



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

WYDZIAŁ PRZYRODNICZO-TECHNOLOGICZNY

Mgr inż. Marta Jurga

**Charakterystyka fitoplazm obecnych w pszenicy i kukurydzy
oraz w potencjalnych wektorach**

Characterization of phytoplasmas in wheat and maize and in potential vectors

Praca doktorska

wykonana pod kierunkiem

Promotor: dr hab. inż. Krzysztof Matkowski, profesor uczelni

Zakład Fitopatologii i Mykologii, Katedra Ochrony Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Zwolińska

Zakład Wirusologii i Bakteriologii

Instytut Ochrony Roślin-Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu

Wrocław, 2021

*Pragnę podziękować Prof. Krzyszofowi Matkowskiemu
za poświęcony czas, wsparcie i cenne wskazówki,
pomocne w pisaniu pracy.*

*Składam serdeczne podziękowania Agnieszce Zwolińskiej,
za szansę, możliwość rozwoju i ogrom wiary we mnie.
Bez Ciebie ta praca, by nie powstała.*

*Serdeczne dziękuję Tomkowi Klejdyszowi
za nieocenioną pomoc w oznaczeniu owadów.*

*I szczególnie dziękuję moim najbliższych,
za wyrozumiałość, cierpliwość i wsparcie.
Dziękuję, że jesteście.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	5
2. CEL PRACY I HIPOTEZA BADAWCZA	6
3. PRZEGLĄD LITERATURY	7
3.1. Ogólna charakterystyka fitoplazm	7
3.2. Klasyfikacja fitoplazm	8
3.3. Wpływ fitoplazm na roślinę żywicielską	10
3.4. Przenoszenie fitoplazm	11
3.4.1. Przez owady	11
3.4.2. Inne sposoby	12
3.5. Występowanie fitoplazm	13
3.5.1. W uprawie pszenicy ozimej	13
3.5.2. Wektory fitoplazm pszenicy ozimej	14
3.5.3. W uprawie kukurydzy	14
3.5.4. Wektory fitoplazm kukurydzy	16
3.6. Wykrywanie fitoplazm	16
3.7. Populacja piewików w Polsce	18
4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ	20
4.1. Materiał roślinny	20
4.1.1. Zebrany materiał roślinny	20
4.1.2. Rośliny testowe	21
4.2. Owady	22
4.2.1. Zbiór potencjalnych wektorów	22
4.2.2. Owady testowe i warunki ich hodowli	22
4.1. Izolacja DNA	23
4.1.1. Izolacja całkowitego DNA roślinnego	23
4.1.2. Izolacja całkowitego DNA z owadów	24
4.2. Spektrofotometryczny pomiar stężenia oraz czystości DNA	24
4.3. Synteza DNA	25
4.3.1. Namnażanie rybosomalnego DNA fitoplazm metodą zagnieżdżonego-PCR	25
4.4. Klonowanie DNA	28
4.4.1. Oczyszczanie produktów reakcji łańcuchowej polimerazy	28
4.4.2. Ligacja	28

4.4.3.	Transformacja bakterii kompetentnych plazmidem _____	29
4.4.4.	Izolacja plazmidów _____	29
4.4.5.	Trawienie restrykcyjne enzymem EcoRI _____	30
4.5.	Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelu agarozowym _____	30
4.6.	Namnażanie fragmentu DNA kodującego translacyjny czynnik elongacji Tu metodą zagnieżdżonego-PCR _____	31
4.7.	Odczyt sekwencji nukleotydów _____	31
4.8.	Analiza filogenetyczna _____	31
4.9.	Wirtualna analiza restrykcyjna (RFLP) _____	32
4.10.	Przenoszenie fitoplazm przez <i>Macrosteles laevis</i> oraz <i>Psammotettix alienus</i> w warunkach szklarniowych _____	32
4.11.	Odczynniki _____	33
4.11.1.	Szczep bakteryjny _____	33
4.11.2.	Gotowe zestawy do analiz _____	34
4.11.3.	Odczynniki chemiczne _____	34
4.11.4.	Bufory i roztwory _____	35
4.11.5.	Podłoża hodowlane _____	35
5.	WYNIKI I DYSKUSJA _____	36
5.1.	Objawy na pszenicy ozimej _____	36
5.1.1.	Identyfikacja czynnika sprawczego _____	36
5.2.	Objawy na kukurydzy _____	43
5.2.1.	Identyfikacja czynnika sprawczego _____	43
5.3.	Identyfikacja potencjalnych wektorów fitoplazm _____	50
5.3.1.	W pszenicy ozimej _____	50
5.3.2.	W kukurydzy _____	59
5.4.	Ocena zdolności przenoszenia fitoplazm w pszenicy ozimej i kukurydzy _____	66
5.4.1.	Przez <i>Macrosteles laevis</i> (Ribaut) _____	66
5.4.2.	Przez <i>Psammotettix alienus</i> (Dahlbom) _____	72
5.	WNIOSKI _____	80
	STRESZCZENIE _____	81
	LITERATURA _____	83
	WYKAZ SKRÓTÓW _____	108
	SPIS WYKRESÓW, TABEL I RYCIN _____	109

1. WSTĘP

Pszenica i kukurydza zajmują jedno z czołowych miejsc w światowej produkcji zbóż [Shiferaw i in., 2013]. W czasie wegetacji narażone są na infekcje ze strony patogenicznych organizmów. W ostatnich latach z powodu zachodzących zmian klimatycznych obserwuje się wzrost chorób powodowanych przez fitoplazmy [Hogenhout i in., 2008; Bertaccini i Duduk, 2009; Salar i in., 2013].

Fitoplazmy to znane od pół wieku fitopatogeniczne bakterie należące do klasy *Mollicutes*. Przedstawicielami tej klasy są patogeny roślin, owadów, zwierząt i ludzi, które charakteryzują się brakiem ściany komórkowej oraz zredukowanym genomem. Fitoplazmy są endopasożytami: roślin i owadów. W żywicielu roślinnym ich występowanie ograniczone jest do tkanki łyka, gdzie przemieszczają się systemicznie wraz z sokiem roślinnym. Z kolei u owadów będących wektorami bakterie przedostają się z przewodu pokarmowego do gruczołów ślinowych, a następnie uwalniane są do nowych żywicieli roślinnych w trakcie żerowania [Marccone i in., 1999; Oshima i in., 2004; Hogenhout i in., 2008].

Bakterie z rodzaju '*Candidatus Phytoplasma*' są sprawcami chorób u ponad 1000 gatunków roślin [Namba, 2019]. Większość zidentyfikowanych żywicieli stanowią rośliny dwuliścienne. U roślin jednoliściennych, zarówno uprawnych jak i chwastów największy odsetek infekcji fitoplazmatycznych odnotowano w rodzinie *Poaceae* [Seemüller i in., 2002; Jurga i Zwolińska, 2020b].

Rozwój choroby fitoplazmatycznej często prowadzi do silnego zaburzenia funkcjonowania łyka oraz równowagi hormonów roślinnych, w wyniku czego powstają różne zmiany morfologiczne u roślin. Bywa, że przebieg infekcji jest bezobjawowy i nie stanowi zagrożenia dla żywicieli [Lee i in., 2000; Christensen i in., 2005; Pagliari i in., 2016; Pradit i in., 2019].

Rozprzestrzenianie i przetrwanie fitoplazm w środowisku związane jest z obecnością owadów. Są one naturalnymi rezerwuarami fitoplazm i odgrywają kluczową rolę w przenoszeniu tych patogenów. Obecnie za wektory uznawanych jest blisko 100 gatunków owadów z rzędu pluskwiaków (Hemiptera). Najliczniejszą grupę stanowią owady z rodziny *Cicadellidae*, z podrodziny *Deltocephalinae* [Lee i in., 2000; Weintraub i Beanland, 2006; Wilson i Weintraub, 2007; Weintraub i Jones, 2009].

W Polsce badania nad fitoplazmami oraz ich biologią są prowadzone przez nielicznych badaczy. W uprawach rolniczych obecność bakterii '*Ca. Phytoplasma*'

potwierdzono u roślin rzepaku ozimego [Zwolińska i in., 2011a; Zwolińska i in., 2011b], grochu siewnego [Zwolińska i in., 2012], buraka cukrowego [Zwolińska i in., 2016], oraz kukurydzy [Zwolińska i Borodynko-Filas, 2021]. Mało wiadomo o występowaniu fitoplazm w uprawach zbóż. Brakuje również danych na temat gatunków owadów biorących udział w rozprzestrzenianiu tych patogenów w środkowej części Europy.

Jak dotąd nie ma skutecznych metod zwalczania fitoplazm. Obecnie stosowane są działania profilaktyczne oparte na używaniu insektycydów w celu ograniczania rozprzestrzeniania patogenu przez owady oraz usuwaniu źródeł infekcji. W związku z tym dostarczenie kluczowych informacji odnośnie obecności fitoplazm oraz owadów będących wektorami może być fundamentalnym elementem służącym ograniczeniu infekcji fitoplazmatycznych [Bertaccini i in., 2014].

2. CEL PRACY I HIPOTEZA BADAWCZA

W ostatnich latach na obszarze Polski odnotowuje się wzrost średniej temperatury powietrza. Ciepła i długa jesień sprzyja aktywności owadów, co zwiększa ryzyko pojawów chorób fitoplazmatycznych w szczególności u roślin ozimych. Uprawy te wiosną będą rezerwuarem bakterii przenoszonych m. in. na kukurydzę.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena zagrożenia przez fitoplazmy uprawom pszenicy ozimej i kukurydzy oraz wskazanie potencjalnych wektorów.

Hipotezy badawcze zakładają, że:

- Fitoplazmy mogą być zagrożeniem dla upraw pszenicy i kukurydzy;
- Podatność na zakażenie fitoplazmami dwóch gatunków roślin uprawnych jest zróżnicowana;
- Istnieje zróżnicowana reakcja odmian na chorobę fitoplazmatyczną;
- Skoczek sześciorek *Macrostelus laevis* (Ribaut 1927) oraz zgłobik smużkowy *Psammotettix alienus* (Dahlbom 1850) są wektorami fitoplazm w uprawie pszenicy i kukurydzy.

3. PRZEGLĄD LITERATURY

3.1. Ogólna charakterystyka fitoplazm

Do roku 1967, z uwagi na podobne symptomy, za czynnik sprawczy chorób fitoplazmatycznych uznawano wirusy. Jednak badania tkanek roślinnych nie ujawniły tego typu patogenów [Doi i in., 1967; Lee i in., 2000]. Przełomem w pracy nad fitoplazmami było dostrzeżenie pod mikroskopem elektronowym sferycznych ciał we fragmentach łyka roślin wykazujących objawy żółtaczki, karłowatości i czarcich mioteł. Obserwowane komórki były wielkości 0,2-0,8 μm oraz nie posiadały ściany komórkowej i otoczone były tylko pojedynczą błoną komórkową. Charakteryzowały się również pleomorfizmem i wrażliwością na antybiotyki z grupy tetracyklin. Z powodu wizualnego podobieństwa do mykoplazm nazwano je organizmami mykoplazmopodobnymi (MLO) [Hogenhout i in., 2008; Kube i in., 2012].

Pod koniec lat 80. XX wieku potwierdzono wcześniej sugerowane informacje, że *Acholeplasma*, *Mycoplasma* i *Spiroplasma* stanowią jedną linię ewolucyjną i pochodzą od bakterii Gram-dodatnich [Woese i in., 1980; Woese, 1987; Weisburg i in., 1989]. Lim i Sears [1989] analizując sekwencję genu 16S rRNA organizmu należącego do grupy żółtaczki astra, wykazali przynależność MLO do klasy *Mollicutes* i bliższe pokrewieństwo z rodzajem *Acholeplasma* niż z *Spiroplasma* czy *Mycoplasma*. Kolejne analizy filogenetyczne MLO wskazały ich grupowanie w osobnym kładzie wewnątrz klasy *Mollicutes* [Seemüller i in., 1994].

Na X Kongresie Międzynarodowej Organizacji Mykoplazmatycznej, w roku 1994 przyjęto nazwę 'fitoplazma'. Dekadę później fitoplazmy zaliczono do nowego rodzaju 'Candidatus (Ca.) Phytoplasma' (Tab. 1) [IRPCM, 2004].

Tab. 1. Taksonomia fitoplazm

Królestwo	<i>Bacteria</i>
Typ	<i>Firmicutes</i>
Klasa	<i>Mollicutes</i>
Rząd	<i>Acholeplasmatales</i>
Rodzina	<i>Acholeplasmataceae</i>
Rodzaj	'Candidatus Phytoplasma'

3.2. Klasyfikacja fitoplazm

Istnieją dwa systemy służące klasyfikowaniu fitoplazm, opierające się o gen kodujący 16S rRNA. Pierwszy z nich wykorzystuje analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). W tym celu produkty o długości 1,2 kb pochodzące z reakcji PCR poddawane są trawieniu z siedemnastoma enzymami restrykcyjnymi, a produkty tych reakcji rozdzielane w celu porównania długości. Alternatywnie, produkt PCR jest sekwencjonowany. Uzyskane sekwencje należy wprowadzić do narzędzia *iPhyClassifier*, który symuluje trawienie 17 enzymami restrykcyjnymi i elektroforezę żelową. Na tej podstawie *iPhyClassifier* generuje wirtualny profil RFLP, uznawany za tzw. „odcisk palca” fitoplazm. W oparciu o wynik współczynnika podobieństwa, który uzyskano w zestawieniu analizowanego profilu ze wzorcami RFLP można określić przynależność fitoplazmy do grupy 16Sr, a także ich podgrupy [Zhao i in., 2009]. Klasyfikacja fitoplazm według grup rybosomalnych pokrywa się z grupowaniem kompletnych sekwencji genu 16S rRNA w analizie filogenetycznej [Lee i in., 1998].

Drugi z systemów określa fitoplazmy do gatunku ‘*Ca. Phytoplasma*’ (Tab. 2), poprzez dopasowanie sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA do sekwencji referencyjnych fitoplazm. Otrzymany procent identyczności między sekwencjami decyduje o ich przynależności. Wartość wskaźnika <97,5% sugeruje obecność nowego gatunku ‘*Ca. Phytoplasma*’ [Duduk i Bertaccini, 2011].

Informacje dostarczone z obu powyższych analiz sekwencji tego samego genu umożliwiają sklasyfikowanie szczepów fitoplazm wyosobnionych w badaniach. Do chwili obecnej opisano 47 gatunków ‘*Ca. Phytoplasma*’, które należą do 37 grup 16Sr i dzielą się na ponad 100 podgrup (Tab. 2) [Yang i in., 2017; Zhao i in., 2021].

Tab. 2. Klasyfikacja fitoplazm

Grupa 16Sr	Gatunek ‘ <i>Candidatus Phytoplasma</i> ’
16SrI	‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’
	‘ <i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i> ’
	‘ <i>Ca. Phytoplasma tritici</i> ’
16SrII	‘ <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ’
	‘ <i>Ca. Phytoplasma australasia</i> ’
16SrIII	‘ <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ’

Grupa 16Sr	Gatunek '<i>Candidatus Phytoplasma</i>'
16SrIV	' <i>Ca. Phytoplasma palmae</i> '
16SrV	' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma rubi</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma balanitae</i> '
16SrVI	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i> '
16SrVII	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '
16SrVIII	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> '
16SrIX	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '
16SrX	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '
16SrXI	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '
16SrXII	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i> '
16SrXIII	' <i>Ca. Phytoplasma hispanicum</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma meliae</i> '
16SrXIV	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '
16SrXV	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '
16SrXVI	' <i>Ca. Phytoplasma graminis</i> '
16SrXVII	' <i>Ca. Phytoplasma caricae</i> '
16SrXVIII	' <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> '
16SrXIX	' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '

Grupa 16Sr	Gatunek '<i>Candidatus Phytoplasma</i>'
16SrXX	' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '
16SrXXI	' <i>Ca. Phytoplasma pini</i> '
16SrXXII	' <i>Ca. Phytoplasma palmicola</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i> '
16SrXXIII	*nc.; Buckland valley grapevine yellows
16SrXXIV	nc.; Sorghum bunchy shoot group
16SrXXV	nc.; Weeping tea tree witches' broom group
16SrXXVI	nc.; Mauritius sugar cane yellows D3T1
16SrXXVIII	nc.; Havana derbid phytoplasma group
16SrXXIX	' <i>Ca. Phytoplasma omanense</i> '
16SrXXX	' <i>Ca. Phytoplasma tamaricis</i> '
16SrXXXI	' <i>Ca. Phytoplasma costaricanum</i> '
16SrXXXII	' <i>Ca. Phytoplasma malaysianum</i> '
16SrXXXIII	' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> '
16SrXXXVI	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> ' ' <i>Ca. Phytoplasma wodyetiae</i> '
16SrXXXVII	' <i>Ca. Phytoplasma stylosanthis</i> '
-	' <i>Ca. Phytoplasma noviguineense</i> '

*nc. - niescharakteryzowany

3.3. Wpływ fitoplazm na roślinę żywicielską

Porażenie roślin przez fitoplazmy powoduje zaburzenia równowagi regulatorów wzrostu, co doprowadza do karłowatości, skrócenia międzywęźli oraz powstawania „czarcich mioteł” w wyniku proliferacji pędów. Wśród objawów chorób fitoplazmatycznych często obserwowane jest zniekształcenie kwiatostanu, którego elementy zamieniają się w liściaste struktury, nazywane fylloidiami oraz ulegają wireshencji, czyli zazielenianiu płatków korony kwiatów. Zmiany w obrębie kwiatów doprowadzają do ich sterylności. Ponadto rozwój fitoplazm powoduje drobnienie liści, staśmienia łodygi, zmiany zabarwienia części nadziemnej czy też wzrost liczebności włóśników [Lee i in., 1998; Olivier i in., 2009a; Duduk i Bertaccini, 2011; Namba i in., 2019]. W niektórych przypadkach obecność fitoplazm w tkankach roślinnych jest cechą

pożądaną. Przykładem jest uprawa poinsecji (*Euphorbia pulcherrima* Wild. ex Klotzsch), w której wykorzystuje się fitoplazmę z podgrupy 16SrIII-H odpowiedzialną za indukcję pędów poinsecji (PoiBI) w celu uzyskania większej ilości kwiatów [Nicolaisen i Horvath, 2008]. Zakażenie roślin przez fitoplazmy może przebiegać również bezobjawowo. Utrudnia to kontrolowanie oraz ograniczanie rozprzestrzeniania się patogenu [Soufi i Komor, 2014; Donkersley i in., 2019].

Coraz większego znaczenia nabierają badania nad rolą efektorów i sposobem ich działania w roślinach żywicielskich. Komórki fitoplazm poprzez wydzielanie białek efektorowych, oddziałujących z niektórymi cząsteczkami gospodarza roślinnego, prowadzą do nieprawidłowości rozwojowych. Ta interakcja jest bardzo specyficzna, ponieważ tylko kompatybilne cząsteczki gospodarza są rozpoznawane przez efekторы fitoplazmy [Bai i in., 2009; Hoshi i in., 2009; Sugio i in., 2011b]. Jednym z przykładów białka efektorowego jest SAP11, którego ekspresja u organizmu modelowego *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., wywołała nadmierną proliferację pędów (tzw. czarcie miotły), falowanie brzegów liści i upośledzenie systemu obronnego roślin. Potwierdzono również, że SAP11 uczestniczy w interakcji owadów i roślin oraz korzystnie oddziałuje na rozwój wektorów fitoplazm [Sugio i in., 2011b]. Innym białkiem efektorowym AY-WB, którego rola została opisana jest SAP54. W systemie modelowym uwzględniającym *A. thaliana* jego obecność skutkowało występowaniem liściastych płatków kwiatowych, zwanych fylloidiami [MacLean i in., 2011]. Z kolei aktywność efektoru SAP05 przedłuża żywotność żywiciela oraz powoduje proliferację liści i sterylność pędów [Huang i in., 2021]. Efektorem wydzielanym przez fitoplazmę żółtaczkę cebuli (OY) jest białko TENGU. Ekspresja TENGU u *A. thaliana* i *Nicotiana benthamiana* L. odpowiedzialna była za karłowatość, tworzenie czarcich mioteł i zaburzenia fitohormonów np. zakłócanie szlaku sygnałowego auksyny [Hoshi i in., 2009; Minato i in., 2014].

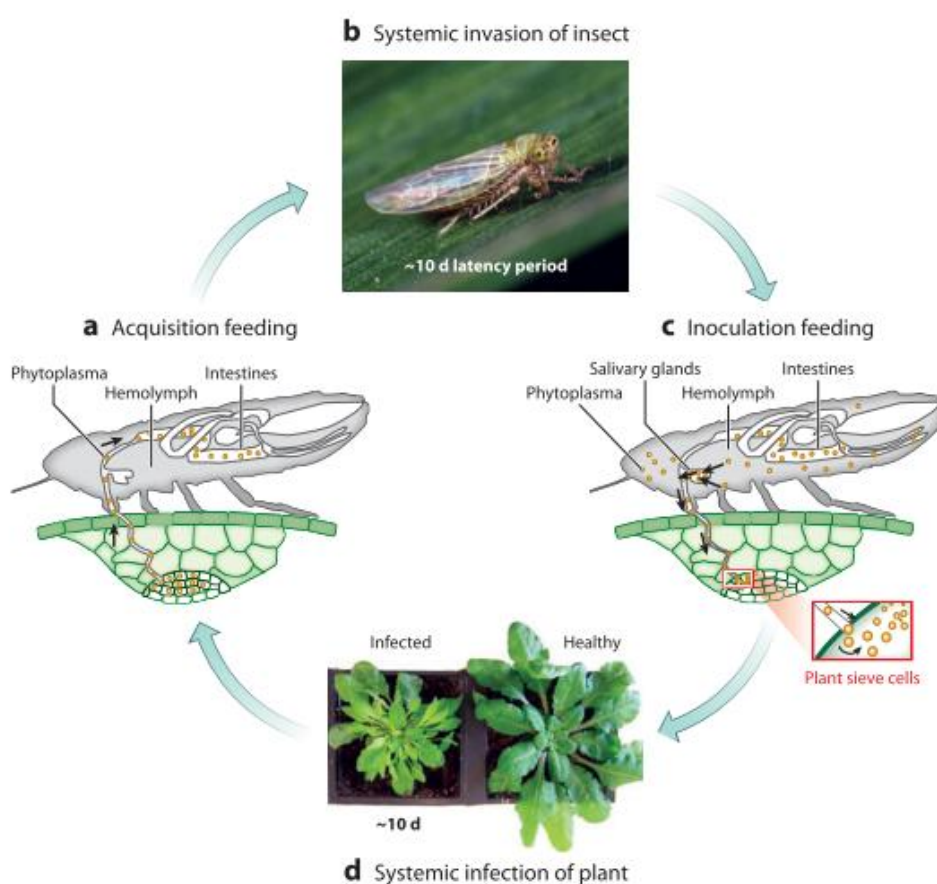
3.4. Przenoszenie fitoplazm

3.4.1. Przez owady

Głównym sposobem rozprzestrzeniania organizmów fitoplazmatycznych w środowisku są owady. Wektorami bakterii ‘*Ca. Phytoplasma*’ są owady z rzędu pluskwiaków (Hemiptera), należące do podrzędu piewików (*Auchenorrhyncha*): *Cicadomorpha* i *Fulgoromorpha* oraz gatunki z rodziny *Psyllidae* (podrząd *Sternorrhyncha*). Ich skuteczność w przenoszeniu fitoplazm wynika z hemimetabolizmu, sposobu żerowania, w którym nie dochodzi do uszkodzenia tkanek i wywołania reakcji obronnych roślin oraz

trwałego związku owadów z patogenem, który ustaje dopiero w momencie ich śmierci [Weintraub i Beanland, 2006].

Wektory fitoplazm odżywiają się sokiem roślinnym. W czasie żerowania oprócz składników pokarmowych dodatkowo pasywnie pobierają bakterie znajdujące się w łyku roślin. Czas nabywania fitoplazm (AAP) może trwać od kilku minut do nawet kilku godzin. Komórki fitoplazm przedostają się do jelita środkowego owada i zasiedlają jego komórki oraz sąsiadujące mięśnie. W okresie latencji (LP), który trwa co najmniej 10 dni fitoplazmy ulegają replikacji i przedostają się do hemolimfy. Ostatecznie trafiają i kumulują się w gruczołach ślinowych, a podczas żeru inokulacyjnego komórki bakterii znajdujące się w ślinie owadów infekują rośliny [Sugio i in., 2011a] (Ryc. 1).



Ryc. 1. Cykl rozwojowy fitoplazm [Sugio i in., 2011a].

3.4.2. Inne sposoby

Fitoplazmy mogą być również przenoszone w procesie rozmnażania wegetatywnego, takiego jak szczepienie roślin, produkcja sadzonek oraz mikrorozmnażanie w warunkach *in vitro* [Weintraub i Beanland, 2006; Bertaccini i Duduk, 2009]. Przedostanie się

fitoplazm na nowe rośliny żywicielskie może zachodzić za pomocą rośliny pasożytniczej jaką jest kanianka (*Cuscuta* sp.) [Kamińska i Korbin, 1999; Pribylova i Spak, 2013].

Sposób przenoszenia poprzez połączenie elementów rośliny zainfekowanej oraz zdrowej został potwierdzony podczas badań nad *Ca. Phytoplasma mali*, gdzie do transportu komórek fitoplazmatycznych zostały wykorzystane „mosty korzeniowe” utworzone pomiędzy drzewami jabłoni [Ciccotti i in., 2008].

W 2002 roku Khan i in. przedstawili pierwsze dowody na obecność fitoplazm w nasionach lucerny. Z wysianych nasion, które pochodziły od rośliny matecznej zakażonej fitoplazmą, w warunkach *in vitro* otrzymano rośliny z objawami choroby fitoplazmatycznej. W kolejnych latach mechanizm ten potwierdzono u goździka (*Dianthus* spp.) [Šeruga-Music i in., 2004], na pomidorze (*Solanum lycopersicum* L.) oraz limonce (*Citrus aurantifolia*) [Botti i Bertaccini, 2006]. W łupinie nasiennej moreli zidentyfikowano Europejską żółtaczkę drzew pestkowych (ESFY) [Nečas i in., 2008]. Natomiast w ziarnie morwy odnotowano fitoplazmę powodującą karłowatość morwy [Jiang i in., 2004]. W swoich badaniach Nipah i in. [2007] wykazali obecność fitoplazmy żółtaczki astra (*Ca. Phytoplasma asteris*) w ziarnie kukurydzy, które zebrano z zainfekowanych roślin. Zwolińska i in. [2012] potwierdzili występowanie fitoplazmy stołburu w roślinach grochu (*Pisum sativum* L.) otrzymanych z zainfekowanych nasion. *Ca. Phytoplasma asteris* wykryto także w nasionach rzepaku ozimego, które pochodziły od roślin zainfekowanych z objawami oraz bez objawów. Uzyskane rośliny w kolejnym pokoleniu posiadały ten sam izolat patogenu, który zidentyfikowano w roślinie matecznej [Olivier i in., 2006; 2010]. Oropeza i in. [2017] potwierdzili przenoszenie fitoplazmy z grupy 16SrIV powodującej śmiertelną chorobę żółknięcia palmy kokosowej (LY) z zarodków do siewek hodowanych *in vitro*. Olivier i Galka [2008] w młodych łodygach rzepaku zidentyfikowali fitoplazmę z podgrupy 16SrI-B. Jednak po fazie czwartego liścia (BBCH 14) wynik był ujemny. Ponadto prowadzone są badania na temat możliwości przenoszenia fitoplazm wraz z ziarnem pszenicy [Satta i in., 2019].

3.5. Występowanie fitoplazm

3.5.1. W uprawie pszenicy ozimej

Najważniejszą chorobą pszenicy ozimej jest błękitna karłowatość pszenicy (Wheat blue dwarf), której czynnikiem sprawczym jest ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’. Babaei i in. [2021] uznali, że czynnik odpowiedzialny za WBD reprezentuje nowy takson ‘*Ca. Phytoplasma tritici*’. Pierwsze doniesienie o WBD pojawiło się w latach 60. XX wieku w Chinach.

Obecnie jest jedną z najbardziej szkodliwych pod względem ekonomicznym chorób zbóż w północno-zachodnich Chinach [Zhao i in., 2021].

Rośliny zainfekowane WBD charakteryzują się karłowatym pokrojem oraz zwiniętymi liśćmi. Na przełomie marca i kwietnia na końcach blaszki liściowej pojawiają się chlorotyczne przebarwienia. W dłuższej perspektywie czasu objawy te mogą ustępować. Natomiast dolne liście oraz łodyga stają się intensywnie zielono-niebieskie, pogrubione i sztywne. Infekcja przyczynia się do deformacji kwiatostanów, która prowadzi do ich sterylności. Zjawisko to wpływa na wytworzenie mniejszej ilości ziarniaków, a te które powstaną mogą być zdeformowane lub słabo niewykształcone. Na niektórych odmianach pszenicy zaobserwować można zniekształcenia całych roślin, gnicie korzeni, a w najgorszym wypadku ich obumieranie [Wu i in., 2010; Chen i in., 2014].

Choroba WBD wywoływana jest przez fitoplazmę należącą do grupy rybosomalnej 16SrI. Szczegółowe analizy pozwoliły wyodrębnić poszczególne podgrupy tj. 16SrI-B, 16SrI-C oraz 16SrI-S, które są odpowiedzialne za powstawanie objawów chorobowych u pszenicy [Chen i in., 2014].

W ostatnich latach w Indiach na pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) oraz pszenicy twardej (*T. durum* L.) odkryto nową chorobę, którą wywołuje fitoplazma z podgrupy 16SrXI-B. Na roślinach pszenicy widoczna była smugowatość, żółknięcie liści oraz zahamowanie wzrostu [Rao i in., 2017].

3.5.2. Wektory fitoplazm pszenicy ozimej

Potwierdzonym wektorem choroby WBD jest *Psammottetix striatus* L. należący do rodziny *Cicadellidae*. Gatunek ten powszechnie występuje w Azji, natomiast w Europie odnotowano pojedyncze osobniki. Szkody bezpośrednie wynikające z żerowania *P. striatus* na pszenicy nie są znaczące, ale możliwość zakażenia roślin fitoplazmą zalicza go do szkodników pszenicy o największym znaczeniu ekonomicznym [Chen i in., 2014].

W warunkach laboratoryjnych dowiedziono, że *P. striatus* przenosi WBD na inne rośliny zbożowe tj. proso zwyczajne (*Panicum miliaceum* L.) i żyto (*Secale cereale* L.) [Wu i in., 2010]. Z kolei w uprawie marchwi owad ten miał zdolność nabywania fitoplazmy z podgrupy 16SrXII-A [Drobnjakovic i in., 2010].

3.5.3. W uprawie kukurydzy

Krzaczastość kukurydzy (MBS) to jedna z chorób fitoplazmatycznych zagrażających uprawie kukurydzy. Pierwsze obserwacje objawów wywołanych przez MBS miały miejsce

w Meksyku w roku 1955 [Maramorosch, 1955]. Dopiero w latach 80. ubiegłego wieku potwierdzono, że czynnikiem sprawczym była fitoplazma [Nault 1980]. Szczegółowe badania wykazały, że choroba powodowana jest przez fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B [Lee i in., 1993; Lee i in., 2004]. Pierwsze objawy na kukurydzy mogą pojawiać się po 3 tygodniach od inokulacji fitoplazmą MBS. Na młodych liściach wierzchołkowych występuje silna chloroza brzeżna, która przeważnie nie obejmuje liści starszych. Zainfekowane rośliny charakteryzują się zahamowanym wzrostem oraz czerwienieniem liści, które widoczne jest w starszych fazach wegetacyjnych. Rozwój choroby prowadzi do powstawania licznych, bocznych rozgałęzień. Liście intensywnie zwijają się oraz łatwo ulegają odrywaniu od nerwu głównego. Z kolei młode liście pozostają zamknięte w okółku i nie rozwijają się całkowicie. Na blaszce liściowej obserwuje się zmiany martwicze. Zaburzony zostaje również rozwój systemu korzeniowego [Nault 1980; Orlovskis i in., 2017]. Dotychczas objawy MBS obserwowano jedynie na komercyjnych odmianach kukurydzy. Nowe badania wskazują na ogniska tej choroby także na rodzimych, lokalnych odmianach kukurydzy uprawianej w rejonach górskich Meksyku. Zainfekowane rośliny kukurydzy są skarlłowaciałe, posiadają zdeformowane kwiatostany i kolby oraz drobne liście, a na ich powierzchni pojawiają się czerwieniejące, chlorotyczne pasy [Pérez-López i in., 2016]. Obecność fitoplazmy wywołującej krzaczałość kukurydzy została potwierdzona w Peru [Nault i in., 1979; Hodgetts i in., 2009], Nikaragui [Hruska i in., 1996], Kostaryce [Harrison 1996], Belize [Henríquez i in., 1999], Brazylii [Bedendo i in., 1997], Kolumbii [Alvarez i in., 2014] i Indiach [Rao i in., 2017a]. We wszystkich tych krajach przyczynę choroby zidentyfikowano jako fitoplazmę należącą do podgrupy 16SrI-B.

Drugą chorobą o podłożu fitoplazmatycznym zagrażającą uprawie kukurydzy jest czerwienie kukurydzy (MR). Jej obecność do tej pory rejestrowana jest w rejonie Bałkanów. Po raz pierwszy została odnotowana w Serbii, w roku 1957. W okresach bezdeszczowych rozwój choroby nasila się i objawy mogą być widoczne na ok. 90% roślin na plantacji. Infekcja MR wpływa na zmniejszenie ilości plonu średnio o 50% [Jović i in., 2007]. W odróżnieniu od MBS rośliny zainfekowane przez MR nie ulegają proliferacji oraz zahamowaniu wzrostu. Rozwijają się prawidłowo do momentu kwitnienia, a pierwsze objawy w postaci czerwonych przebarwień tkanek w pobliżu nerwu głównego pojawiają się na końcu lipca i sukcesywnie przechodzą w kierunku części szczytowej liścia. W wyniku czerwienienia kukurydzy ziarno w kolbie jest zniekształcone, a jego ilość zredukowana. Tempo rozwoju choroby uwarunkowane jest temperaturą powietrza. Im cieplej tym szybsze wędnięcie, postępujące od górnej części rośliny ku dołowi. Korzenie

kukurydzy ulegają nekrozie i przypominają porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Objawy widoczne są na pojedynczych roślinach, losowo rozmieszczonych na polu. Rozwój choroby rozpoczyna się najczęściej od krawędzi pola, z obszarów obwodowych tj.: rowy, miedze, brzeg pola, do wewnątrz. Ma to związek z kierunkiem napływu owadów [Duduk i Bertaccini 2006; Hollingsworth i in., 2008; Purar i in., 2009]. Dopiero w roku 2006 zidentyfikowano patogen czerwienienia kukurydzy jako fitoplazmę stołburu [*Ca. Phytoplasma solani*], reprezentującą podgrupę 16SrXII-A [Duduk i Bertaccini 2006].

3.5.4. Wektory fitoplazm kukurydzy

Na kontynentach obu Ameryk zdolność przenoszenia MBS potwierdzono u owadów rodzaju *Dalbulus*. Głównym i najefektywniejszym wektorem jest gatunek *D. maidis* (DeLong). Ważnymi w transmisji MBS są *D. elimatus* i *Graminella nigrifrons* (Forbes). Owady te oprócz zdolności przenoszenia fitoplazm mają też możliwość przenoszenia spiroplazm (*Spiroplasma kunkelii*), będących zagrożeniem dla uprawy kukurydzy [Ebbert i Nault 2001; De Oliveira i in., 2007; Pérez-López i in., 2018].

Głównym wektorem odpowiedzialnym za transmisję fitoplazmy stołburu (MR) jest piewik *Reptalus panzeri* (Löw). Jest to polifag powszechnie występujący w południowo-wschodniej Europie. Jego cykl rozwojowy jest ściśle związany z uprawą kukurydzy. Żywotność osobników dorosłych wynosi około 1 miesiąca, dlatego podczas zimowania w pobliżu korzeni, nimfy są zdolne pobrać z nich fitoplazmę. Pozostawione korzenie roślin po zbiorach stanowią doskonałe inokulum fitoplazm [Jović i in., 2009]. Duże populacje tego owada spotyka się na zainfekowanych polach, a testowanie odłowionych owadów wykazało, że średnio 20% jest nosicielem fitoplazmy '*Ca. Phytoplasma solani*'. *R. panzeri* jest również wektorem fitoplazmy z podgrupy 16SrXII-A w uprawie winorośli [Palermo i in., 2004]. Alternatywnym wektorem fitoplazmy czerwienienia kukurydzy może być *Hyalesthes obsoletus* (Signoret), który spotykany jest na obrzeżach pól kukurydzy. W warunkach eksperymentalnych wykazano, że może on zakażać kukurydzę chorobą MR [Mori i in., 2013].

3.6. Wykrywanie fitoplazm

Pierwsze metody służące identyfikacji bakterii fitoplazmatycznych opierały się głównie o symptomatologię, zakres roślin żywicielskich, mechanizm przenoszenia przez wektory oraz obserwację w mikroskopie elektronowym [Shiomi i Sugiura, 1984; Chiykowski, 1991; Lee i Davis, 1992; Marcone i Ragozzino, 1996]. W latach 80. XX wieku rozwinęły

się techniki serologiczne, które polegały na stosowaniu m. in. poliklonalnych i monoklonalnych przeciwciał, metodzie dot-blot oraz teście ELISA [Boudon-Padieu i in., 1989; Lee i in., 1993; Chen i in., 1994; Saeed i in., 1994].

Wykrywanie bakterii '*Ca. Phytoplasma*' z użyciem mikroskopii świetlnej z uwagi na trudności w bezpośredniej obserwacji wymaga zastosowania pewnych rozwiązań. W tym celu stosuje się barwienie za pomocą np. DAPI (4'-6-diamidyno-2-fenylindol), który jest najczęściej stosowany w diagnostyce fitoplazm. Technika barwienia DAPI jest prostą metodą, która została opracowana w celu potwierdzenia obecności fitoplazm w skrawkach zakażonych tkanek. DAPI wiąże się z DNA bogatym w adeninę i tyminę, dzięki czemu fitoplazmy zlokalizowane wśród komórek łyka można uwidocznic pod mikroskopem fluorescencyjnym. Procedura jest szybka, łatwa w użyciu, niedroga i może być stosowana jako wstępna metoda wykrywania fitoplazm w zakażonych roślinach [Andrade i Arismendi, 2013].

Od ponad 30 lat transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) jest jedną z najbardziej wiarygodnych i skutecznych metod wykrywania fitoplazm [Poghosyan i in., 2004]. Technika ta umożliwiła nie tylko diagnozę, ale także badanie interakcji roślina-fitoplazma [Musetti i in., 2000]. Po raz pierwszy została z powodzeniem wykorzystana do znalezienia i opisanie fitoplazm związanych z chorobą żółtaczką [Doi i in., 1967]. Komórki fitoplazmy są małe i pleomorficzne, dlatego do ich bezpośredniej obserwacji wymagane jest powiększenie i rozdzielczość mikroskopu elektronowego oraz badanie cech morfologicznych i strukturalnych w rurkach sitowych chorych roślin żywicielskich [Lee i in., 2000; Chapman i in., 2001]. Radziej stosowaną metodą wykrywania fitoplazm jest technika skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) służąca obserwacji komórek fitoplazm w tkance łyka zaatakowanych roślin [Lebsky i in., 2011]. Techniki mikroskopii elektronowej są czasochłonne, wymagają wykwalifikowanego personelu, nadal są drogie i nie nadają się do szybkich zastosowań diagnostycznych [Nejat i Vadamalai, 2013].

Inną metodą służącą wykrywaniu fitoplazm jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), w której jako sondy można zastosować sekwencje starterów. FISH może być stosowana m.in. do specyficznej identyfikacji grup taksonomicznych fitoplazm, podgrup i/lub szczepów i dynamiki populacji fitoplazm w środowisku [Webb i in., 1999; Bulgari i in., 2011].

Rozwój technik molekularnych w latach 90. ubiegłego wieku umożliwił wykrywanie fitoplazm na większą skalę. Wówczas analiza opierała się o sondy molekularne, które wykazywały komplementarność wobec patogenu zasiedlającego rośliny oraz owady

[Kirkpatrick i in., 1987; Lee i in., 1992a, b; Bertaccini i in., 1993]. W kolejnych latach szybka amplifikacja określonego fragmentu DNA zyskała na popularności, dzięki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) [Ahrens i Seemüller, 1992; Namba i in., 1993; Schneider i in., 1993]. Ryzyko niewykrycia komórek w jednej rundzie PCR spowodowało opracowanie techniki zagnieżdżonego PCR (nested-PCR). Sytuacja ta wynika z nierównomiernego rozmieszczenia fitoplazm w roślinie żywicielskiej i ich niskiego miana [Goodwin i in., 1994; Andersen i in., 1998; Hogenhout i in., 2008]. Uzyskany w pierwszej rundzie amplikon czyli powielony, fragment DNA, tutaj gen 16S rRNA, jest matrycą w drugiej rundzie reakcji, w której stosuje się specyficzne startery, hybrydujące do tego amplikonu [Lee i in., 1994; Heinrich i in., 2001; Gholami i in., 2020]. Zastosowanie podwójnej reakcji powoduje wzmocnienie sygnału i zwiększa szansę wykrycia patogenu, który występuje w małej koncentracji. Mimo dużej czułości nested-PCR jest metodą czasochłonną oraz obciążoną ryzykiem zanieczyszczenia między poszczególnymi etapami. Zminimalizowanie czasu analiz oraz zwiększenie czułości umożliwiła metoda qPCR. W wyniku analizy generowanie amplikonów w kolejnych cyklach termicznych zobrazowane jest wzrastającym poziomem fluorescencji. Metoda ta dodatkowo daje możliwość ilościowego oznaczenia DNA [Ikten i in., 2016].

Obiecującą alternatywą wśród metod służących wykrywaniu fitoplazm jest izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego (LAMP) [Tomlinson i in., 2010; Obura i in., 2011; De Jonghe i in., 2017]. Metoda LAMP opisywana jest jako wysoce specyficzna, wydajna i szybka [Ravindran i in., 2012]. Zastosowana polimeraza prowadzi do wymiany nici DNA w warunkach izotermicznych bez użycia zaawansowanego sprzętu, czyli termocyklerów [De Jonghe i in., 2017]. Mała popularność tej metody wynika ze złożoności projektowania wielu starterów, wyboru odpowiednich regionów w sekwencji genów tak, aby startery były wydajne, skomplikowanej struktury uzyskanego produktu oraz braku komercyjnych zestawów opartych na technice LAMP. Jednak metoda LAMP ma znaczące zalety, które przy pewnych modyfikacjach mogą być ważną alternatywą dla metody PCR i służyć np. w badaniach przesiewowych [Keikha, 2018; Schröder, 2019; Siemonsmeier i in., 2019].

3.7. Populacja piewików w Polsce

Piewiki (*Auchenorrhyncha*) to owady z rzędu pluskwiaków - Hemiptera, które są istotnym komponentem większości ekosystemów lądowych. Aktualny podział dzieli piewiki na dwa podrzędy: *Fulgoromorpha* i *Cicadomorpha* [Bunalski i in., 2020]. Piewiki

są fitofagami, silnie związanymi z określonymi zespołami roślinnymi, gdzie tworzą wielogatunkowe zbiorowiska [Walczak, 2005]. Dodatkowo mogą pełnić rolę bioindykatorów, które są pomocne w określaniu stopnia antropopresji i monitorowaniu środowiska [Walczak i in., 2019].

W Polsce stwierdzono obecność 6 rodzin, reprezentowanych przez 552 gatunki [Bunalski i in., 2020]. Najbardziej rozpowszechnionymi piewikami wśród entomofauny pól uprawnych są: skoczek sześciorek (*Macrosteles laevis* Ribaut), zgłobik smużkowany (*Psammotettix alienus* Dahlbom), *Hardya tenuis* Germar, skoczek ziemniaczak (*Empoasca pteridis* Dahlbom) i skoczek trawnik (*Javesella pellucida* Fabricius) [Klejdzysz, 2013; Zwolińska i in., 2017].

Najliczniejszym wśród piewików w uprawie zbóż jest skoczek sześciorek (*M. laevis*). Obecność pozostałych gatunków oceniana jest na 1% [WWW1]. Gatunek ten jest polifagiem o szerokim zakresie roślin żywicielskich. Najbardziej atrakcyjnym pokarmem dla *M. laevis* są zboża i trawy, a najmniej rzepak. W Polsce może rozwijać 2-3 pokolenia na zbożach ozimych i jarych [Zwolińska i in., 2017]. Aktywność osobników dorosłych obserwowana jest od pierwszej dekady maja do października. Szkodliwość *M. laevis* jest znacząca, z uwagi na zdolność przenoszenia organizmów chorobotwórczych zagrażających uprawie zbóż. Istnieją dowody, że gatunek ten pełni rolę wektora fitoplazm żółtaczki astra, w uprawach innych niż pszenica ozima i kukurydza [Brčák, 1979; Kamińska i Śliwa, 2005; Zwolińska i in., 2017].

W ostatnich latach w Polsce zauważono wzrost liczebności zgłobika smużkowanego (*P. alienus*), dawniej nazywanego skoczkiem zbożowiakiem [Klejdzysz i Wałkowski, 2008; Klejdzysz, 2013]. Jest to gatunek występujący na terenie całego kraju na zbożach oraz trawach. Biologia zgłobika smużkowanego zbliżona jest do *M. laevis*, jednak poszczególne stadia rozwojowe pojawiają się po 7-10 dniach później niż u skoczka sześciorka. *P. alienus* jest aktywny od maja do listopada, nawet pomimo pierwszych przymrozków [Tratwal i in., 2017]. Osobniki tego gatunku są już dobrze znanymi wektorami wirusa karłowatości pszenicy (WDV) w uprawie zbóż. Natomiast rola *P. alienus* w przenoszeniu fitoplazm w uprawie zbóż nie jest jeszcze znana [Trzmiel i Klejdzysz, 2018]. Inny wektor *Psammotettix striatus* opisywany jako skuteczny wektor fitoplazmy z podgrupy 16SrI-C w innych krajach [Wu i in., 2010].

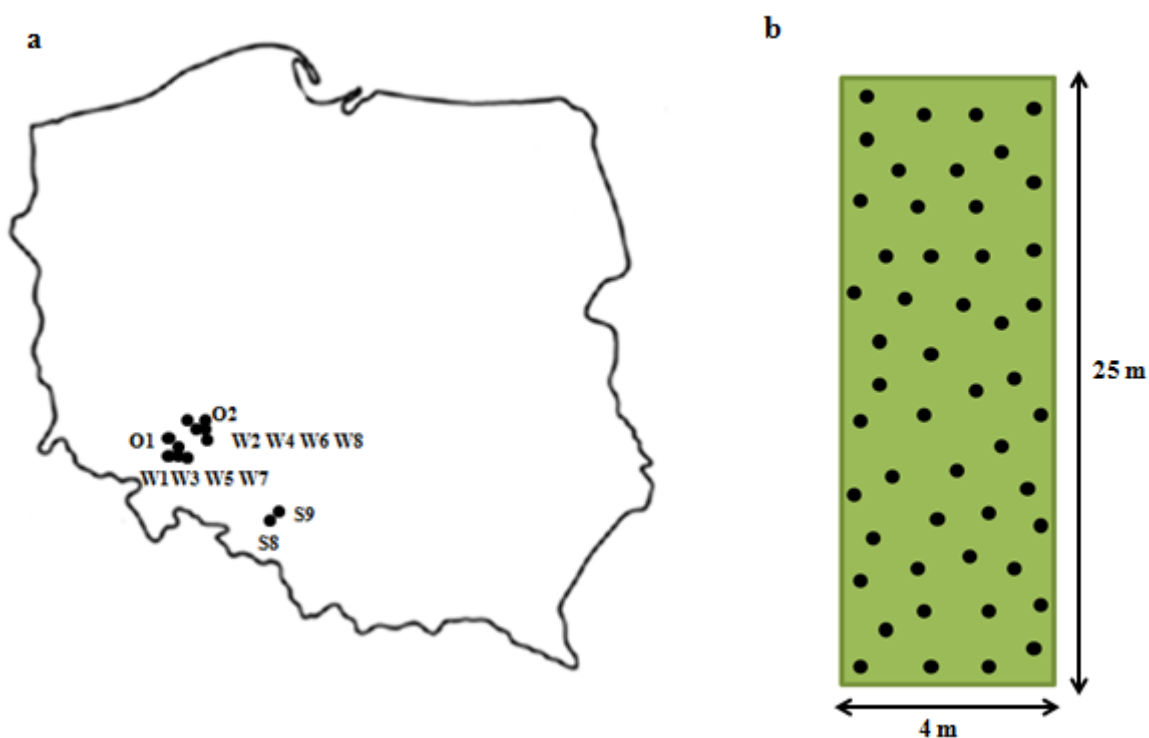
4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

4.1. Materiał roślinny

4.1.1. Zebrany materiał roślinny

Materiał badawczy stanowiły próbki pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) oraz kukurydzy (*Zea mays* L.), zbierane w rejonie południowo-zachodniej Polski (Rys. 2a). Pszenica ozima znajdowała się w fazie krzewienia oraz w końcowej fazie strzelania w źdźbło, natomiast kukurydza w fazie 7-8 liścia właściwego oraz końcowej fazie wydłużania pędu (Tab. 3).

W trakcie lustracji pól, próbki pobierano losowo z powierzchni około 100 m² (Rys. 2b) z pól zlokalizowanych na Ryc. 2a i Tab. 3. Pojedynczą próbkę tworzyły liście pobrane z różnych fragmentów jednej rośliny. Łącznie zebrano po 200 próbek dla każdego z gatunków, które umieszczono pojedynczo w plastikowym woreczku i przetransportowano w lodówce przenośnej do laboratorium. Przed rozpoczęciem analiz próbki przechowywano w temperaturze 4°C.



Ryc. 2. Miejsca poboru próbek a) lokalizacje b) schemat poboru próbek roślinnych.

Tab. 3. Rodzaj prób i miejsce ich poboru

Gatunek rośliny	Kod partii	Data zbioru	Lokalizacja	Faza rozwojowa
Pszenica ozima	W1	3.05.2019	50°58'34''N, 16°42'24''E	BBCH 39
Pszenica ozima	W2	4.05.2019	51°12'30''N, 17°11'42''E	BBCH 39
Pszenica ozima	W7	10.11.2019	50°58'08''N, 16°42'38''E	BBCH 24
Pszenica ozima	W8	11.11.2019	51°12'53''N, 17°08'26''E	BBCH 25
Kukurydza	W3	10.06.2019	50°59'19''N, 16°42'03''E	BBCH 17
Kukurydza	W4	11.06.2019	51°12'48''N, 17°08'51''E	BBCH 18
Kukurydza	W5	29.07.2019	50°59'31''N, 16°41'23''E	BBCH 39
Kukurydza	W6	29.07.2019	51°12'48''N, 17°08'51''E	BBCH 39

4.1.2. Rośliny testowe

Ziarna pszenicy ozimej oraz kukurydzy wysiano pojedynczo do doniczek produkcyjnych z torfem. Uprawę roślin prowadzono w szklarni w temperaturze 24°C oraz wilgotności 50%, do osiągnięcia fazy 3-4 liści właściwych. W badaniach wykorzystano odmiany opisane poniżej:

- **Pszenica ozima:**

- Hondia – wg Danko, odmiana o wysokim poziomie plonowania, doskonałe parametry jakościowe ziarna na pograniczu grupy E/A. Bobrze sprawdza się w opóźnionym siewie. Charakteryzuje się wysoką zdrowotnością wśród pszenicy ozimych. Odmiana o wysokiej zimotrwałości. Możliwa uprawa na słabszych stanowiskach.

- Tytanika – wg Danko, posiada bardzo dobre parametry jakościowe ziarna, na pograniczu grupy A/B. Pszenica o bardzo dobrej zimotrwałości. Charakteryzuje się także dobrą odpornością na choroby oraz bardzo dobrą odpornością na zakwaszenie gleby. Przeznaczona do uprawy na glebach średniej jakości i słabszych.

- **Kukurydza:**

- Pokusa – wg HR Smolice, odmiana wczesna przeznaczona na ziarno oraz kiszonkę. Dobrze znosi słabsze stanowiska. Wykazuje wysoką tolerancję na choroby w szczególności fuzariozę kolb.

- Popis – wg HR Smolice, odmiana średniopóźna wykorzystywana do produkcji kiszonki oraz biogazu. Posiada jeden z najwyższych potencjałów plonowania. Toleruje słabsze warunki glebowe. Odmianę cechuje wysoka tolerancja na choroby.

4.2. Owady

4.2.1. Zbiór potencjalnych wektorów

Owady dorosłe z rzędu pluskwiaków (*Hemiptera*) odłowiono z upraw pszenicy ozimej oraz kukurydzy (Tab. 4) wykonując 50 pełnych uderzeń czerpakiem entomologicznym. Czerpakowanie przeprowadzono w dwóch liniach na powierzchni ok. 100 m². Zebrane osobniki przeniesiono do próbki typu Falcon zawierającej etanol o stężeniu 96%.

Tab. 4. Miejsce i czas poboru owadów

Uprawa na której odławiano owady	Kod odłowu	Data odłowu	Lokalizacja	Faza rozwojowa roślin
Pszenica ozima	S8	24.05.2018	50°16'25''N, 18°33'12''E	BBCH 45
Pszenica ozima	S9	17.07.2018	50°16'18''N, 18°33'31''E	BBCH 87
Kukurydza	O1	2.08.2018	50°59'31''N, 16°41'23''E	BBCH 51
Kukurydza	O2	3.08.2018	51°12'48''N, 17°08'51''E	BBCH 51

4.2.2. Owady testowe i warunki ich hodowli

4.2.2.1. Pozyskanie owadów do badań w kierunku potwierdzenia zdolności przenoszenia fitoplazm

Osobniki dorosłe dwóch gatunków owadów: skoczka sześciorka *Macrosteles laevis* Ribaut oraz zgłobika smużkowanego *Psammotettix alienus* Dahlbom, odłowiono za pomocą czerpaka entomologicznego, z terenów śródpolnych w okolicy Poznania. Owady każdego gatunku umieszczono w osobnych izolatorach (po około 25 osobników) i hodowano na zdrowych siewkach jęczmienia w kabinie szklarniowej, w warunkach długiego dnia (14 godz. oświetlenia) w temperaturze 24°C/16°C ± 2°C (dzień/noc) i wilgotności 50%, aż do uzyskania pierwszego pokolenia potomnego F1. Następnie grupę

20 owadów przetestowano w celu wykluczenia obecności komórek fitoplazmy. Izolatory, w których stwierdzono brak fitoplazm w owadach uznawano za hodowle wolne od fitoplazm (nieinfekcyjne) i utrzymywano w warunkach szklarniowych, w hodowli ciągłej, dostarczając sukcesywnie zdrowych siewek jęczmienia.

4.2.2.2. Pozyskanie owadów *P. alienus* zainfekowanych fitoplazmą

Owady *P. alienus* odłowiono na pasie śródpolnym, na terenie Polowej Stacji Doświadczalnej IOR-PIB w Winnej Górze. Owady umieszczono w izolatorze ze zdrowymi siewkami pszenicy odm. Belissa i hodowano w warunkach szklarniowych podanych w punkcie 4.2.2.1. Uzyskane pokolenie F1 owadów poddano testowaniu w kierunku zakażenia fitoplazmami.

4.2.2.3. Nabywanie fitoplazmy przez owady *M. laevis*

Do izolatora z rzepakiem ozimym z wyraźnymi objawami fyllodiozy, u którego potwierdzono obecność fitoplazmy dodano 50 osobników *M. laevis* z hodowli nieinfekcyjnej. Po 4 dniach żerowania owadów na rzepaku, do izolatora dołożono młode, zdrowe rośliny jęczmienia odm. Nagradowicki, w celu zwiększenia przeżywalności skoczków i utworzenia hodowli owadów zakażonych fitoplazmą.

4.1. Izolacja DNA

4.1.1. Izolacja całkowitego DNA roślinnego

Całkowite DNA roślinne zostało wyizolowane w oparciu o zmodyfikowaną metodę strącania kompleksów polisacharydowych buforem CTAB [Maixner i in., 1995]. Fragmenty liści o łącznej masie 2 g umieszczono w woreczkach do homogenizacji i roztarto z dodatkiem 2 ml buforu CTAB stosując homogenizator kulkowy Homex 6 (Bioreba). Powstały homogenat pobrano pipetą Pasteura i przeniesiono do probówek typu Eppendorfa o pojemności 2 ml. Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 60°C, z wytrząsaniem 160 obr./min.

Zawiesiny ostudzono do temperatury pokojowej. Dodano 800 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy (24:1) i całość zworteksowano przez 5 sekund, a następnie wirowano przez 3 minuty z prędkością 7000 obr./min. Górną fazę wodną mieszaniny przeniesiono do nowej probówki i prowadzono dalszą ekstrakcję mieszaniną chloroformu i alkoholu izoamylowego. Po zwirowaniu oraz przeniesieniu fazy wodnej do nowej probówki dodano 0,7 objętości schłodzonego izopropanolu i natychmiast wytrącano

DNA przez kilkakrotne odwrócenie probówki. Następnie próbki inkubowano w temperaturze -20°C przez 16 godzin.

Kwasy nukleinowe osadzano wirując próbki przez 5 min przy 15000 obr./min. Supernatant usuwano, a powstały osad przemywano dwukrotnie 70% etanolem. Wyszuszony osad zawieszono w 500 μl buforu TE (pH 7,8) i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze 4°C . Po spektrofotometrycznym zbadaniu stężenia DNA, preparaty przechowywano w temperaturze -20°C .

4.1.2. Izolacja całkowitego DNA z owadów

Izolacja całkowitego DNA z tkanek owadów została przeprowadzona z użyciem kitu NucleoSpin Tissue Macherey-Nagel. W probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml umieszczono po 1 dorosłym osobniku owada. Następnie dodano 180 μl buforu lizującego T1 i dokładnie roztarto owady stosując sterylny mini homogenizator. Do przygotowanej zawiesiny dodano 25 μl proteiny K, w celu inaktywacji nukleaz. Całość zworteksowano przez kilka sekund. Probki inkubowano używając termobloku TS-100 (Biosan) w temperaturze 56°C przez 1 godzinę, po czym zawartość probówek przemieszano i dodano 200 μl buforu B3, każdorazowo dokładnie mieszając. W celu wytrącenia kwasu nukleinowego dodano 200 μl 96% etanolu. Mieszaninę przelano do kolumniek zawierających złoża krzemionkowe, które zwirowano z prędkością 8000 obr./min przez 1 minutę. Otrzymany przesącz z zanieczyszczeniami usunięto, a kolumniekę umieszczono w nowej probówce zbierającej.

Na kolumniekę naniesiono 500 μl roztworu płuczącego BW i zwirowano z prędkością 8000 obr./min przez 1 minutę. Otrzymany przesącz usunięto, a złożę przepłukano buforem B5 w ilości 500 μl i zwirowano przez 3 minuty z prędkością 14000 obr./min. Oczyszczenie kolumnienki z resztek etanolu przeprowadzono poprzez jej zwirowanie wraz z pustą probówką zbierającą przez 1 minutę z prędkością 14000 obr./min.

W celu przeprowadzenia elucji na membranę naniesiono 100 μl buforu BE i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty. Następnie całość zwirowano przez 1 minutę z prędkością 8000 obr./min. Probki przechowywano w temperaturze -20°C .

4.2. Spektrofotometryczny pomiar stężenia oraz czystości DNA

Pomiar stężenia oraz czystości kwasów nukleinowych wykonano na spektrofotometrze NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). W przypadku DNA roślinnego

jako próbkę „ślepią” zastosowano bufor TE. Natomiast w przypadku DNA owadziego do kalibracji wykorzystano bufor BE.

Pomiary absorbancji przeprowadzono przy długościach fal: 230nm, 260nm oraz 280nm. Na okienko spektrofotometru nanoszono po 1µl próby. W przypadku koncentracji DNA wynoszącej 700 ng/µl lub wyższej sporządzono rozcieńczenie buforem TE w stosunku 1:10.

Wskaźnikiem czystości DNA był stosunek współczynnika A260/230 nm oraz A260/280 nm, który mieścił się w przedziale 1,8-2,0.

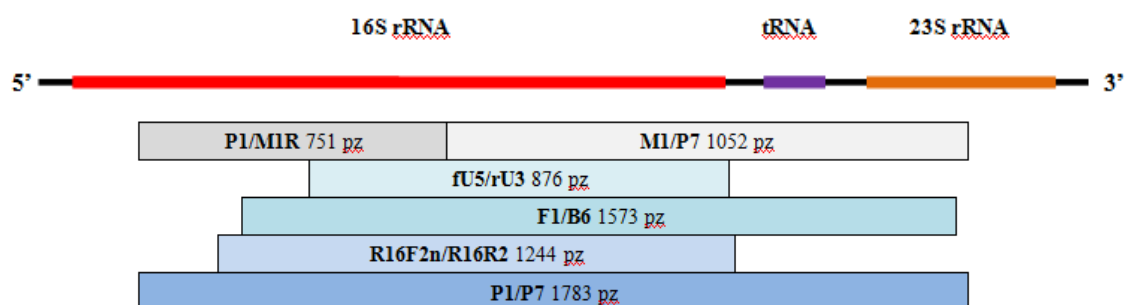
4.3. Synteza DNA

4.3.1. Namnażanie rybosomalnego DNA fitoplazm metodą zagnieżdżonego-PCR

Do wykrycia fitoplazm w preparatach DNA uzyskanych z roślin i owadów zastosowano zagnieżdżony PCR (nested PCR). Namnażanie produktu obejmującego gen 16S rRNA oraz region międzygenowy 16S-23S i fragment genu 23S rRNA, o wielkości 1,8 kb przeprowadzono stosując parę starterów P1/P7 (Tab. 5). Otrzymany produkt rozcieńczono sterylną wodą destylowaną w stosunku 1:30. W drugiej rundzie amplifikacji wykorzystano startery R16F2n/R16R2 lub fU5/rU3, syntetyzujące odpowiednio produkty o długości 1244 pz i 876 pz, powielające fragment genu 16S rRNA (Ryc. 3).

Tab. 5. Sekwencje starterów użytych w badaniach

Starter	Sekwencja 5'→3'	Referencje
P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	Deng i Hiruki, 1991; Schneider i in., 1995
R16F2n R16R2	GAAACGACTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Gundersen i Lee, 1996
M1 M1R	GTCTTTACTGACGCTGAGGC GCCTCAGCGTCAGTAAAGAC	Gibb i in., 1995
F1 B6	TAAAAGACCTAGCAATAGG TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG	Lee i in., 1994; Padovan i in., 1995
fU5 rU3	CGGCAATGGAGGAAACT TTCAGCTACTCTTTGTAACA	Lorenz i in., 1995
fTuf1 rTuf1	CAAGTTGGTGTTCAAA GTTGTCACCTGCTTGAGC	Schneider i in., 1997
fTufAY rTufAY	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA CGTTGTCACCTGGCATTACC	Schneider i in., 1997
M13fwd M13rev	GTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	Promega, Madison, WI



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie wielkości ampliconów uzyskanych w reakcjach PCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli (Tab. 6)

Tab. 6. Skład mieszaniny reakcyjnej dla 1 reakcji

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Ilość
GoTaq G2 Master Mix	10 μ l
Sterylna woda destylowana	10 μ l
Starter 1 (10 μ M)	1 μ l
Starter 2 (10 μ M)	1 μ l
Matryca DNA	1 μ l
Objętość mieszaniny reakcyjnej	23 μl

Reakcje przeprowadzono z wykorzystaniem buforu GoTaq® Green Master Mix zawierającego polimerazę GoTaq® G2 oraz obciążacz umożliwiający bezpośrednie nakładanie na żel agarozowy produktów PCR. Warunki termiczne reakcji przedstawiono w tabeli 7.

Tab. 7. Warunki reakcji zagnieżdżonego-PCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Wstępna denaturacja	94°C	2 min	
Denaturacja	94°C	45 s	33
Hybrydyzacja	Runda 1 55°C (P1/P7)	45 s	
	Runda 2 50°C (R16F2n/R16R lub fU5/rU3)		
Elongacja	72°C	1 min 30 s	
Końcowa elongacja	72°C	5 min	

W przypadku próbek, w których wykryto fitoplazmy amplifikację metodą nested-PCR (Tab.7) przeprowadzono również z dodatkowymi parami starterów: M1/P7, F1/B6 oraz P1/M1R stosując podobnie jak wyżej rozcieńczone produkty P1/P7 jako matryce DNA.

Do namnożenia fragmentu M1/P7 zastosowano profil TD-PCR, który polegał na stopniowym obniżaniu temperatury z 62°C do 55°C. Reakcja składała się z następujących etapów:

- **denaturacja wstępna:** 94°C przez 2 min,
- **denaturacja:** 94°C przez 45 s,
- **przyłączanie starterów do matrycy (hybrydyzacja):** przez 45 s, w temperaturze 62°C w pierwszym cyklu, a następnie w temperaturze spadającej o jeden stopień w kolejnych cyklach, aż do 55°C, cykl z temperaturą 60°C powtórzony 3-krotnie, cykl z temperaturą 55°C powtórzony 23-krotnie,
- **wydłużanie nici:** 72°C przez 90 s,
- **końcowa elongacja:** 72°C przez 5 min.

W przypadku amplifikacji z parą starterów F1/B6 oraz P1/M1R zastosowano profil temperaturowy opisany w tabeli 5, w obu przypadkach stosując temperaturę hybrydyzacji równą 50°C.

Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze T-Personal Biometra.

4.4. Klonowanie DNA

W celu ustalenia sekwencji nukleotydów pełnych fragmentów wielkości 1,8 kb, uzyskanych z użyciem pary starterów P1/P7, produkty te poddano klonowaniu. Dodatkowo metoda umożliwia określenie zmienności pomiędzy dwoma kopiami genu 16S rRNA fitoplazm w badanym fragmencie. Klonowanie DNA składało się z etapów opisanych poniżej.

4.4.1. Oczyszczanie produktów reakcji łańcuchowej polimerazy

Otrzymany produkt reakcji PCR oczyszczono z pozostałych wolnych nukleotydów oraz soli stosując separację magnetyczną. W tym celu mieszaninę przeniesiono do probówki typu Eppendorf, do której dodano preparat CleanPCR (CleanNA) w odpowiedniej ilości.

$$\text{Ilość CleanPCR} = 1,8 \times \text{objętość oczyszczanego produktu PCR}$$

W celu związania DNA na powierzchni drobinek magnetycznych, mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej na statywie magnetycznym. Otrzymany supernatant usunięto zwracając szczególną uwagę, aby nie naruszyć osadu znajdującego się na ściance probówki. Osad dwukrotnie przemyto 70% etanolem, każdorazowo inkubując w roztworze przez około 1 minutę. Osad suszono w temperaturze pokojowej przez 10-15 min uważając, aby nie dopuścić do odklejania się od ścian probówki.

Probówkę usunięto ze statywu magnetycznego i dodano do osadu 40 μ l roztworu TE w celu wypłukania DNA do roztworu.

Ponownie probówkę umieszczono na statywie magnetycznym w celu separacji drobinek od roztworu. Do nowej 1,5 ml probówki typu Eppendorf przeniesiono oczyszczony roztwór, zostawiając na ściankach probówki osad. W celu potwierdzenia obecności DNA w preparacie, naniesiono 1,5 μ l roztworu na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics, Niemcy).

4.4.2. Ligacja

Oczyszczony produkt reakcji PCR został zligowany z wektorem pGEM®-T Easy (Promega). Skład mieszaniny ligacyjnej był następujący:

- 2x bufor Rapid Ligation - 5 μ l,
- wektor pGEM®-T Easy - 0,5 μ l,
- ligaza T4 - 1 μ l,

- oczyszczony produkt reakcji PCR obliczony według wzoru poniżej - x μl ,

$$x \mu\text{l} = \frac{\text{ilość wektora [ng]} \times \text{wielkość oczyszczonego produktu PCR [kpz]}}{\text{wielkość wektora [kpz]}} \times \frac{3}{1}$$

- sterylna H_2O - uzupełnić do objętości równej 10 μl .

Ligację przeprowadzono w temperaturze pokojowej, a czas inkubacji wynosił 1 godzinę.

4.4.3. Transformacja bakterii kompetentnych plazmidem

Komórki *Escherichia coli* (podpunkt 4.11.1) znajdujące się w 1,5 ml próbówce typu Eppendorf umieszczono w pojemniku z lodem. Mieszaninę ligacyjną w objętości 2,5 μl przeniesiono na dno próbówki i delikatnie zamieszano końcówką pipety. Całość inkubowano przez 30 min w pojemniku z lodem. W kolejnym etapie mieszaninę umieszczono w temperaturze 42°C na 45 sekund i następnie szybko przeniesiono na lód na 2 minuty, w celu wywołania szoku termicznego.

Do próbówki dodano 200 μl płynnej pożywki LB o temperaturze 37°C. Inkubację przeprowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 670 obr./min przez 1 godzinę.

Na płytce Petriego ze stałą pożywką LB oraz antybiotykiem ampicyliną w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ dodano i roz tarto za pomocą głaszczki 15 μl IPTG (200 mg/ml) oraz 15 μl X-gal (2%). Kolejno na płytce dodano mieszaninę bakteryjną, którą również równomiernie roz tarto po całej powierzchni pożywki. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez noc. W przeprowadzonym w ten sposób teście α -komplementacji, na selektywnym podłożu wyodrębniły się białe i niebieskie kolonie transformowanych bakterii.

Do próbówek zawierających 5 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Sterylnym tipsem dodano z powierzchni płytki pojedyncze, białe kolonie, a następnie inkubowano przez noc w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem 220 obr./min.

4.4.4. Izolacja plazmidów

Po inkubacji, mętne zawiesiny zwirowano przez 1 minutę (13000 obr./min). Do izolacji plazmidowego DNA użyto zestawu Invisorb Spin Plasmid Mini Two (Stratec, Niemcy), postępując zgodnie z instrukcją producenta. W celu wywołania lizy alkalicznej i separacji plazmidów dodawano kolejno roztwory zawarte w zestawie. Uzyskany supernatant przeniesiono do kolumny ze złożem krzemionkowym i inkubowano przez 1 minutę, a

następnie zwirowano przez 1 min (11000 obr./min). Przefiltrowany roztwór usunięto i na filtr dodano 750 μ l roztworu do płukania. Próbę zwirowano przez 1 minutę (11000 obr./min) i kolejno przez 3 minuty (13000 obr./min). Filtr umieszczono w nowej probówce o pojemności 1,5 ml i dodano 50 μ l roztworu elucyjnego. Po inkubacji trwającej 1 minutę w warunkach temperatury pokojowej całość zwirowano (1 min, 11000 obr./min).

Jakość oraz ilość wyizolowanego DNA plazmidowego oceniono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

4.4.5. Trawienie restrykcyjne enzymem EcoRI

DNA plazmidowe strawiono enzymem EcoRI. Wybrano enzym restrykcyjny, którego miejsca cięcia były zlokalizowane po obu stronach miejsca ligacji, by uzyskać fragment o długości odpowiadającej długości wstawki. Mieszanina restrykcyjna w objętości 10 μ l miała następujący skład:

- Bufor - 1 μ l,
- Enzym EcoRI - 1 μ l,
- DNA plazmidowe - 300 ng–500 ng,
- H₂O - uzupełniono do 10 μ l.

Reakcję trawienia restrykcyjnego wykonano w warunkach: 37°C przez 1 godzinę, następnie 65°C przez 15 minut. Otrzymane produkty (10 μ l) naniesiono na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem Midori Green.

4.5. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA w żelu agarozowym

Po przeprowadzeniu reakcji polimerazy otrzymany produkt w objętości 5 μ l naniesiono na 1,5% żel agarozowy z dodatkiem barwnika Midori Green i rozdzielono elektroforetycznie. Do pierwszej i ostatniej ścieżki żelu nakładano 5 μ l wzorca masy cząsteczkowej DNA GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready-to-use (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Rozdział prowadzono w 0,5x stężonym buforze SB (podpunkt 4.11.4) (0,8% NaOH, 4,5% kwas borowy) przy napięciu 75 V. Produkty reakcji PCR wizualizowano w świetle UV na transiluminatorze (Biometra).

4.6. Namnażanie fragmentu DNA kodującego translacyjny czynnik elongacji Tu metodą zagnieżdżonego-PCR

Dalszą charakterystykę molekularną wykrytych fitoplazm przeprowadzono namnażając gen *tuf* kodujący czynnik elongacji Tu. Bezpośredni PCR przeprowadzono stosując parę starterów fTufI/rTufI (Tab. 5). Reakcja przebiegała w następujących warunkach:

- denaturacja wstępna w temp. 94°C przez 2 min;
- reakcja amplifikacji 35 cykli:
 - denaturacja w temp. 94°C przez 45 s,
 - przyłączanie starterów do matrycy przez 30 s w temp. 45°C,
 - wydłużanie nici w temp. 72°C przez 80 s;
- końcowa elongacja 3 min w temp. 72°C.

Nested-PCR został przeprowadzony z parą starterów fTufAY/rTufAY. Warunki przeprowadzenia reakcji były identyczne jak opisano powyżej. Jedyne zmiany jakie wprowadzono dotyczyły temperatury przyłączania starterów, która była równa 52°C oraz czasu wydłużania nici, który wynosił 70 sekund.

Skład mieszaniny reakcyjnej był taki sam jak opisano w tabeli 6. Rozdział uzyskanych produktów PCR wykonano według metody opisanej w punkcie 4.5.

4.7. Odczyt sekwencji nukleotydów

W celu potwierdzenia obecności fitoplazm w próbkach, produkty PCR o odpowiedniej długości poddano sekwencjonowaniu z starterami: P1/P7, R16F2n/R16R2, fU5/rU3, M1/M1R i F1/B6. DNA plazmidowe, u którego trawienie restrykcyjne wykazało obecność insertu sekwencjonowano w oparciu o startery M13fwd oraz M13rev, hybrydujące do plazmidowego DNA. Odczyt sekwencji nukleotydów zlecono firmie Genomed SA. Otrzymane sekwencje były porównywane z sekwencjami zdeponowanymi w bazie nukleotydowej GenBank, za pomocą narzędzia BLASTn [WWW2]. Na podstawie analizy porównawczej potwierdzono, czy namnożony produkt jest fragmentem genomu fitoplazm oraz wstępnie klasyfikowano szczep fitoplazmy. Sekwencje posłużyły do uzyskania końcowej sekwencji konsensusowej.

4.8. Analiza filogenetyczna

Analizę filogenetyczną przeprowadzono z użyciem sekwencji referencyjnych szczepów fitoplazm dostępnych w bazie GenBank. Wzajemne dopasowanie sekwencji

przeprowadzono przy użyciu programu BioEdit z wbudowanym narzędziem Clustal W. Dendrogram ukazujący powiązania filogenetyczne został wykonany w programie MEGA X metodą największej wiarygodności (Maximum likelihood estimation), przy wartości bootstrap równej 1000 powtórzeń.

4.9. Wirtualna analiza restrykcyjna (RFLP)

Celem zaklasyfikowania do grupy 16Sr badanego szczepu fitoplazmy wykonano wirtualną analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (vRFLP) za pomocą narzędzia iPhyClassifier [WWW3].

Profil RFLP dla badanej próbki otrzymano w wyniku wirtualnego trawienia fragmentu R16F2n/R16R2 z użyciem 17 enzymów restrykcyjnych: AluI, BamHI, BfaI, BstUI, BraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Sau3AI, MseI, RsaI, SspI, TaqI, który następnie porównano z profilami zamieszczonymi w programie.

4.10. Przenoszenie fitoplazm przez *Macrosteles laevis* oraz *Psammodettix alienus* w warunkach szklarniowych

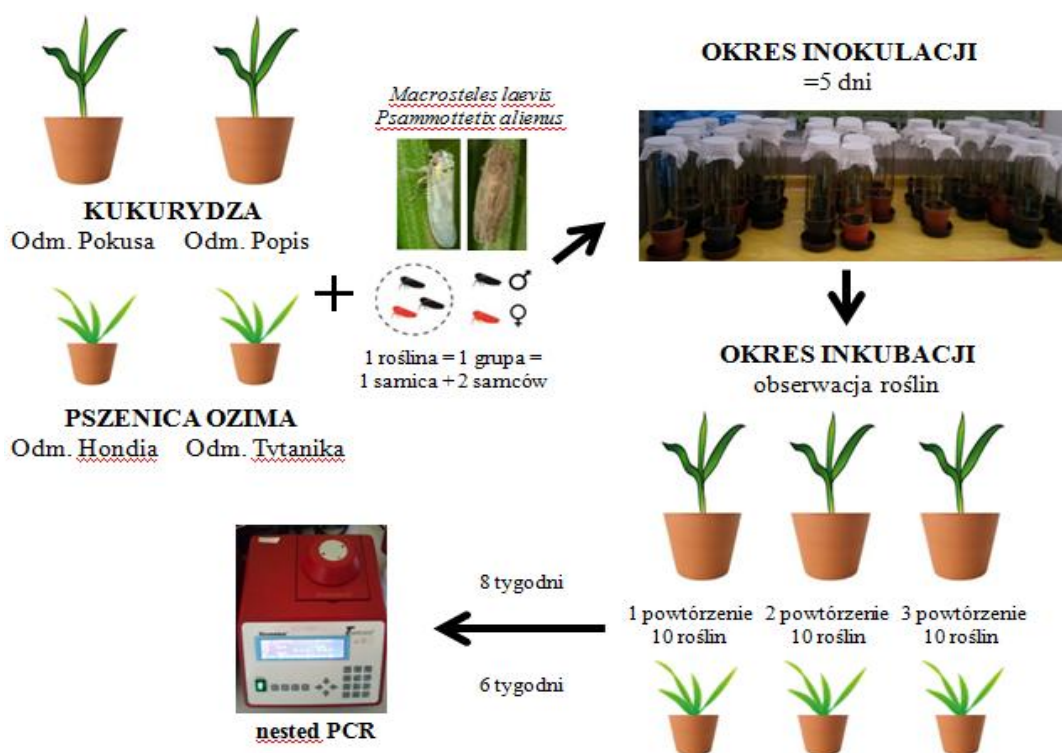
Przed rozpoczęciem każdego eksperymentu zbadano poziom zainfekowania kolonii. Z izolatora, w którym prowadzono hodowle owadów odłowiono 10 osobników (5 samic i 5 samców). Owady umieszczono pojedynczo w probówkach typu Eppendorf o pojemności 1,5ml. Izolacje DNA owadów przeprowadzono zgodnie z podpunktem 4.1.2. W celu wykrycia fitoplazm zastosowano bezpośredni PCR (direct-PCR) ze starterami R16F2n/R16R2. Rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów wykonano według podpunktu 4.5.

Badania wykonano w izolatorach w warunkach szklarniowych., na dwóch odmianach pszenicy ozimej (Hondia i Tytanika) oraz dwóch odmianach kukurydzy (Popis i Pokusa) (Ryc. 4). Doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. W każdym powtórzeniu testowano 10 roślin. Próbkę kontrolną stanowiła roślina, którą inkubowano z owadami nieinfekcyjnymi. W eksperymentach użyto roślin pszenicy w stadium rozwojowym 3-4 liści właściwych, a kukurydzy w fazie 3 liści właściwych. Rośliny umieszczono pojedynczo pod szklanymi kloszami, zabezpieczonymi od góry siatką nylonową i za pomocą ekshaustora, naniesiono na nie po 3 dorosłe osobniki skoczków, każdorazowo w kombinacji 1 samica i 2 samce. Używano owadów, z kolonii której poziom zainfekowania przekraczał 90%. Czas inokulacji wynosił 5 dni. Rośliny

utrzymywano w szklarni w temperaturze 23-25°C oraz przy wilgotności powietrza wynoszącej 40%.

Rośliny pszenicy obserwowano przez 6 tygodni, a kukurydzy przez 8 tygodni pod kątem zmian w morfologicznych tj. wysokość i pokrój roślin, zmiana zabarwienia. Następnie przetestowano rośliny przeprowadzając izolację DNA z roślin zgodnie z procedurą opisaną w podpunkcie 4.1.2.

Do opracowania statystycznego wykorzystano program Statistica 13. Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji. Najmniejsze istotne różnice porównano stosując test Tukeya, przy $\alpha=0,05$.



Ryc. 4. Schemat doświadczenia testującego przenoszenie fitoplazm przez *M. laevis* i *P. alienus* na rośliny pszenicy i kukurydzy.

4.11. Odczynniki

4.11.1. Szczep bakteryjny

- **One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli***; Genotyp: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* (Invitrogen)

4.11.2. Gotowe zestawy do analiz

- CleanPCR (CleanNA)
- Invisorb®Spin Plasmid Mini Two (Strattec molecular)
- pGEM®T-Easy Vector System (Promega)
- GoTaq®Colorless Master Mix (Promega)
- GoTaq®Green Master Mix (Promega)
- GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready-to-use (Thermo Scientific)
- NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel)

4.11.3. Odczynniki chemiczne

- 2-Mercaptoetanol
- 2-Propanol (Izopropanol), czda
- Agaroza - Agarose Basica Le
- Alkohol etylowy
- Alkohol izoamylowy, czda
- Ampicylina
- Bactotrypton
- Bactoagar
- Chlorek sodu (NaCl)
- Chloroform, czda
- CTAB
- EDTA
- Ekstrakt drożdżowy
- IPTG
- Kwas borowy
- Kwas solny
- Midori Green DNA Stain
- Tris HCl
- Wodorotlenek sodu (NaOH)
- X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)

4.11.4. Bufory i roztwory

- **Bufor ekstrakcyjny do izolacji DNA roślinnego (pH 8,0)**
 - 0,5 M Tris
 - 1,4 M NaCl
 - 20 mM EDTA
 - 2% CTAB
 - 0,2% 2-Mercaptoetanol
- **Bufor TE (pH 7,6)**
 - 10 mM Tris
 - 1 mM EDTA
- **Bufor SB 20X stężony (pH 8,5)**
 - 8 g NaOH
 - 45 g kwas borowy
 - H₂O destylowana (uzupełnić do objętości 1L)
- **1,5% żel agarozowy do rozdzielania DNA**
 - 1,5 g agarowa
 - 100 ml buforu SB 1X
 - 1 µl Midori Green Advanced DNA Stain

4.11.5. Podłoża hodowlane

- **Pożywka płynna LB**
 - 10 g bactotrypton
 - 5 g ekstrakt drożdżowy
 - 5 g NaCl
 - H₂O destylowana (uzupełnić do objętości 1L)
- **Pożywka stała LB z ampicyliną**
 - 10 g bactotrypton
 - 5 g ekstrakt drożdżowy
 - 5 g NaCl
 - H₂O destylowana (uzupełnić do objętości 1L)
 - 1 ml ampicylina 100 mg/ml

5. WYNIKI I DYSKUSJA

5.1. Objawy na pszenicy ozimej

Z zebranych 200 próbek pszenicy ozimej poddanych szczegółowym analizom, 50% posiadało zmiany pokroju oraz zabarwienia części nadziemnej.

W fazie krzewienia obserwowano małe, żółte przebarwienia na liściach obecne u 20% roślin (Ryc. 5A i 5B). W fazie końcowej strzelania w źdźbło u 10% roślin wystąpiły żółte plamy, przypominające mozaikę oraz silne zahamowanie wzrostu, prowadzące do karłowatości u pszenicy (Ryc. 5C). Rośliny objawowe rozwijały się wolniej w porównaniu do roślin wyglądających zdrowo i kończyły wegetację w fazie krzewienia z nadmierną ilością rozkrzewień (Ryc. 5D).

Rośliny pszenicy, które reprezentowały próbki bezobjawowe rozwijały się prawidłowo i nie posiadały żadnych przebarwień oraz innych zmian wskazujących na rozwój organizmów chorobotwórczych.

5.1.1. Identyfikacja czynnika sprawczego

Przeprowadzona analiza nested-PCR potwierdziła obecność fitoplazm w czterech roślinach pszenicy ozimej, co stanowiło 2% przebadanych (Tab. 8). Jedna z roślin (W1.22) u której wykryto patogen posiadała zmiany w postaci żółtych plam na liściach, karłowacenia oraz nadmiernego krzewienia. Natomiast pozostałe trzy rośliny, tj.: W1.36, W1.47 i W7.07 pochodziły z puli roślin bezobjawowych.

Tab. 8. Wykrywanie fitoplazm w pszenicy ozimej

Kod partii	Liczba pozytywnych/ liczba testowanych roślin	Podgrupa fitoplazmy
W1	3/50	16SrI-R, 16SrI-S
W2	0/50	-
W7	1/50	16SrI-R
W8	0/50	-



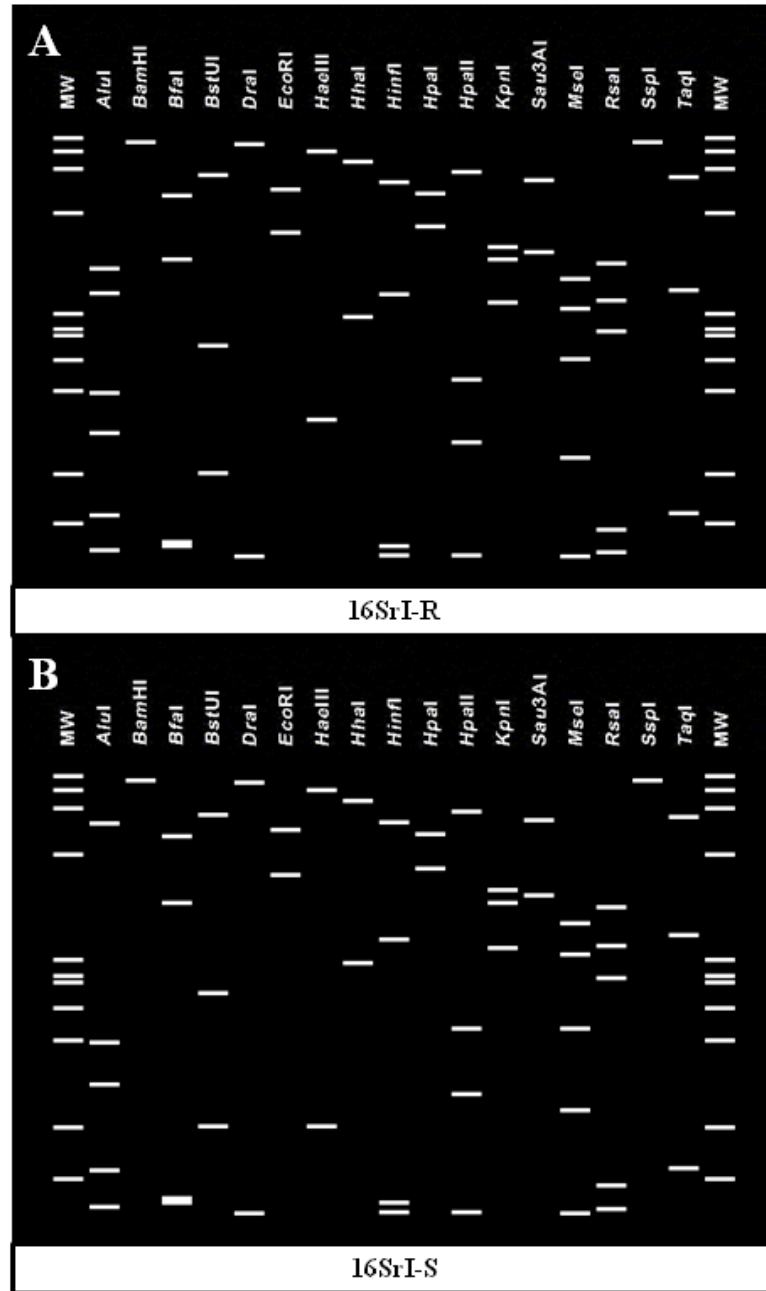
Ryc. 5. Objawy zaobserwowane na pszenicy ozimej: A, B- żółte przebarwienia występujące w fazie krzewienia; C- zahamowanie wzrostu; D- porównanie roślin bezobjawowych (1) oraz objawowych (2).

Analiza porównawcza sekwencji o długości 1244 pz, izolatów W1.22, W1.36 oraz W7.07 z użyciem programu BLASTn wykazała 100% podobieństwo z sekwencjami fitoplazm występujących na: orliku (*Aquilegia* sp.) w Iranie (nr akcesyjny MK307856) [Babaei i in., 2021]; roślinach bobowatych w Rosji (nr akcesyjny KX773514, KX773506, KX773498) [Girsova i in., 2017]; truskawce (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) w Egipcie (nr akcesyjny MT757900) [Mokbel i Kheder, 2020] i USA (nr akcesyjny AY102275) [Jomantiene i in., 2002] oraz jeżówce purpurowej (*Echinacea purpurea* L.) (nr akcesyjny EF546778) [Fránová i in., 2009] i porzeczce (*Ribes rubrum* L.) (nr akcesyjny AY669063) w Czechach [Navrátil i in., 2007]. Ponadto otrzymana sekwencja była identyczna ze

szczepami fitoplazm zidentyfikowanymi na terenie Litwy (nr akcesyjny HM067754) w wiśni pospolitej (*Prunus cerasus* L.) [Jomantiene i in., 2011] oraz w ciele owada pienika ślinianki (*Philaenus spumarius* L.) (nr akcesyjny KC283218) [Ivanauskas i in., 2014].

W wyniku analizy porównawczej fragmentu genu 16S rRNA o wielkości 1,2 kb, izolatu W1.47 otrzymano 100% podobieństwo z izolatami fitoplazm zidentyfikowanymi na roślinach koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense* L.) w Rosji (nr akcesyjny KX773520, KX773505) [Girsova i in., 2017]. Otrzymana sekwencja była identyczna z sekwencją szczepu wykrytego ciele owada *Aphrophoraalni* Fallén (pień olchowiec) odłowionego w Rosji (nr akcesyjny KP864664) [Girsova i in., 2016]. Sekwencje fitoplazm infekujących lilaka pospolitego (*Syringa vulgaris* L.) na Litwie (nr akcesyjny HM067755) [Jomantiene i in., 2011], marchew (*Daucus carota* L.) we Włoszech (nr akcesyjny HM448473) [Mitrović i in., 2011] i sprawcy fyllodiozy koniczyny (Clover phyllody phytoplasma) w Kanadzie (nr akcesyjny AF222066) [Lee i in., 2004] pokrywały się w 100% z badanym izolatem. Obserwowano wysokie podobieństwo (99,92%) izolatu W1.47 do szczepów fyllodiozy koniczyny: KVF (nr GenBank HQ530150) infekującego barwinka pospolitego (*Vinca minor* L.) we Francji [Mitrović i in., 2011] i KVE pochodzącego z koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) z terenu Niemiec (nr akcesyjny AY265217) [Lee i in., 2004] oraz fitoplazm wykrytych na terenie Rosji na koniczynie łąkowej (*T. pratense* L.) (nr akcesyjny KX773517) i komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus* L.) (nr akcesyjny KX773513, KX773512) [Girsova i in., 2017] oraz fitoplazmy żółtaczki kostrzewy (Festuca yellows phytoplasma) zidentyfikowanej na Litwie (nr akcesyjny DQ640504) [Valiūnas i in., 2007].

Przeprowadzona analiza restrykcyjna sekwencji genu kodującego 16S rRNA [Zhao i in., 2009] zaklasyfikowała izolaty fitoplazm z pszenicy ozimej do gatunku 'Ca. Phytoplasma asteris'. W próbkach W1.22, W1.36 oraz W7.07 potwierdzono obecność fitoplazmy należącej do podgrupy rybosomalnej 16SrI-R (Ryc. 6A). Badane sekwencje były identyczne (współczynnik podobieństwa 1.00) z wcześniej opisanym szczepem fitoplazmy pochodzącym z Litwy (nr GenBank HM067754), który powoduje chorobę wiśni (ang. *Cherry bunchy leaf*, ChBL). Natomiast profil restrykcyjny uzyskany z próbki W1.47 (Ryc. 6B) zaklasyfikował izolat fitoplazmy do podgrupy 16SrI-S. Analiza fragmentu genu 16S rRNA wskazała tożsamość ze szczepem pochodzącym z Litwy (nr GenBank HM067755), odpowiedzialnym za drobnienie liści na lilaku pospolitym (*Lilac little leaf*, LcLL) [Jomantiene i in., 2011].



Ryc. 6. Analiza RFLP sekwencji genu 16S rRNA izolatu W1.22 (A) oraz izolatu W1.47 (B) wykonana w programie iPhyClassifier.

Analiza filogenetyczna wykonana metodą Maximum Likelihood (ML) [Tamura i in., 2011] wskazała, że izolaty fitoplazm pochodzące z pszenicy grupują się na jednej gałęzi filogenetycznej (Ryc. 7) wśród szczepów referencyjnych należących do podgrupy 16SrI-C. Analiza topologii drzewa wykazała najbliższe pokrewieństwo izolatu W1.47 z izolatami Clover phyllody, a dokładniej z jego operonem B (*rrnB*). Natomiast pozostałe analizowane izolaty (W1.22, W1.36 i W8.37) były najbardziej spokrewnione ze szczepem Cherry bunchy leaf ChBL (nr GenBank HM067754) oraz Strawberry phylloid fruit StrawbPhF (nr GenBank AY102275).

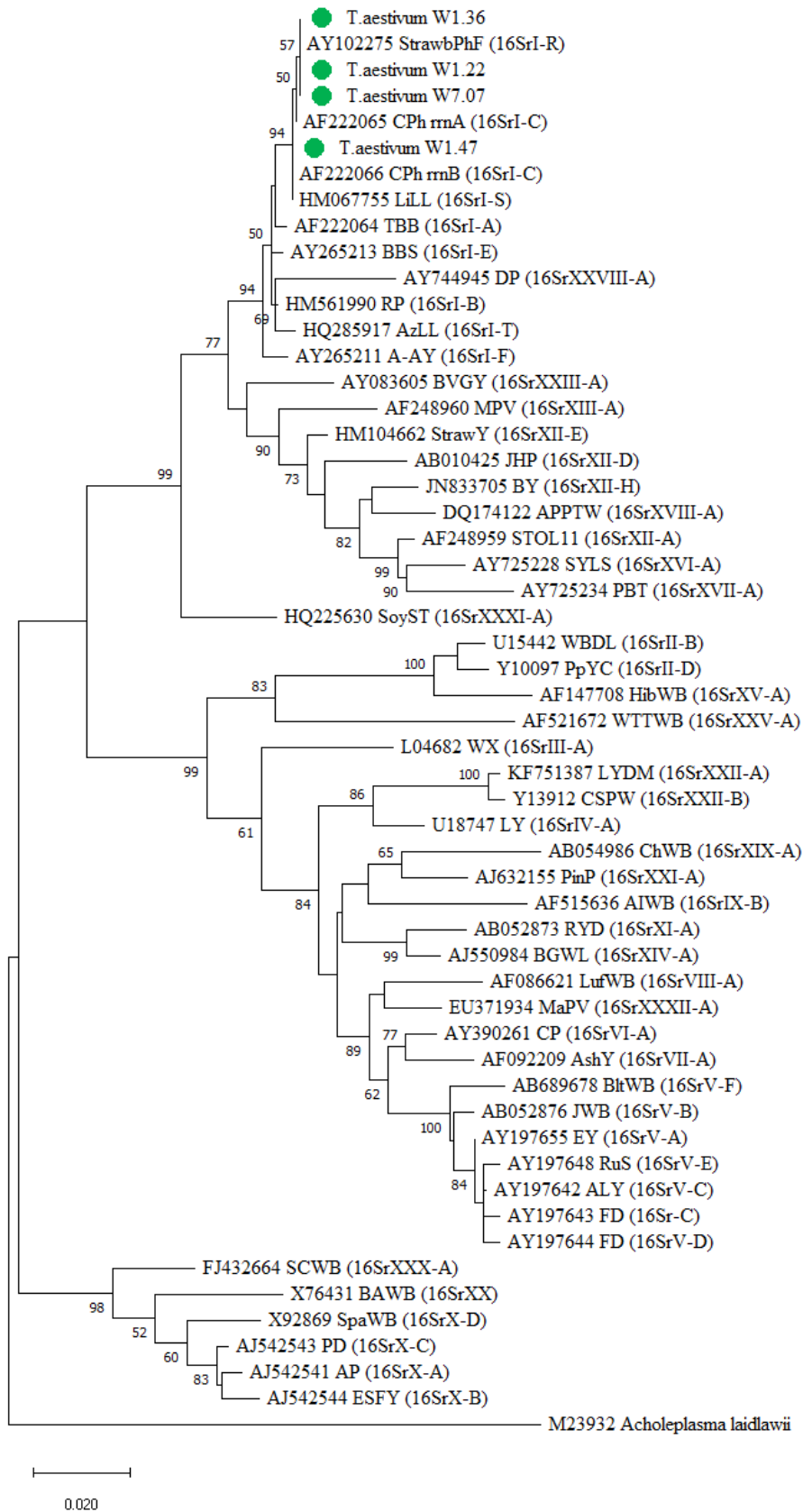
W wyniku analizy sekwencji nukleotydowej genu *tuf* podobieństwo równe 100% otrzymano względem izolatu wykrytego na roślinach marchwi (*D. carota* L.) w Serbii (nr akcesyjny KC354605), a także z sekwencjami fitoplazm pochodzących z: krwawnika pospolitego (*Achillea millefolium* L.) we Włoszech (nr akcesyjny JQ824213), jeżówki purpurowej (*E. purpurea* L.) z Czech (nr akcesyjny EF551060) oraz barwinka różowego (*Cataranthus roseus* L.) z Niemiec (nr akcesyjny L46369). Badany izolat był również identyczny z sekwencją fitoplazmy powodującej chorobę Wheat blue dwarf (WBD) w Chinach (nr akcesyjny DQ507200). Wysoki stopień podobieństwa wynoszący 99,74% wystąpił ze szczepami zidentyfikowanymi w Wielkiej Brytanii (nr akcesyjny JQ824248) oraz we Francji (nr akcesyjny AJ271317) na roślinach koniczyny. W przeprowadzonej analizie filogenetycznej (Ryc. 8) badany izolat fitoplazmy na drzewie grupował się wraz z fitoplazmą reprezentującą podgrupę 16SrI-C.

Obecność fitoplazm 16SrI-R i 16SrI-S w przebadanych próbkach pszenicy ozimej wskazuje na zagrożenie upraw przez niebieską karłowatość pszenicy (WBD). Dotychczas na terenie Polski, ale także Europy nie notowano tej choroby. Do roku 2010 nie rozróżniano podgrup w obrębie grupy 16SrI, którą uznawano za jedyny czynnik sprawczy WBD. Wu i in. [2010] dowiedli, że choroba wywoływana jest przez nową fitoplazmę należącą do podgrupy 16SrI-C. Inną fitoplazmą odpowiedzialną za WBD jest szczep 16SrI-B [Chen i in., 2014]. W przypadku podgrupy 16SrI-B wykazano, że genom tej fitoplazmy posiada 2 kopie genów 16S rRNA, różniące się czterema parami zasad. Na podstawie wyników z iPhyClassifier Cho i in. [2020] przypisali fitoplazmy WBD do podgrup: 16SrI-R i 16SrI-S. Jednak analiza filogenetyczna wskazuje, że różnią się one od innych sekwencji 16SrI-B. Z kolei w roku 2011 Jomantiene i in. stwierdzili, że fitoplazmy związane z podgrupą 16SrI-C są blisko spokrewnione z przedstawicielami podgrupy 16SrI-R.

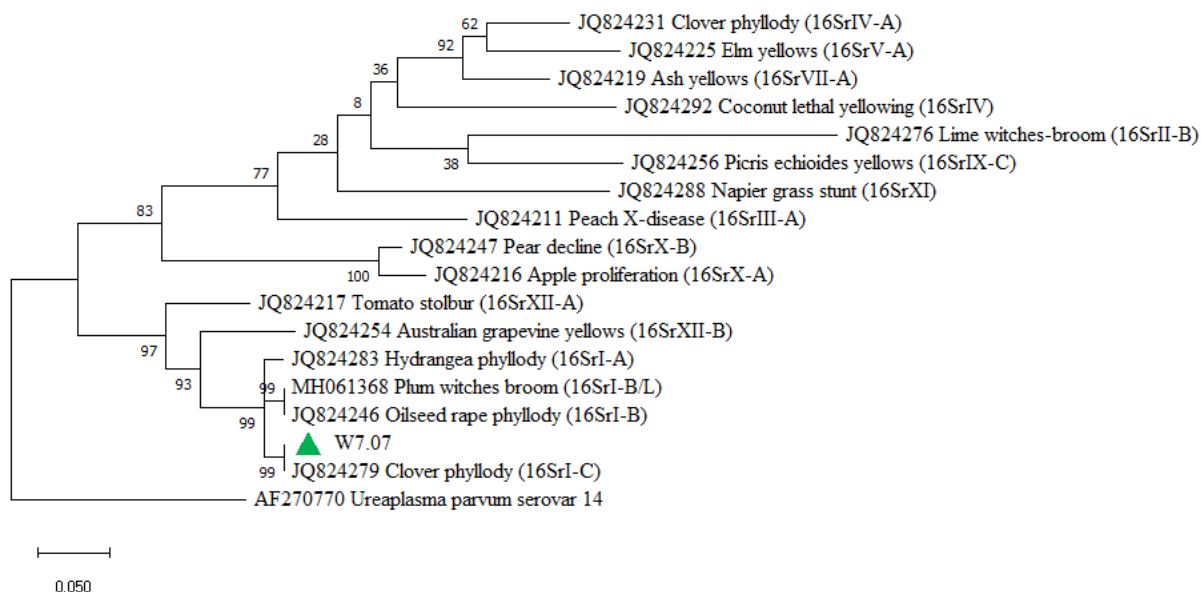
Dotychczas w uprawie pszenicy potwierdzono obecność z podgrupy: 16SrI-B [Olivier, niepublikowane; Zwolińska, 2019]; 16SrI-C [Wu i in., 2010] i 16SrXI-B [Rao i in., 2017b]. Fitoplazma wykryta w pszenicy z objawami żółtych plam na liściach, karłowatości i nadmiernego krzewienia została zaklasyfikowana do ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’, podgrupy 16SrI-R. Podobne zmiany zaobserwował Wu i in. [2010] przy infekcji fitoplazmą 16SrI-C. Na liściach widoczne były również ciemnozielone lub niebieskozielone smugi i żółknięcie ich końcówek, które w niektórych przypadkach ustępowało. Pszenica z żółtymi smugami i zahamowanym wzrostem może wskazywać na obecność fitoplazmy z podgrupy 16SrXI-B [Rao i in., 2017b].

Ponadto fitoplazmę z podgrupy 16SrI-R i 16SrI-S wyizolowano z roślin bezobjawowych, co wskazuje na możliwość latentnej infekcji WBD. Sytuacja ta może być spowodowana bardzo niskim mianem bakterii ‘*Ca. Phytoplasma*’ w tkankach żywiciela lub mechanizmami obronnymi roślin bądź owadów. Infekcje utajone są trudne do monitorowania i często pomijane w badaniach, co stwarza możliwość niekontrolowanego rozprzestrzeniania się fitoplazm [Kado, 2016; Donkersley i in., 2019]. Otrzymane wyniki wskazują na konieczność badania roślin objawowych oraz bezobjawowych. Identyfikacja patogenu wyłącznie w momencie wystąpienia objawów pozwala na określenie przyczyny choroby, jest jednak zbyt późna z punktu widzenia epidemiologii tych organizmów. Nie będzie również skuteczna w ograniczaniu zasięgu epidemii. Symptomy chorób fitoplazmatycznych mogą być mylone z objawami wywołanymi stresem środowiskowym, infekcją wirusową lub powstałych w wyniku naturalnego starzenia się roślin [Hollingsworth i in., 2008].

Dotychczas obecność fitoplazmy 16SrI-R odnotowano w: ziemniaku (*Solanum tuberosum* L.) [Santos-Cervantes i in., 2010]; rumianku (*Matricaria chamomilla* L.), marchwi (*D. carota* L.), barwinku (*Vinca minor* L.) [Torres i in., 2011]; pomarańczy (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) i limonce (*Citrus aurantifolia* L.) [Arratia-Castro i in., 2014]; *Waltheria indica* L. [Alves i in., 2017] i *Macroptilium lathyroides* L. [Alves i in., 2018]. Z kolei podgrupa 16SrI-R dotąd opisywana była jako choroba fylloidiozy na owocach truskawki (Strawberry phylloid fruit) [Jomantiene i in., 2002; Cieślińska i in., 2006], czereśni (*Prunus avium* L.) [Jomantiene i in., 2011] i orliku pospolitym (*Aquilegia vulgaris* L.) [Babaei i in., 2021].



Ryc. 7. Drzewo filogenetyczne pokrewieństwa szczepów w oparciu o sekwencję genu 16S rRNA. Skonstruowane metodą Maximum Likelihood w programie MEGA X. Badane izolaty oznaczono ●.



Ryc. 8. Drzewo filogenetyczne oparte o gen tuf. Skonstruowane metodą Maximum Likelihood w programie MEGA 7. Badany izolat oznaczono ▲

5.2. Objawy na kukurydzy

Przeprowadzona lustracja w fazie 7-8 liści właściwych ujawniła obecność jasnych, długich, równoległych pasów wzdłuż nerwów (Ryc. 9A i 9B). W końcowej fazie wydłużania pędu na liściach wystąpiły czerwone przebarwienia obejmujące zewnętrzną krawędź i pogłębiające się w kierunku nerwu głównego (Ryc. 9E i 9F). Niektóre z roślin charakteryzowały się słabszym wzrostem (Ryc. 9D).

5.2.1. Identyfikacja czynnika sprawczego

Obecność fitoplazm potwierdzono w 4 roślinach kukurydzy (2% analizowanych próbek), u trzech z objawami oraz jednej bez objawów (Tab. 9). W fazie BBCH 17 dwie rośliny (W3.05 i W4.03) posiadały jasne przebarwienia liści. W fazie BBCH 39 jedna kukurydza (W6.18) charakteryzowała się czerwonym zabarwieniem blaszki liściowej i ograniczonym wzrostem. Ponadto odnotowano jeden przypadek infekcji latentnej (W4.29) (Ryc. 9C).

Sekwencje o długości 1244 pz izolatów W3.05 i W4.29 były identyczne z sekwencjami izolatów uzyskanymi z pszenicy ozimej (W1.22, W1.36, W7.07). Analiza porównawcza została opisana w podpunkcie 5.1.1.

Tab. 9. Wykrywanie fitoplazm w roślinach kukurydzy

Kod partii	Liczba pozytywnych/ liczba testowanych roślin	Podgrupa fitoplazmy
W3	1/50	16SrI-R
W4	2/50	16SrI-R, 16SrV-C
W5	0/50	-
W6	1/50	16SrV-C

Natomiast sekwencje uzyskane z próbek W3.05 i W4.29 w analizie BLAST wykazały najwyższe podobieństwo z sekwencjami fitoplazm pochodzącymi z Czech, z jeżówki purpurowej (*E. purpurea* L.) (nr akcesyjny EF546778) [Fránová i in., 2009] oraz różanecznika (*Rhododendron* L.) (nr akcesyjny KC009838) [Příbylová i in., 2009]. Wysokie podobieństwo uzyskano z sekwencjami opisanymi w Korei Południowej wyizolowanymi z: *Mallotus japonicus* (nr akcesyjny KC558500) [Sang-Sub i in., 2013], runianki japońskiej (*Pachysandra terminalis*) (nr akcesyjny AB551736) [Back i in., 2010], morwy białej (*Morus alba* L.) (nr akcesyjny AB693124) [Win i in., 2012] i *Boehmeria pannosa* (nr akcesyjny MT708485) [Han i in., 2021]. Podobieństwo na poziomie 99,31% uzyskano również z izolatami wykrytymi w Kanadzie na winorośli (nr akcesyjny FJ824597) [Olivier i in., 2009b] i Estonii na wierzbownicy kosmatej (nr akcesyjny AY101386) [Alminaite i in., 2002] oraz fitoplazmą żółtaczkki cebuli (nr akcesyjny AP006628) [Oshima i in., 2004]. Badanie regionu R16F2n/R2 (1,2 kb) wykazało, że izolaty otrzymane z próbek W4.03 oraz W6.18 były identyczne z sekwencją fitoplazmy mającej zdolność infekowania drzew z rodzaju *Ulmus* na terenie Polski (nr akcesyjny MT859113) [Zwolińska i Jurga, nieopublikowane] oraz Serbii (nr akcesyjny HM038455) [Jović i in., 2012]. Duże podobieństwo równe 99,92% istniało z sekwencjami fitoplazm zidentyfikowanymi: w Słowenii na leszczynie pospolitej (*Corylus avellana* L.) (nr akcesyjny MK775267) [Mehle i in., 2019]; w Belgii na wiązcie pospolitym (*Ulmus minor* Mill.) (nr akcesyjny MH583020) [De Jonghe i in., 2019]; w Polsce na bylicy pospolitej (*Artemisia vulgaris* L.) oraz olszy czarnej (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) (nr akcesyjny MK440304, MK440303) [Jurga i Zwolińska, 2020a]; na powojniku pnącym (*Clematis vitalba* L.) na terenie Czarnogóry (nr akcesyjny KJ911208) oraz Serbii (nr akcesyjny KJ911207) [Krstić i in., 2018] i z niemieckimi izolatami z grupy 16SrV infekującymi olszę czarną (*A. glutinosa*) (nr akcesyjny KP238298, KP238297, KP238296, KP238295,

KP238294, KP238292) [Holz i in., 2016]. Badanie BLAST sekwencji rDNA o długości 1851 pz pokazało, że najwyższe podobieństwo (99,62%) wystąpiło z sekwencją fitoplazmy infekującej wiąz pospolity (*U. minor*) w USA (nr akcesyjny AF189214) [Lee i in., 2004] oraz Czechach (nr akcesyjny EU184021) [Navrátil i in., 2009]. Równie duże podobieństwo wystąpiło z sekwencjami opisanymi w Polsce na wiązie szypułkowym (*U. laevis*) (nr akcesyjny MT859113), olszy czarnej (*A. glutinosa*) (nr akcesyjny MK440303) oraz bylicy pospolitej (*A. vulgaris*) (nr akcesyjny MK440304) i wynosiło odpowiednio 99,89%, 99,45%, 99,45% [Zwolińska i Jurga, niepublikowane; Jurga i Zwolińska, 2020a].

Na podstawie analizy restrykcyjnej fragmentu R16F2n/R2 izolaty W3.05 i W4.29 zaklasyfikowano do podgrupy 16SrI-R. Uzyskany profil restrykcyjny (Ryc. 10A) był identyczny z fitoplazmą krzaczastości liści wiśni (Cherry bunchy leaf phytoplasma) (nr akcesyjny HM067754) [Jomantiene i in., 2011], przy współczynniku podobieństwa równym 1.00. Z kolei profil restrykcyjny izolatów W4.03 i W6.18 (Ryc. 10B) był identyczny z fitoplazmą żółtaczkki olszy (Alder yellows phytoplasma) (nr akcesyjny AY197642) [Lee i in., 2004]. Współczynnik podobieństwa wynosił 1.00, co umożliwiło sklasyfikowanie izolatów jako członków podgrupy 16SrV-C.

Analiza filogenetyczna (Ryc. 11) oparta na sekwencjach 16S rDNA ujawniła, że izolaty fitoplazm pochodzące z kukurydzy utworzyły dwie linie filogenetyczne. W pierwszej grupie znajdowały się izolaty W6.18 i W4.03 wraz z fitoplazmami należącymi do grupy 16SrV. Topologia drzewa wskazała na bliskie pokrewieństwo z fitoplazmą pochodzącą z Polski (nr GenBank MT859113), którą zidentyfikowano na wiązie szypułkowym (*U. laevis*) [Zwolińska i Jurga, niepublikowane]. Pozostałe dwa izolaty W4.29 i W3.05 były najbliższej spokrewnione ze szczepami referencyjnymi przynależnymi do grupy 16SrI. Wykazywały zróżnicowany stopień pokrewieństwa z fitoplazmami znajdującymi się w tej grupie.

Identyfikacja fitoplazm zasiedlających kukurydzę potwierdziła obecność szczepów żółtaczkki astra (Aster yellows phytoplasma) i wiązu (Elm yellows phytoplasma). Fitoplazma z podgrupy 16SrI-R została zidentyfikowana u rośliny z jasnymi przebarwieniami, ułożonymi w równoległe pasy oraz u rośliny bezobjawowej. Z kolei obecność fitoplazmy z podgrupy 16SrV-C potwierdzono u kukurydzy w fazach BBCH 17-18 i 39. Na liściach widoczne były jasne pasy, z wyraźnie widocznym czerwonym przebarwieniem. Roślina miała ograniczony wzrost. Obecność czerwonych smug przy nerwie głównym liści oraz mała ilość nasion w kolbach może świadczyć o obecności fitoplazmy 16SrXII-A [Jović i in., 2007]. Z kolei drobne, czerwone liście i nerwy główne,

chlorotyczne paski na liściach kukurydzy z zanikającymi kwiatostanami i/lub pędami i nierozwiniętymi kolbami [Pérez-López i in., 2016] oraz karłowatość [Galvão i in., 2021] mają związek z rozwojem ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ z podgrupy 16SrI-B. U roślin kukurydzy, u której obserwowano zahamowany wzrost i skrócone międzywęzła wykryto fitoplazmę z podgrupy 16SrI-L [Zwolińska i Borodynko-Filas, 2021].

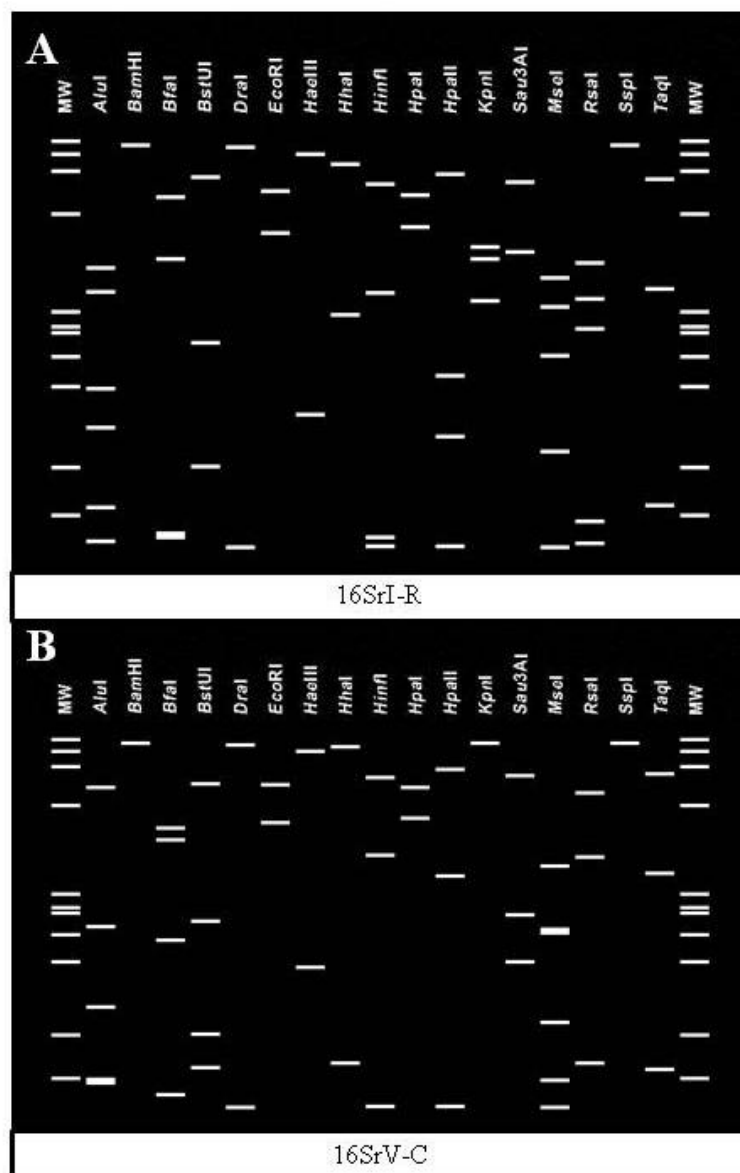
Dotychczasowe doniesienia potwierdzają zakażenia kukurydzy przez fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B w Meksyku [Seemuller i in., 1998], Brazylii [Bedendo i in., 2000], Kolumbii, we Włoszech i na Kubie [Mejia i in., 2013], w południowej Afryce [Kruger i in., 2015] oraz USA i Indiach [Rao i in., 2017a]. Innym z zagrożeń dla kukurydzy jest fitoplazma z podgrupy XII-A odpowiedzialna na chorobę stołburu. Jej obecność odnotowano wyłącznie na obszarze krajów europejskich: Serbii [Duduk i Bertaccini, 2006], Włoch [Calari i in., 2010], Węgier [Acs i in., 2011], Bośni i Hercegowiny [Kovačević i in., 2014], Bułgarii [Genov i in., 2014] i Turcji [Çağlar i in., 2021].

Jak dotąd na obszarze Polski fitoplazmy z grupy 16SrV odnotowano u: maliny i borówki amerykańskiej [Cieślińska, 2001]; drzew pestkowych [Cieślińska i in., 2004; Cieślińska, 2011b]; bylicy pospolitej i olszy czarnej [Jurga i Zwolińska, 2020a] oraz wiązu szypułkowego [Zwolińska i Jurga, niepublikowane].

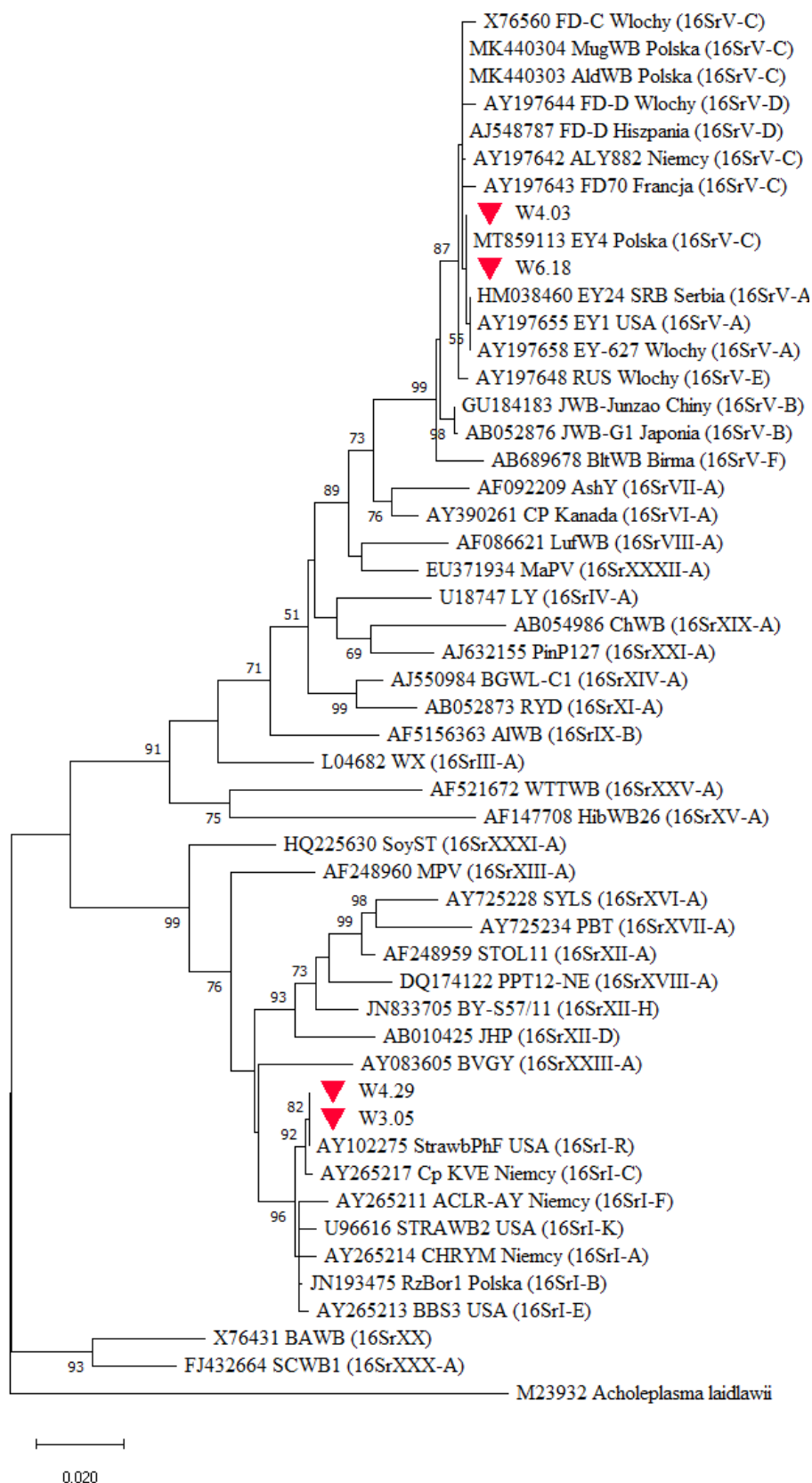
Jednym z rezerwuarów fitoplazm dla upraw rolniczych są drzewa i krzewy leśne [Marcone, 2015]. Przedstawione na rycinie 11 podobieństwo fitoplazmy 16SrV-C z innymi bakteriami tej grupy wskazuje, że wiąz szypułkowy może być źródłem patogenów infekujących kukurydzę w Polsce.



Ryc. 9. Objawy na kukurydzy: A, B- jasne, długie, równoległe pasy wzdłuż nerwów w fazie BBCH 17-18; C- roślina bezobjawowa; D- słabszy wzrost widoczny w fazie BBCH 39; E, F- czerwone przebarwienia na zewnętrznej krawędzi liści.



Ryc. 10. Porównanie wirtualnych wzorców RFLP otrzymanych w wyniku trawienia in silico sekwencji o długości 1244 pz pochodzących od izolatów W3.05 (A) oraz W4.03 (B).



Ryc. 11. Drzewo filogenetyczna utworzone na podstawie sekwencji 16S rDNA metodą Maximum Likelihood w programie MEGA X. Badane izolaty oznaczono ▼.

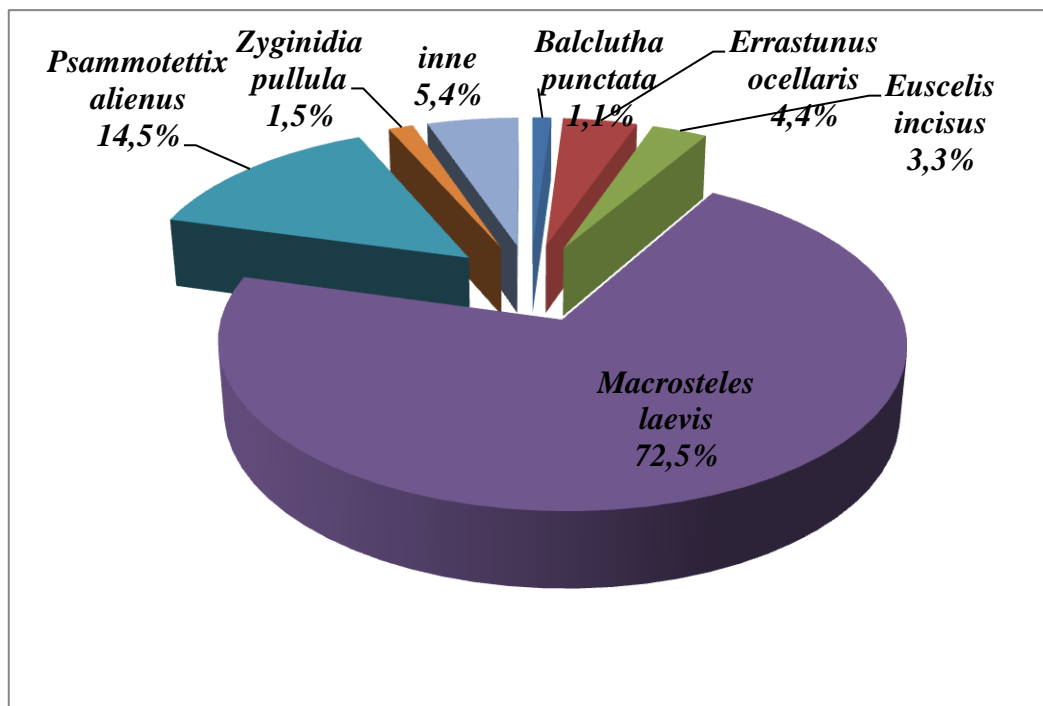
5.3. Identyfikacja potencjalnych wektorów fitoplazm

5.3.1. W pszenicy ozimej

Z pszenicy ozimej odłowiono 276 osobników dorosłych z rzędu *Hemiptera*, które oznaczono do 12 gatunków (Tab. 10). W zebranych materiale przeważali przedstawiciele rodziny *Cicadellidae*, stanowiąc 98,2% (Wyk. 1). Pozostałe gatunki (1,8%) należały do rodzin *Cercopidae* i *Delphacidae*. Dominującym był *Macrosteles laevis* Ribaut, a drugim pod względem liczebności był *Psammotettix alienus* Dahlbom (Wyk. 1). Identyczne rezultaty uzyskała Nowacka [1982] w badaniach na skoczki zasiedlającymi zboża. Dominację *P. alienus* w zbożach potwierdzono w Polsce i Niemczech [Klejdzysz, 2013; El-Wakeil i in. 2014].

Tab. 10. Skład gatunkowy skoczków odłowionych z pszenicy ozimej

Rząd	Podrząd	Nadrodzina	Rodzina	Gatunek lub rodzaj	
<i>Hemiptera</i>	<i>Cicadomorpha</i>	<i>Membracoidea</i>	<i>Cicadellidae</i>	<i>Arthaldeus striifrons</i> Kirschbaum	
				<i>Balclutha punctata</i> Fabricius	
				<i>Chlorita palii</i> Ossiannilsson	
				<i>Empoasca pteridis</i> Dahlbom	
				<i>Errastunus ocellaris</i> Fallén	
				<i>Euscelis incisus</i> Kirschbaum	
				<i>Macrosteles laevis</i> Ribaut	
				<i>Psammotettix alienus</i> Dahlbom	
				<i>Zyginidia pullula</i> Boheman	
		<i>Cercopoidea</i>	<i>Cercopidae</i>	<i>Cercopis vulnerata</i> Illiger	
	<i>Fulgoromorpha</i>	<i>Fulgoroidea</i>		<i>Delphacidae</i>	<i>Javesella pellucida</i> Fabricius
					<i>Laodelphax striatellus</i> Fallén



Wyk. 1. Udział poszczególnych gatunków skoczków odłowionych z pszenicy ozimej

5.3.1.1. Analiza genetyczna fitoplazm w odłowionych z pszenicy ozimej owadach

Badania potwierdziły obecność fitoplazm w 29 próbkach, u 10,5% ogólnej liczby odłowionych osobników (Tab. 11).

Izolat S9.205 uzyskał najwyższe podobieństwo (99,84%) z izolatem Ei1096 wykrytym u *E. incisus* w Serbii (nr akcesyjny MN047257) [Jakovljević i in., 2020] oraz szczepem AY-A Europejskiej żółtaczkę drzew pestkowych (nr akcesyjny LC388956) [Iwabuchi i in., 2020]. Analogiczna sytuacja wystąpiła u izolatów S9.250 i S9.251, których zgodność wobec wyżej wymienionych fitoplazm, ale również ze szczepem AVUT należącym do ‘Ca. Phytoplasma asteris’ (nr akcesyjny LC388958) [Iwabuchi i in., 2020] wynosiła 99,92% i 99,76%. Sekwencja izolatu S9.226 była w 100% zgodna ze szczepem AVUT, a izolat S9.322 w 99,84%. Izolaty S9.205, S9.226, S.250, S9.251 i S9.322 wykazywały różny stopień podobieństwa z fitoplazmami wyizolowanymi m.in. z owada należącego do rodziny *Cicadellidae* (Niemcy, nr akcesyjny AY265212) [Lee i in., 2004], barwinka różowego (Włochy, nr akcesyjny MH279545) [Muirhead i in., 2019] i moreli (Niemcy, nr akcesyjny AY265211) [Lee i in., 2004]. Sekwencje fitoplazm wyosobnione od *M. laevis* (S8.282, S9.205, S9.226, S9.238, S9.250, S9.251, S9.270), *E. incisus* (S9.322, S9.324-328), *E. ocellaris* (S9.330, S9.332-333), *L. striatellus* (S9. 334-335), *J. pellucida* (S9. 336),

E. pteridis (S9.337) oraz *A. striifrons* (S9.338) były identyczne (współczynnik podobieństwa 1.00) ze wzorcem (nr akcesyjny AY265211) należącym do podgrupy 16SrI-F [Lee i in., 2004] (Ryc. 12).

Sekwencja izolatu S9.244 była w 100% identyczna z polską (nr akcesyjny MT859113) [Zwolińska i Jurga, nieopublikowane] oraz serbską (nr akcesyjny HM038455) fitoplazmą zasiedlającą drzewa z rodzaju *Ulmus* L [Jović i in., 2012]. Równie wysokie podobieństwo (nr akcesyjny 99,92%) wystąpiło z 23 sekwencjami wyizolowanymi m.in. z: leszczyny pospolitej na Słowenii (nr akcesyjny MK775267) [Mehle i in., 2019]; wiązu pospolitego w Belgii (nr akcesyjny MH583020) [De Jonghe i in., 2019]; powojnika pnącego w Czarnogórze (nr akcesyjny KJ911208) [Krstić i in., 2018]; bylicy pospolitej w Polsce (nr akcesyjny MK440304); olszy czarnej w Polsce (nr akcesyjny MK440303) [Jurga i Zwolińska, 2020a], Serbii (nr akcesyjny KJ911207) [Krstić i in., 2018] i Niemczech (nr akcesyjny KP238297, KP238298) [Holz i in., 2016]. Na podstawie profilu restrykcyjnego (Ryc. 12) izolat fitoplazmy S9.244 uzyskany od *M. laevis* został zaklasyfikowany jako przedstawiciel podgrupy 16SrV-C. Wykazywał zgodność z profilem referencyjnym szczepu żółtaczkolchy ALY882 (współczynnik podobieństwa 1.00; nr akcesyjny AY197642) [Lee i in., 2004].

Porównanie sekwencji izolatu S8.219, S8.327 i S9.297 wskazało 100% zgodność z 89 sekwencjami fitoplazm zidentyfikowanymi m.in.: w Polsce u skoczka sześciorka (nr akcesyjny CP055264) [Zwolińska i in., 2017]; Iranie w rzepaku (nr akcesyjny MN877914) [Davoodi i in., nieopublikowane] i roślinach ozdobnych w Indiach (nr akcesyjny MN239503, MN239504, MN223677) [Panda i in., 2019; Sumashri i Janardhana, 2020]; na Węgrzech (nr akcesyjny MK992774, MN080270) [Mergenthaler i in., 2020]; w Afryce (nr akcesyjny CP035949) [Coetzee i in., 2019]; Iranie (nr akcesyjny MK069967) [Salehi, nieopublikowane] i Chinach (nr akcesyjny MG252367) [Zhu, nieopublikowane]. Otrzymane profile restrykcyjne (Ryc. 12) fitoplazm wyizolowanych z *M. laevis* (S8.219, S9.297) i *E. ocellaris* (S8.327) były identyczne (współczynnik podobieństwa 1.00) z referencyjnym szczepem podgrupy 16SrI-B (nr akcesyjny AP006628) [Oshima i in., 2004].

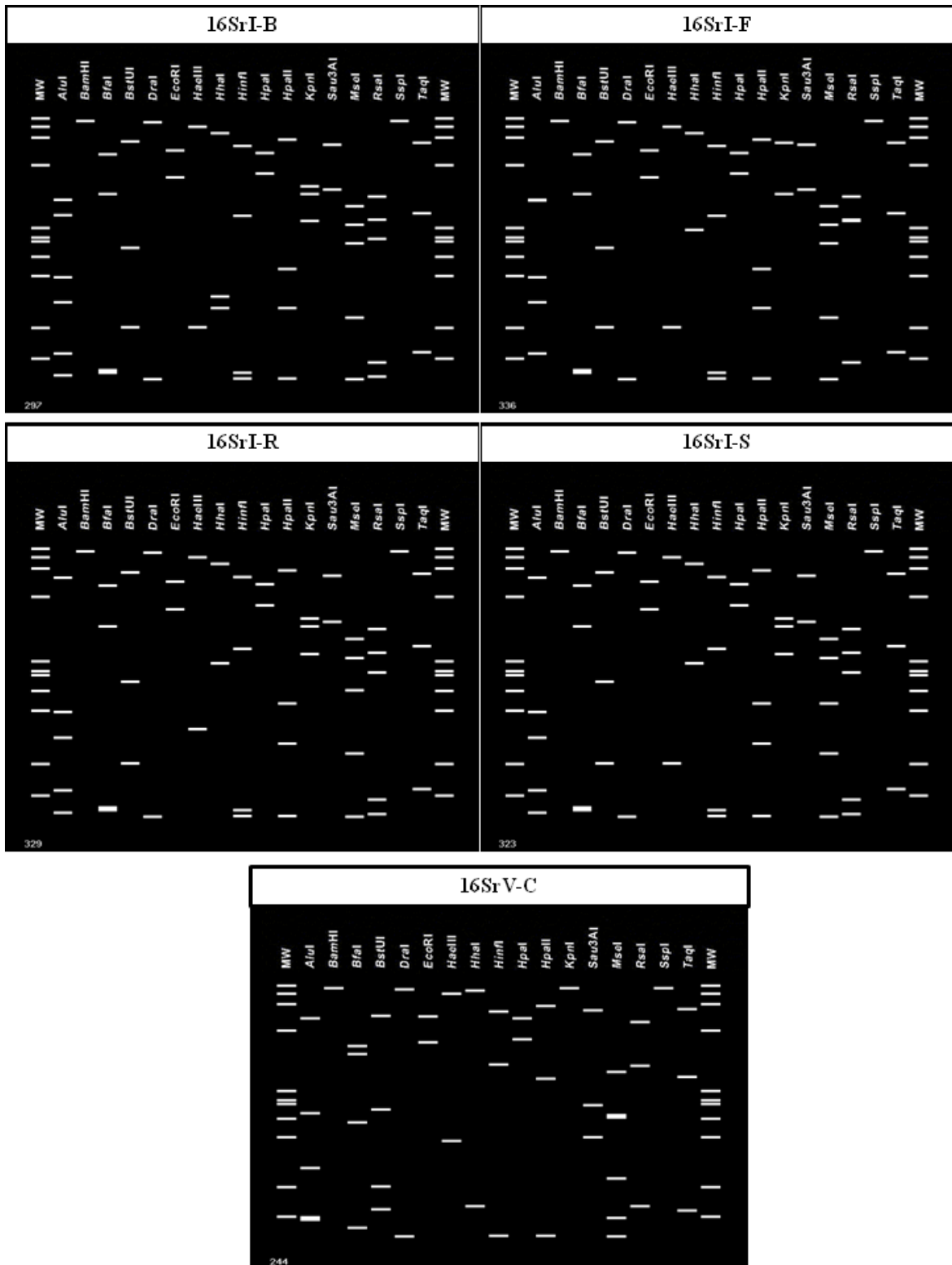
Izolat S9.323 pozyskany od *Euscelis incisus* miał najwyższe podobieństwo równe 99,92% z sekwencjami fitoplazm wyizolowanymi z: konicyzny łąkowej w Rosji (nr akcesyjny KX773517) [Girsova i in., 2017]; kostrzewy trzcinowej na Litwie (nr akcesyjny DQ640504) [Valiūnas i in., 2007]; aksamitki i *P. striatus* w Iranie (nr akcesyjny MZ458406 i MZ457910) (Salehi i in., nieopublikowane). Równie wysoki wskaźnik podobieństwa (99,84%) uzyskał z sekwencjami pochodzącymi od żywicieli owadzych tj.

Aphrophora alni (nr akcesyjny KP864664) [Girsova i in., 2016] i *E. incisus* (Serbia; nr akcesyjny MN047255) (Jakovljević i in., 2020) oraz wyizolowanych z roślin: koniczyny łąkowej w Rosji (nr akcesyjny KX773507, KX773505) [Girsova i in., 2017] i Finlandii (nr akcesyjny FN298629) [Boberg, 2009]; różanecznika w Czechach (nr akcesyjny KC009838) [Příbylová i in., 2009]; lilaku pospolitym na Litwie (nr akcesyjny HM067755) [Jomantiene i in., 2011] i marchwi we Włoszech (nr akcesyjny HM448473) [Mitrović i in., 2010]. Fragment sekwencji genu 16S rRNA izolatu S9.329 był w 99,92% podobny do sekwencji fitoplazm uzyskanych z: orlika w Iranie (nr akcesyjny MK307856) [Babaei i in., 2021]; komonicy zwyczajnej i koniczyny łąkowej w Rosji (nr akcesyjny KX773514; KX773498) [Girsova i in., 2017] i Finlandii (nr akcesyjny FN298629) [Boberg, 2009]; różanecznika (nr akcesyjny KC009838) [Příbylová i in., 2009], jeżówki purpurowej (nr akcesyjny EF546778) [Fránová i in., 2009] i porzeczki czerwonej w Czechach (nr akcesyjny AY669063) [Navrátil i in., 2007]; truskawki w Egipcie (nr akcesyjny MT757900) [Mokbel i Kheder, 2020] i USA (nr akcesyjny AY102275) [Jomantiene i in., 2002] i wiśni pospolitej na Litwie (nr akcesyjny HM067754).

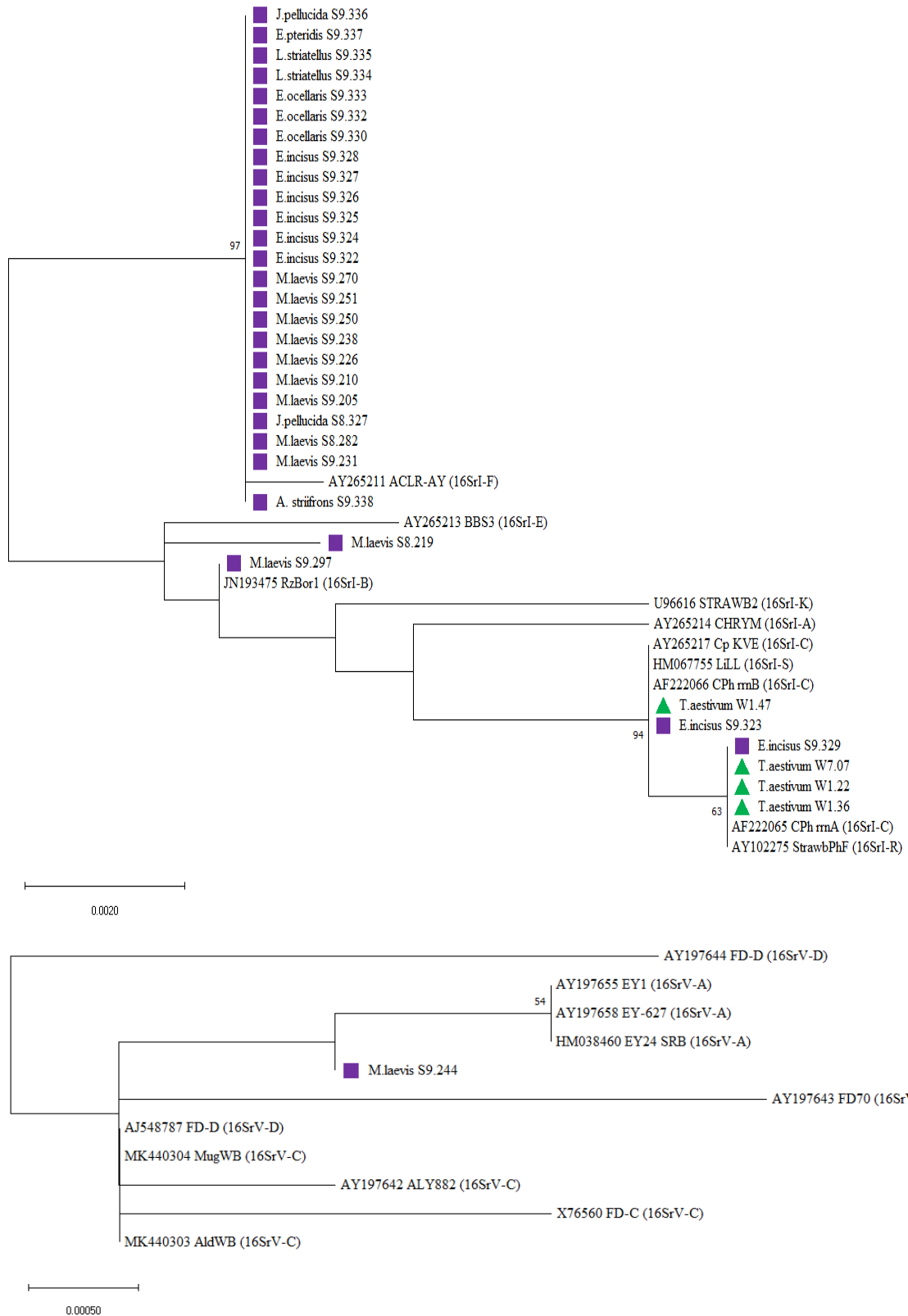
Profil restrykcyjny izolatu (Ryc. 12) uzyskanego z *E. incisus* (S9.323) zakwalifikował fitoplazmę jako członka grupy 16SrI, podgrupy S, wskazując podobieństwo (współczynnik podobieństwa 1.00) z sekwencją szczepu LiLL (nr akcesyjny HM067755). Również z tego samego gatunku (S9.329) wyizolowano fitoplazmę, której sekwencja była identyczna (współczynnik podobieństwa 1.00) z sekwencją referencyjną fitoplazmy z podgrupy 16SrI-R (nr akcesyjny HM067754) [Jomantiene i in., 2011].

Przeprowadzona analiza filogenetyczna (Ryc. 13) wskazuje, że przeważająca większość izolatów uzyskanych z owadów odłowionych z pszenicy grupuje się wraz z fitoplazmami należącymi do grupy 16SrI. Izolat S8.219 wykryty u *M. laevis* utworzył oddzielny klaster w kladzie 16SrI, co wskazuje na jego odrębność w tej grupie. Izolaty pochodzące od *M. laevis* (S8.282, S9.205, S9.210, S9.226, S9.231, S9.238, S9.250, S9.251, S9.270), *E. incisus* (S9.322, S9.324, S9.325, S9.326, S9.327, S9.328), *E. ocellaris* (S9.330, S9.332, S9.333), *L. striatellus* (S9.334, S9.335), *J. pellucida* (S9.336) oraz *E. pteridis* (S9.337) zgrupowały się w obrębie fitoplazm należących do podgrupy 16SrI-F. Sekwencja izolatu S9.397 zidentyfikowana w owadzie z gatunku *M. laevis* była blisko spokrewniona z fitoplazmą infekującą rzepak w Polsce. Izolaty fitoplazm pochodzące od *E. incisus* (S9.323, S9.329) były blisko spokrewnione z izolatami wyosobnionymi z roślin pszenicy, które opisano w punkcie 5.1.1. Izolat S9.323 zgrupował się z operonem B fitoplazmy fyllodiozy koniczyny (16SrI-C) oraz z fitoplazmą sklasyfikowaną jako

podgrupa 16SrI-S. Z kolei izolat S9. 329 znalazł się w jednym klastrze z sekwencją operonu A fitoplazmy fyllodiozy koniczyny oraz z fitoplazmą Strawberry phylloid fruit zaklasyfikowaną jako członek podgrupy 16SrI-R. Jeden z izolatów pozyskanych od *M. laevis* (S9.244) znalazł się w grupie fitoplazm 16SrV-C i 16SrV-D. Dodatkowo topologia fragmentu drzewa przedstawionego na Rycinie 13 wskazuje, że izolat ten dzieli wspólnego przodka z podgrupą 16SrV-A.



Ryc. 12. Profile restrykcyjne sekwencji izolatów pochodzących z owadów odłowionych z pszenicy ozimej.



Ryc. 13. Fragmenty drzewa filogenetycznego uwzględniającego sekwencje izolatów uzyskanych od nosicieli fitoplazm w pszenicy ozimej. Sekwencje uzyskane od pszenicy oznaczono ▲, a potencjalnych wektorów oznaczono ■

Tab. 11. Identyfikacja i klasyfikacja fitoplazm wykrytych w skoczках odłowionych z pszenicy ozimej

Izolat	Gatunek skoczka	Podgrupa
S8.219	<i>Macrosteles laevis</i>	16SrI-B
S8.282		16SrI-F
S8.327	<i>Errastunus ocellaris</i>	16SrI-B
S9.205	<i>Macrosteles laevis</i>	16SrI-F
S9.210		16SrI-F
S9.226		16SrI-F
S9.231		16SrI-F
S9.238		16SrI-F
S9.244		16SrV-C
S9.250		16SrI-F
S9.251		16SrI-F
S9.270		16SrI-F
S9.297		16SrI-B
S9.322		<i>Euscelis incisus</i>
S9.323	16SrI-S	
S9.324	16SrI-F	
S9.325	16SrI-F	
S9.326	16SrI-F	
S9.327	16SrI-F	
S9.328	16SrI-F	
S9.329	16SrI-R	
S9.330	<i>Errastunus ocellaris</i>	16SrI-F
S9.332		16SrI-F
S9.333		16SrI-F
S9.334	<i>Laodelphax striatellus</i>	16SrI-F
S9.335		16SrI-F
S9.336	<i>Javesella pellucida</i>	16SrI-F
S9.337	<i>Empoasca pteridis</i>	16SrI-F
S9.338	<i>Arthaldeus striifrons</i>	16SrI-F

W wyniku przeprowadzonych badań wyodrębniono grupę potencjalnych wektorów fitoplazm w uprawie pszenicy ozimej, było to 7 gatunków owadów z rzędu Hemiptera: *Arthaldeus striifrons* Kirschbaum, *Empoasca pteridis* Dahlbom, *Errastunus ocellaris* Fallén, *Euscelis incisus* Kirschbaum, *Javesella pellucida* Fabricius, *Laodelphax striatellus* Fallén i *M. laevis* (Tab. 11).

Fitoplazmę z podgrupy 16SrI-F po raz pierwszy wykryto u *A. striifrons* i *E. pteridis* w Polsce i na świecie (Tab. 11). Dostępne informacje potwierdzają rolę *A. striifrons* jako potencjalnego wektora fitoplazmy z podgrupy 16SrI-C wśród roślin kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* Schreb.) na Litwie [Ivanauskas, 2014]. U *E. pteridis* dotychczas wykryto ‘*Ca. Phytoplasma solani*’, patogen odpowiedzialny za chorobę stołburu [Šafářová i in., 2018].

U gatunku *E. ocellaris* wykazano obecność fitoplazm z podgrupy 16SrI-B i 16SrI-F (Tab. 11). O występowaniu ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ z podgrupy 16SrI-F doniosła Orságová i in. [2011]. W Austrii u *E. ocellaris* stwierdzono obecność patogenu z podgrupy 16SrXII-A [Riedle-Bauer i in., 2006].

Fitoplazmy z podgrup 16SrI-F i 16SrI-S potwierdzono u *E. incisus* (Tab. 11). W literaturze można znaleźć informacje dotyczące roli *E. incisus* jako wektora fitoplazm. Podgrupę 16SrIII-B oraz mieszaną infekcję fitoplazm 16SrIII-B z 16SrI-F u *E. incisus* wykazała Orságová i in. [2011]. Występowanie podgrupy 16SrIII-P wskazał Ivanauskas i in. [2011], a grupę 16SrIII odnotowano u osobników odłowionych w Rosji [Girsova i in., 2016]. *E. incisus* może pełnić rolę w rozprzestrzenianiu ‘*Ca. Phytoplasma solani*’, czynnika sprawczego choroby stołburu [Fos i in., 1992; Mehle i in., 2011; Šafářová i in., 2018].

Pokrewieństwo pomiędzy izolatami uzyskanymi z pszenicy i *E. incisus* ukazane na rycinie 13 wskazuje, że może być on wektorem fitoplazmy z podgrupy 16SrI-S w uprawie pszenicy. Zdolność przenoszenia fitoplazm przez *E. incisus* potwierdzono w przypadku podgrup: 16SrI-C [Ivanauskas, 2014] i 16SrVI [Posnette i Ellenberger, 1963] u koniczyny białej (*Trifolium repens* L.); 16SrIII-B u ostrożnia polnego (*Cirsium arvense* (L.) Scop.) [Jakovljevic i in., 2015] i 16SrXII-A w uprawie winorośli [Alma i in., 2001].

Natomiast u *J. pellucida* i *L. striatellus* potwierdzono obecność fitoplazmy 16SrI-F (Tab. 11). W literaturze znajdują się informacje o obecności fitoplazm 16SrI-C i 16SrI-F u tych gatunków [Riedle-Bauer i in.; 2006; Orságová i in., 2011].

Fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B, 16SrI-F i 16SrV-C stwierdzono u *M. laevis* (Tab. 11). U tego gatunku potwierdzono obecność fitoplazm z grupy 16SrI i podgrup 16SrI-B i

16SrI-P [Girsova i in., 2016]. Udowodniono w warunkach doświadczalnych, że *M. laevis* jest wektorem fitoplazmy 16SrXII-A [Batlle i in., 2008; Šafářová i in., 2018]. W Europie *M. laevis* uznawany jest za wektora: żółtaczki astra, pierwiosnka, cebuli (16SrI-B) i fyllodiozy koniczyny (16SrI-C) [Lee i in., 1998; Kamińska i Śliwa, 2005; Zwolińska i in., 2017].

5.3.2. W kukurydzy

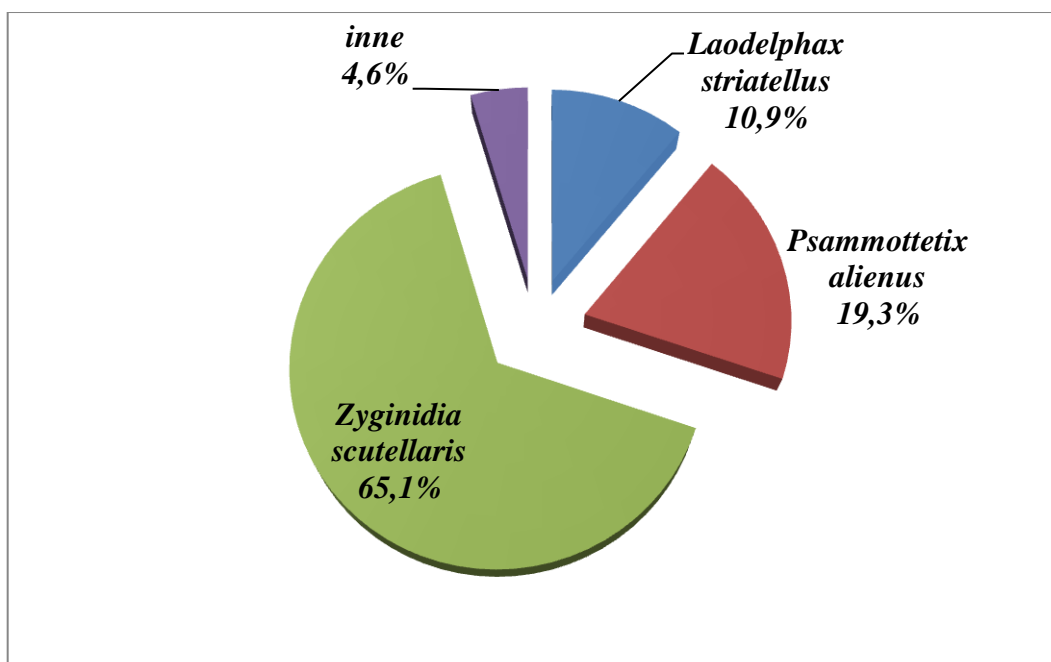
Z pól kukurydzy zebrano 275 osobników z rzędu *Hemiptera*. Odłowione owady oznaczono do 8 gatunków, pozostałe przypisano do dwóch rodzajów (Tab. 12). W zebranych materiale badawczym dominowały gatunki należące do rodziny *Cicadellidae* (87,9%). Dominujący w kukurydzy był skoczek kukurydziany *Zyginidia scutellaris* Herrich-Schaffer (Wyk. 2). Pierwsze doniesienia o jego obecności pochodzą z Sopotu z roku 1906 [Matsumura, 1906]. W latach 2000-2001 *Z. scutellaris* odnotowano w centralnej części Wyżyny Śląskiej [Simon i Szwedo, 2005]. W roku 2009 w województwie wielkopolskim odłowiono wyłącznie jedną samicę tego gatunku [Klejdzysz, 2013].

Z. scutellaris jest gatunkiem polifagicznym zasiedlającym rośliny z rodziny *Poaceae* (R.Br.) Barnh. Na kukurydzy masowe naloty obserwowane są w okresie letnim. Gatunek preferuje żerowanie na starszych liściach, w rezultacie na których pojawiają się białe plamy o różnych kształtach. Gatunek *Z. scutellaris* w zachodniej Europie uznawany jest za szkodnika wtórnego kukurydzy, a jego obecność nie prowadzi do istotnych strat ekonomicznych [El-Waikey i in, 2014]. Według Ardanuy i in. [2016] żerowanie *Z. scutellaris* przyczynia się do zwabiania innych gatunków szkodników za pomocą substancji lotnych.

Obserwacje przeprowadzone w niniejszej pracy stanowią pierwsze doniesienie o masowych pojawach skoczka kukurydzianego w Polsce.

Tab. 12. Gatunki skoczków odłowione z kukurydzy

Rząd	Podrząd	Nadrodzina	Rodzina	Gatunek/rodzaj
Hemiptera	Cicadomorpha	Membracoidea	Cicadellidae	<i>Empoasca</i> sp.
				<i>Empoasca pteridis</i> Dahlbom
				<i>Macrosteles laevis</i> Ribaut
				<i>Mocuellus collinus</i> Boheman
				<i>Psammotettix alienus</i> Dahlbom
				<i>Streptanus aemulans</i> Kirschbaum
				<i>Zyginidia scutellaris</i> Herrich-Schaffer
	Fulgoromorpha	Fulgoroidea	Delphacidae	<i>Dicranotropis hamata</i> Boheman
				<i>Laodelphax striatellus</i> Fallén
				<i>Stenocranus</i> sp.



Wyk. 2. Udział gatunków skoczków odłowionych z kukurydzy

5.3.2.1. Analiza genetyczna fitoplazm z owadów odłowionych z kukurydzy

Obecność patogenów potwierdzono w 4 próbkach (1,5% wszystkich zebranych osobników) (Tab. 13). Analiza izolatów O1.204 i O1.242 uzyskanych od *Z. scutellaris* wykazała najwyższe podobieństwo (99,92%) z fitoplazmami infekującymi wiąz szypułkowy w Polsce (nr akcesyjny MT859113) [Zwolińska i Jurga, niepublikowane] i wiąz pospolity w Serbii (nr akcesyjny HM038455) [Jović i in., 2012]. Również wysoka homologia (99,84%) wystąpiła z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank otrzymanymi z: leszczyny pospolitej na Słowenii (nr akcesyjny MK775267) [Mehle i in., 2019]; wiązu pospolitego w Belgii (nr akcesyjny MH583020) [De Jonghe i in., 2019]; powojnika pnącego w Czarnogórze (nr akcesyjny KJ911208) [Krstić i in., 2018]; bylicy pospolitej z Polski (nr akcesyjny MK440304) oraz olszy czarnej z Polski (nr akcesyjny MK440303) [Jurga i Zwolińska, 2020a], Serbii (nr akcesyjny KJ911207) [Krstić i in., 2018] i Niemiec (nr akcesyjny KP238297, KP238298) [Holz i in., 2016]. Z analizy porównawczej izolatu O2.260 wynika, że otrzymana sekwencja jest w 99,68% podobna do sekwencji fitoplazm uzyskanych z: leszczyny pospolitej na Słowenii (nr akcesyjny MK775267) [Mehle i in., 2019]; bylicy pospolitej w Polsce (MK440304) [Jurga i Zwolińska, 2020a]; powojnika pnącego w Czarnogórze (KJ911208) i Serbii (KJ911207) [Krstić i in., 2018]; a także z olszy czarnej w Polsce (MK440303) [Jurga i Zwolińska, 2020a] i Niemczech (KP238298, KP238297, KP238296, KP238295 i KP238294) [Holz i in., 2016].

W wyniku wirtualnej analizy restrykcyjnej izolatów O1.204, O1.242 i O2.260 uzyskano profil, który wykazał podobieństwo z profilem referencyjnym fitoplazmy o nr. akcesyjnym AY197642 [Lee i in., 2004] (Ryc. 14). Izolaty te były pokrewne z sekwencją referencyjną ‘Ca. *Phytoplasma vitis*’ (nr akcesyjny AF176319) [Bedendo i in., 2000] i zostały zaklasyfikowane do podgrupy 16SrV-C.

Wśród gatunków odłowionych z kukurydzy drugim pod względem liczebności był zgłobik smużkowany *Psammotettix alienus*. Rezaei i in. [2013] w swoich badaniach potwierdzili, że *P. alienus* wraz z *M. laevis*, *Empoasca decipiens* oraz *L. striatellus* są dominującymi gatunkami w kukurydzy oraz pszenicy w Iranie. Obecność *P. alienus* na polach kukurydzy została odnotowana również przez Parizipour i in. [2016]. Według Abt i in. [2018] *P. alienus* dominuje wśród innych osobników z rodzaju *Psammotettix* w uprawach zbóż we Francji i na Słowenii.

Izolat O2.284 uzyskany od *P. alienus* wykazał najwyższe podobieństwo z sekwencją szczepu KVF otrzymaną z barwinka we Francji (nr akcesyjny HQ530150) [Mitrović i in., 2010]. Izolat ten był identyczny w 99,84% z sekwencjami, które pozyskano z komonicy zwyczajnej (nr akcesyjny KX773512) (Girsova i in., 2017) i roślin z rodzaju koniczyna w Rosji (nr akcesyjny KX773505, KX773497) oraz Kanadzie (nr akcesyjny AF222066, AF222065), barwinka w Iranie (nr akcesyjny KC661073), lilaka pospolitego na Litwie (nr akcesyjny HM067755) (Jomantiene i in., 2011), marchwi we Włoszech (nr akcesyjny HM448473) (Mitrović i in., 2010) oraz z owada *Aphrophora alni* odłowionego na obszarze Rosji (nr akcesyjny KP864664) (Girsova i in., 2016). Wirtualny wzór RFLP izolatu O2.284 (Ryc. 15) różnił się od wzorców opisanych wcześniej grup oraz podgrup. Jednak najbardziej podobny był wzorec (Ryc.18) z grupy 16SrI, podgrupy R (nr akcesyjny HM067754) (Jomantiene i in., 2011) ze współczynnikiem podobieństwa równym 0,97. Badana fitoplazma była pokrewna z ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ (nr akcesyjny M30790) (Lim i Sears, 1989) na poziomie 99,3%.

Izolaty O2.284 (*P. alienus*) i W3.05 (kukurydza) zgrupowały się z fitoplazmami należącymi do ‘*Ca. Phytoplasma asteris* (16SrI) (Ryc. 16). Topologia drzewa wykazała, że izolat O2.284 jest blisko spokrewniony z operonem A fitoplazmy fylloidiozy koniczyny (AF222065) i ściśle związany z fitoplazmą zasiedlającą kukurydzę (W3.05). Pozostałe izolaty umiejscowiły się w grupie fitoplazm 16SrV. Izolat O2.260 utworzył dłuższą gałąź z obrębie przedstawicieli podgrupy 16SrV-C oraz 16SrV-D z uwagi na pojedyncze zmiany w sekwencji, które przedstawiono na rysunku 7. Izolaty pochodzące od *Z. scutellaris* O1.204, O1.242 oraz z kukurydzy W4.03, W6.18 umiejscowiły się w obrębie kładu fitoplazm 16SrV-C i 16SrV-D i wraz z fitoplazmą żółtaczkę wiązu posiadają wspólnego przodka.

Do grupy potencjalnych wektorów fitoplazm w uprawie kukurydzy zaklasyfikowano: *Z. scutellaris* i *P. alienus* (Tab. 14). W skoczku kukurydzianym *Z. scutellaris* odłowionym z kukurydzy wykryto fitoplazmę z podgrupy 16SrV-C. Jest to pierwsze doniesienie dotyczące roli tego owada jako potencjalnego wektora podgrupy V-C. Obecność fitoplazmy z grupy 16SrV będącej czynnikiem sprawczym *Flavescence dorée* (FD) w owadach *Z. scutellaris* potwierdzają Lefol i in. [1993]. Jak pokazują badania *Z. scutellaris* może być również nosicielem stołburu wywoływanego przez ‘*Ca. Phytoplasma solani*’, członka podgrupy 16SrXII-A [Fos i in., 1992; Battle i in., 2003; Chuche i in., 2016].

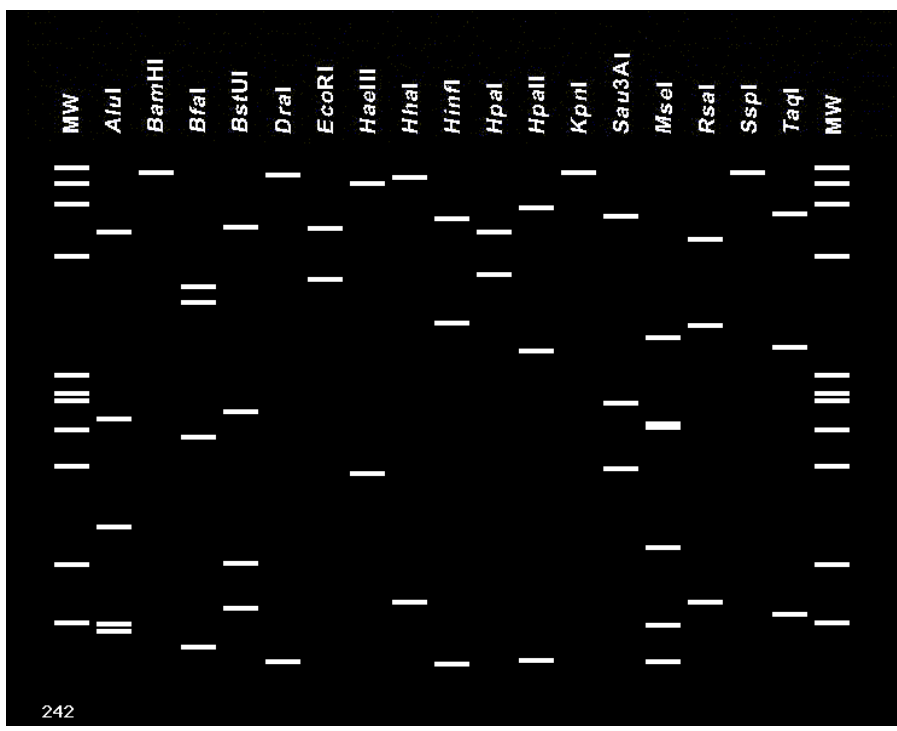
U *P. alienus*, czyli zgłobika smużkowanego wykazano obecność fitoplazmy należącej do ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ podgrupy 16SrI-S. Šafářová i in. [2018] potwierdziła

obecność ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ podgrupy 16SrI-F. W Serbii u *P. alienus* odłowionych z kukurydzy potwierdzono obecność żółtaczk astra z podgrupy 16SrI-C oraz 16SrI-B [Jović i in., 2011; Landi i in., 2013]. Sigalla [2019] wskazała u osobników odłowionych w Szwecji obecność niebieskiej karłowatości pszenicy (WBD). *P. alienus* jest również nosicielem fitoplazmy stołburu (16SrXII-A) w uprawie winorośli, selera marchwi [Fos i in., 1992; Prota i in., 2006; Carraro i in., 2008; Drobnjakovic i in., 2010; Quaglino i in., 2019; Zamharir i in., 2019].

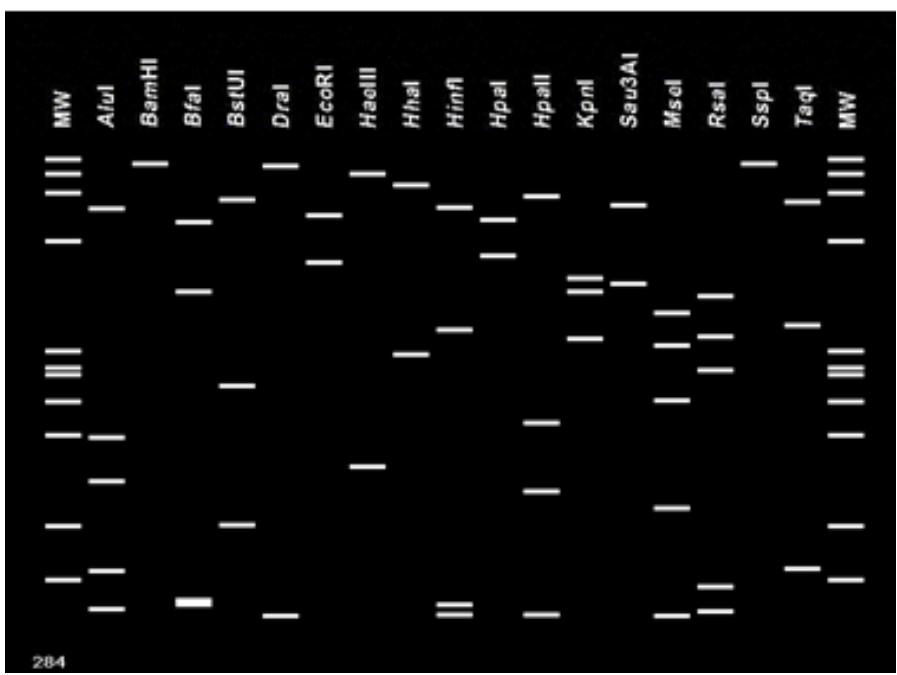
W osobnikach *Z. scutellaris* i *P. alienus* wykryto szczepy, które były podobne do zidentyfikowanych w roślinach kukurydzy (Ryc. 16), co wskazuje, że oba gatunki mogą pełnić rolę wektorów fitoplazm 16SrV-C i 16SrI-S w tej uprawie.

Tab. 13. Klasyfikacja fitoplazm wykrytych w skoczkach odłowionych z kukurydzy

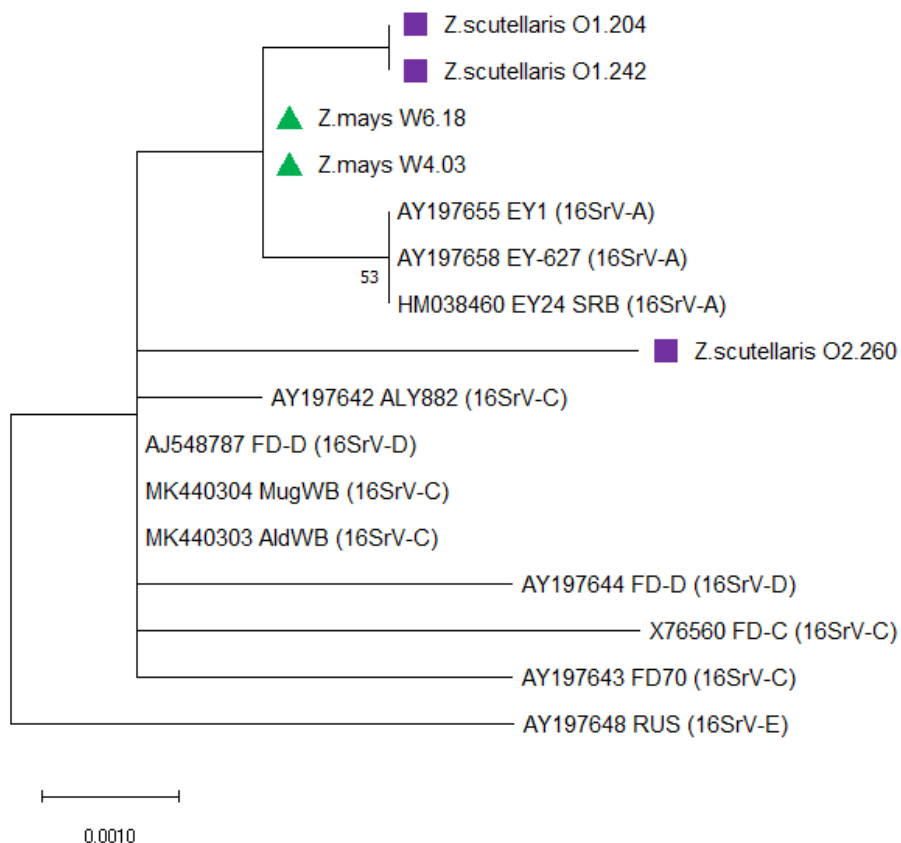
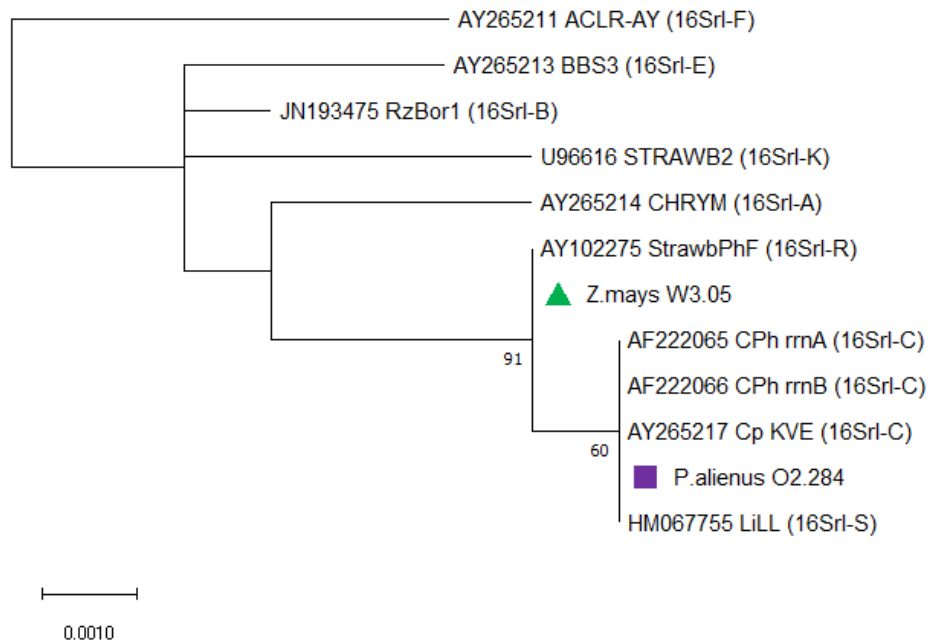
Izolat	Gatunek skoczka	Podgrupa
O1.204	<i>Zyginidia scutellaris</i>	16SrV-C
O1.242		
O2.260		
O2.284	<i>Psammotettix alienus</i>	16SrI-S



Ryc. 14. Profil restrykcyjny izolatu O1.242 reprezentujący podgrupę 16SrV-C.



Ryc. 15. Profil restrykcyjny izolatu O2.284 reprezentujący podgrupę 16SrI-S.



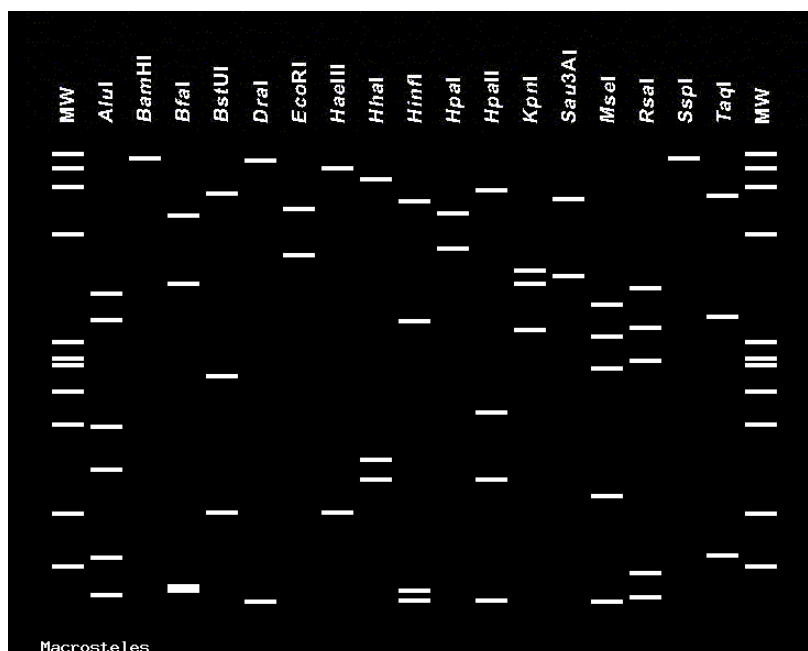
Ryc. 16. Fragmenty drzewa filogenetycznego uwzględniającego sekwencje izolatów uzyskanych od nosicieli fitoplazm w kukurydzy. ▲ oznaczono fitoplazmy zidentyfikowane w owadach odłowionych z kukurydzy, a fitoplazmy zasiedlające rośliny kukurydzy ■

5.4. Ocena zdolności przenoszenia fitoplazm w pszenicy ozimej i kukurydzy

5.4.1. Przez *Macrosteles laevis* (Ribaut)

Przeprowadzona analiza podobieństwa wykazała, że sekwencja izolatu utrzymywanego w kolonii *M. laevis* jest w 100% homologiczna z 26 sekwencjami fitoplazm, które pochodziły m.in. z: szafirku drobnokwiatowego (Węgry; nr akcesyjny MN080271) [Mergenthaler i in., 2020], kukurydzy (Indie; nr akcesyjny KY565572, KY565571) [Rao i in., 2017a], gwiazdnicy pospolitej (Litwa; nr akcesyjny KC623537) [Valiunas i in., 2013], ziemniaka (Indie; nr akcesyjny KC312703; JN191343) [Tiwari i in., 2013], śliwy (Litwa; nr akcesyjny GU289674) i rzepaku (Polska, Francja; kolejno nr akcesyjne HM561990, HM590625) [Zwolińska i in., 2011a; Mitrović i in., 2010].

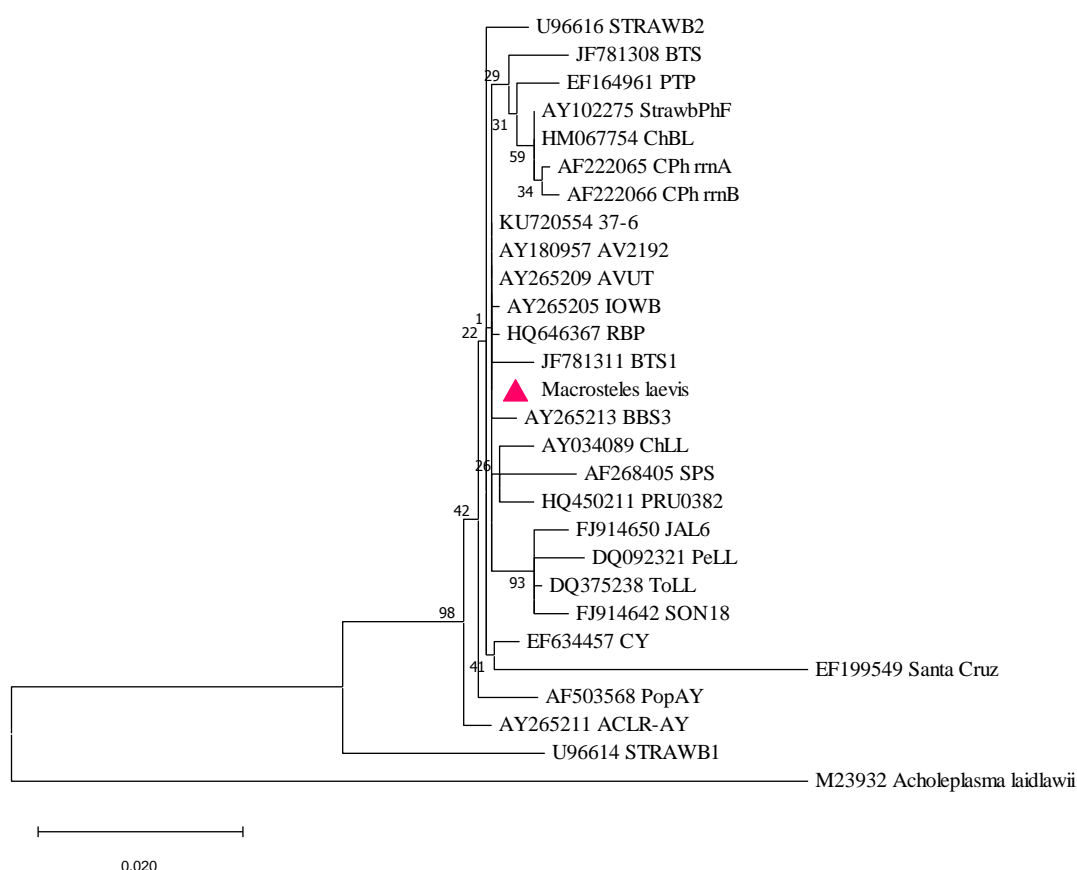
Na podstawie wirtualnej analizy restrykcyjnej (Ryc. 17) izolat został sklasyfikowany jako przedstawiciel podgrupy rybosomalnej 16SrI-B. Sekwencja była identyczna (współczynnik podobieństwa 1.00) ze wzorcem fitoplazmy ‘Onion yellows phytoplasma OY-M’ (nr akcesyjny AP006628) będącej sprawcą żółtaczki cebuli [Oshima i in., 2004]. Wynik ten potwierdza analiza filogenetyczna, która grupuje fitoplazmę wśród przedstawicieli podgrupy 16SrI-B (Ryc. 18).




Ryc. 17. Wirtualny profil restrykcyjny izolatu uzyskanego od *M. laevis*.

Szczep utrzymywany w hodowli *M. laevis* jest identyczny ze szczepem RzW14, odpowiedzialnym za chorobę fyllodiozy rzepaku (rapeseed phyllody) zidentyfikowanym

na rzepaku ozimym przez Zwolińską i in. [2011a]. ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ typu B jest najczęściej notowaną fitoplazmą na terenie Polski [Zwolińska i Borodynko-Filas, 2021]. Dotychczasowe doniesienia potwierdzają obecność tego patogenu nie tylko w rzepaku, ale również u: jeżyny [Cieślińska, 2011a]; leszczyny [Cieślińska i Kowalik, 2011]; brukselki [Kaminska i in., 2012a], kapusty pekińskiej [Kamińska i in., 2012b]; jabłoni [Cieślińska i Kruczyńska, 2014]; jałowca [Krawczyk i in., 2016]; buraka cukrowego [Zwolińska i in., 2016]; kalafiora, łubinu, grochu i gorczycy [Zwolińska i Borodynko-Filas, 2021].



Ryc. 18. Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie fragmentu genu 16S rRNA izolatów z grupy 16SrI. Badany izolat został oznaczony . Drzewo skonstruowano w programie MEGA X, metodą największej wiarygodności.

U 20% testowanych roślin pszenicy odmiany Tytanika (Ryc. 19A) odnotowano jasne przebarwienia występujące wzdłuż zewnętrznej krawędzi liścia (Ryc. 19B). Pojawiły się one w 6 tygodniu od inokulacji. Pozostałe rośliny odmiany Tytanika oraz wszystkie odmiany Hondia nie odróżniały się wyglądem od roślin kontrolnych (Ryc. 19C). U kukurydzy nie zaobserwowano zmian morfologicznych (Ryc. 20).



Ryc. 19. Rośliny pszenicy ozimej w teście infekcyjnym z *M. laevis*: A, B – jasne przebarwienia u odmiany Tytanika; C – rośliny odmiany Hondia.



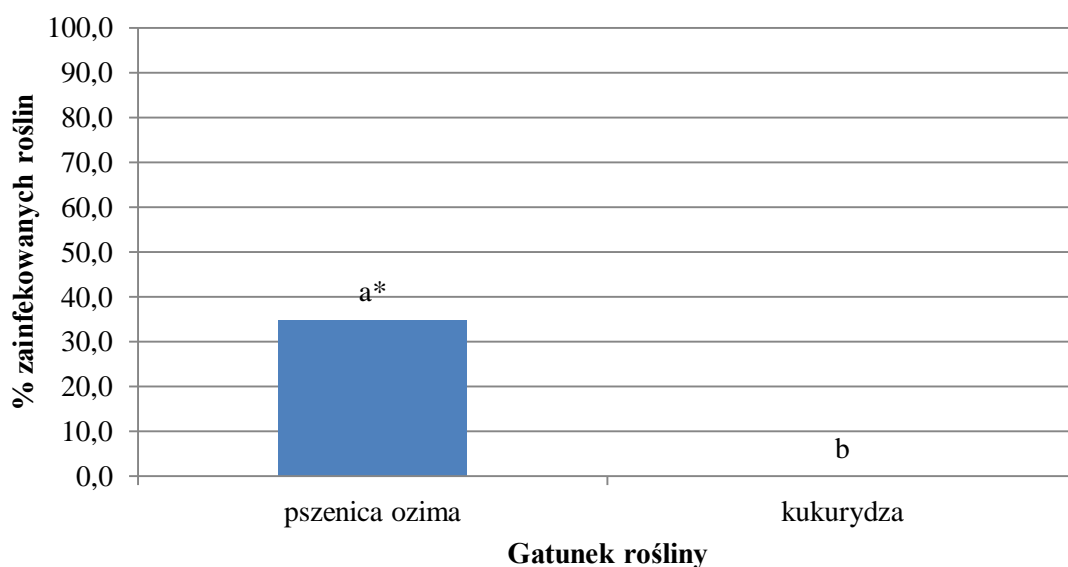
Ryc. 20. Rośliny kukurydzy w teście infekcyjnym z *M. laevis*: A, B – odmiana Popis; C, D – odmiana Pokusa.

Udaną transmisję fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B uzyskano wyłącznie u roślin pszenicy ozimej. Skuteczność przeniesienia czynnika sprawczego przez skoczka sześciorka wyniosła 35% (Wyk. 3). Wcześniejsze dane literaturowe wskazują, że *M. laevis* jest wektorem fitoplazm na licznych gatunkach. Transmisję fitoplazm z grupy 16SrI u astra chińskiego oraz katarantusa różowego potwierdził Heinze i Kunze [1955]. Kochman i Książek [1964] udowodnili doświadczalnie przenoszenie przez *M. laevis* fitoplazmy z cebuli i astra na cebulę oraz z przymiotna kanadyjskiego na katarantusa. W Czechach *M. laevis* przenosił fitoplazmę z podgrup 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII-B oraz grupy 16SrXII [Brčák, 1979]. Gatunek ten jest skutecznym wektorem fitoplazmy stołburu występującej w Turcji w uprawie ziemniaka [Guclu i Ozbek, 1991]. Z kolei Kamińska i Śliwa [2005] odnotowały przeniesienie żółtaczki astra na lilię oraz katarantus. Zwolińska i in. [2017] potwierdzili przenoszenie fitoplazmy fyllodiozy rzepaku 16SrI-B na rośliny katarantusa, bobu oraz jęczmienia, a skuteczność zakażenia zależała od gatunku. W pracach tych nie badano jednak przenoszenia tego patogenu w uprawach pszenicy ozimej i kukurydzy.

Uzyskane wyniki są pierwszym doniesieniem o transmisji fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B przez skoczka sześciorka na rośliny pszenicy ozimej. Z przeprowadzonych badań wynika, że odmiany tego gatunku różnią się podatnością na fitoplazmę 'Ca. Phytoplasma asteris' typu B. Rośliny odmiany Tytanika uległy infekcji w 66,7%, z kolei obecność patogenu u odmiany Hondia odnotowano u 3,3% roślin (Wyk. 4). Otrzymane wyniki mogą potwierdzać, że owady *M. laevis* migrując pomiędzy uprawami rzepaku i pszenicy – upraw o dużym udziale w strukturze zasiewów w Polsce, przenoszą badany patogen. W Polsce obecność fitoplazmy odpowiedzialnej za fyllodiozę rzepaku (Ca. Phytoplasma asteris; 16SrI-B) wykazano w licznych gatunkach chwastów: *Matricaria discoidea*, *M. perforata*, *Sisymbrium officinale*, *Geranium pusillum*, *Papaver rhoeas*, *Echinochloa crus-galli*, *Polygonum aviculare*, co sugeruje, że rośliny te mogą być rezerwuarem lub zielonym mostem pomiędzy rzepakiem i pszenicą, które często występują w rotacji zmianowania [Tiwari i in., 2017; Zwolińska, 2019; Zwolińska i in., 2019].

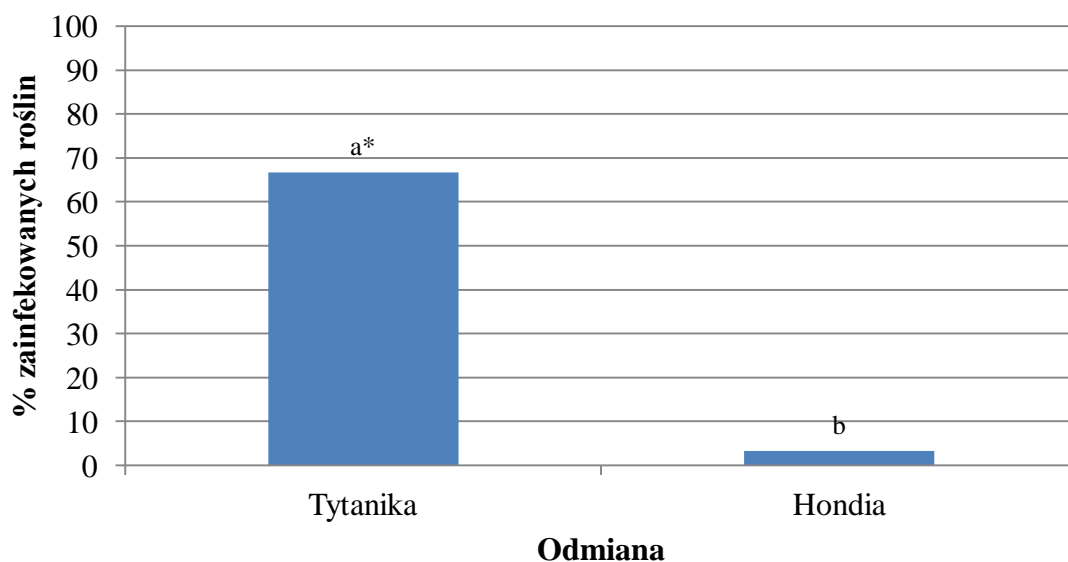
Fitoplazma z podgrupy 16SrI-B wpłynęła stymulująco na wzrost roślin pszenicy odmiany Tytanika. Rośliny zainfekowane były średnio o 0,6 cm wyższe od roślin zdrowych. W przypadku odmiany Hondia bakterie fitoplazmatyczne ograniczały wprawdzie wzrost roślin średnio o 1,5 cm w porównaniu do roślin wolnych od fitoplazm, jednak w tym przypadku rozproszenie cechy było aż tak duże, że występujące różnice nie były statystycznie istotne (Wyk. 5). Stymulacja wzrostu roślin w przypadku infekcji

fitoplazmami może wynikać ze zwiększonej ilości auksyn np. kwasu indolilo-3-octowego [Dermastia, 2019].



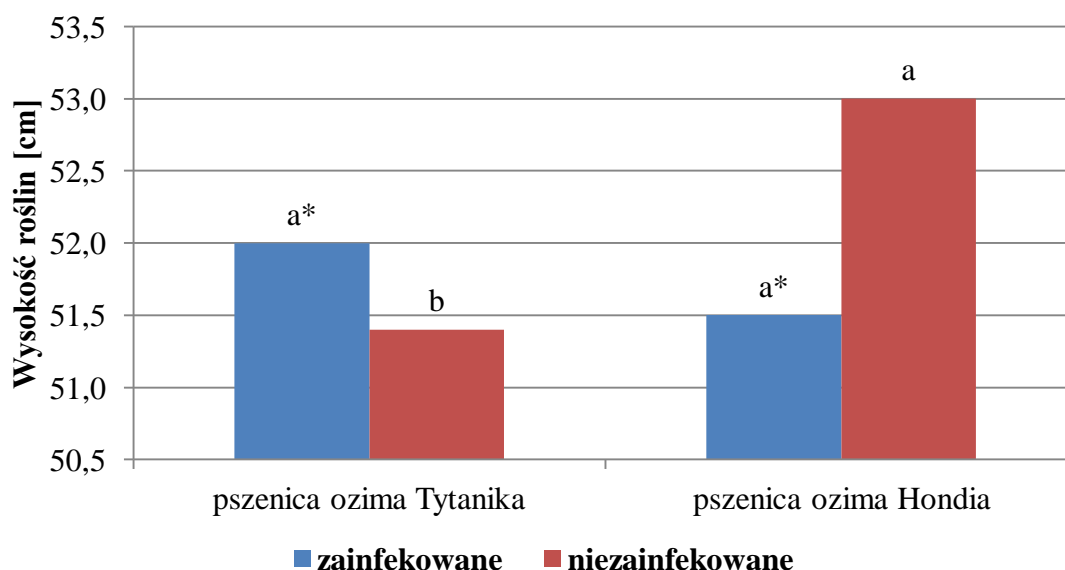
*Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie, Test Tukeya $\alpha \leq 0,05$.

Wyk. 3. Średnia efektywność przenoszenia fitoplazmy przez *M. laevis*



*Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie, Test Tukeya $\alpha \leq 0,05$.

Wyk. 4. Średnia efektywność przenoszenia fitoplazmy przez *M. laevis* wśród odmian pszenicy ozimej



*Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie, Test Tukeya $\alpha \leq 0,05$.

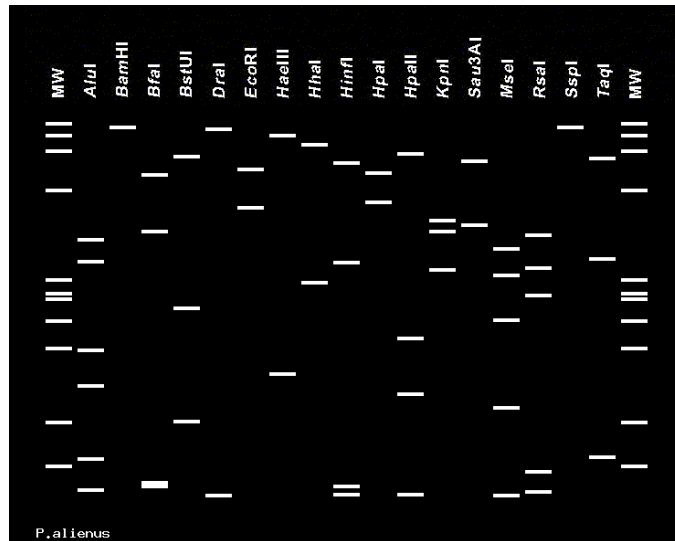
Wyk. 5. Wpływ infekcji fitoplazmy na wysokość roślin

5.4.2. Przez *Psammotettix alienus* (Dahlbom)

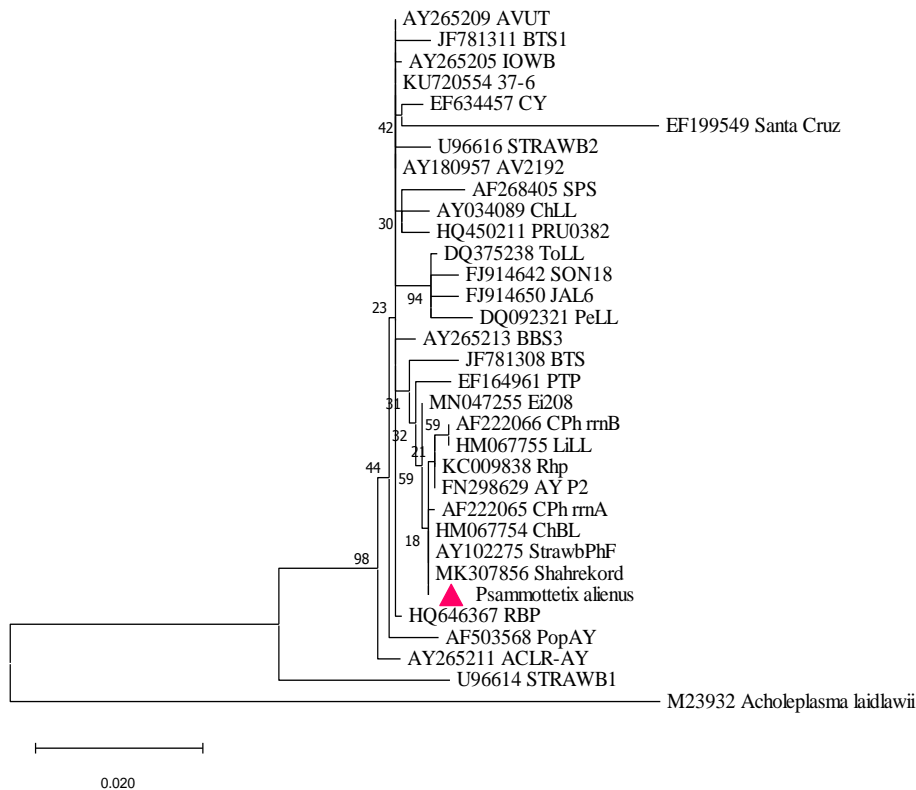
Na podstawie trzech klonów uzyskano sekwencję konsensusową fragmentu genu 16S rRNA o długości 1244 pz. Sekwencja fitoplazmy pochodzącej z hodowli skoczka *P. alienus* w zestawieniu z sekwencjami dostępnymi z bazy GenBank była w 100% podobna do uzyskanej z: izolatu '*Aquilegia* sp.' phyllody phytoplasma infekującej orlika w Iranie (nr akcesyjny MK307856) [Babaei i in., 2021]; izolatów wyosobnionych z roślin koniczyny i komonicy zwyczajnej w Rosji (nr akcesyjny KX773498 i KX773514) [Girsova i in., 2017]; klonu Strawberry phylloid fruit phytoplasma z Egiptu (nr akcesyjny MT757900) [Mokbel i Kheder, 2020]; szczepu Cherry bunchy leaf phytoplasma z Litwy (nr akcesyjny HM067754) [Jomantiene i in., 2011]; fitoplazm wyizolowanych z jeżówki purpurowej (nr akcesyjny EF546778) [Fránová i in., 2009] i porzeczki czerwonej (nr akcesyjny AY669063) w Czechach [Navrátil i in., 2007]; z truskawki w USA (nr akcesyjny AY102275) [Jomantiene i in., 2002], a także z jedną kopią genu 16SrRNA Clover phyllody phytoplasma (rrnA) uzyskanego od skoczka pienik ślinianka na Litwie (nr akcesyjny KC283218) [Ivanauskas i in., 2014].

Zgodnie z przeprowadzoną analizą restrykcyjną sekwencji (1244 pz) izolatu fitoplazmy uzyskanego z owada *P. alienus* wygenerowany profil restrykcyjny (Ryc. 21) był identyczny (współczynnik podobieństwa 1.00) z wzorcem referencyjnym należącym do litewskiego szczepu fitoplazmy z podgrupy 16SrI-R, który odpowiedzialny jest za chorobę

wiśni (Cherry bunchy leaf phytoplasma; nr akcesyjny HM067754) [Jomantiene i in., 2011] oraz szczepu z podgrupy I-C wywołującego fyllodiozę koniczyny (Clover phyllody phytoplasma, nr akcesyjny AF222065). Badany izolat fitoplazmy grupował się z innymi reprezentantami podgrupy 16SrI-R (Ryc. 22).



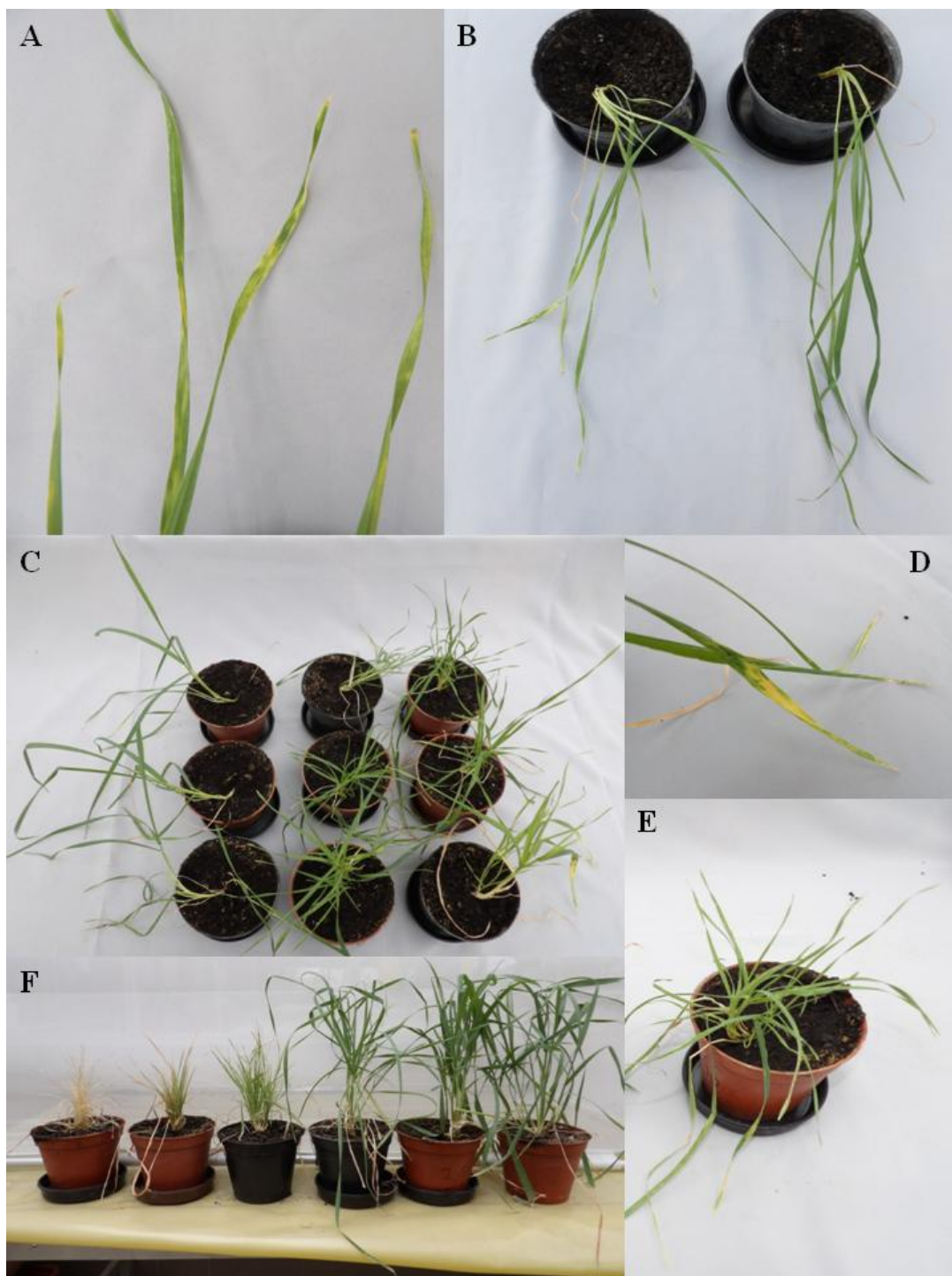
Ryc. 21. Wirtualny profil restrykcyjny izolatu uzyskanego od *P. alienus*.



Ryc. 22. Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie fragmentu genu 16S rRNA izolatów z grupy 16SrI. Badany izolat został oznaczony ▲. Dendrogram skonstruowano w programie MEGA X metodą największej wiarygodności.

U pszenicy ozimej odmiany Tytanika pierwsze objawy w postaci drobnych, żółtych plam pojawiły się po 5 tygodniach od inokulacji (Ryc. 23A). Zmiany te były rozproszone po całej powierzchni liści u 70% roślin. U odmiany Hondia pierwsze objawy w postaci żółtych plam, przypominających mozaikowatość zaobserwowano w 6 tygodniu od inokulacji (Ryc. 23D). Dodatkowo rośliny te wykazywały nadmierne krzewienie, zdrobnienie liści oraz karłowatość, zaczęły zamierać w 10 tygodniu po inokulacji (Ryc. 23C, 23E i 23F). Objawy występowały u 90% roślin.

Pierwsze objawy chorobowe na kukurydzy pojawiły się w 9 tygodniu od inokulacji i wystąpiły niezależnie od testowanej odmiany. Pojedyncze rośliny wykazywały zahamowany wzrost w porównaniu z próbą kontrolną (Ryc. 24). Po 13 tygodniach od inokulacji pojawiły się chlorotyczne przebarwienia na szczytowych liściach roślin (Ryc. 24A i 24E), w przestrzeni pomiędzy nerwami pojawiła się chloroza, tworząc tzw. "pasiastość" liści (Ryc. 24D). Zaobserwowano również silne skrócenie międzywęźli (Ryc. 24C). Objawy wystąpiły u ok. 6% roślin odmiany Popis i 30% odmiany Pokusa.



Ryc. 23. Rośliny pszenicy w teście infekcyjnym z *P. alienus*: odmiana Tytanika - żółknięcia liści (A); porównanie rośliny zainfekowanej (po lewej) i niezainfekowanej (po prawej) (B); odmiana Hondia – porównanie roślin niezainfekowanych po 6 tygodniach od inokulacji (po lewej) i zainfekowanych (środek i po prawej) (C); odmiana Hondia - żółknięcie liści (D); odmiana Hondia - nadmierne krzewienie (E); odmiana Hondia - zamieranie zainfekowanych roślin po 10 tygodniach od inokulacji (po lewej) i rośliny niezainfekowane (po prawej) (F).



Ryc. 24. Rośliny kukurydzy w teście infekcyjnym z *P. alienus*: chloroza górnych liści na odmianie Popis (A); rośliny zainfekowane (po lewej) i niezainfekowane (po prawej) (B); skrócone międzywęźla (C); przebarwienia liści (po lewej 3 liście pochodzą od zainfekowanych roślin, jeden liść po prawej liść od niezainfekowanej kukurydzy) (D); przebarwienia liści widoczne na odmianie Pokusa (E).

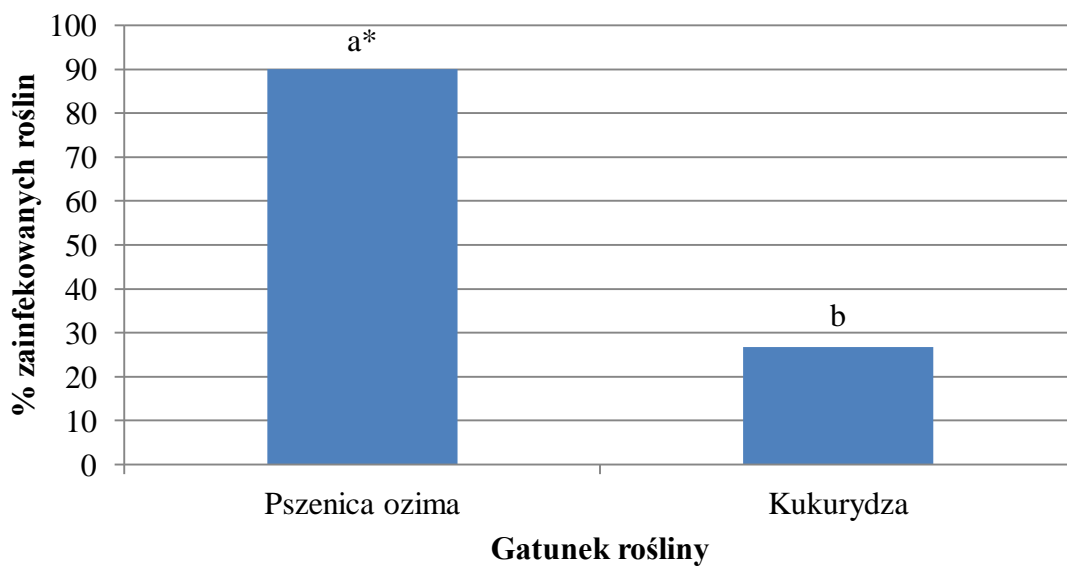
W literaturze informacje na temat udziału *P. alienus* w przenoszeniu fitoplazm są ograniczone. Landi i in. [2013] wykazali, że osobniki tego gatunku wprowadziły do sztucznej pożywki komórki fitoplazmy odpowiedzialne za żółtaczkę astra (16SrI-B). Natomiast Zwolińska i in. [2017] nie udowodnili nabywania oraz transmisji 'Ca. Phytoplasma asteris' z podgrupy 16SrI-B w uprawie rzepaku ozimego i jęczmienia. Dobrze znanym wektorem fitoplazmy WBD jest z kolei *P. striatus* [Wu i in., 2010]. Wykonane eksperymenty potwierdziły zdolność przenoszenia niebieskiej karłowatości pszenicy (WBD), fitoplazmy z podgrupy 16SrI-R przez *P. alienus* w pszenicy ozimej oraz kukurydzy. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że wyłącznie grupa owadów z rodzaju *Psammodettix* jest zdolna do transmisji groźnej dla upraw zbożowych fitoplazmy. Gatunek zglobik smużkowany (*P. alienus*) jest znanym i skutecznym wektorem wirusa karłowatości pszenicy (WDV) w zbożach [Manurung i in., 2004; Zhang i in., 2010; Trzmiel i Klejdysz, 2018].

Ponadto w uprawie pszenicy może dochodzić do zjawiska mieszanej infekcji wirusem WDV oraz fitoplazmą [Tao i in., 2012]. Fakt ten potwierdziły również badania własne. W związku z powyższym diagnoza oparta jedynie na objawach chorobowych nie musi wskazywać na jednostkę chorobową.

Efektywność przenoszenia fitoplazmy z podgrupy 16SrI-R przez *P. alienus* zależała od gatunku rośliny i genotypu odmiany (Wyk. 6 i 7). Patogen był z większą skutecznością przenoszony na *T. aestivum* (90,0%). U kukurydzy średnia efektywność przenoszenia wynosiła 26,7%. W przypadku pszenicy ozimej *P. alienus* z wyższą efektywnością przenosił bakterie fitoplazmatyczne na odmianę Hondia (96,7%). Istotnie słabiej zakażał odmianę Tytanika (83,3%). Średnia efektywność przenoszenia na kukurydzę odmiany Pokusa wynosiła 46,7% i była o 40 punktów % większa w porównaniu do odmiany Popis. Rozwój fitoplazmy żółtaczkę astra reprezentującej podgrupę 16SrI-R miał wpływ na wysokość roślin pszenicy ozimej (Wyk. 8). Skrócenie długości pędu w przypadku roślin odmiany Hondia wynosiło 27,3%, a u odmiany Tytanika było to 26,1%. Natomiast u kukurydzy obecność patogenu nie wpłynęła znacząco na ograniczenie jej wzrostu.

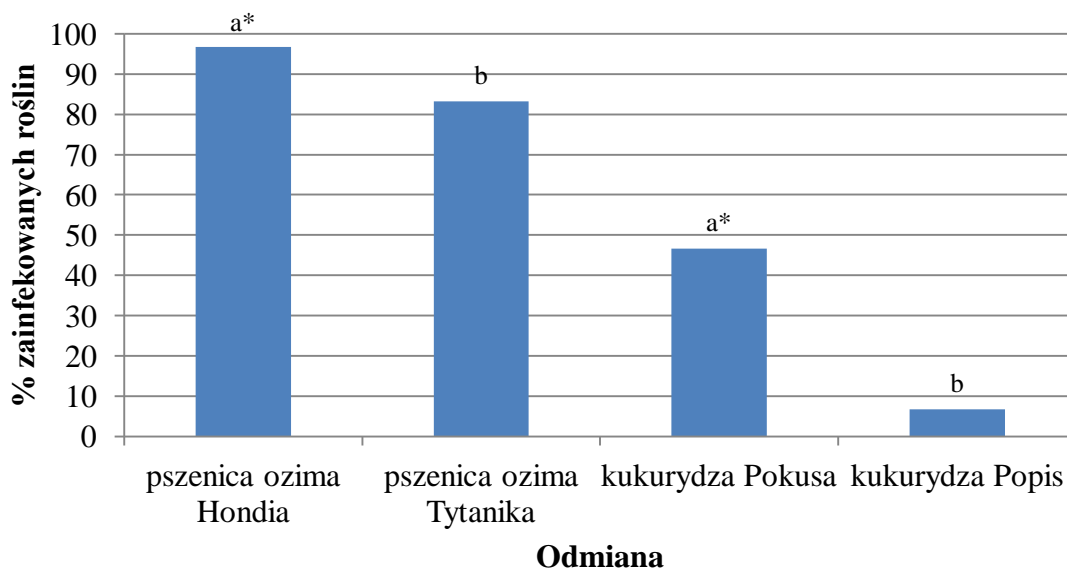
Wpływ genotypu na powstałe objawy w wyniku infekcji MBSP u kukurydzy potwierdzili Orlovskis i in. [2017]. Dodatkowo objawy powstałe u roślin mogą być zależne od szczepu fitoplazmy. W literaturze nie znaleziono informacji dotyczących wpływu fitoplazm na zmiany w pokroju roślin pszenicy w zależności od genotypu odmian. Wpływ genotypu na stopień porażenia przez fitoplazmy zaobserwowano u innych gatunków np.: winorośli. Odmiana Chardonnay uznawana jest za bardziej wrażliwą na *Grapevine*

flavescence dorée phytoplasma należąca do grupy żółtaczk wiązu (16SrV) niż odmiana Merlot [Boudon-Padieu, 1996; Sandrine i in., 2012].



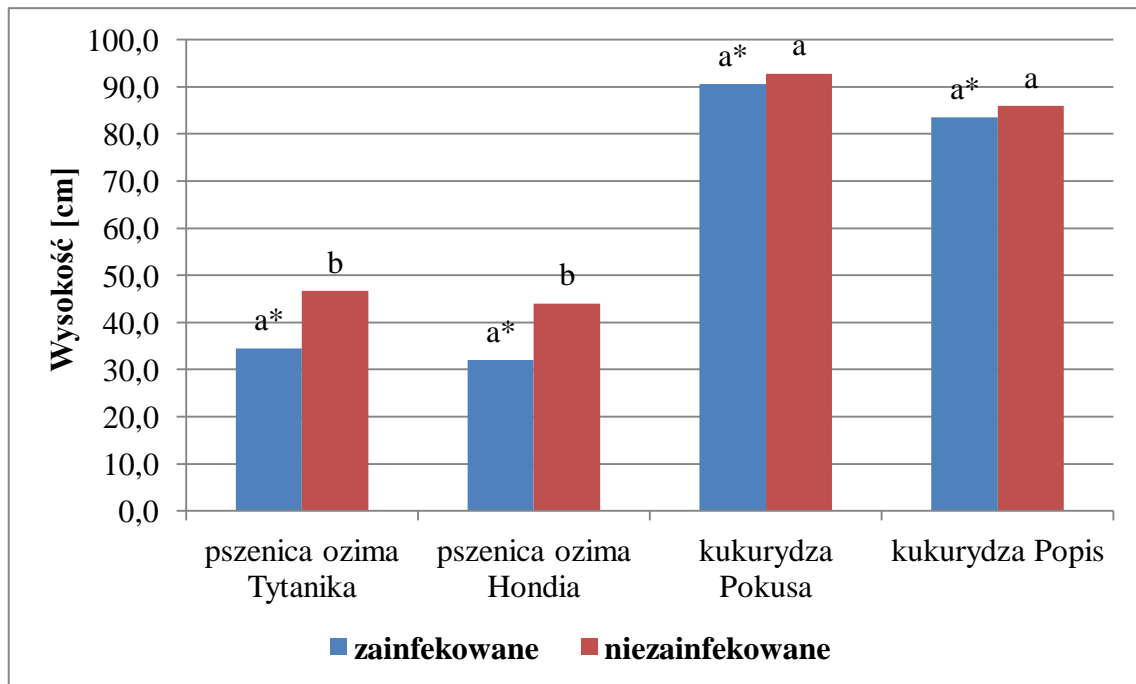
*Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie, Test Tukeya $\alpha \leq 0,05$.

Wyk. 6. Efektywność przenoszenia fitoplazmy przez *P. alienus*



*Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie, Test Tukeya $\alpha \leq 0,05$.

Wyk. 7. Efektywność przenoszenia fitoplazmy przez *P. alienus* wśród odmian



*Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie, Test Tukeya $\alpha \leq 0,05$.

Wyk. 8. Wpływ infekcji fitoplazmy na wysokość roślin

W uprawie polowej pszenicy ozimej i kukurydzy wykryto stosunkowo niewiele roślin, w których obecne były fitoplazmy (2% roślin). Odmienne wyniki uzyskano w eksperymentach wykonanych w warunkach kontrolowanych, w szklarni przy udziale *M. laevis* i *P. alienus*, gdzie porażenie fitoplazmami odnotowano u 35% (*M. laevis*) i 90% (*P. alienus*) roślin pszenicy ozimej. Z kolei, *M. laevis* nie przenosił patogenu na kukurydzę, zaś *P. alienus* przeniósł bakterie na 26,7% roślin. Niska skala porażenia roślin w warunkach naturalnych przez fitoplazmy może wynikać ze ścisłych preferencji pokarmowych poszczególnych gatunków owadów. Podczas hodowli na jednym gatunku rośliny owady nie korzystają z bioróżnorodności występującej w miejscu ich naturalnego bytowania [Alma i in., 2001; Zwolińska i in., 2017].

5. WNIOSKI

1. Pszenica ozima i kukurydza są roślinami żywicielskimi dla fitoplazm na terenie Polski.
2. Identyfikacja fitoplazm z podgrupy 16SrI-R i 16SrI-S potwierdziła po raz pierwszy w Europie obecność Wheat blue dwarf (WBD) groźnej dla pszenicy ozimej choroby.
3. Kukurydza może być infekowana przez dotychczas nie notowane na terenie Polski u roślin uprawnych fitoplazmy z podgrupy 16SrI-R oraz 16SrV-C.
4. Potencjalnym wektorem fitoplazm zidentyfikowanych w pszenicy jest *Euscelis incisus*.
5. *Zyginidia scutellaris* (Herrich-Schaeffer) jest potencjalnym wektorem fitoplazm i może stanowić zagrożenie dla upraw kukurydzy.
6. *Macrosteles laevis* (Ribaut) jest wektorem fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B w pszenicy ozimej.
7. Zdolność transmisji fitoplazmy 16SrI-R w uprawie pszenicy i kukurydzy potwierdza rolę *Psammotettix alienus* (Dahlbon) jako nowego wektora.
8. Rozwój chorób fitoplazmatycznych zależy od gatunku rośliny żywicielskiej oraz odmiany.
9. Choroby fitoplazmatyczne na pszenicy ozimej i kukurydzy mogą mieć przebieg latentny.

STRESZCZENIE

Fitoplazmy to fitopatogeniczne bakterie zagrażające wielu gatunkom roślin. Mają zdolność namnażania w roślinach i owadach. Celem przeprowadzonych badań była ocena zagrożenia ze strony fitoplazm w uprawie pszenicy ozimej i kukurydzy oraz wskazanie potencjalnych wektorów tych patogenów. Badania wykonano w latach 2018-2019 w rejonie południowo-zachodniej Polski. Materiał badawczy stanowiły tkanki pszenicy ozimej i kukurydzy oraz owady odłowione z upraw tych gatunków roślin. Ponadto oceniono potencjał przenoszenia fitoplazm żółtaczkii astra (*Candidatus Phytoplasma asteris*) przez najliczniej występujące skoczki w uprawie zbóż w Polsce. Wykrywanie fitoplazm wykonano za pomocą reakcji PCR stosując specyficzne startery, a uzyskane produkty zsekwencjonowano. W oparciu o analizę restrykcyjną genu kodującego 16S rRNA zidentyfikowano 3 podgrupy rybosomalne fitoplazm w uprawie pszenicy i kukurydzy. Zebrane owady zidentyfikowano do 16 gatunków i 2 rodzajów z rzędu Hemiptera. Wśród nich grupę potencjalnych wektorów fitoplazm w uprawie pszenicy stanowiło 7 gatunków. Natomiast u owadów odłowionych z kukurydzy obecność patogenu potwierdzono u 2 gatunków. Praca dostarcza dowodów, że *M. laevis* i *P. alienus* są nowymi wektorami fitoplazm zagrażającymi uprawie pszenicy i kukurydzy. Jest to pierwsza kompleksowa praca dotycząca chorób fitoplazmatycznych pszenicy ozimej i kukurydzy.

Słowa kluczowe: fitoplazma, pszenica, kukurydza, wektor, transmisja fitoplazm

ABSTRACT

Phytoplasmas are phytopathogenic bacteria threatening many plant species. They have ability to multiply in plants and insects. The main aim of the research was threat assessment from the phytoplasmas in wheat and maize crops, and to identify potential vectors of phytoplasma. The research was conducted in 2018-2019, in southwestern Poland. Research material constituted tissues of wheat and maize, and insects harvested from this crops. Furthermore, was assessed ability to transmit aster yellows phytoplasmas ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') by most numerous leafhoppers in cereals. Pathogen was detected by PCR with specific primers, and products obtained have been sequenced. Based on restriction analysis 16S rRNA gene, phytoplasmas from wheat and maize were classified into 3 ribosomal subgroup. Insects were identified to 16 species and 2 genus (Hemiptera). Group of potential vectors of phytoplasma in wheat were represented by 7 species. However, in insects from maize crop pathogen was present in 2 species. Thesis provides evidence that *M. laevis* and *P. alienus* are new vector phytoplasmas in wheat and maize crop in the world. This is the first comprehensive study devoted to phytoplasma diseases in wheat and maize.

Keyword: phytoplasma, wheat, maize, vector, phytoplasma transmission

LITERATURA

1. Abt I., Derlink M., Mabon R., Virant-Doberlet M., Jacquot E. (2018). Integrating multiple criteria for the characterization of *Psammotettix* populations in European cereal fields. *Bulletin of Entomological Research*, 108(2), 185–202. <https://doi.org/10.1017/S0007485317000669>
2. Acs Z., Jović J., Ember I., Cvrković T., Nagy Z., Talaber C., Gergely L., Toševski I., Kölber M. (2011). First report of maize redness disease in Hungary. *Bulletin of Insectology*, 64, 229–230.
3. Ahrens U., Seemüller E. (1992). Detection of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82, 828–832.
4. Alma A., Palermo S., Boccardo G., Conti M. (2001). Transmission of Chrysanthemum Yellows, a subgroup 16SrI-B phytoplasma, to grapevine by four leafhopper species. *Journal of Plant Pathology* 83(3), 181–187.
5. Alminaitė A., Davis R.E., Valiunas D., Jomantiene R. (2002). First Report of a Group 16SrI, Subgroup B, Phytoplasma in Diseased *Epilobium hirsutum* in the Region of Tallin, Estonia. *Plant Disease*, 86(10), 1177. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.10.1177A>
6. Alvarez E., Mejía J., Contaldo N., Paltrinieri S., Duduk B., Bertaccini A. (2014). ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ strains associated with Oil Palm Lethal Wilt in Colombia. *Plant Disease*, 98(3), 311–318. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1182-RE>
7. Alves M.S., de Souza A.N., Ribeiro G.M., Carvalho C.M. (2018). First report of a ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ isolate associated with *Macroptilium lathyroides* yellow leaf disease in Brazil. *New Disease Reports*, 37, 11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01231.x>
8. Alves M.S., Ribeiro G.M., Souza A.N., Carvalho C.M. (2017). First report of a phytoplasma associated with witches’ broom symptoms in *Waltheria indica* in Brazil. *New Disease Reports*, 35(1), 28. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.035.028>
9. Andersen M., Beever R., Gilman A., Liefting L., Balmori E., Beck D., Sutherland P., Bryan G., Gardner R., Forster R. (1998). Detection of phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. *Plant Pathology*, 47, 188–196.
10. Andrade N.M., Arismendi N.L. (2013). DAPI Staining and Fluorescence

- Microscopy Techniques for Phytoplasmas. *Methods in Molecular Biology*, 938, 115–121. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-89-2_10
11. Ardanuy A., Albajes R., Turlings T. (2016). Innate and Learned Prey-Searching Behavior in a Generalist Predator. *Journal of Chemical Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0716-9>
 12. Arratia-Castro A., Santos-Cervantes M., Fernández-Herrera E., Chávez-Medina J., Flores-Zamora G., Camacho-Beltrán E., Méndez-Lozano J., Leyva-López N. (2014). Occurrence of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection*, 62, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>
 13. Babaei G., Esmailzadeh-Hosseini S.A., Davoodi S., Bertaccini A. (2021). Occurrence and molecular characterization of a 16SrI-R subgroup phytoplasma associated with *Aquilegia vulgaris* phyllody disease. *Journal of Plant Protection Research*, 61(3).
 14. Back C., Chung H., Jung H-Y. (2010). First report of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' associated with yellowing and rosetting of Japanese spurge in Korea. *Journal of General Plant Pathology*, 76(5), 355–357. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0253-2>
 15. Bai X., Correa V.R., Toruño T.Y., Ammar E., Kamoun S., Hogenhout S. (2009). AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(1), 18–30. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0018>
 16. Battle A., Altabella N., Sabate J., Lavina A. (2008). Study of the transmission of stolbur phytoplasma to different crop species by *Macrostelus quadripunctulatus*. *Annals of Applied Biology*, 152, 235–242. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2007.00210.x>
 17. Bedendo I., Davis R., Dally E. (1997). Molecular evidence for the presence of Maize Bushy Stunt phytoplasma in corn in Brazil. *Plant Disease*, 81(8), 957. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.8.957C>
 18. Bedendo I., Davis R., Dally E. (2000). Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. *International Journal of Pest Management*, 46(1), 73–76. <https://doi.org/10.1080/096708700227606>
 19. Bertaccini A., Arzone A., Alma A., Bosco D., Vibio M. (1993). Detection of mycoplasma-like organisms in *Scaphoideus titanus* Ball reared on “flavescence dorée” infected grapevine by dot hybridizations using DNA probes. *Phytopathologia Mediterranea*, 32, 20–24.
 20. Bertaccini A., Duduk B., Paltrinieri S., Contaldo N. (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. (5), 1763–1788.

21. Bertaccini A., Duduk B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: A review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 355–378. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3300
22. Boberg J.M. (2009). Aster yellows- ja X-disease- fytoplasmoja s. 61.
23. Botti S., Bertaccini A. (2006). Phytoplasma infection through seed transmission: further observations. *16th International Congress of the IOM, Cambridge, United Kingdom*, 76, 113.
24. Boudon-Padiou E., Larrue J., Caudwell A. (1989). ELISA and dot blot detection of “flavescence dorée” MLO in individual leafhopper vector during latency and inoculative state. *Current Microbiology*, 19, 357–364.
25. Brčák J. (1979). Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. In Maramorosch K., Harris K. (Ed.), *Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents* (Academic P., ss. 97–146).
26. Bulgari D., Casati P., Faoro F. (2011). Fluorescence in situ hybridization for phytoplasma and endophytic bacteria localization in plant tissues. *Journal of Microbiological Methods*, 87(2), 220–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.08.001>
27. Bunalski M., Hałaj R., Klejdysz T., Osiadacz B. (2020). Zwierzęta - bezkręgowce. Owady: Pluskwiki - Hemiptera. In Buchholz L., Józwiak M., Reklewski J., Szczepaniak P. (Ed.), *Świętokrzyski Park Narodowy – Przyroda i Człowiek* (ss. 361–365).
28. Çağlar B.K., Şimşek E., Dikilitas M., Bertaccini A. (2021). Characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ associated with a maize leaf reddening disease in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 169, 658-666.
29. Calari A., Contaldo N., Ardizzi S., Bertaccini A. (2010). Phytoplasma detection in corn with reddening in Italy. *Current Status and Perspectives of Phytoplasma Disease Research and Management. Eds Bertaccini A, Laviña A, Torres E. Sitges, Spain*, 5.
30. Carraro L., Ferrini F., Martini M., Ermacora P., Loi N. (2008). A serious epidemic of stolbur on celery. *Journal of Plant Pathology*, 90(1), 131–135.
31. Chapman G., Buerkle E., Barrows E., Davis R.E., Dally E. (2001). A light and transmission electron microscope study of a black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), affected by witches’ broom and classification of the associated phytoplasma. *Journal of Phytopathology*, 149, 589–597.
32. Chen K.H., Guo J.R., Wu X.J., Loi N., Carraro L., Guo H.J., Chen Y.D., Osler R., Pearson R., Chen T.A. (1994). Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and

- PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology*, 83, 915–922.
33. Chen W., Li Y., Wang Q., Wang N., Wu Y. (2014). Comparative genome analysis of wheat blue dwarf phytoplasma, an obligate pathogen that causes wheat blue dwarf disease in China. *PLoS ONE*, 9(5), 1–11. <https://doi.org/http://doi.org/10.1371/journal.pone.0096436>
34. Chiykowski L.N. (1991). Vector-pathogen-host plant relationships of clover phyllody mycoplasma-like organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13(1), 11–18.
35. Cho S-T., Kung H-J., Huang W., Hogenhout S.A., Kuo C-H. (2020). Species Boundaries and Molecular Markers for the Classification of 16SrI Phytoplasmas Inferred by Genome Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01531>
36. Christensen N.M., Axelsen K.B., Nicolaisen M., Schulz A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 11(10), 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.008>
37. Chuche J., Danet J.L, Salar P., Foissac X., Thiéry D. (2016). Transmission of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ by *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of Applied Biology*, 169(2), 214–223. <https://doi.org/10.1111/aab.12291>
38. Ciccotti A.M., Bianchedi P.L., Bragagna P., Deromedi M., Filippi M., Forno F., Mattedi L. (2008). Natural and experimental transmission of *Candidatus Phytoplasma mali* by root bridges. *Acta Horticulturae*, 781, 459–464. <https://doi.org/DOI:10.17660/ActaHortic.2008.781.66>
39. Cieślińska M., Komorowska B., Stankiene J. (2006). Occurrence and identification of aster yellows related phytoplasma in strawberry in Poland and Lithuania. *Acta Horticulturae*, 708, 141–146.
40. Cieślińska M., Kowalik B. (2011). Detection and molecular characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ in European Hazel (*Corylus avellana*) in Poland. *Journal of Phytopathology*, 159(9), 585–588. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01807.x>
41. Cieślińska M., Kruczyńska D.E. (2014). Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting apple trees in Poland. *Horticultural Science*, 41(1), 27–33. <https://doi.org/10.17221/181/2013-hortsci>
42. Cieślińska M., Morgaś H., Jakubowski T. (2004). Phytoplasma diseases of stone fruit trees in Poland. *Acta Horticulturae*, 657, 523–526. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.657.85>

43. Cieślińska M. (2001). Preliminary results on detection of phytoplasmas associated with small fruit diseases in Poland. *Acta Horticulturae*, 87–92. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.551.14>
44. Cieślińska M. (2011a). Detection and characterization of phytoplasmas associated with diseases of *Rubus* spp. in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 51–56. <https://doi.org/10.1400/169643>
45. Cieślińska M. (2011b). Less common phytoplasmas infecting stone fruit trees. *Journal of Plant Protection Research*, 51(4), 435–440. <https://doi.org/10.2478/v10045-011-0072-2>
46. Coetzee B., Douglas-Smit N., Maree H.J., Burger J.T., Kruger K., Pietersen G. (2019). Draft Genome Sequence of a '*Candidatus* Phytoplasma asteris'- Related Strain (Aster Yellows, Subgroup 16SrI-B) from South Africa. *Microbiology Resource Announcements*, 8(17), e00148-19.
47. De Jonghe K., De Roo I., Maes M. (2017). Fast and sensitive on-site isothermal assay (LAMP) for diagnosis and detection of three fruit tree phytoplasmas. *European Journal of Plant Pathology*, 147, 749–759. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10658-016-1039-y>
48. De Jonghe K., Deeren A.M., Goedefroit T., Ronse A. (2019). First Report of '*Candidatus* Phytoplasma ulmi' on Elm in Belgium. *Plant Disease*, 103(7), 1763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2271-PDN>
49. De Oliveira E., Santos J., Magalhães P., Cruz I. (2007). Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 229–230.
50. Deng S., Hiruki C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53–61. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90007-D](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90007-D)
51. Dermastia M. (2019). Plant hormones in phytoplasma infected plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00477>
52. Doi M., Tetranaka M., Yora K., Asuyama H. (1967). Mycoplasma or PLT- group like organism found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellow, or paulownias witches' broom. *Annals Phytopathological Society of Japan*, 33, 259–266.
53. Donkersley P., Silva, F., Alves M., Carvalho C., Al-Sadi A., Elliot S. (2019). Asymptomatic Phytoplasma Reveal a Novel and Troublesome Infection. *Plant Diseases* -

Current Threats and Management Trends. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86650>

54. Drobnjakovic T., Peric P., Marcic D., Picciau L., Alma A., Mitrovic J., Duduk B., Bertaccini A. (2010). Leafhoppers and cixiids in phytoplasma-infected carrot fields: Species composition and potential phytoplasma vectors. *Pesticidi i Fitomedicina*, 25(4), 311–318. <https://doi.org/10.2298/PIF1004311D>
55. Duduk B., Bertaccini A. (2006). Corn with symptoms of reddening: New host of stolbur phytoplasma. *Plant Disease*, 90(10), 1313–1319. <https://doi.org/http://doi.org/10.1094/PD-90-1313>
56. Duduk B., Bertaccini A. (2011). Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.1.001>
57. Ebbert M., Nault L. (2001). Survival in Dalbulus leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 100(3), 311–324.
58. El-Wakeil N., Kurth L., Abdel-Moniem A., Volkmar C. (2014). Identification and Field study on diversity of leafhoppers in winter wheat and barley in central Germany. *Mitteilungen Der Deutschen Gesellschaft Für Allgemeine Und Angewandte Entomologie*, 19(September), 105–111.
59. Fos A., Danet J.L., Zreik L., Garnier M., Bove J.M. (1992). Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasmalike organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease*, 76, 1092–1096.
60. Fránová J., Přibylová J., Petrzik K. (2009). Purple coneflower with reddening and phyllody: A new host of clover phyllody phytoplasma. *European Journal of Plant Pathology*, 123(1), 85–90. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9320-3>
61. Galvão S.R., Sabato E.O., Bedendo I.P. (2021). Occurrence and distribution of single or mixed infection of phytoplasma and Spiroplasma causing corn stunting in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 46(2), 152–155. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00381-6>
62. Genov N., Mitrović J., Genov M., Duduk B. (2014). First report of corn reddening caused by ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ in Bulgaria. *Plant Disease*, 98(7), 991–991. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1220-PDN>
63. Gholami J., Bahar M., Talebi M. (2020). Simultaneous Detection and Direct Identification of Phytoplasmas in the Aster Yellows (16SrI), Clover Proliferation (16SrVI) and Stolbur (16SrXII) Groups Using a Multiplex Nested PCR Assay in Potato Plants. *Potato Research*, 63, 403–415.

64. Gibb K.S., Padovan A.C., Mogen B.D. (1995). Studies on Sweet-Potato Little-Leaf Phytoplasma Detected in Sweet-Potato and Other Plant-Species Growing in Northern Australia. *Phytopathology*, 85, 169–174.
65. Girsova N., Bottner-Parker K., Bogoutdinov D., Kastalyeva T., Meshkov Y., Mozhaeva K., Lee I.M. (2017). Diverse phytoplasmas associated with leguminous crops in Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 149(3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1209-6>
66. Girsova N., Bottner-Parker K., Bogoutdinov D., Meshkov Y., Mozhaeva K., Kastalyeva T., Lee I. (2016). Diverse phytoplasmas associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia. *European Journal of Forest Pathology*, 145, 139–153. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0824-3>
67. Goodwin P., Xue B., Kuske C., Sears M. (1994). Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Annals of Applied Biology*, 24, 27–36.
68. Guclu S., Ozbek H. (1991). Studies on the vectors of MLOs caused stolbur disease of potatoes in Erzurum. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22, 35–42.
69. Gundersen D., Lee I. (1996). Ultrasensitive by nested-PCR assays detection of phytoplasmas using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35(3), 144–151. <https://doi.org/157.182.150.22>
70. Han S., Lee G., Seralathan K. (2021). First report of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ (16SrI-B) causing witches’-broom disease of *Boehmeria pinnata* Nakai & Satake in Korea. *Journal of Plant Pathology*, 103(3), 1049–1050. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00856-8>
71. Harrison N. (1996). PCR Assay for Detection of the Phytoplasma Associated with Maize Bushy Stunt Disease. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0263>
72. Heinrich M., Botti S., Caprara L., Arthofer W., Strommer S., Hanzer V., Katinger H., Bertaccini A., Da Câmara M. (2001). Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reports*, 19, 169–179.
73. Heinze, K., Kunze, L. (1955). Die Europäische Asterengelbsucht und Ihre Übertragung durch Zwergzikaden. *Nachrichtenblatt Des Deutsch. Pflanzenschutzdienst*, 7, 161–164.
74. Henríquez N., Kenyon L., Quiroz L. (1999). Corn stunt complex Mollicutes in Belize. *Plant Disease*, 83(1), 77. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.1.77B>
75. Hodgetts J., Chuquillangui C., Muller G., Arocha Y., Gamarra D., Pinillos O., Velit

- E., Lozada P., Boa E., Boonham N., Mumford R., Barker I., Dickinson M. (2009). Surveys reveal the occurrence of phytoplasmas in plants at different geographical locations in Peru. *Annals of Applied Biology*, 155, 15–27. <https://doi.org/http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00316.x>
76. Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E.D., Kakizawa S., Kingdom H.N., Namba S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, 403–423.
77. Hollingsworth C., Atkinson L., Samac D., Larsen J., Motteberg C., Abrahamson M., Glogoza P., MacRae I. (2008). Region and field level distributions of Aster Yellows phytoplasma in small grain crops. *Plant Disease*, 92(4), 623–630. <https://doi.org/http://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0623>
78. Holz S., Duduk B., Büttner C., Kube M. (2016). Genetic variability of Alder yellows phytoplasma in *Alnus glutinosa* in its natural Spreewald habitat. *Forest Pathology*, 46(1), 11–21. <https://doi.org/10.1111/efp.12206>
79. Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6416–6421. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813038106>
80. Hruska A., Gladstone S., Obando R. (1996). Epidemic roller coaster: Maize stunt disease in Nicaragua. *American Entomologist*, 42(4), 248–252.
81. Huang W., MacLean A.M., Sugio A., Maqbool A., Busscher M., Cho S-T., Kamoun S., Kuo C-H., Immink R.G.H., Hogenhout S. (2021). Parasitic modulation of host development by ubiquitin-independent protein degradation. *Cell*, 184, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.029>
82. Ikten C., Ustun R., Catal M., Yol E., Uzun B. (2016). Multiplex real-time qPCR assay for simultaneous and sensitive detection of phytoplasmas in sesame plants and insect vectors. *PLoS ONE*, 11(5), e0155891.
83. IRPCM. (2004). ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1243–1255.
84. Ivanauskas A., Valiūnas D., Jomantienė R., Picciau L., Davis R.E. (2014). Possible insect vectors of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ and ‘*Ca.* Phytoplasma pruni’-related strains in Lithuania. *Zemdirbyste*, 101(3), 313–320. <https://doi.org/10.13080/z->

a.2014.101.040

85. Ivanauskas A., Valiunas D., Jomantiene R., Staniulis J., Alma A., Picciau L., Davis R.E. (2011). First report of potential phytoplasma vectors *Euscelis incisus* and *Macrosteles sexnotatus* in Lithuania. *Bulletin of Insectology*, *64*, 131–132.
86. Ivanauskas A. (2014). *Phytoplasmas and their insect vectors in Lithuania*. Vilnius University, Nature Research Centre, institute of Botany, Wilno.
87. Iwabuchi N., Kitazawa Y., Maejima K., Koinuma H., Miyazaki A., Matsumoto O., Suzuki T., Nijo T., Oshima K., Namba S., Yamaji Y. (2020). Functional variation in phyllogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism. *Molecular Plant Pathology*, *21*(10), 1322–1336. <https://doi.org/10.1111/mpp.12981>
88. Jakovljević M., Jović J., Krstić O., Mitrović M., Marinković S., Toševski I., Cvrković T. (2020). Diversity of phytoplasmas identified in the polyphagous leafhopper *Euscelis incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae) in Serbia: pathogen inventory, epidemiological significance and vectoring potential. *European Journal of Plant Pathology*, *156*(1), 201–221. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01878-w>
89. Jakovljevic M., Jovic J., Mitrovic M., Krstic O., Kosovac A., Toševski I., Cvrkovic T. (2015). *Euscelis incisus* (Cicadellidae, Deltocephalinae), a natural vector of 16SrIII-B phytoplasma causing multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense*. *Annals of Applied Biology*, *167*(3), 406–419. <https://doi.org/10.1111/aab.12236>
90. Jiang H., Wei W., Saiki T., Kawakita H., Watanabe K., Sato M. (2004). Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees. *Journal of General Plant Pathology*, *70*, 168–173.
91. Jomantiene R., Davis R., Alminaite A., Valiunas D., Jasinskaite R. (2002). First report of oat as host of a phytoplasma belonging to group 16SrI, subgroup A. *Plant Disease*, *86*(4), 443–443. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.4.443B>
92. Jomantiene R., Yhao Z., Lee I.M., Davis R.E. (2011). Phytoplasmas infecting sour cherry and lilac represent two distinct lineages having close evolutionary affinities with clover phyllody phytoplasma. *European Journal of Plant Pathology*, *130*, 97–107.
93. Jomantiene R.R., Maas J.L., Takeda F., Davis R.E. (2002). Molecular Identification and Classification of Strawberry Phylloid Fruit Phytoplasma in Group 16SrI, New Subgroup. *Plant Disease*, *86*(8), 920.
94. Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Krstić O., Redinbaugh M., Pratt R., Toševski I. (2011). Hosts of stolbur phytoplasmas in maize redness affected fields. *Bulletin*

of *Insectology*, 64, 155–156.

95. Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Petrović A., Redinbaugh M., Pratt R., Hogenhout S., Toševski I. (2009). Stolbur phytoplasma transmission to maize by *Reptalus panzeri* and the disease cycle of Maize Redness in Serbia. *Phytopathology*, 99(9), 1053–1061. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1053>
96. Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Petrović A., Redinbaugh M., Pratt R., Hogenhout S., Toševski I. (2007). Maize redness in Serbia caused by stolbur phytoplasma is transmitted by *Reptalus panzeri*. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 397–398.
97. Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Petrović A., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. (2012). Multigene sequence data and genetic diversity among 'Candidatus Phytoplasma ulmi' strains infecting *Ulmus* spp. in Serbia. *Plant Pathology*, 60, 356–368.
98. Jurga M., Zwolińska A. (2020a). *Artemisia vulgaris*, a new host of 16SrV-C phytoplasma related strains infecting black alder in Poland. *Journal of Phytopathology*, 168(11–12), 659–667. <https://doi.org/10.1111/jph.12946>
99. Jurga M., Zwolińska A. (2020b). Phytoplasmas in Poaceae species: a threat to the most important cereal crops in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 287–297. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00481-6>
100. Kado C.I. (2016). Asymptomatic and Latent Infections. In *Plant Bacteriology* (pp. 221–228). <https://doi.org/10.1094/9780890545034.009>
101. Kamińska M., Berniak H., Kamiński P. (2012a). Detection of 'Candidatus Phytoplasma asteris' infection in *Brassica* spp. plants with flower bud failure in Poland. *Acta Horticulturae*, 960, 351–358. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.960.51>
102. Kamińska M., Berniak H., Kamiński P. (2012b). Detection and identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris' in *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* in Poland. *Journal of Phytopathology*, 160(11–12), 723–727. <https://doi.org/10.1111/jph.12011>
103. Kamińska M., Korbin M. (1999). Graft and dodder transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/s11738-999-0023-y>
104. Kamińska M., Śliwa H. (2005). the Reaction of *Catharanthus Roseus* Test Plant To Infection With Two Polish Strains of Aster Yellows Phytoplasma. *Phytopathologia Polonica*, 37, 23–32.
105. Keikha M. (2018). LAMP method as one of the best candidates for replacing with PCR method. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 25(1), 96–98. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.1.11>

106. Khan A.J., Botti S., Paltrinieri S., Al-Subhi A.M., Bertaccini A. (2002). Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? *14th International Congress of the IOM, Vienna, Austria*, 6.
107. Kirkpatrick B.C., Stenger B.C., Morris T.J., Purcell A.H. (1987). Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238, 197–200.
108. Klejdysz T., Wałkowski W. (2008). Dynamika liczebności wybranych populacji Piewików (Hemiptera: Auchenorrhyncha) występujących na jęczmieniu jarym. *Progress in Plant Protection*, 48(3), 864–872.
109. Klejdysz T. (2013). Piewiki (Hemiptera: Cicadomorpha & Fulgoromorpha) jako składnik szkodliwej entomofauny ważniejszych upraw w Polsce. Institute of Plant Protection-National Research Institute, Poznań 2013.
110. Kochamn J., Książek D. (1964). Badania nad przenoszeniem wirusów żółtaczki astra i żółtej karłowatości cebuliprzy udziale skoczków *Macrosteles laevis* Rib. *Acta Agrobotanica*, 16, 145-156.
111. Kovačević M., Durić Z., Jović J., Perković G., Lolić B., Hrnčić S., Toševski I., Delić D. (2014). First report of stolbur phytoplasma associated with maize redness disease of Maize in Bosnia and Herzegovina. *Plant Disease*, 98(3), 418. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0371-PDN>
112. Krawczyk K., Zwolińska A., Pospieszny H., Borodynko N. (2016). First Report of ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’-Related Strain Affecting Juniperus Plants in Poland. *Plant Disease*, 100(12), 2521. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0621-PDN>
113. Krstić O., Cvrković T., Mitrović M., Radonjić S., Hrnčić S., Toševski I., Jović J. (2018). *Wolbachia* infection in natural populations of *Dictyophara europaea*, an alternative vector of grapevine Flavescence dorée phytoplasma: effects and interactions. *Annals of Applied Biology*, 172(1), 47–64. <https://doi.org/10.1111/aab.12400>
114. Kruger K., Pietersen G., Smit N., Carstens R. (2015). Epidemiology of aster yellows phytoplasma: alternate host plants and the vector *Mgenia fuscovaria* (Hemiptera: Cicadellidae) in South Africa. In *18th Meeting of the International Council for the study of Virus-like diseases of the Grapevine (ICVG), September 7-11, 2015, Ankara, Turkey* (pp. 126–127).
115. Kube M., Mitrovic J., Duduk B., Rabus R., Seemüller E. (2012). Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/185942>

116. Landi L., Isidoro N., Riolo P. (2013). Natural phytoplasma infection of four phloem-feeding auchenorrhyncha across vineyard agroecosystems in central-Eastern Italy. *Journal of Economic Entomology*, 106(2), 604–613. <https://doi.org/10.1603/EC12400>
117. Lebsky V., Hernández-González J., Arguello-Astorga G., Cardenas-Conejo Y., Poghosyan A. (2011). Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: A case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology*, 64, 2–4.
118. Lee I., Gundersen-Rindal D., Bertaccini A. (1998). Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88(12), 1359–1366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1359>
119. Lee I., Gundersen-Rindal D., Davis R., Bartoszyk I. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16s rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1153–1169. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1153>
120. Lee I., Gundersen-Rindal D., Davis R., Bottner K., Marccone C., Seemüller E. (2004). 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1037–1048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijms.0.02843-0>
121. Lee I., Hammond R., Gundersen D. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of Mycoplasma-like Organisms. *Phytopathology*, 83(8), 834–842. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-834>
122. Lee I., Martini M., Marccone C., Zhu S. (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. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02697-0>
123. Lee I., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 221–255.
124. Lee I., Davis R.E., Chen T.A., Chiykowski L.N., Fletcher J., Hiruki C., Schaff D.A. (1992). A genotype-base system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology*, 82, 977–986.
125. Lee I.M., Davis R.E. (1992). Mycoplasmas which infect plant and insects. In Maniloff J., McElhansey R.N., Finch L.R., Baseman J.B. (Ed.), *Molecular Biology and Pathogenesis* (American S, pp. 379–390). Washington, USA.
126. Lee I.M., Dawn E., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A. (1998). Phytoplasma : Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology*, 88(12), 1359–1366.

127. Lee I.M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E. (1994). Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84, 559–566.
128. Lefol C., Caudwell A., Lherminier J., L. J. (1993). Attachment of the Flavescence dorée pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Annals of Applied Biology*, 123, 611–622.
129. Lim P.O., Sears B.B. (1989). 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 171, 5901–5906.
130. Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemüller E. (1995). Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. *Phytopathology*, 85(7), 771–776.
131. MacLean A.M., Sugio A., Makarova O.V., Findlay K.C., Grieve V.M., Tóth R., Nicolaisen M., Hogenhout S. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology*, 157(2), 831–841. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181586>
132. Maixner M., Ahrens U., Seemüller E. (1995). Detection of the German grapevine yellows MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, 101, 241–250.
133. Manurung B., Witsack W., Mehner S., Grüntzig M., Fuchs E. (2004). The epidemiology of Wheat dwarf virus in relation to occurrence of the leafhopper *Psammotettix alienus* in Middle-Germany. *Virus Research*, 100(1), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.019>
134. Maramorosch K. (1955). The occurrence of two distinct types of corn stunt in Mexico. *Plant Disease Reporter*, 39(12), 896–898.
135. Marcone C., Neimark H., Ragozzino A., Lauer U., Seemüller E. (1999). Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology*, 85, 805–810.
136. Marcone C., Ragozzino A. (1996). Comparative ultrastructural studies on genetically different phytoplasmas using scanning electron microscopy. *Petria*, 6, 125–136.
137. Marcone C. (2015). Current status of phytoplasma diseases of forest and landscape trees and shrubs. *Journal of Plant Pathology*, 97(1), 9–36.

138. Matsumura S. (1906). Die Cicadinen der Provinz Westpreussen und des Sulichen Nachbargebiets. Mit Beschreibungen und Abbildungen neuer Arten. *Schr. Naturf. Ges. Danzig*, 11, 64–82.
139. Mehle N., Jakoš N., Mešl M., Miklavc J., Matko B., Rot M., Rus A.F., Brus R., Dermastia M. (2019). Phytoplasmas associated with declining of hazelnut (*Corylus avellana*) in Slovenia. *European Journal of Plant Pathology*, 155(4), 1117–1132. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01839-3>
140. Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Gorica N., Dermastia M. (2011). The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in the most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(2). <https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.2.012>
141. Mejia J.F., Duduk B., Zamora L., Paltrinieri S., Satta E., Bertaccini A., Contando N. (2013). Identification and molecular characterization of 'Candidatus Phytoplasma' strains from maize in four countries. In *abstract Book of COST Action FA0807, Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in different crop systems. Final Meeting, Portugal, Lisbon, 2013* (pp. 25–26).
142. Mergenthaler E., Fodor J., Agoston J., Viczián O. (2020). First Report of *Lychnis flos-cuculi* as a New Host Plant for 'Candidatus Phytoplasma asteris' (Subgroup 16SrI-B). *Plant Disease*, 104(4), 1249. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1160-PDN>
143. Minato N., Himeno M., Hoshi A., Maejima K., Komatsu K., Takebayashi Y., Kasahara H., Yusa A., Yamaji Y., Oshima K., Kamiya Y., Namba S. (2014). The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07399>
144. Mitrović J., Kakizawa S., Duduk B., Oshima K., Namba S., Bertaccini A. (2011). The groEL gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. *Annals of Applied Biology*, 159(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00472.x>
145. Mitrović J., Kakizawa S., Duduk B., Oshima K., Namba S., Bertaccini A. (2010). The cpn60 gene as an additional marker for 'Candidatus Phytoplasma asteris' strain differentiation. *18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology*, 147.
146. Mokbel S., Kheder A. (2020). In vitro Propagation of Phytoplasma-Free Strawberry Plants and Molecular Characterization of the Pathogen. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 490–500. <https://doi.org/10.36632/mejas/2020.10.3.43>

147. Mori N., Mitrović J., Smiljković M., Duduk N., Paltrinieri S., Bertaccini A., Duduk B. (2013). *Hyalesthes obsoletus* in Serbia and its role in the epidemiology of corn reddening. *Bulletin of Insectology*, 66(2), 245–250.
148. Muirhead K., Perez-Lopez E., Bahder B.W., Hill J.E., Dumonceaux T. (2019). The CpnClassiPhyR is a resource for cpn60 universal target-based classification of phytoplasmas. *Plant Disease*, 103(10), 2494–2497. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0454-A>
149. Musetti R., Favali M.A., Pressacco L. (2000). Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*, 2000(401), 133–147.
150. Namba S., Kato S., Iwanami S., Oyaizu H., Shiozawa H., Tsuchizaki T. (1993). Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83, 786–791.
151. Namba, S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 95(7), 401–418. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>
152. Nault L., Gordon D., Gingery R., Brangfute O., Loayza J. (1979). Identification of Maize Viruses and Mollicutes and Their Potential Insect Vectors in Peru. *Phytopathology*, 69(8), 824–828.
153. Nault L. (1980). Maize Bushy Stunt and Corn Stunt: A Comparison of Disease Symptoms, Pathogen Host Ranges, and Vectors. *Phytopathology*, Vol. 70, p. 659. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/Phyto-70-659>
154. Navrátil M., Příbylová J., Válová P., Fialová R., Šafářová D., Špak J., Kubelková D., Petrzik K., Karešová R., Špaková V. (2007). Detection and identification of phytoplasmas in *Ribes rubrum*. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 123–124.
155. Navrátil M., Šafářová D., Válová P., Fránová J., Šimková M. (2009). Phytoplasma associated with witches'-broom disease of *Ulmus minor* Mill. in the Czech Republic: Electron microscopy and molecular characterization. *Folia Microbiologica*, 54(1), 37–42. <https://doi.org/10.1007/s12223-009-0006-9>
156. Nečas T., Mašková V., Krška B. (2008). The possibility of ESFY phytoplasma transmission through flowers and seeds. *Acta Horticulturae*, 781, 443–448.
157. Nejat N., Vadamalai G. (2013). Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases : past and present. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120(1), 16–25.
158. Nicolaisen, M., & Horvath, D. P. (2008). A branch-inducing phytoplasma in *Euphorbia pulcherrima* is associated with changes in expression of host genes. *Journal of*

- Phytopathology*, 156(7–8), 403–407. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01372.x>
159. Nipah J.O., Jones P., Hodgetts J., Dickinson M. (2007). Detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms in Ghana, and kernels from maize in Peru. *Bulletin of Insectology*, 60, 385–386.
160. Nowacka W. (1982). Skoczki (Homoptera, Auchenorrhyncha) występujące na uprawach zbóż i traw nasiennych na terenie Polski. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu, Rozprawy Naukowe*, 122, 81 ss.
161. Obura E., Masiga D., Wachira F., Gurja B., Khan Z.R. (2011). Detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). *Journal of Microbiological Methods*, 84, 312–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.12.011>
162. Olivier C., Galka B. (2008). Consequences of phytoplasma infection on canola crop production in the Canadian prairies. *Endure International Conference: Diversifying Crop Protection. La Grande-Motte, France, O-47*, 1–4.
163. Olivier C., Lowery D., Stobbs L. (2009a). Phytoplasma diseases and their relationships with insect and plant hosts in Canadian horticultural and field crops. *The Canadian Entomologist*, 141(05), 425–462. <https://doi.org/10.4039/n08-CPA02>
164. Olivier C.Y., Galka B., Séguin-Swartz G. (2010). Detection of aster yellows phytoplasma DNA in seed and seedlings of canola (*Brassica napus* and *B. rapa*) and AY strain identification. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32, 298–305.
165. Olivier C.Y., Lowery D.T., Stobbs L.W., Vincent C., Galka B., Saguez J., Bittner L., Johnson R., Rott M., Masters C., Green M. (2009b). First report of aster yellow phytoplasmas ('*Candidatus Phytoplasma asteris*') in Canadian Grapevines. *Plant Disease*, 93(6), 669. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0669A>
166. Olivier C.Y., Séguin-Swartz G., Hegedus D. (2006). First report of '*Candidatus Phytoplasma asteris*'- related strains in *Brassica rapa* in Saskatchewan, Canada. *Plant Disease*, 90, 832.
167. Orlovskis Z., Canale M., Haryono M., Lopes J., Kuo C., Hogenhout S. (2017). A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of Botany*, 119(5), 869–884. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/aob/mcw213>
168. Oropeza C., Cordova I., Puch-Hau C., Castillo R., Chan J.L., Sàenz L. (2017). Detection of lethal yellowing phytoplasma in coconut plantlets obtained through *in vitro* germination of zygotic embryos from the seeds of infected palms. *Annals of Applied*

Biology, 171, 28–36.

169. Orságová H., Brežíková M., Schlesingerová G. (2011). Presence of phytoplasmas in hemipterans in Czech vineyards. *Bulletin of Entomological Research*, 64, 119–120.
170. Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H-Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36, 27–29.
171. Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S.I., Ugaki M., Namba S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36(1), 27–29. <https://doi.org/10.1038/ng1277>
172. 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 phytoplasma and comparison with a grapevine yellows phytoplasma from Emilia-Romagna in Italy. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1, 25–31.
173. Pagliari L., Martini M., Loschi A., Musetti R. (2016). Looking inside phytoplasma-infected sieve elements: A combined microscopy approach using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Micron*, 89, 87–97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.07.007>
174. Palermo S., Ember I., Botti S., Elekes M., Alma A., Bertaccini A., Orosz A., Kölber M. (2004). Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis*, 43(4), 201–203.
175. Panda P., Rihne T., Reddy M.G., Rao G.P. (2019). First report of the association of a ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’ strain with *Crossandra infundibuliformis*. *New Disease Reports*, 40, 15. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.038>
176. Parizipour M.H.G., Behjatnia S.A.A., Afsharifar A., Izadpanah K. (2016). Natural hosts and efficiency of leafhopper vector in transmission of Wheat dwarf virus. *Journal of Plant Pathology*, 98(3). <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I3.022>
177. Pérez-López E., Olivier C., Luna-Rodríguez M., Rodríguez Y., Iglesias L., Castro-Luna A., Adame-García J., Dumonceaux T. (2016). Maize bushy stunt phytoplasma affects native corn at high elevations in Southeast Mexico. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 963–971. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10658-016-0883-0>
178. Pérez-López E., Wist T., Dumonceaux T., Luna-Rodríguez M., Nordin D., Castro-Luna A., Iglesias-Andreu L., Olivier C. (2018). Detection of Maize Bushy Stunt

- Phytoplasma in Leafhoppers Collected in Native Corn Crops Grown at High Elevations in Southeast Mexico. *Florida Entomologist*, 101(1), 12–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1653/024.101.0104>
179. Poghosyan A., Lebsky V., Arce-Montoya M., Landa L. (2004). Possible phytoplasma disease in papaya (*Carica papaya* L.) from Baja California Sur: diagnosis by scanning electron microscopy. *Journal of Phytopathology*, 152, 376–380.
180. Posnette A.F., Ellenberger C.E. (1963). Further studies of green petal and other leafhopper-transmitted viruses infecting strawberry and clover. *Annals of Applied Biology*, 51, 69–83.
181. Pradit N., Mescher M.C., Wang Y., Vorsa N., Rodriguez-Saona C. (2019). Phytoplasma Infection of Cranberries Benefits Non-vector Phytophagous Insects. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 181.
182. Příbylová J., Petrzik K., Špak J. (2009). The first detection of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' in *Rhododendron hybridum*. *European Journal of Plant Pathology*, 124(1), 181–185. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9391-1>
183. Příbylova J., Spak J. (2013). Dodder Transmission of Phytoplasmas. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 938, pp. 41–46). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_4
184. Prota V.A., Sechi A., Tolu G., Garau R., Botti S., Bertaccini A. (2006). New findings on phytoplasmas-affected Auchenorrhyncha populations in Sardinian vineyards. *2006 1st International Symposium on Environment Identities and Mediterranean Area, ISEIM*, (August), 622–624. <https://doi.org/10.1109/ISEIMA.2006.345015>
185. Purar B., Bekavac G., Jocković D., Toldi Tóth É., Kálmán L., Raspudić E., Dimitrijević M. (2009). Corn reddening: Occurrence, symptoms and field observations. *Cereal Research Communications*, 37(1), 121–129. <https://doi.org/10.1556/CRC.37.2009.1.14>
186. Quaglino F., Sanna F., Moussa A., Faccincani M., Passera A., Casati P., Bianco P.A., Mori N. (2019). Identification and ecology of alternative insect vectors of 'Candidatus Phytoplasma solani' to grapevine. *Scientific Reports*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56076-9>
187. Rao G., Kumar M., Madhupriya S. (2017). First report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16SrI-B subgroup) associated with a maize leaf redness disease in India. *Phytopathogenic Mollicutes*, 7(1), 52–56.
188. Rao G., Prakasha T., Priya M., Thorat V., Kumar M., Mishra A., Yadav A. (2017).

- First Report of Association of '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis' (16SrXI-B Group) With Streak, Yellowing, and Stunting Disease in Durum and Bread Wheat Genotypes From Central India. *Plant Disease*, 101(7), 1314–1314. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0163-PDN>
189. Ravindran A., Levy J., Pierson E., Gross D. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification procedure as a sensitive and rapid method for detection of '*Candidatus* Liberibacter solanacearum' in potatoes and psyllids. *Phytopathology*, 102(9), 899–907.
190. Rezaei F., Hatami B., Habibollah Norbakhsh S., Jalalizand A. (2013). Determine the dominant species leafhoppers of cereal fields and their abundance in Shahrekord region. *The Second International Conference on Agriculture and Natural Resources, Iran* (December 25-26), 986–989.
191. Riedle-Bauer M., Tiefenbrunner W., Otreba J., Hanak K., Schildberger B., Regner F. (2006). Epidemiological observations on Bois Noir in Austrian vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg* (56), 177–181.
192. Saeed E., Sarindu N., Davies D.L., Clark M.F., Roux J., Cousin M.T. (1994). Use of polyclonal antibodies to identify mycoplasma-like organisms (MLOs) from the Sudan and from Thailand. *Journal of Phytopathology*, 142, 345–349.
193. Šafářová D., Lauter P., Starý M., Válová P., Navrá M. (2018). Insight into epidemiological importance of phytoplasma vectors in vineyards in South Moravia, Czech Republic. *Plant Protection Science*, 54(4), 234–239. <https://doi.org/10.17221/8/2018-PPS>
194. Salar P., Charenton C., Foissac X., Malembic-Maher S. (2013). Multiplication kinetics of Flavescence dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. *European Journal of Plant Pathology*, 135(2), 371–381. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0093-3>
195. Sang-Sub H., Byung-Taek O. Seralathan K. (2013). Identification of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' (16SrI-B) Causing Witches' Broom Disease of *Mallotus japonicus* in Korea. *Journal of Phytopathology*, 162. <https://doi.org/10.1111/jph.12167>
196. Santos-Cervantes M.E., Chávez-Medina J.A., Acosta-Pardini J., Flores-Zamora G.L., Méndez-Lozano J., Leyva-López N.E. (2010). Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant Disease*, 94(4), 388–395. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0388>
197. Satta E., Paltrinieri S., Bertaccini A. (2019). Phytoplasma Transmission by Seed. In Bertaccini A., Weintraub P., Rao G., Mori N. (Ed.), *Phytoplasmas: Plant Pathogenic*

- Bacteria - II*. (pp. 131–148). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_6
198. Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E. (1993). Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139, 519–527.
199. Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143, 3381–3389.
200. Schneider B., Seemüller E., Smart C., Kirkpatrick B. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, 369–380.
201. Schröder M. (2019). Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ (pear decline agent) in pear trees by different diagnostic procedures in the seasonal course. *Journal Für Kulturpflanzen*, 71(7), 201–210. <https://doi.org/10.5073/JfK.2019.07.01>
202. Seemüller E., Garnier M., Schneider B. (2002). Mycoplasmas of Plants and Insects. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (pp. 91–115). https://doi.org/10.1007/0-306-47606-1_5
203. Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Goschl M. (1998). Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80(1), 3–26.
204. Seemüller E., Schneider B., Maurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K. H., Firrao G., Avinent L., Sears B. B., Stackebrandt E. (1994). Phylogenetic Classification of Phytopathogenic Mollicutes by Sequence analysis of 16S Ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 440–446.
205. Šeruga-Music M., Vrek I., Korjae D. (2004). *Dianthus croaticus* Borb –a new host for phytoplasma from ribosomal groups 16SrI and 16SrIII. *15th International Congress of the IOM, Athens, United States of America*, 76, 122–123.
206. Shiferaw B., Smale M., Braun H.J., Duveiller E., Reynolds M., Muricho G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, 5, 291–317.
207. Shiomi T., Sugiura M. (1984). Grouping of mycoplasma like organisms transmitted by the leafhopper vector, *Macrostelus orientalis* Virvaste, based on host range. *Annals Phytopathological Society of Japan*, 50, 49–57.
208. Siemonsmeier A., Hadersdorfer J., Neumüller M., Schwab W., Treutter D. (2019). A LAMP protocol for the detection of ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’, the causal agent of

- pear decline. *Plant Disease*, 103(6), 1397–1404. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2150-RE>
209. Sigalla J. (2019). *Analyses of circular DNA molecules in the leafhopper Psammotettix alienus for identification of viruses and plasmids alienus for identification of viruses and plasmids*. Swedish University of Agricultural Sciences.
210. Simon E., Szwedo J. (2005). Zgrupowania piewików na hałdach kopalnianych Rudy Śląskiej i Mikołowa (Hemiptera: Fulgoromorpha et Cicadomorpha). *Acta Entomologica Silesiana*, 12–13, 79–144.
211. Soufi Z., Komor, E. (2014). Latent infection of asymptomatic Hawaiian sugarcane cultivars with 16SrI and 16SrXI phytoplasmas. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0514-6>
212. Sugio A., Kingdom H.N., MacLean A.M., Grieve V.M., Hogenhout S. (2011a). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), E1254-1263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105664108>
213. Sugio A., MacLean A.M., Kingdom H.N., Grieve V.M., Manimekalai R., Hogenhout S. A. (2011b). Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 175–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095323>
214. Sumashri K.S., Janardhana G.R. (2020). First report of 'Candidatus Phytoplasma oryzae' associated with lemongrass in India. *New Disease Reports*, 42, 16. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00645-9>
215. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
216. Tao Y., Man J., Wu Y. (2012). Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China. *Archives of Virology*, 157(7), 1261–1267. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1294-y>
217. Tiwari A.K., Khan M.S., Chun S.C., Priya M. (2013). Molecular identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris' (16SRI-B) associated with the little leaf disease of potato in India. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 659-668. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.024>

218. Tiwari A.K., Khan M.S., Kumar P., Tiwari A. (2017). Molecular characterization of phytoplasma of 16SrI-B group association with *Acalypha indica* in India. *3 Biotech*, 7(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0671-3>
219. Tomlinson J.A., Boonham N., Dickinson M. (2010). Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathology*, 59, 465–471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02233.x>
220. Torres L., Galdeano E., Fernandez F., Meneguzzi N., Conci L. (2011). Establishment of the new subgroup 16SrI-S (rr-rp) tuf-H belonging to 'Ca. Phytoplasma asteris' in wild and cultivated plants in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 93(2), 311–320.
221. Tratwal A., Bereś P., Korbas M., Danielewicz J., Jajor E., Horoszkiewicz Janka J., Jakubowska M., Roik K., Baran M., Strażyński P., Kubasik W., Klejdysz T., Węgorek P., Zamojska J., Dworzańska D., Barłóg P. (2017). *Poradnik Sygnalizatora Ochrony Zbóż*. IOR, Poznań, 113-122.
222. Trzmiel K., Klejdysz T. (2018). Detection of barley and wheat specific forms of *Wheat dwarf virus* in their vector *Psammotettix alienus* by duplex PCR assay. *Journal of Plant Protection Research*, 58(1), 54–57. <https://doi.org/10.24425/119118>
223. Valiunas D., Jomantiene R., Davis R.E. (2013). Evaluation of the DNA-dependent RNA polymerase β -subunit gene (rpoB) for phytoplasma classification and phylogeny. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART10), 3904–3914. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051912-0>
224. Valiūnas D., Urbanavičienė L., Jomantienė R., Davis R.E. (2007). Molecular detection, classification and phylogenetic analysis of subgroup 16SrI-C phytoplasmas detected in diseased *Poa* and *Festuca* in Lithuania. *Biologija*, 53(2), 36–39.
225. Walczak M., Chruściel M., Trela J., Sojka K., Herczek A. (2019). Planthopper and leafhopper fauna (Hemiptera: Fulgoromorpha et Cicadomorpha) at selected postmining dumping grounds in Southern Poland. *Annals Of The Upper Silesian Museum In Bytom Entomology*, 28, 1–28.
226. Walczak M. (2005). Piewiki (Hemiptera, Auchenorrhyncha) zieleni miejskiej Sosnowca. *Acta Entomologica Silesiana*, 12–13, 145–154.
227. Webb D.R., Bonfiglioli R.G., Carraro L., Osler R., Symons R.H. (1999). Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. *Phytopathology*, 89(10), 894–901.

<https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.894>

228. Weintraub P.G., Jones P. (2009). Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors. *Wallingford: CABI*. <https://doi.org/10.1079/9781845935306.0000>
229. Weintraub P.G., Beanland L. (2006). Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 91–111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>
230. Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., Vanetten J., Maniloff J., Woese C.R. (1989). A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas - Basis for the Classification. *Journal of Bacteriology*, 171, 6455–6467.
231. Wilson M.R., Weintraub, P.G. (2007). An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 177–178.
232. Win N., Lee Y., Back K., Chung C., Jung H., Young H. (2012). Reclassification of aster yellows group phytoplasmas in Korea. *Journal of General Plant Pathology*, 78(4), 264–268. <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0387-5>
233. Woese C.R., Maniloff J., Zablen L.B. (1980). Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 77, 494–498.
234. Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 221–271.
235. Wu Y., Hao X., Li Z., Gu P., An F., Xiang J., Wang H., Luo L., Liu J., Xiang Y. (2010). Identification of the Phytoplasma Associated with Wheat Blue Dwarf Disease in China. *Plant Disease*, 94(8), 977–985. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0977>
236. Yang Y., Jiang L., Tian Q., Lu Y., Zhang X., Zhao W. (2017). Detection and identification of a novel subgroup 16SrII-V phytoplasma associated with *Praxelis clematidea* phyllody disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 5290–5295. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002449>
237. Zamharir M.G., Mozaffarian F., Hosseini-Gharalari A. (2019). Molecular Detection of Grape Decline Phytoplasma in Leafhopper Species Associated with Infected Grapevines in Iran. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 54(1), 25–34. <https://doi.org/10.1556/038.54.2019.003>
238. Zhang X., Zhou G., Wang X. (2010). Detection of wheat dwarf virus (WDV) in wheat and vector leafhopper (*Psammotettix alienus* Dahlb.) by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 169(2), 416–419. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.029>

239. Zhao Y., Wei W., Lee I.M., Shao J., Suo X., Davis R.E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2582–2593.
240. Zhao Y., Wei W., Davis R.E., Lee I.M., Bottner-Parker K.D. (2021). The agent associated with blue dwarf disease in wheat represents a new phytoplasma taxon, ‘*Candidatus Phytoplasma tritici*.’ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 004604. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004604>
241. Zwolińska A., Borodynko-Filas N. (2021). Intra and extragenomic variation between 16S rRNA genes found in 16SrI-B-related phytopathogenic phytoplasma strains. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/10.1111/aab.12722>
242. Zwolińska A., Borodynko N., Krawczyk K., Pospieszny H. (2016). First Report of Aster Yellows Related Phytoplasma Affecting Sugar Beets in Poland. *Plant Disease*, 100(10), 2158. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0225-PDN>
243. Zwolińska A., Klejdysz T., Krawczyk K., Nawrot J. (2017). The role of selected Auchenorrhyncha species (Hemiptera: Cicadomorpha & Fulgoromorpha) in a transmission of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ phytoplasma – a causal factor of oilseed rape phyllody. *Progress in Plant Protection*, 57(1), 5–15. <https://doi.org/10.14199/ppp-2017-001>
244. Zwolińska A., Krawczyk K., Borodynko-Filas N., Pospieszny H. (2019). Non-crop sources of Rapeseed Phyllody phytoplasma (‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’: 16SrI-B and 16SrI-(B/L)L), and closely related strains. *Crop Protection*, 119, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.11.015>
245. Zwolińska A., Krawczyk K., Klejdysz T., Pospieszny H. (2011a). First Report of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ Associated with Oilseed Rape Phyllody in Poland. *Plant Disease*, 95(11), 1475. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0177>
246. Zwolińska A., Krawczyk K., Maćkowiak-Sochacka A., Kamasa J. (2011b). Identyfikacja fitoplazm porażających rzepak ozimy w Polsce. *Progress in Plant Protection*, 51(4), 1659–1662.
247. Zwolińska A., Krawczyk K., Pospieszny H. (2012a). Molecular Characterization of Stolbur Phytoplasma Associated with Pea Plants in Poland. *Journal of Phytopathology*, 160, 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01903.x>.
248. Zwolińska A. (2019). *Występowanie i charakterystyka fitoplazm na wybranych roślinach rolniczych*. Institute of Plant Protection-National Research Institute, Poznań.

Strony internetowe:

WWW1: <https://www.agrofagi.com.pl/148,rosliny-zbozowe-kukurydza>: dostęp 14.11.2021r.

WWW2: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>: dostęp 25.11.2021r.

WWW3: <https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>: dostęp 23.09.2021r.

WYKAZ SKRÓTÓW

AAP – ang. acquisition access period/ okres żeru nabywającego

AY-WB – ang. Aster Yellows Witches' Broom

CTAB – ang. cetyltrimethylammonium bromide/ bromek heksadecylotrimetyloamoniowy

EDTA – ang. ethylenediaminetetraacetic acid/ kwas etylenodiaminotetraoctowy

ESFY – ang. European stone fruit yellows phytoplasma/ Europejska żółtaczka drzew pestkowych

IPTG – ang. isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside/ izopropyl- β -D-thiogalaktopiranozyd

LAMP – ang. loop-mediated isothermal amplification/ izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego

LB – ang. lysogeny broth/ bulion lizogenny

LP – ang. latent period/ okres latencji

LY – ang. Lethal yellowing/ śmiertelne żółknięcie

MBS – ang. Maize bushy stunt/ krzaczastość kukurydzy

MLO – ang. Mycoplasma-like organisms/ organizmy mykoplazmopodobne

MR – ang. Maize redness/ czerwienienie kukurydzy

Obr./min – obroty na minutę

OY – ang. Onion Yellows/ żółtaczka cebuli

PCR – ang. polymerase chain reaction/ reakcja łańcuchowej polimerazy

PoiBI – ang. Poinsettia branch inducing/ indukcja gałęzi poinsecji

RFLP – ang. restriction fragment length polymorphism/ polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

SAP – ang. Secreted AY-WB Protein/ białka sekrecyjne AY-WB

SB – ang. sodium borate/ tetraboran sodu

TD-PCR – ang. touchdown PCR/ gradientowy PCR

WBD – ang. wheat blue dwarf/ niebieska karłowatość pszenicy

SPIS WYKRESÓW, TABEL I RYCIN

Wyk. 1. Udział poszczególnych gatunków skoczków odłowionych z pszenicy ozimej	51
Wyk. 2. Udział gatunków skoczków odłowionych z kukurydzy	60
Wyk. 3. Średnia efektywność przenoszenia fitoplazmy przez <i>M. laevis</i>	71
Wyk. 4. Średnia efektywność przenoszenia fitoplazmy przez <i>M. laevis</i> wśród odmian pszenicy ozimej	71
Wyk. 5. Wpływ infekcji fitoplazmy na wysokość roślin	72
Wyk. 6. Efektywność przenoszenia fitoplazmy przez <i>P. alienus</i>	78
Wyk. 7. Efektywność przenoszenia fitoplazmy przez <i>P. alienus</i> wśród odmian	78
Wyk. 8. Wpływ infekcji fitoplazmy na wysokość roślin	79
Tab. 1. Taksonomia fitoplazm	7
Tab. 2. Klasyfikacja fitoplazm	8
Tab. 3. Rodzaj prób i miejsce ich poboru	21
Tab. 4. Miejsce i czas poboru owadów	22
Tab. 5. Sekwencje starterów użytych w badaniach	25
Tab. 6. Skład mieszaniny reakcyjnej dla 1 reakcji	26
Tab. 7. Warunki reakcji zagnieżdżonego-PCR	27
Tab. 8. Wykrywanie fitoplazm w pszenicy ozimej	36
Tab. 9. Wykrywanie fitoplazm w roślinach kukurydzy	44
Tab. 10. Skład gatunkowy skoczków odłowionych z pszenicy ozimej	50
Tab. 11. Identyfikacja i klasyfikacja fitoplazm wykrytych w skoczkach odłowionych z pszenicy ozimej	59
Tab. 12. Gatunki skoczków odłowione z kukurydzy	60
Tab. 13. Klasyfikacja fitoplazm wykrytych w skoczkach odłowionych z kukurydzy	63

Ryc. 1. Cykl rozwojowy fitoplazm	12
Ryc. 2. Miejsca poboru próbek a) lokalizacje b) schemat poboru próbek roślinnych	20
Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie wielkości amplikonów uzyskanych w reakcjach PCR	26
Ryc. 4. Schemat doświadczenia testującego przenoszenie fitoplazm przez <i>M. laevis</i> i <i>P. alienus</i> na rośliny pszenicy i kukurydzy	33
Ryc. 5. Objawy zaobserwowane na pszenicy ozimej: A, B- żółte przebarwienia występujące w fazie krzewienia; C- zahamowanie wzrostu; D- porównanie roślin bezobjawowych (1) oraz objawowych (2).	37
Ryc. 6. Analiza RFLP sekwencji genu 16S rRNA izolatu W1.22 (A) oraz izolatu W1.47 (B) wykonana w programie iPhyClassifier	39
Ryc. 7. Drzewo filogenetyczne pokrewieństwa szczepów w oparciu o sekwencję genu 16S rRNA. Skonstruowane metodą Maximum Likelihood w programie MEGA X. Badane izolaty oznaczono ●	42
Ryc. 8. Drzewo filogenetyczne oparte o gen tuf. Skonstruowane metodą Maximum Likelihood w programie MEGA 7. Badany izolot oznaczono ▲	43
Ryc. 9. Objawy na kukurydzy: A, B- jasne, długie, równoległe pasy wzdłuż nerwów w fazie BBCH 17-18; C- roślina bezobjawowa; D- słabszy wzrost widoczny w fazie BBCH 39; E, F- czerwone przebarwienia na zewnętrznej krawędzi liści.	47
Ryc. 10. Porównanie wirtualnych wzorców RFLP otrzymanych w wyniku trawienia in silico sekwencji o długości 1244 pz pochodzących od izolatów W3.05 (A) oraz W4.03 (B).	48
Ryc. 11. Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie sekwencji 16S rDNA metodą Maximum Likelihood w programie MEGA X. Badane izolaty oznaczono ▼	49
Ryc. 12. Profile restrykcyjne sekwencji izolatów pochodzących z owadów odłowionych z pszenicy ozimej.	55
Ryc. 13. Fragmenty drzewa filogenetycznego uwzględniającego sekwencje izolatów uzyskanych od nosicieli fitoplazm w pszenicy ozimej. Sekwencje uzyskane od pszenicy oznaczono ▲ a potencjalnych wektorów oznaczono ■	56
Ryc. 14. Profil restrykcyjny izolatu O1.242 reprezentujący podgrupę 16SrV-C	64
Ryc. 15. Profil restrykcyjny izolatu O2.284 reprezentujący podgrupę 16SrI-S	64
Ryc. 16. Fragmenty drzewa filogenetycznego uwzględniającego sekwencje izolatów uzyskanych od nosicieli fitoplazm w kukurydzy	65
Ryc. 17. Wirtualny profil restrykcyjny izolatu uzyskanego od <i>M. laevis</i> .	66
Ryc. 18. Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie fragmentu genu 16S rRNA izolatów z grupy 16SrI. Badany izolot został oznaczony ▲. Dendrogram skonstruowano w programie MEGA X, metodą największej wiarygodności.	67
Ryc. 19. Rośliny pszenicy ozimej w teście infekcyjnym z <i>M. laevis</i> : A, B – jasne przebarwienia u odmiany Tytanika; C – rośliny odmiany Hondia.	68
Ryc. 20. Rośliny kukurydzy w teście infekcyjnym z <i>M. laevis</i> : A, B – odmiana Popis; C, D – odmiana Pokusa.	69
Ryc. 21. Wirtualny profil restrykcyjny izolatu uzyskanego od <i>P. alienus</i> .	73
Ryc. 22. Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie fragmentu genu 16S rRNA izolatów z grupy 16SrI. Badany izolot został oznaczony ▲. Dendrogram skonstruowano w programie MEGA X metodą największej wiarygodności.	73
Ryc. 23. Rośliny pszenicy w teście infekcyjnym z <i>P. alienus</i> : odmiana Tytanika - żółknięcia liści (A); porównanie rośliny zainfekowanej (po lewej) i niezainfekowanej (po prawej) (B); odmiana Hondia – porównanie roślin niezainfekowanych po 6 tygodniach od inokulacji (po lewej) i zainfekowanych (środek i po prawej) (C); odmiana Hondia - żółknięcie liści (D); odmiana Hondia - nadmierne krzewienie (E);	75

odmiana Hondia - zamieranie zainfekowanych roślin po 10 tygodniach od inokulacji (po lewej) i rośliny niezainfekowane (po prawej) (F)

Ryc. 24. Rośliny kukurydzy w teście infekcyjnym z *P. alienus*: chloroza górnych liści na odmianie Popis (A); rośliny zainfekowane (po lewej) i niezainfekowane (po prawej) (B); skrócone międzywęźla (C); przebarwienia liści (po lewej 3 liście pochodzą od zainfekowanych roślin, jeden liść po prawej liść od niezainfekowanej kukurydzy) (D); przebarwienia liści widoczne na odmianie Pokusa (E). 76