (b) TufAyf/r (940 bp); Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).



Sl. 35. RFLP analiza 16S rDNA 1.2-kb PCR produkta (R16F2n/R2) obradena restrikcijom enzimom (a) *AluI*: linija 1. *E. angustifolia*; 2. *E. purpurea*; 3. M; 4. FD-C izolovana iz vinove loze sorte Plovdina; kontrolni uzorci fitoplazmi 5. AY; 6. 16SrXII-A (STOL); 7. FD-C; (b) *TruI*: kontrolni uzorci fitoplazmi 1. STOL; 2. FD-C; 4. M; 5. *E. angustifolia*; 6. *E. purpurea*. c) *KpnI*: 1. M; kontrolni uzorci fitoplazmi 2. AY; 3. FD-C; 4. STOL; 5. *E. angustifolia*; 6. *E. purpurea*. M- Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).

Fig. 35. RFLP analysis of the 16S rDNA 1.2-kb PCR product (R16F2n/R2) digested by (a) *AluI*: lane 1. *E. angustifolia*; 2. *E. purpurea*; 3. M; 4. FD-C from grapevine cv. Plovdina; Control 5. AY; 6. 16SrXII-A (STOL); 7. FD-C; (b) *TruI*: Control 1. STOL; 2. FD-C; 4. M; 5. *E. angustifolia*; 6. *E. purpurea*. c) *KpnI*: 1. M; Control 2. AY; 3. FD-C; 4. STOL; 5. *E. angustifolia*; 6. *E. purpurea*. M- Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).



Sl. 36. RFLP analiza 16S rDNA 1.2-kb PCR produkta (R16F2n/R2) obradena restrikcijom enzimom (a) *AluI*: linije 1., 4., 9. M; 2. *A. montana* Am2; 3. Am4; kontrolni uzorci fitoplazmi 5. STOL; 6. AY; 7. PoiB; 8. CYE; (b) *TruI*: 1., 6. M; kontrolni uzorci fitoplazmi 2. STOL; 3. AY; 4. PoiBI; 5. CYE; 7. *A. montana* Am2; 8. Am4; M- Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).

Fig. 36. RFLP analysis of the 16S rDNA 1.2-kb PCR product (R16F2n/R2) digested by (a) *AluI*: lane 1., 4., 9. M; 2. *A. montana* Am2; 3. Am4; Control 5. STOL; 6. AY; 7. PoiB; 8. CYE; (b) *TruI*: 1., 6. M; Control 2. STOL; 3. AY; 4. PoiBI; 5. CYE; 7. *A. montana* Am2; 8. Am4; M- Marker: GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Lithuania).

Navedene principe mera borbe protiv fitoplazmi su načelno koncipirana za gajeno bilje, međutim neke od predloženih mera ne mogu biti primenjene u usevima lekovitog bilja, čije gajenje isključuje upotrebu pesticida. Sve alternativne mere, bez primene pesticida, mogu se i predložiti, prvo za preliminarna ispitivanja, a neke od njih i za zaštitu od fitoplazmi.

Mera sprečavanja unošenja i širenja u nova područja fitoplazmarnog biljnog materijala je jedna od vrlo važnih preventivnih mera suzbijanja bolesti. Fitoplazma Stolbur tipa (16SrXII) identifikovana u najvećem broju slučajeva na lekovitim biljkama u Srbiji, pripada karantinskim štetnim organizmima koji se nalaze na A2 listi EPPO, što znači da je prisustvo patogena registrovano, ali da se strogo kontroliše njihovo širenje. Stolbur fitoplazma je obuhvaćena i Pravilnikom o listama štetnih organizama i listama bilja, biljnih proizvoda i propisanih objekata, Republike Srbije (Sl.gl. RS, 41/09), koji je definisao listu štetnih organizama čije je unošenje i širenje u Republici Srbiji zabranjeno (IA lista, I deo). Na ovoj listi se nalazi 9 vrsta fitoplazmi: *Elm phloem necrosis phytoplasma*, Lime witches' broom *phytoplasma*, Palm lethal yellowing *phytoplasma*, Peach rosette *phytoplasma*, Peach X-disease *phytoplasma*, Peach yellows *phytoplasma*, Stolbur *phytoplasma*, Strawberry witches' broom *phytoplasma* i Elm phloem necrosis *mycoplasma*. Lista IA II deo, sadrži četiri fitoplazme čije je prisustvo poznato na ograničenom području u Republici Srbiji, ali je njihovo unošenje i širenje u Republiku Srbiju zabranjeno: *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation *phytoplasma*), *Candidatus Phytoplasma prunorum* (European stone fruit yellows *phytoplasma*), *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline *phytoplasma*) i *Grapevine flavescence doree phytoplasma*. Definisanjem lista podrazumeva se da se predu-

zimaju sve potrebne mere zaštite širenja patogena u prometu sadnog materijala, kao što su analize u prometu, karantinski nadzor, postkarantinski nadzor u toku kojih se obavljaju poljski pregledi i laboratorijske analize, a bilje se u tom periodu ne može razmnožavati, iznositi sa parcele, ili premeštati na drugu parcelu, čime je onemogućeno širenje patogena reproduktivnim materijalom. Rizik da se patogen ipak prenese, pre nego što se utvrdi da je bilje zaraženo, postoji, i to putem vektora, ako su prisutni u okruženju. Zbog toga je bitno da se poljski pregledi i laboratorijske analize, odrade sinhronizovano u najkraćem mogućem vremenu i na taj način smanji rizik od unošenja i širenja patogena.

Na površinama plantažnog gajenja u lokalitetu Pančevo, ispitivan je uticaj različitih vrsta endofitih mikroorganizama na pojavu i razvoj fitoplazmarnih simptoma, kao i pojava supresije simptoma na već obolelim biljkama (Jošić i saradnici, neobjavljeni podaci). Dobijeni su ohrabrujući rezultati, naročito pri korišćenju mešovite kultura mikroorganizama, koji upućuju na dalja ispitivanja i razvoj preparata za biološku borbu protiv fitoplazmi, koje su sve prisutnije i u svetu i kod nas.

Suzbijanje fitoplazmi, kao i drugih obligatnih patogena, treba da se zasniva, uglavnom, na preventivnim merama. Ove mere su utoliko više opravdane kada se radi o zaštiti od bolesti lekovitih vrsta, u kojima je primena hemijskih sredstava ograničena ili zabranjena. Iz tih razloga, kao jedina direktna mera suzbijanja preostaje biološka borba.

ZAHVALNICA

Ova istraživanja finansirana su u okviru Projekata III 46007 i TR-31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Adamović, D., Đalović, I., Mitrović, P., Kojić, S., Pivić, R., Jošić, D. (2014a): First Report on Natural Infection of *Paeonia tenuifolia* by "Candidatus Phytoplasma solani" in Serbia. *Plant Disease*, 98(4): 565.
- Adamović, D., Đalović, I., Mitrović, P., Kojić, S., Starović, M., Purar, B., Jošić, D. (2014b): First Report of 16SrXII-A subgroup phytoplasma (Stolbur) associated with reddening of *Oenothera biennis* in Serbia. *Plant Disease* 98(6): 841.
- Ahrens, U., Seemüller, W. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.

- Alhudaib, K., Aroch, Y., Wilson, M., Jones, P. (2009): Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. *Crop Protection* 28: 13–18.
- Alma, A., Davis, R. E., Vibio, M., Danielli, A., Bosco, D., Arzone, A., Bertaccini, A. (1996): Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16Sr RNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported in this host. *Plant Disease*, 80: 418–421.
- Amidžić, L., Dražić, S., Kostić, M., Maksimović, S., Mandić, R., Menković, N., Panjković, B., Popov, V., Radanović, D., Sekulović, D., Stepanović, B., Tasić, S. (1999): Strategija Zaštite Lekovitog Bilja u Srbiji. Ministarstvo zaštite životne sredine Republike Srbije, 1–111.
- 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.
- Angelini, E., Negrisol, E., Clair, D., Borgo, M., Boudon-Padieu, E. (2003): Phylogenetic relationships among Flavescence dorée isolates and related phytoplasmas determined by Heteroduplex Mobility Assay and sequences of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Plant Pathology*, 52: 663–672.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E., Foissac, X. (2007): Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness between three distinct “flavescence dorée” phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4001–4010.
- Assante, G., Bava, A., Nasini, G. (2006): Enhancement of a pentacyclic tyrosine kinase inhibitor production in *Cladosporium cf. cladosporioides* by cladospore. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 718–721.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Hogenhout, S.A. (2006). Living with genomic instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Bava, A., Dallavalle, S., Fronza, G., Nasini, G., Vajna de Pava, O. (2006): Absolute configuration of Sporotricale and structure of 6-Hydroxysporotricale. *Journal of Natural Products*, 69: 1793–1795.
- Berger, J., Dalla Via, J., Baric, S. (2009): Development of a TaqMan allelic discrimination assay for the distinction of two major subtypes of the grapevine yellows phytoplasma Bois noir. *Eur J Plant Pathol*, 124: 521–526.
- Bertaccini, A. (2007): Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12: 673–689.
- Bertaccini, A., Marani, F. (1980): Mycoplasma-like organisms in *Gladiolus* sp. Plants with malformed and virescent flowers. *Phytopath. Medit.* 19: 121–128.
- Bertamini, M., Neduchezhain, N. (2001): Effect of phytoplasma stolbur-subgroup (Bois noir-BN) on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*, 39: 119–122.
- Bertaccini, A., Vibio, M., Stefani, E. (1995): Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopath. Medit.*, 34: 137–141.
- Bobev, S.G., De Jonghe, K.W.A. (2011): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF293091.1>
- Borth, W.B., Fukuda, S.K., Hamasaki, R.T., Hu, J.S., Almeida, R.P. (2006): Detection, characterisation and transmission by *Macrostelus* leafhoppers of watercress yellows phytoplasma in Hawaii. *Annals of Applied Biology*, 149 (3): 357–363.

- Bos, L. (1960): A witches broom virus disease of *Vaccinium myrtillus* in the Netherlands. *Tijdschrift Planteziekten*, 66: 259-263.
- Botti, A., Bertaccini, A. (2003): Molecular variability in Flavescence dorée phytoplasmas as marker for the disease outbreaks in vineyards. Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy): 62-63.
- Botti, S., Bertaccini, A. (2006): Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. U: 16 International Congress of the International Organization of Mycoplasma, Cambridge, 113.
- Boudon-Padieu, E. (2005): Phytoplasmas associated to Grapevine yellows and potential vectors. *Bulletin O.I.V.*, 78: 311-320.
- Bruni, R., Sacchetti, G. (2005): Micro-Organism-Plant Interactions As Influencers of Secondary Metabolism in Medicinal Plants. *Minerva Biotechnologica*, 17: 119-125.
- Bruni, R., Oellati, F., Bellardi, M.G., Benvenuti, S., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Bianchi, A. (2005): Herbal Drug Quality and Phytochemical Composition of *Hypericum perforatum* L. Affected by Ash Yellows Phytoplasma Infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 964-968.
- Chen, T.A. (1971): Mycoplasma-like organisms in sieve tube elements of plants infected with blueberry stunt and cranberry false blossom. *Phytopathology*, 61: 233-236.
- Chiesa, S., Prati, S., Assante, G., Maffi, D., Bianco, P.A. (2007): Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control. *Bulletin of Insectology*, 60: 313-314.
- Clair, D., Larrue, J., Aubert, G., Gillet, J., Cloquemin, G., Boudon-Padieu, E. (2003): A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis*, 42: 151-157.
- Cordova, I., Jones, P., Harrison, N.A., Oropexa, C. (2003): In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.*, 4: 99-108.
- COST action FA 0807 (2009): Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems. Vector Table (Vector species, Disease Association, Host Plants, Distribution, First Reference, Phytoplasma group): <http://www.costphytoplasma.eu/WG2/Vector%20table.htm> (verified August 19, 2012).
- COST action FA 0807 (2009): Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems: <http://costphytoplasma.eu/index.htm> (verified July 10 2012).
- Credi, R., Terlizzi, F., Milanesi, L., Bondavalli, R., Cavallini, G., Montermini, A., Dradi, D. (2006): Wild host plants of Stolbur Phytoplasma and its vector, *Hyalesthes obsoletus*, at sites of Grapevine bois noir occurrence in Emilia-Romagna, Italy. 15th Meeting of the ICVG, Stellenbosch, South Africa, Extended Abstracts: 182-184.
- Cvrković, T. (2009): Diverzitet faune cikada u vinogradima Srbije i njihova uloga u prenošenju Bois Noir fitoplazme, Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., Caudwell, A. (1992): Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, 121: 95-103.
- Daire, X., Clair, D., Reinert, W., Boudon-Padieu, E. (1997): Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 507-514.

- Davies, D.L. (2000): The occurrence of two phytoplasmas associated with stunted *Rubus* species in the UK. *Plant Pathol*, 49: 86-88.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J Meth Mic*, 14: 53-61.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or pawlonia witches' broom. *Annals of Phytopathological Society Japan*, 33: 259-266.
- Drobnjaković, T., Perić, P., Marčić, D., Piciau, L., Alma, A., Mitrović, J., Duduk, B., Bertaccini, A. (2009): Leafhoppers in phytoplasma infected carrot fields: species composition and potential phytoplasma vectors. Kongres o zaštiti bilja sa simpozijumom (VI), Zlatibor, Zbornik rezimea: 85-86.
- Duduk, B., Bertaccini, A. (2006): Corn with symptoms of reddening: New host of stolbur phytoplasma. *Plant Disease*, 90: 1313-1319.
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstić, B., Dukić, N., Bertaccini, A. (2004): Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *J. Phytopathology*, 152: 575-579.
- Duduk, B., Perić, P., Marčić, D., Drobnjaković, T., Piciau, L., Alma, A., Bertaccini, A. (2008): Phytoplasmas in carrots: disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 61: 327-331.
- Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Salehi, M., Khanchezar, A., Shamszadeh, M. (2011): The first report of a phytoplasma associated with pot marigold phyllody in Iran. *Bulletin of Insectology*, 64: S109-S110.
- Fahmeed, F., Rosete, A.Y., Pérez, K.A., Boa, E., Lucas, J. (2009): First Report of *Candidatus* Phytoplasma asteris' (Group 16SrI) Infecting Fruits and Vegetables in Islamabad, Pakistan. *J Plant Pathol*, 157: 639-641.
- Firrao, G. (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.
- Fos, A., Danet, J.L., Zreik, L., Garnier, M., Bove, J.M. (1992): Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease*, 76: 1092-1096.
- Franova, J., Cermakova, H. (2012): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ944798.1>
- Franova, J., Šimkova, M. (2009a): Association of *Candidatus* Phytoplasma asteris with Yellowing and Phyllody of *Plantago lanceolata*. *Folia Microbiol.*, 54 (5): 469-472.
- Franova, J., Pribylova, J., Petrzik, K. (2009b): Purple coneflower with reddening and phyllody: a new host of clover phyllody phytoplasma. *Eur J Plant Pathol*, 123: 85-90.
- Franova, J., Pribylova, J., Šimkova, M., Navratil, M., Valova, P. (2003): Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with strawflower yellows in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 883-887.
- Gundersen, D.E., Lee, I.M. (1996): Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
- Hartman, J.X., Hooper, G.R., Bath, J.E. (1972): Occurrence and nature of mycoplasma-like organisms in stunt disease of Michigan highbush blueberry. *Michigan Academician*, 4: 461-467.
- Hwang, S.F., Chang, K.F., Howard, R.J., Khadhair, A.H., Gaudiol, R.G., Hiruki, C. (1997): First report of yellows

- phytoplasma disease in purple coneflower (*Echinacea* app.) in Canada. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 104: 182-192.
- Iriti, M., Quaglino, F., Maffi, D., Casati, P., Bianco, A., Faoro, F. (2008): *Solanum malacoxylon*, a New Natural Host of Stolbur Phytoplasma. *J. Phytopathology*, 154: 8-14.
- Ishii, T., Doi, Y., Yora, K., Asuyama, H. (1967): Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, 33: 267-275.
- Jošić, D., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Aleksić, G., Starović, M. (2009): XII Group Phytoplasma detection by RFLP analysis of 16SrRNA sequences. IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, Book of Abstracts: 13.
- Jošić, D., Pavlović, S., Stojanović, S., Kuzmanović, S., Gavrilović, V., Starović, M. (2010a): *Phytoplasma* disease on *Plantago major* in Serbia. Abstracts Book of 6th CMAPSEEC in Pharmacognosy Magazine, 6: S170-S171.
- Jošić, D., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Aleksić, G., Pavlović, S., Starović, M. (2010b): Detection of XIIA Phytoplasma group on Cultivar Zupljanka in Zupa vineyard region by RFLP analysis of 16S rDNA sequences. *Genetika*, 42: 146-153.
- Jošić, D., Pavlović, S., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Popović, T., Pivić, R., Starović, M. (2012a): Cultivated and wild plantain (*Plantago major*) is a host of Stolbur Phytoplasma in Serbia. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6: 284-288
- Jošić, D., Starović, M. (2012b): Identifikacija fitoplazmi. u: Fitoplazmoze lekovitih biljaka, 77-103 (Eds. Pavlović S. i Kišgeci J.). Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd: 116.
- Jošić, D., Starović, M., Stojanović, S., Popović, T., Dolovac N., Zdravković J., Pavlović S. (2013): First report of Stolbur phytoplasma detection in *Saponaria officinalis* plants showing leaf yellowing and reddening in Serbia. *Plant Disease*, 97(3): 420.
- Jošić, D., Starović, M., Kojić, S., Pivić, R., Stanojković-Sebić A., Zdravković, M., Pavlović S. (2014): *Dianthus barbatus* - a new host of Stolbur phytoplasma in Serbia. *Plant Disease*, 99(2): 283.
- Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Krnjanjić, S., Petrović, A., Redinbaugh, M.G., Pratt, R.C., Hogenhout, S.A., Toševski, I. (2009): Stolbur phytoplasma transmission to maize by *Reptalus panzeri* and the disease cycle of maize redness in Serbia. *Phytopathology*, 99: 1053-1061.
- Kegler, H., Müller, H.M., Kleinhempel, H., Vederevskaja, T.D. (1973): Untersuchungen über den Kirshenverfall and die Hexenbesenkrankheit der Heidelbeere. *Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst*, 27: 5-9.
- Khadhair, A.H., Hiruki, C., Deyholos, M. (2008): Molecular Characterization of Aster Yellows Phytoplasma Associated with Valerian and Sowthistle Plants by PCR-RFLP Analyses. *J. Phytopathology*, 156: 326-331.
- Khadhair, A.H., Kawchuk, L.M., Taillon, R.C., Botar, G. (1998): Detection and molecular characterization of an aster yellows phytoplasma in parsley. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20:55-61.
- Khan, A.J., Botti, S., Paltrinieri, S., Al-Subhi, A.M., Bertaccini, A. (2002): Phytoplasma in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? In: 14th International Organization of Mycoplasma Conference, Vienna, 6.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J., Purcell, A.H. (1987): Cloning and detection of DNA from a non culturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238: 197-200.
- Kube, M., Mitrović, J., Duduk, B., Bertaccini, A. (2010): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HQ589197.1>
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ermacora, F., Ferrini, F., Starović, M., Carraro, L., Osler, R., Tošić, M. (2008): In-

cidence and molecular characterization of *Flavescence dorée* and *stolbur* phytoplasma in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. *Vitis*, 47: 105-111.

Kuzmanović, S., Jošić, D., Stojanović, S., Aleksić, G., Popović, T., Pavlović, S., Starović, M. (2011): Stolbur Phytoplasma Associated with Reddening of Blackberry in Serbia. 7th Balkan Congress of Microbiology, Belgrade. CD Proceedings.

Langer, M., Maixner, M. (2004): Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43: 191-199.

Lawson, R, Hsu, H.T. (2006): Quarantine Viruses, Viroids and Phytoplasmas that Affect Movement of Ornamental Plants. *Acta Hort.*, 722: 17-30.

Lebsky, V., Poghosyan, A., Silva-Rosales, L. (2010): Application of scanning electron microscopy for diagnosing phytoplasmas in single and mixed (virus-phytoplasma) infection in Papaya. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. *Julius-Kuhn-Archiv*, 427: 70-78.

Lee, I.M., Davis, R.E., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., Schaff, D.A. (1992): A Genotype-Based System for Identification and Classification of Mycoplasma-like Organisms (MLOs) in the Aster Yellows MLO Strain Cluster. *Molecular Plant Pathology*, 82: 977-986.

Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.

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., Davis, R.E., Bottner, K.D., Marcone, C., Seemueller, E. (2004a): '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54: 1037-1048.

Lee, I.M., Martini, M., Marcone, C., Zhu, S.F. (2004b): 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., Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Davis, R.E., Harrison, N.A. (2010): Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2887-2897.

Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Louis, C., Caudwell, A. (1994): Propagation of flavescence dorée MLO (Mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 285-293.

Lherminier, J., Benhamou, N., Larrue, J., Milat, M.L., Boudon-Padieu, E., Nicole, M., Blein, J.P. (2003): Cytological Characterization of Elicitin-Induced Protection in Tobacco Plants Infected by *Phytophthora parasitica* or Phytoplasma. *Phytopathology*, 93: 1308-1319.

Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E. (1997): Witches' broom of *Sarothamus scoparius*: a new disease associated with a phytoplasma related to spartium witches' broom agent. *J. Phytopathol.*, 145: 159-161.

Marcone, C., Hergenhausen, F., Ragozzino, A., Seemüller, E. (1999): Dodder Transmission of Pear Decline, European Stone Fruit Yellows, Rubus Stunt, Picris echinoides Yellows and Cotton Phyllody Phytoplasmas to Periwinkle. *Journal of Phytopathology*, 147: 187-192.

- 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: 297.
- McCoy, R. E. (1979): Mycoplasmas and yellows diseases. In: The Mycoplasmas. Vol. III. Plant and insect mycoplasmas. (eds. by Whitcomb, R.F., Tully, J.G.). Academic Press, Ins., New York: 229-265.
- McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. Annual Review of Phytopathology, 40: 443-465.
- Musetti, R., Poalacci, A., Ciaffi, M., Tanzarella, O.A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora P., Badiani, M., Osler, R. (2010): Phloem Cytochemical Modification and Gene Expression Following the Recovery of Apple Plants from Apple Proliferation Disease. Phytopathology, 100: 390-399.
- Musetti, R, De Marco, F., Farhan, K., Polizzotto, R., Santi, S., Ermacora, P., Osler, R. (2011): Phloem-specific protein expression patterns in apple and grapevine during phytoplasma infection and recovery. Bulletin of Inocetology, 64: S211-S212.
- Nasu, S., Sugiura, M., Wakimoto, T., Iida, T. T. (1967): On the etiologic agent of rice yellow dwarf disease). Annals Phytopathological Society Japan, 33: 343-344.
- Olivier, C.Y., Lowery, D.T., Stobbs, L.W., Vincent, C., Galka, B., Saguez, J., Bittne, L., Johnson, R., Rott, M., Masters, C., Green, M. (2009): First Report of Aster Yellow Phytoplasmas ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') in Canadian Grapevines. Plant Disease, 93: 669.
- Pavlović, S., Starović, M., Živković, S., Kostić, M., Tomić, T. (2004a): Crvenilo – raširena pojava na lekovitom bilju. V kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 22-26. 11, Zbornik rezimea: 160-161.
- Pavlović, S., Tošić, M., Stojanović, S., Starović, M. (2004b): Detakcija fitoplazmi u *Echinacea* spp. Elektronskom mikroskopijom. V kongres o zaštiti bilja. Zlatibor, Zbornik rezimea: 106-107.
- Pavlović, S, Tošić, M., Stojanović, S., Starović, M., Dražić, S. (2004c): First report on *Phytoplasma* disease in purple coneflower in Serbia. 3th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Nitra, Slovak Republic, Proceedings: 94-98.
- Pavlović, S., Stojanović, S., Starović, M., Rajković, S. (2005): Some new diseases of medicinal plants in Serbia. 9th International Congress PHYTOPHARM 2005. St-Petersburg, Rusia, Proceedings: 468-473.
- Pavlović, S., Ivanović, Ž., Stojanović, S., Starović, M., Jošić, D., Martini, M. (2010a): Identification of phytoplasma of 16Sr XIIA group infecting two *Echinacea* species in Serbia. COST Action Combined meeting of Work Groups 1-4: Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management, Sitges, Spain, Abstract book: 32.
- Pavlović, S., Mitrović, J., Duduk, B. (2010b): Prvi nalaz stolbur fitoplazmi na peršunu i valerijani u Srbiji. Zbornik rezimea radova X Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor: 69-70.
- Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Popović, T., Aleksić, G., Dražić, S., Jošić, D. (2011): *Echinacea purpurea* – a host of 16SrXII-A phytoplasma group in Serbia. Phytopathogenic Mollicutes, 1: 35-39.
- Pavlović, S., Pljevljakušić, D., Vuković, G., Starović, M., Stojanović, S. (2012a): *Fusarium* spp. causing withering of nasurtium in Serbia. Proceedings of the 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia: 309-314.
- Pavlović, S., Jošić, D., Starović, M., Stojanović, S., Aleksić, G., Stojšin, V., Radanović, D. (2012b): Stolbur Phyto-

plasma on two St. John's Worth species (*Hypericum perforatum* L. and *H. barbatum* L.) in Serbia. *Journal of Medicinal Plant Research*, 6: 906-911.

Pavlović, S., Pljevljakušić, D., Starović, M., Stojanović, S., Jošić, D. (2012c): First report of 16SrIII-B phytoplasma subgroup associated with virescence of *Arnica montana* L. in Serbia. *Plant Disease*, DOI ORG 10.1094/PDIS-07-12-0650-PDN.

Pavlović, S., Pljevljakušić, D., Starović, M., Stojanović, S., Jošić, D. (2012d): First report of 16SrIII-B phytoplasma subgroup associated with virescence of *Arnica montana* L. in Serbia. *Plant Disease*, 96(11): 1691.

Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Aleksić, G., Kojić, S., Zdravković, M., Jošić, D. (2014a): The first report of Stolbur phytoplasma associated with phyllody of *Calendula officinalis* in Serbia. *Plant Disease*, 98(8): 1152.

Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Kojić, S., Marinković, J., Jošić, D. (2014b): First report of Stolbur phytoplasma affecting *Cichorium intybus* in Serbia. *Plant Disease*, 98(6): 839.

Pracros, P., Renaudin, J., Eveillard, S., Mouras, A., Hernould, M. (2006): Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 62-68.

Prince, J.P., Davis, R. E., Wolf, T.K., Lee, I.M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi, R., Barba, M. (1993): Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, 83: 1130-1137.

Quaglino, F., Zhao, Y., Bianco, P.A., Wei, W., Casati, P., Davis, R.E. (2010): [http:// www.ncbi.nlm.gov/nuccore/GU220565.1](http://www.ncbi.nlm.gov/nuccore/GU220565.1)

Radisek, S., Ferant, N., Jakse, J., Javornik, B. (2008): Identification of a phytoplasma from the aster yellows group infecting purple coneflower (*Echinacea purpurea*) in Slovenia. *New Disease Reports*, 18: 13.

Radonjć, S., Hrnčić, H., Jović, J., Cvrković, T., Krstić, O., Krnjajić, S., Toševski, I. (2009): Occurrence and Distribution of Grapevine Yellows Caused by Stolbur Phytoplasma in Montenegro. *Journal of Phytopathology*, 157: 682-685.

Raju, B.C., Nyland, G., Purcell, A.H. (1983): Current status of the etiology of pear decline. *Phytopathology*, 73: 350-353.

Rančić, D., Paltrinieri, S., Toševski, I., Petanović, R., Stevanović, B., Bertaccini, A. (2005): First report of multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense* and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. *Plant Pathology*, 54: 561.

Rangaswami, G.D.J., Bagayaraj, D.G. (2005): *Agricultural Microbiology*. 2nd ed. Prentice, Hall of India, New Delhi, 442.

Razin, S., Tully, J.G. (1975): *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: molecular characterization*. San Diego (CA): Academic Press; 1995. v.1.

Reeder, R., Kelly, P.L., Arocha, Y. (2009): "Candidatus Phytoplasma asteris" identified in blackberry (*Rubus fruticosus* agg.) in the United Kingdom. *New Dis Rep*, 19: 66.

Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E., Lee, I.M., Martini, M., Aspiros, H.S. (2003): Detection and characterization of the phytoplasma associated with marigold phyllody in Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 85: 81-86.

Sarić, M. (1989): *Lekovite biljke Srbije*. Srpska akademija nauka, Beograd, 640.

- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E. (1997): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tuf gene in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381-3389.
- 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.
- Sertkaya, G., Osler, R., Musetti, R., Ermacora, P., Martini, M. (2004): Detection of phytoplasmas in *Rubus* spp. by microscopy and molecular techniques in Turkey. U Martin RR (urednik) X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases, Valencia, Spain. *Acta Horticulturae*: 656.
- Singh, A., Dubey, N. K. (2012): An ethnobotanical study of medicinal plants in Sonebhadra District of Uttar Pradesh, India with reference to their infection by foliar fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2727-2746.
- Službeni glasnik RS (2009): 41/2009.
- Stanosz, G.R., Heimann, M.F., Lee, I.M. (1997): Purple coneflower is a host of the aster yellows phytoplasma. *Plant Disease*, 81: 424.
- Starović, M., Kuzmanović, S., Gavrilović, V., Aleksić, G., Popović, T., Stojanović, S., Jošić, D. (2012): Detection and identification of two phytoplasmas – 16SrIII-B and 16SrXII-A from Alfalfa (*Medicago sativa*) in Serbia. *Journal of Phytopathology* 160(11-12):758-760.
- Starović, M., Kojić, S., Kuzmanović, Stojanović, S., Pavlović, S., Jošić, D. (2013): First Report of Blueberry Reddening Disease in Serbia Associated with 16SrXII-A (Stolbur) Phytoplasma. *Plant Disease*, 97(12):1653.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Mettraux, J.P. (1997): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- Šutić, D. (1995): Anatomija i fiziologija bolesnih biljaka. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 443.
- Tozzi, D.C.M., Ramsdell, D.C., Taboada, O., Lee, I.M., Davis, R.E. (1993): Epidemiological studies on the stunt disease of highbush blueberry. *Annals of Applied Biology*, 123: 579-599.
- Valiunas, D., Alminaite, A., Jomantiene, R., Davis R.E., Maas, J.L. (2004): Possible Cause of European Blueberry Disease in Related to North American Milkweed Yellows Phytoplasma. *Journal of Plant Pathology*, 86: 135-140.
- Van der Meer, F.A. (1987): *Rubus* stunt.: Converse R. (urednik) *Virus Diseases of Small Fruits*. Washington, D.C.: US Department of Agriculture, Handbook, 631: 197-203.
- Vindimian, M.E., Grassi, A., Ciccotti, A., Pollini, C.P., Terlizzi, F. (2004): Epidemiological studies on *Rubus* Stunt (RS) in Blackberry orchards located near Trento (Italy). U Martin RR. (urednik) X International Symposium on Small Fruit Virus Diseases, Valencia, Spain. *Acta Horticulturae*, pp. 654.
- Wang, K., Hiruki, C. (2001): Use of heteroduplex mobility assay for identification and differentiation of phytoplasmas in the aster yellows group and the clover proliferation group. *Phytopathology*, 91: 546-552.
- Wu, W., Cai, H., Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.M., Chen, H., Zhao, Y. (2011): Identification of two new phylogenetically distant phytoplasmas from *Senna surattensis* plants exhibiting stem fasciation and shoot proliferation symptoms. *Annals of Applied Biology*, 160: 25-34.
- Xu, B.Y., Chen, T.A. (1996): Cranberry false blossom disease in New Jersey. *Phytopathology*, 86: S125.

(Primljeno: 18.05.2015.)
(Prihvaćeno: 30.06.2015.)

PHYTOPLASMA DISEASES OF MEDICINAL PLANTS

MIRA STAROVIĆ¹, SNEŽANA PAVLOVIĆ², SAŠA STOJANOVIĆ¹, DRAGANA JOŠIĆ³

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

²Institute for Medicinal Plant Research "Dr. J. Pancic", Belgrade, Serbia

³Institute of Soil Science, Belgrade, Serbia

SUMMARY

A diversity and increasing economic importance of medicinal plants demand a need to study their diseases. Among them phytopathogenic fungi are of a considerable importance, and in the last decade, phytoplasma diseases.

Phytoplasma are important obligate intracellular, insect – transmitted pathogenic agents, found inside the phloem, in particular in the sieve tube cells of many plant species. These plant pathogens are wall-less, non-cultivable prokaryotes belonging to the *Mollicutes* class. They are the smallest prokaryotic organisms of a varied shape and size (50-1000 nm in diameter) and visible under the electron microscope. Their genome is the shortest known of all prokaryotic organisms (680-1600 kb). The most cited and widely accepted system of identification is based on the similarity in the 16S ribosomal gene sequence as well as their biological characteristics.

Phytoplasmas are associated with plant diseases in several hundred plant species, including many important vegetable, fruit crops, ornamental and medicinal plants. Disease plants exhibit pathological changes (in plants) which are demonstrated through four typical types of symptoms: (1) phyllody, (2) yellowing and reddening, (3) virescence and (4) proliferation of axillary buds or 'witch's broom'.

Typical phytoplasma symptoms are confirmed on the following species of medicinal plants: *Echinacea purpurea*, *E. Angustifolia*, *Hypericum perforatum*, *H. barbatum*, *Plantago major*, *Saponaria officinalis*, *Digitalis purpurea*, *Origanum vulgare*, *Levisticum officinale*, *Carum carvi*, *Trigonella foenum greacum*, *Melisa officinalis*, *Petroselinum sativum*, *Apium graveolens*, *Valeriana officinalis*, *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus*, *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Cichorium intybus*, *Salix alba* and *Chamomilla recutita*. The presence of phytoplasma was detected using electron microscopy (TEM) in 5 species of medicinal plants in Serbia, and using molecular identification in order to identify phytoplasma in other species.

Two types of phytoplasma were identified on more than 20 species of the medicinal plants in Serbia: Stolbur phytoplasma (16SrXII group) and Clover yellow edge (16SrIII-B). There are very few qualitative and quantitative data on the changes in secondary metabolites affected by the phytoplasma and these data should be improved.

Key words: phytoplasma diseases, medicinal plants, symptoms, identification

(Received: 18.05.2015.)

(Accepted: 30.06.2015.)