

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 11.05.2018. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Жељка Томановића и др Јелене Јовић о урађеној докторској дисертацији **Андреа М. Косовац**, истраживача-сарадника Института за заштиту биља и животну средину, под насловом „Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве преношења '*Candidatus Phytoplasma solani*'“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: проф. др Жељко Томановић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелена Јовић, виши научна сарадница Института за заштиту биља и животну средину у Београду и др Иво Тошевски, научни саветник Института за заштиту биља и животну средину у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ:

Докторска дисертација **Андреа М. Косовац** под насловом „Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве преношења '*Candidatus Phytoplasma solani*'“, написана је на 174 стране, садржи 25 слика и 12 табела. Текст дисертације је подељен у 8 основних поглавља: **Увод** (16 страна), **Циљеви** (1 страна), **Материјал и методе** (30 страна), **Резултати** (58 страна), **Дискусија** (26 страна), **Закључци** (3 стране), **Литература** (22 стране) и **Прилози** (18 страна). Рад садржи 195 литературних цитата, **Садржај**, као и **Сажетак** на српском и енглеском језику.

#### АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Поглавље **Увод** докторске дисертације садржи укупно пет потпоглавља у којима се на систематичан, јасан и разумљив начин представљају досадашња литературна сазнања о биологији, популационој генетици, специјализацији према биљкама домаћинима цикаде *Hyalesthes obsoletus* и њеној векторској улози у епидемиологији '*Candidatus Phytoplasma solani*' (столбур фитоплазма). У потпоглављу „**Таксономија, биологија и векторска улога *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865**“ представљена су досадашња знања о таксономији, биологији, екологији и распрострањењу врсте *H. obsoletus*, као и њеној улози у преношењу биљних патогена из групе фитоплазми. Посебан фокус је дат на епидемиолошкој улози и значају ове цикаде у преношењу '*Ca. P. solani*', асоцијацијама са различитим биљним врстама које су познати или потенцијални резервоари фитоплазми. У потпоглављу „**Биологија и епидемиологија фитоплазми ('*Candidatus Phytoplasma*')**“ је

сажето представљен историјат изучавања ових облигатних патогена биљака домаћина и инсеката вектора. Дат је приказ таксономије фитоплазми, описи симптома које узрокују на оболелим биљкама, начини преношења и облици епидемиолошких циклуса и путева ширења. Посебно је објашњен значај молекуларне карактеризације у таксономији фитоплазми, статус и правила описа врста кандидата ('*Candidatus Phytoplasma*'). Треће потпоглавље увода „*'Candidatus Phytoplasma solani'* – столбур фитоплазма: епидемиологија условљена вектором, путеви преношења и молекуларна идентификација“ приказује историјат изучавања, распрострањење, епидемиологију и путева преношења и ширења '*Ca. P. solani*' и *Bois noir* болести на виновој лози, посебно истичући улогу цикаде *H. obsoletus* у епидемиолошком циклусу. Објашњене су епидемиолошка специфичности различитих путева преношења у зависности од биљке резервоара патогена и географске области. У завршном потпоглављу увода „*Специјализација вектора H. obsoletus* према биљкама домаћинима и утицај на епидемиологију '*Ca. P. solani*'“ даје се преглед литературних података о специјализацији и генетичкој диференцијацији популација *H. obsoletus* у асоцијацији са различитим биљкама домаћинима које су истовремено домаћини патогена (дуални домаћин) у различитим географским областима распрострањења. Сумирани су досадашњи подаци о потенцијалним биљкама домаћинима у југоисточној Европи и њихов значај за специјализацију вектора и епидемиолошки циклус '*Ca. P. solani*' кроз генетичку сегрегацију вектора и генотипова патогена.

У оквиру поглавља **Циљеви**, изнет је непосредни, општи циљ докторске дисертације који истиче значај проучавања потенцијала криптичне специјације вектора *Hyalesthes obsoletus* као последице еколошке специјализације према биљци домаћину и утицаја ове диференцијације на епидемиолошке путеве преношења '*Ca. Phytoplasma solani*'. Из општег циља изведени су и специфични циљеви који на јасан и прецизан начин дефинишу главне правце докторске дисертације.

Поглавље **Материјали и методе** садржи укупно четири потпоглавља. Овако структурирано поглавље на систематичан и јасан начин даје описе методологије сакупљања и тестирања популација цикаде *H. obsoletus*, карактеристике и специфичности одабраних локалитета и популација инсеката за проучавање, детаље о молекуларној мултигенској карактеризацији популација домаћина и патогена '*Ca. Phytoplasma solani*' у асоцијацији са различитим домаћинима. У потпоглављу „*Популационо-генетичке анализе диверзитета H. obsoletus*“ приказана је методологија сакупљања материјала за популационо-генетичке анализе диверзитета вектора. Дат је детаљан приказ примењених метода недеструктивне екстракције ДНК из инсеката, анализе митохондријских и нуклеарних (микросателитских) маркера методом PCR и секвенцирањем. Објашњене су примењене методе за утврђивање генеалогije гена конструкцијом хаплотипске мреже употребом статистичке парсимоније и *median-joining* методе, као и филогенетске анализе. Приказане су методе утврђивања параметара молекуларног диверзитета, анализе молекуларне варијансе и тестирања  $F_{ST}$  индекса за утврђивање асоцијације између мтДНК варирања и различитих хијерархијских нивоа хаплотипске варијабилности. За тестирање деловања селекције или демографских процеса на популације *H. obsoletus* у виду одступања од претпоставки неутралне еволуције спроведени су тестови неутралности (Тацимин *D* тест и Фуов  $F_s$  тест). Приказане су методе анализе популационе структуре и диференцијације базиране на микросателитима. У следећем потпоглављу насловљеном „*Молекуларна детекција и карактеризација 'Ca. P. solani'* у популацијама *H. obsoletus*“ дат је детаљан приказ примењених метода идентификације '*Ca. P. solani*' методом PCR на STOL11 генском региону и метода карактеризације PCR-RFLP и секвенцирањем *tuf*, *stamp* и *trp1* гена. Потпоглавље „*Молекуларно-епидемиолошке анализе праћења путева*

**дисеминације 'Ca. P. solani' у природним системима медитеранских винограда**“ даје преглед методологије сакупљања *H. obsoletus* у асоцијацији са различитим биљкама дуалним домаћинима и карактеризације 'Ca. P. solani' у циљу утврђивања епидемиолошке повезаности путева преношења и утицаја на шишење *Bois noir* болести у медитеранским виноградима. Завршно потпоглавље **„Експерименти преношења 'Ca. P. solani' природно инфичираним популацијама *H. obsoletus*“** даје податке о методологији експерименталне процедуре укрштеног преношења 'Ca. P. solani' између различитих природних асоцијација вектора. Експерименти су спроведени у циљу утврђивања могућности преношења 'Ca. P. solani' *tuf-b* епидемиолошког типа популацијама вектора једне асоцијације на биљке домаћине друге две асоцијације.

Поглавље **Резултати** подељено је на укупно пет потпоглавља. Потпоглавље **„Локалитети узорковања *H. obsoletus* популација у асоцијацијама са различитим биљкама домаћинима“** приказује специфичности распрострањења, станишта и бројности популација *H. obsoletus* у асоцијацији са четири биљке домаћина (*C. arvensis*, *U. dioica*, *V. agnus-castus* и *C. foetida*) на ширем географском подручју југоисточне Европе. У потпоглављу **„Популационо-генетички диверзитет и варијабилност *H. obsoletus*“** приказани су резултати диверзитета и варијабилности митохондријских и микросателитских маркера унутар популација *H. obsoletus* у асоцијацији са четири биљке домаћина. Потпоглавље **„Генетичка диференцијација популација *H. obsoletus* специјализованих према биљкама домаћинима“** приказују филогенетске анализе диференцијације *H. obsoletus* популација у асоцијацији са биљкама домаћинима на 3 филогенетске групе: 1) *C. arvensis* и *U. dioica*, 2) *V. agnus-castus* и 3) *C. foetida*, и диференцијацију у односу на морфолошки најсроднију врсту, *Hyaalsthes thracicus*. Анализама структуре популација на основу микросателитских маркера, потврђена је сегрегација у три кластера према биљкама домаћинима. У потпоглављу **„'Ca. P. solani' инфичираност популација *H. obsoletus* специјализованих према биљкама дуалним домаћинима“** представљена је мултилокусна карактеризација и поређење локусних генотипова изолата 'Ca. P. solani' идентификованих у јединкама *H. obsoletus* популација у асоцијацији са различитим биљкама домаћинима. У завршном потпоглављу **„Молекуларна епидемиологија 'Ca. P. solani': утицај специјализације вектора према биљкама дуалним домаћинима на путеве дисеминације патогена“** приказани су резултати молекуларне карактеризације изолата 'Ca. P. solani' у природним епидемиолошким системима медитеранских винограда под инфекцијом *Bois noir* болести винове лозе. Представљени су резултати експерименталног унакрсног преношења 'Ca. P. solani' *tuf-b* епидемиолошког типа између асоцијација *ex C. arvensis*, *ex V. agnus-castus* и *ex C. foetida*.

Поглавље **Дискусија** подељено је на четири потпоглавља, која чине главне тематске целине дисертације, и представља упоредну анализу оригиналних резултата докторске дисертације и релевантних теоријских и емпиријских сазнања. Потпоглавље **„Генетичка дивергенција популација *H. obsoletus* као последица специјализације према биљци домаћину“** садржи упоредну анализу резултата докторске дисертације са доступним и релевантним истраживањима везаним за филогенију, популациону генетику и специјализацију вектора *H. obsoletus* у асоцијацији са четири биљке домаћина. Истакнута је генетичка хомогеност *H. obsoletus* у асоцијацији *C. arvensis* и *U. dioica* у југоисточној Европи, и генетичка диференцијација асоцијација *H. obsoletus* са *V. agnus-castus* и са *Crepis foetida*. У потпоглављу **„Таксономски статус *H. obsoletus*: потреба за интегративним приступом“** представљена је анализа диференцијације популација *H. obsoletus* у асоцијацији са биљкама домаћинима и утицај на таксономски статус врсте. У потпоглављу **„Биогеографска историја *H. obsoletus*“** дат је опис путева продора

различитих филогеографских линија *H. obsoletus* у асоцијацији са четири биљке домаћина (три линије) и географија ширења и мешања ових генетичких ентитета. У потпоглављу „Развој епидемиолошких путева ширења '*Ca. Phytoplasma solani*' под утицајем специјализације вектора“ сагледана је и продискутована улога *H. obsoletus ex Urtica dioica* у *tuf-b* епидемиологији '*Ca. P. solani*'; затим векторска улога *H. obsoletus ex V. agnus-castus* и укрштање *tuf-b* епидемиологије '*Ca. P. solani*' *ex V. agnus-castus* и *C. arvensis*; и укрштање *tuf-b* путева дисеминације '*Ca. P. solani*' и векторска улога три асоцијације у епидемиологији *Bois noir* болести винове лозе.

У поглављу **Закључци**, сажето и јасно су изнети најважнији закључци засновани на анализама добијених експерименталних и теренских резултата. Закључено је да су популације *H. obsoletus* на територији југоисточне Европе у асоцијацији са једном од четири биљке домаћина: *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Vitex agnus-castus* и *Crepis foetida*. Популационо-генетичким анализама митохондријских и нуклеарних маркера (микросателита) утврђена је криптична диференцијација *H. obsoletus* популација на три генетичке линије условљене биљком домаћином: 1) *C. arvensis* и *U. dioica*, 2) *V. agnus-castus* и 3) *C. foetida*. Анализе диверзитета, варијабилности, генеалогичке и филогеније митохондријске ДНК показале су дивергенцију између три детектоване генетичке групе од 1.1% до 1.5%. Дистанце на нивоу mtDNA између *H. obsoletus* асоцијација и најсродније врсте *Hyalesthes thracicus*, варирају између 2.1% и 3.3% указују на криптичну специјацију унутар врсте *H. obsoletus*. Анализе популационо-генетичке структуре базиране на микросателитима, потврдиле су раздвајање популација у један од три генетичка кластера условљена биљком домаћином. Раздвајање популација *H. obsoletus* условљено специјализацијом према биљци домаћину забележено је и на независно анализираним синтопским локалитетима асоцијација *C. arvensis/C. foetida*, *U. dioica/C. foetida* и *U. dioica/V. agnus-castus*. Митохондријске ДНК анализе су указале на генеолошку сродност популација *V. agnus-castus* из источног медитерана са хаплотиповима популација *C. foetida* асоцијације што указују на процес преласка на новог домаћина који се највероватније догодио на подручју Блиског истока. Резултати параметра тестова неутралности показали су статистички значајан сигнал експанзије популација асоцијације са *U. dioica* на ширем подручју југоисточне Европе. За све четири биљке домаћина *H. obsoletus* у југоисточној Европи и асоциране популације инсекта, утврђена је природна инфицираност са '*Ca. Phytoplasma solani*' и њихова епидемиолошка улога. У јединкама *H. obsoletus* и биљкама дуалним домаћинима на територији југоисточне Европе детектовано је укупно 29 '*Ca. P. solani*' MLST генотипова окарактерисаних на три гена: *tuf*, *stamp* и *vmpl*. *Tuf-a/-ab* епидемиолошки тип '*Ca. P. solani*' везан је искључиво за *U. dioica* асоцијацију вектора. *Tuf-b* епидемиолошки тип '*Ca. P. solani*' везан је за *C. arvensis*, *V. agnus-castus* и *C. foetida* асоцијације вектора чије се епидемиологије преклапају и укрштају. Експериментима трансмисије '*Ca. P. solani*' на огледне биљке утврђена је векторска улога *H. obsoletus* асоцијација са *C. arvensis*, *V. agnus-castus* и *C. foetida* у епидемиологији CPs-индуковане *Bois noir* болести винове лозе у југоисточној Европи.

Поглавље **Литература** садржи листу од 195 библиографске јединице. Наведене научне публикације су актуелне и односе се на области које су од значаја за урађену дисертацију. Наведене библиографске јединице коришћене су на прикладан начин и доприносе општем разумевању садржаја докторске дисертације.

Поглавље **Прилози** има укупно шест делова. Први прилог приказује преглед литературних података о биљкама које се доведе у везу са *H. obsoletus*; други прилог наводи листу раније публикованих *H. obsoletus* митохондријских хаплотипова присутних у Европи и Израелу; трећи прилог наводи листу новоописаних митохондријских

хаплотипова *H. obsoletus*; четврти прилог приказује вредности тестова неутралности на нивоу сваке од четири *H. obsoletus* асоцијације; пети прилог садржи податке о молекуларној варијанси *H. obsoletus* популација груписаних према асоцијацији са биљком домаћином или географији; а шести прилог наводи разлике у диверзитету '*Ca. P. solani*' MLST генотипова детектованих у оквиру четири епидемиолошка циклуса који отпочињу од специфичне биљке домаћина. Представљени табеларно, прилози на адекватан начин употпуњују главни текст докторске дисертације.

### Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

#### Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Kosovac A.**, Johannesen J., Krstić O., Mitrović M., Cvrković T., Toševski I., Jović J. **M21** (2018): Widespread plant specialization in the polyphagous planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae), a major vector of stolbur phytoplasma: Evidence of cryptic speciation. *PLoS ONE* 13(5): e0196969. IF 2.806  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196969>
2. **Kosovac A.**, Radonjić S., Hrnčić S., Krstić O., Toševski I., Jović J. **M21** (2016): Molecular tracing of the transmission routes of bois noir in Mediterranean vineyards of Montenegro and experimental evidence for the epidemiological role of *Vitex agnus-castus* (Lamiaceae) and associated *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Plant Pathology*, 65(2), 285-298. IF 2.425  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppa.12409>
3. Mitrović M., Jakovljević M., Jović J., Krstić O., **Kosovac A.**, Trivellone V., Jermini **M21** M., Toševski I., Cvrković T. (2016): '*Candidatus* Phytoplasma solani' genotypes associated with potato stolbur in Serbia and the role of *Hyalesthes obsoletus* and *Reptalus panzeri* (Hemiptera, Cixiidae) as natural vectors. *European Journal of Plant Pathology* 144(3), 619-630. IF 1.478  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-015-0800-y>
4. Radonjić S., Hrnčić S., **Kosovac A.**, Krstić O., Mitrović M., Jović J., Toševski I. **M21** (2016): First Report of '*Candidatus* Phytoplasma solani' Associated With Potato Stolbur Disease in Montenegro. *Plant Disease* 100(8), 1775-1775. IF 3.173  
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-16-0180-PDN>

#### Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **Kosovac A.**, Jakovljević M., Krstić O., Cvrković T., Mitrović M., Toševski I., Jović J. **M52** (2014): *Crepis foetida* L. – Nova biljka domaćin cikade *Hyalesthes obsoletus* Signoret 1865 (Hemiptera: Cixiidae), vektora stolbur fitoplazme. *Zaštita bilja* 65(1), 7-14.

#### Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Kosovac A.**, Krstić O., Jakovljević M., Cvrković T., Mitrović M., Toševski I., Jović J. **M33** (2016): Elucidation of '*Candidatus* Phytoplasma solani' epidemiology through trac(k)ing transmission pathways using field, experimental and molecular data. *Mitteilungen Klosterneuburg* 66(1), Suppl., 9-11. *Proceedings of the 4rd European Bois Noir Workshop*.
2. **Kosovac A.**, Johannesen J., Krstić O., Mitrović M., Cvrković T., Toševski I., Jović J. **M33** (2016): Is *Hyalesthes obsoletus* a species complex undergoing cryptic speciation? More evidence of host-associated genetic differentiation in Southeast Europe. *Mitteilungen Klosterneuburg* 66(1), Suppl., 24-25. *Proceedings of the 4rd European Bois Noir Workshop*.

3. **Kosovac A.**, Radonjić S., Hrnčić S., Krstić O., Toševski I., Jović J. (2016): The role of *Vitex agnus-castus* and associated *Hyalesthes obsoletus* in the epidemiology of Bois noir in Mediterranean vineyards. *Mitteilungen Klosterneuburg* 66(1), Suppl., 1-3. *Proceedings of the 4rd European Bois Noir Workshop*. **M33**
4. **Kosovac A.**, Johannesen J., Krstić O., Mitrović M., Cvrković T., Maixner M., Toševski I., Jović J. (2013): Microsatellite and mtDNA evidence for genetic differentiation of *Hyalesthes obsoletus* populations associated with a new major host, stinking hawk's-beard (*Crepis foetida*), in Southeast Europe. *Proceedings of the 3rd European Bois Noir Workshop*, pp.18-19. **M33**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M**
2. **M**

## МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидата **Андреа М. Косовац**, под насловом „Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве преношења '*Candidatus Phytoplasma solani*'“ представља свестрано урађен, комплексан научни рад утемељен у најновијим сазнањима из области популационе генетике и еколошке специјализације фитофагних инсеката вектора биљних болести. Дисертација садржи јасно формулисане циљеве који су засновани на добром познавању научне проблематике и потреби за изучавањем генетичке диференцијације популација вектора фитоплазме кроз фокус утицаја биљака домаћина на еколошку специјализацију и криптичну специјацију са импликацијама на путеве дисеминације патогена и епидемиолошке циклусе болести. Имајући у виду да се тема докторске дисертације односи на нове правце истраживања утицаја биљака домаћина на специјализацију и генетичку диференцијацију популација инсеката вектора и епидемиолошке путева дисеминације патогена, може се закључити да резултати ове дисертације представљају оригинални научни допринос у сагледавању утицаја биљака домаћина на криптичну специјацију фитофагних инсеката вектора фитоплазме и епидемиолошке циклусе патогена.

Током израде дисертације **Андреа М. Косовац** је показала изузетне вештине у реализацији истраживачког поступка експерименталног тестирања односа биљка домаћин-инсект вектор-патоген и анализа популационо-генетичког диверзитета инсеката вектора и фитоплазме, висок степен самосталности у експерименталном раду, дефинисању хипотеза и циљева рада, обради добијених података и теоријски заснованом тумачењу резултата студије.

На основу увида у експериментални рад, прегледане докторске дисертације и постигнутих резултата, Комисија закључује да су задаци, постављени у циљу и програму, који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, у потпуности испуњени и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватање позитивне оцене докторске дисертације **Андреа М. Косовац** под насловом „Утицај биљке домаћина на криптичну диференцијацију популација вектора *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865 (Hemiptera: Cixiidae) и епидемиолошке путеве преношења '*Candidatus Phytoplasma solani*'“ и кандидату омогући јавну одбрану рада.

У Београду, 08.06.2018. године.

**КОМИСИЈА:**

---

др Жељко Томановић, редовни професор,  
Универзитет у Београду-Биолошки факултет

---

др Јелена Јовић, виша научна сарадница,  
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

---

др Иво Тошевски, научни саветник,  
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд