

Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja

Smiljanić, Vanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:882948>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE I IDENTIFIKACIJE
ŠTETNIKA U ZAŠTITI BILJA**

ZAVRŠNI RAD

Vanja Smiljanić

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Preddiplomski studij:
Fitomedicina

**MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE I IDENTIFIKACIJE
ŠTETNIKA U ZAŠTITI BILJA**

ZAVRŠNI RAD

Vanja Smiljanić

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Maja Čačija

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Vanja Smiljanić**, JMBAG 0178127247, izjavljujem da sam samostalno izradila završni rad
pod naslovom:

MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE I IDENTIFIKACIJE ŠTETNIKA U ZAŠTITI BILJA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga završnog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj završni rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga završnog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI ZAVRŠNOG RADA

Završni rad studentice **Vanja Smiljanić**, JMBAG 0178127247, naslova

MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE I IDENTIFIKACIJE ŠTETNIKA U ZAŠTITI BILJA

mentor je ocijenio ocjenom _____.

Završni rad obranjen je dana _____ pred povjerenstvom koje je prezentaciju ocijenilo ocjenom _____, te je studentica postigla ukupnu ocjenu¹

_____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--------------------------------|--------|-------|
| 1. | Izv. prof. dr. sc. Maja Čačija | mentor | _____ |
| 2. | _____ | član | _____ |
| 3. | _____ | član | _____ |

¹ Ocjenu završnog rada čine ocjena rada koju daje mentor (2/3 ocjene) i prosječna ocjena prezentacije koju daju članovi povjerenstva (1/3 ocjene).

Zahvala

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Maji Čačija na pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog završnog rada. Zahvaljujem obitelji i prijateljima na potpori i pomoći.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada	1
2. Pregled literature	2
2.1. Detekcija i identifikacija štetnika klasičnim metodama	2
3. Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika	5
3.1. Izolacija DNA	5
3.2. Sekvenciranje DNA	6
3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	8
3.4. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP)	10
3.5. DNA barkodiranje	11
3.6. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP)	13
3.7. Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP)	14
3.8. Jednočlani konformacijski polimorfizam (SSCP)	15
4. Primjeri primjene molekularnih metoda u zaštiti bilja	17
5. Primjena molekularnih metoda u istraživanju rezistentnosti.....	23
6. Prednosti i nedostaci molekularnih metoda detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja	26
7. Zaključci.....	27
8. Popis literature	28
Životopis.....	36

Sažetak

Završnog rada studentice **Vanja Smiljanić**, naslova

MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE I IDENTIFIKACIJE ŠTETNIKA U ZAŠTITI BILJA

Štetnici predstavljaju velik izazov za poljoprivredu jer smanjuju prinose i kvalitetu usjeva, prenose bolesti, utječu na globalnu dostupnost hrane i prihode poljoprivrednika. Praćenje štetnika i njihova pravilna identifikacija najvažniji su preduvjeti za uspješnu integriranu zaštitu bilja. U svrhu uspješne procjene rizika od štetnika, te posljedično i njihovog suzbijanja, važno je osigurati brzu, ekonomičnu i točnu detekciju i identifikaciju štetnika. Velik broj klasičnih metoda detekcije i identifikacije nezamjenjive su i dandanas, no ne garantiraju apsolutnu točnost i često su fizički i vremenski zahtjevnije. Molekularne metode sve se više koriste u detekciji i proučavanju biljnih štetnika, jer omogućuju bržu, osjetljiviju i kvantitativniju detekciju ciljanog organizma. One se temelje na analizi genomske ili genetičke građe te omogućuju bolje razumijevanje i upravljanje populacijama štetnih kukaca, otkrivanje genetskih varijacija i istraživanje rezistentnosti na pesticide. Metode su visoko osjetljive i omogućuju brzu identifikaciju u malim količinama, čime se smanjuje rizik od pogrešne identifikacije vrsta. Unatoč prednostima, ove metode su skuplje zbog potrebe za specijaliziranom opremom te zahtijevaju visoku stručnost za primjenu i analizu rezultata.

KLJUČNE RIJEČI: detekcija, identifikacija, molekularne metode, rezistentnost, štetnici

Summary

Of the final work - student **Vanja Smiljanić**, entitled

MOLECULAR METHODS OF PESTS DETECTION AND IDENTIFICATION IN PLANT PROTECTION

Pests present a significant challenge to agriculture by reducing crop yields and quality, spreading diseases, affecting global food availability, and impacting farmers' incomes. Monitoring pests and their correct identification are the most important prerequisites for successful integrated plant protection. To successfully assess the risk of pests, and consequently their suppression, it is important to ensure fast, economical and accurate detection and identification of pests. Many classic methods of detection and identification are indispensable even today, but they do not guarantee absolute accuracy and are often physically and time-consuming. Molecular methods are increasingly used in the detection and study of plant pests, as they enable faster, more sensitive and more quantitative detection of the target organism. They are based on the analysis of genomic or genetic material and enable a better understanding and management of populations of harmful insects, detection of genetic variations and research on resistance to pesticides. The methods are highly sensitive and enable rapid identification in small quantities, reducing the risk of misidentifying species. Despite their advantages, these methods are more expensive due to the need for specialized equipment and require high expertise for application and analysis of results.

KEYWORDS: pest, molecular methods, detection, identification, resistance

1. Uvod

Štetnici predstavljaju konstantan izazov u zaštiti bilja koji ima utjecaj na produktivnost i kvalitetu usjeva širom svijeta. Štetnici mogu smanjiti prinose usjeva ili ih potpuno uništiti, što direktno utječe na prihod poljoprivrednika i na globalnu dostupnost hrane. Mnogi štetnici su prenositelji bolesti koje mogu prenijeti na biljke, što može dovesti do ozbiljnih bolesti biljaka i gubitaka usjeva. Putovanje i globalna trgovina mogu omogućiti brzo širenje štetnika na nove teritorije, što može izazvati ozbiljne probleme u novim sredinama (Turnock, 2012; Sheika, 2019).

Da bi se štetnici suzbili, sve je veća uporaba pesticida što može imati utjecaj na zdravlje ljudi i bioraznolikost. Da bi se riješili problemi štetnika u zaštiti bilja, ključni su pravovremena detekcija i identifikacija štetnika. Uvođenje različitih metoda detekcije i identifikacije u zaštiti bilja omogućuje pravovremeno prepoznavanje prisustva štetnika, prije nego nastupe ozbiljne štete te omogućuje primjenu odgovarajućih mjera suzbijanja (Codling, 2014; Sheikha, 2019). Precizna identifikacija štetnika omogućuje poljoprivrednicima da primjene manje količine pesticida ili da poduzmu neke druge mjere zaštite. Identifikacija štetnika koji su nosioci bolesti omogućuje brzo prepoznavanje potencijalne prijetnje biljci. Zbog ograničenja klasičnih ili tradicionalnih metoda u razlikovanju vrsta štetnika, osjetljivosti, potrebnog vremena za analizu, mogućnosti propuštanja latentne infekcije i nedostatka mogućnosti za automatsku analizu, pri identifikaciji i praćenju štetnih kukaca u zaštiti bilja javlja se sve veća potreba za uporabom molekularnih metoda.

Molekularne metode su u posljednjih nekoliko desetljeća postale ključne u detekciji, identifikaciji i praćenju štetnika biljaka. Ove metode omogućuju brzu, osjetljivu i preciznu detekciju štetnika, što rezultira učinkovitijom kontrolom i upravljanjem štetnim organizmima u poljoprivrednoj proizvodnji (Lazcka i sur., 2007). One predstavljaju skup tehnika koje se baziraju na analizi genetskog materijala štetnika. Koristeći tehnike kao što su PCR (lančana reakcija polimeraze), sekvenciranje DNA, DNA barkodiranje i druge, moguće je identificirati štetnike na molekularnoj razini, čak i kada su u pitanju latentne infekcije ili su štetnici u vrlo maloj brojnosti. One omogućuju preciznu identifikaciju vrsta, podvrsta i varijacija štetnika. Molekularne metode pridonose učinkovitom suzbijanju i postale su neizostavan alat u integriranoj zaštiti bilja (Tedersoo i sur., 2018).

1.1. Cilj rada

Cilj rada je pregledom literature opisati najvažnije molekularne metode koje se koriste u detekciji i identifikaciji štetnih kukaca, navesti mogućnosti primjene u zaštiti bilja te istaknuti njihove prednosti i nedostatke.

2. Pregled literature

2.1. Detekcija i identifikacija štetnika klasičnim metodama

Praćenje štetnika i njihova pravilna identifikacija najvažniji su preduvjeti za uspješnu integriranu zaštitu bilja. Postoje različite metode detekcije i identifikacije štetnika. Klasične metode, poput pregleda tla i biljaka, uporabe mamaca, feromona itd., neizostavni su alati i danas, ali nisu uvijek u mogućnosti dati potpuno kvantitativan i kvalitativan opis nekog štetnika. U novije vrijeme razvijaju se digitalni i automatski sustavi za praćenje štetnika koji bi omogućili bolju preciznost u detekciji i identifikaciji nekog štetnika (Pajač Živković i sur., 2020). Identifikacija štetnika omogućuje procjenu visine populacije, odnosno napad štetnika što pomaže u predviđanju napada i potrebe suzbijanja. Poljoprivredne kulture napada velik broj štetnika. Zbog toga je točna identifikacija vrste složena i zahtjevna. Ipak, praktičar mora moći znati identificirati štetnika barem do porodice ili roda, što dovodi do mogućnosti pretpostavke o kojemu se štetniku radi. Nakon obavljanja preliminarne identifikacije štetnika, koja uključuje pregled štetnika nađenog na biljci ili na alatu kojim je ulovljen, slijedi utvrđivanje štete. Sve to omogućuje točnu identifikaciju štetnika (Bažok, 2022).

Za identifikaciju glavnih skupina štetnika koristi se vizualna identifikacija, odnosno pregled biljaka ili drugih površina gdje se štetnici mogu nalaziti, te promatranjem morfoloških osobina štetnika. Da bi se štetnici izbliza identificirali, koriste se zamke za hvatanje. Korištenje referentnih materijala, mikroskopskih analiza i konzultacije sa stručnjacima, također mogu olakšati identifikaciju (Bažok, 2022).

Pregled tla na prisutnost štetnika moguć je kopanjem jama, uzimanjem uzoraka tla sondom, metodom „100 uboda“ i metodom ukopavanja zrnatih mamaca pod foliju. Utvrđivanje je moguće i pregledom podzemnih i nadzemnih dijelova biljke te primjenom entomološke mreže. Beskrilni oblici kukaca prate se pregledom biljnih organa, metodom „100 listova“ i metodom „100 buseva“. Utvrđivanje brojnosti štetnika različitim načinima lovljenja ili privlačenja moguće je prekrivanjem ili krčenjem tla, lovnim čašama, vizualnim mamcima i olfaktornim mamcima (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005).

Olfaktorni atraktanti su hranidbeni mamci koji se rabe za praćenje pojave štetnika, ali i za njihovo suzbijanje. Za praćenje pojave rabe se kiselo vino, ocat, hidrolizirani proteini, mirisi sjemena biljke angelike itd. Seksualni mamci, također su olfaktorni atraktanti tj., to su spojevi (feromoni) koje proizvode kukci radi reguliranja odnosa između jedinki istih vrsta. Mužjaci osjećaju miris ženki na velikim udaljenostima pa je to svojstvo iskorišteno. Kemijskim putem sintetizirani su mirisi ženki kojima se prati pojava štetnika. Feromoni su najčešće u obliku kapsula, stavljeni u klopke te su iznutra premazane nesušivim ljepilom. U Hrvatskoj se rabe

feromoni za praćenje velikog broja štetnika (jabukinog savijača, grozdovih moljaca, kukuruzne zlatice, sovice gama, kupusnog moljca, kupusne i povrtne sovice, žičnjaka i dr.) (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005).

Primjena svjetla i obojenih atraktanata također je bitna za praćenje štetnika. Lovne lampe privlače kukce svjetlošću. Moguće je praćenje štetnih vrsta leptira, posebice sovice. Lampe se postavljaju na četiri metra visine i upale u sumrak. Leptiri koji su privučeni padaju u posudu s eterom. Koriste se živine, UV i fluorescente lampe. Obojeni atraktanti rabe se u praćenju tako što štetnika privlače pojedine boje. Najčešće se koriste žute, plave i bijele ploče premazane nesušivim ljeplivom. Žute ljepljive ploče (slika 1.) rabe se za ulov trešnjine, maslinine i mediteranske voćne muhe, za praćenje lisnih uši, cvjetnog štitastog moljca, katkad kalifornijskog tripsa. Plave ploče (slika 2.) privlače tripse, a bijele se koriste za praćenje malinina pupara i šljivine osice. Lovne ljepljive trake i daske starija su metoda, zamjena su ljepljivim pločama (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005).



Slika 1. Žuta ljepljiva ploča

Izvor: <https://plantella.hr/proizvodi/bio-plantella-rumene-lepljive-plosce/>



Slika 2. Plava ljepljiva ploča

Izvor: <https://pseno.hr/novo-u-internet-trgovini-ljepljive-ploce/>

Pored klasičnih metoda, sve se više razvijaju inovativni uređaji („e-lovke“ ili „pametne lovke“) za automatsko praćenje štetnika čime se omogućava lakše i učinkovitije praćenje njihove populacije (Sciarretta i Calabrese, 2019; Živković i sur., 2020). Prednosti ovih uređaja su te što mogu pratiti populaciju štetnika 24 sata dnevno, svaki dan u godini, s različitih polja istovremeno te trajno spremite primljene podatke i fotografije (Potamitis i sur., 2017; Živković i sur., 2020). Pri pojavi štetnika automatski sustav za praćenje odmah ga identificira što omogućava ručni pregled snimljenih fotografija (Marić i sur., 2016; Živković i sur., 2020). Takvi sustavi unapređuju integriranu poljoprivredu tako što obavještavaju proizvođača o kritičnom broju štetnika putem računala ili mobilnog uređaja radi donošenja pravovremene odluke o zaštiti uzgajane kulture (Miresmailli i sur., 2009; Živković i sur., 2020). Uređaji za automatsko praćenje štetnika mogu slati podatke o brojnosti štetnika na središnje računalo koje pokreće model prognoziranja porasta populacije štetnika i obavještava korisnika o trenutku kada se očekuje da će populacija prijeći ekonomski prag štetnosti (Mul i sur., 2016; Živković i sur., 2020). Praćenje štetnika može pružiti uvid u učinkovitost primjene insekticidnog tretmana, smanjiti njihovu uporabu i pomoći pri boljem razumijevanju populacije štetnika u poljoprivredi (Potamitis i sur., 2017; Živković i sur., 2020).

Za praćenje jabukova savijača (*Cydia pomonella* L.) u istraživanju na Agronomskom fakultetu u Zagrebu koristila se Trapview-lovka. Trapview je automatizirani, digitalni sustav koji se koristi za praćenje različitih štetnika u ratarstvu, voćarstvu i vinogradarstvu. Ulov štetnika u ovome sustavu temeljen je na korištenju različitih atraktanata. Štetnici se fotografiraju i prebrojavaju u realnom vremenu. Svrha ovoga sustava je obavještavanje proizvođača o kritičnom broju štetnika putem računala ili mobilnog uređaja kako bi pravovremeno obavio tretiranje, tj. zaštitu kulture (Živković i sur., 2020).

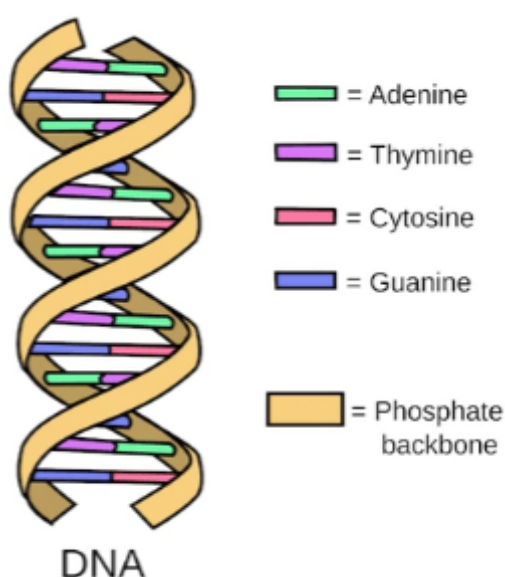
Također, brzina i učinkovitost detekcije mogu se povećati korištenjem tehnologije u automatskoj detekciji, poput termalnih kamera i akustičnih detektora. Primjer toga je *Rhynchophorus ferrugineus* (crvena palma pipa) koji je bitan štetnik palmi u mediteranskoj regiji, Aziji, sjevernoj Africi i Bliskom istoku. Akustičnu aktivnost *R. ferrugineus* proučavalo je nekoliko istraživača koji su zaključili da se zvuk koji proizvodi štetnik može izolirati i razlikovati od zvukova okoliša i drugih kukaca. Utvrđeno je da štetnik u stadiju ličinke ima konstantan zvuk prilikom žvakanja i grizenja, a tijekom kretanja se razlikuje (Mankin i sur., 2016).

Tradicionalne metode detekcije i identifikacije štetnika imaju nekoliko prednosti. One su jednostavne, zahtijevaju samo osnovnu opremu bez potrebe za naprednom tehnologijom pa su time i lako dostupne. Cijena ovih metoda je niža u usporedbi sa primjerice molekularnim metodama. Metode se mogu koristiti za identifikaciju širokog spektra štetnika. Postoji i nekoliko nedostataka klasičnih metoda. Vizualna inspekcija i morfološka analiza često ovise o iskustvu i vještini osobe, pa se mogu dobiti i netočni rezultati. One zahtijevaju puno vremena i radne snage, preciznost je ograničena, karakterizira ih visoka osjetljivost i nije moguće otkriti niske populacije (Radhika i sur., 2023).

3. Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika

3.1. Izolacija DNA

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je molekula koja nosi genetske informacije o svim živim organizmima. Ona sadrži upute potrebne za razvoj, funkcioniranje, rast i reprodukciju organizma. Molekula DNA građena je od dva polinukleotidna lanca koji su spiralno obavijeni jedan oko drugoga. Svaki nukleotid građen je od šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze (adenin, gvanin, citozin, timin) (slika 3.) (Plejić, 2021).

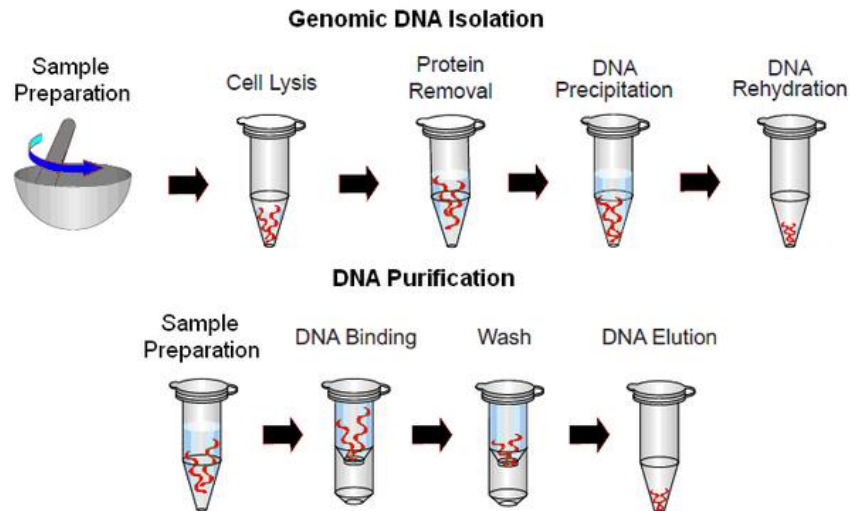


Slika 3. Struktura DNA

Izvor: <https://www.mometrix.com/academy/dna/>

Izolirana DNA koristi se za različite molekularne analize, kao što su sekvenciranje gena, PCR (lančana reakcije polimeraze), DNA barkodiranje i druge tehnike koje pomažu u identifikaciji i proučavanju štetnih kukaca. Izolacija DNA kod štetnih kukaca provodi se u nekoliko koraka. Prvi korak je prikupljanje uzoraka štetnih kukaca. Uzorci se mehanički ili kemijski razbijaju kako bi se stanice razgradile i da bi se oslobodila DNA. Taj korak uključuje mljevenje kukaca u tekućem dušiku, korištenje homogenizatora ili uporabu kemikalija koje razgrađuju stanične stjenke. Uzorci se tretiraju liza puferom koji sadrži deterdžente i enzime za razgradnju staničnih membrana i otapanje proteina. Taj korak oslobađa DNA u otopinu. Otopina se tretira proteinazom K za daljnju razgradnju proteina i RNazom za uklanjanje RNA. DNA se pročišćava organskim otapalima. Tim korakom dolazi se do odvajanja DNA od ostatka staničnih komponenti. Pročišćena DNA se često taloži dodavanjem hladnog alkohola, te

postaje vidljiva kao bijeli talog koji se sakuplja centrifugiranjem. Taložena DNA se ispiru hladnim alkoholom kako bi se uklonile nečistoće. Na kraju se taložena DNA otapa u puferu ili destiliranoj vodi za daljnje analize (slika 4.) (Alberts i sur., 2002).



Slika 4. Postupak izolacije DNA

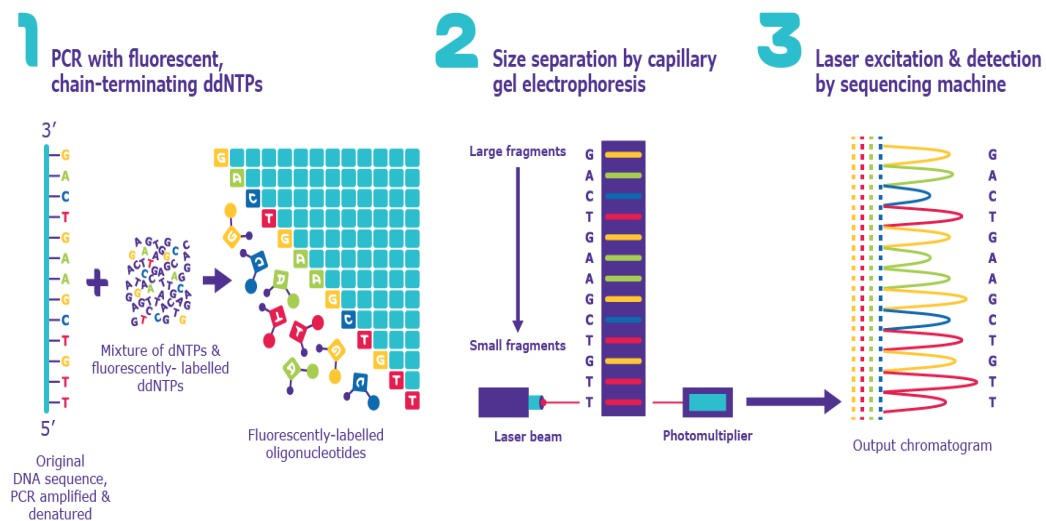
Izvor: <https://www.indiamart.com/proddetail/dna-extraction-kit-21293661691.html>

3.2. Sekvenciranje DNA

Sekvenciranje DNA je metoda koja omogućuje određivanje redoslijeda nukleotida u DNA molekuli. Metoda je izrazito značajna kod štetnih kukaca jer predstavlja ključni alat u mnogim istraživanjima i aplikacijama, uključujući poljoprivredu i ekologiju. Kao i kod ostalih metoda, istraživači i poljoprivrednici bolje razumiju i upravljaju populacijama štetnih kukaca, što dovodi do učinkovitijih strategija suzbijanja. Precizno sekvenciranje gena omogućuje razlikovanje morfološki sličnih vrsta, razumijevanje i praćenje otpornosti na pesticide, te mogućnost uvida u dinamiku populacija. Metode su različite. Po brzini, preciznosti, propusnosti, veličini fragmenata, te načinu njihove detekcije i analize, dijele se u tri generacije. Prvu generaciju čine Sangerova metoda i Maxam-Gilbertova metoda, u drugu generaciju ubrajaju se metode poput pirosekvenciranja i metode ligacijskog sekvenciranja, dok treću generaciju čine monomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu i sekvenciranje pomoću nanopora (Trupković, 2018).

Sangerova metoda (slika 5.), koristi se za određivanje redoslijeda nukleotida. Prvi korak je priprema uzorka DNA, odnosno ciljanog fragmenta DNA. Kratki segment DNA se veže za

početak ciljanog fragmenta DNA. Uzorak se razdijeli u četiri reakcijske smjese. Dobiveni fragmenti DNA se razdvajaju elektroforezom. Moguće je odrediti točnu poziciju svakog nukleotida jer svaki fragment završava različitim ddNTP-om. Fragmenti se detektiraju i redoslijed nukleotida se određuje pomoću veličine fragmenata i ugrađenih ddNTP-ova. Rezultati Sangerovog sekvenciranja su relativno jednostavni za interpretaciju, što omogućuje lakšu analizu i identifikaciju sekvenci (Russell i sur., 2002; Trupković, 2018).



Slika 5. Sangerova metoda sekvenciranja DNA

Izvor: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing->

Maxam-Gilbertova metoda temelji se na nasumičnom cijepanju svih vrsta nukleotidnih baza ovisno o korištenom agensu (DMS, hidrazin i dr.). Fragmenti su također detektirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (Trupković, 2018). Prednost ove metode je točnije očitavanje rezultata, bolje kontrolirani uvjeti izvedbe (Boland i sur., 1994.; Trupković, 2018), kao i mogućnost korištenja u različite svrhe, primjerice sekvenciranje genoma (Church i Gilbert, 1984; Trupković, 2018), lociranje rijetkih baza (Sayers i Waring, 1993; Trupković, 2018) i detektiranje mutacija (Ferraboli i sur., 1993; Trupković, 2018).

Metoda pirosekvenciranja temelji se na detekciji otpuštenog pirofosfata i emitiranog svjetla u reakcijama polimerizacije (Nyren i Lundin 1995; Trupković, 2018). Za razliku od prve generacije, brža je jer su koraci poput fluorescentnog označavanja primera i baza te gel elektroforeza potpuno izostavljeni (Ronaghi, 2001; Trupković, 2018).

Nadalje, razvijeno je monomolekularno sekvenciranje koje koristi samo jednu molekulu DNA. Za metodu je potreban poseban optički nanouređaj (ZMW) koji omogućuje uvjete za promatranje jednog nukleotida koji se veže na lanac DNA. Svaka baza označena je

drugačijom fluorescentnom bojom, čime se olakšava analiza nastalih fragmenata (Rhoads i Au, 2015; Trupković, 2018). Velika prednost ove metode je duljina očitavanja sekvenci. Uz dovoljne količine enzima, moguće je sekvenciranje oba lanca DNA molekule, što olakšava detektiranje i analizu fragmenata (Eid i sur., 2009; Trupković, 2018).

Razvijena je i novogeneracijska metoda, sekvenciranje nanoporama, koja ne koristi fluorescentno označavanje baza. Fragmenti DNA prolaze kroz nanopore i time stvaraju naboj u gustoći električnog strujanja koji se potom izračunava i analizira na uređaju (Greninger i sur., 2015; Trupković, 2018). Nanopore mogu biti biološke ili krute, a svaka vrsta ima svoje prednosti. Prednost bioloških nanopora je ujednačenija struktura i raznolikost membranskih proteina koji mogu detektirati pojedine baze (Stoddart i sur., 2009; Trupković, 2018), dok su krute nanopore dugotrajnije i izdržljivije (Chang i sur., 2012; Trupković, 2018).

3.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

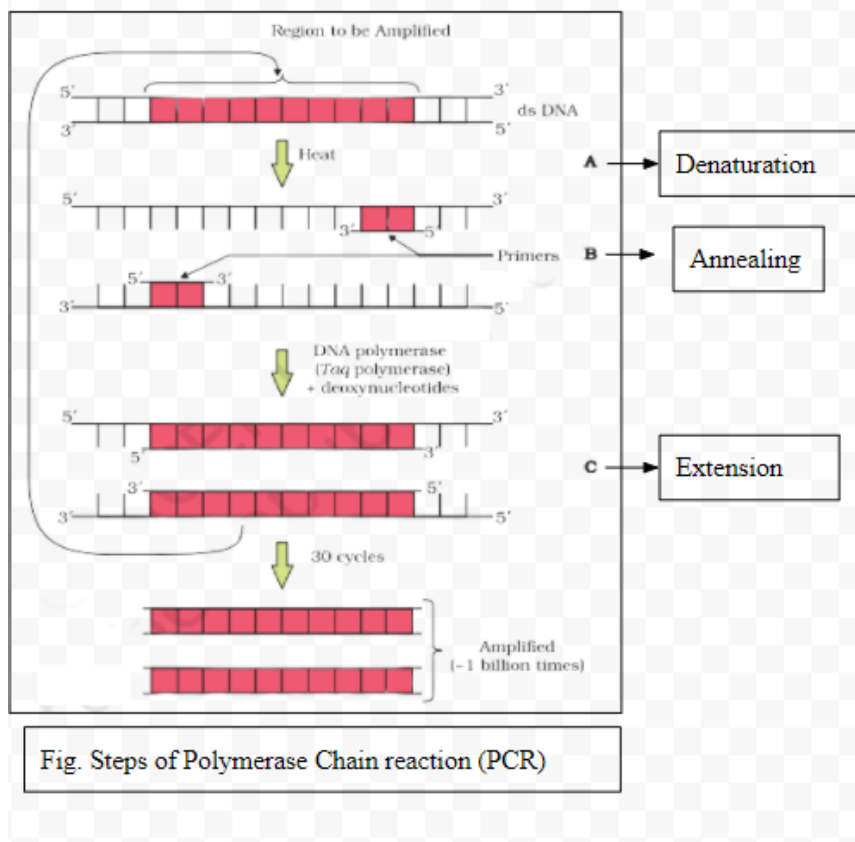
Lančana reakcije polimerazom ili polimerazna lančana reakcija (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) metoda je kojom se kratki dio DNA umnožava u velik broj identičnih kopija. Ovu metodu je otkrio i opisao 1983. godine Karry Mullis. Navedena metoda je izvršila presudni utjecaj na primjenu molekularno-bioloških metoda u znanstvenim istraživanjima. PCR predstavlja oblik „*in vitro* kloniranja“ koji može generirati, kao i modificirati fragmente DNA definirane duljine i sekvence u reakciji. Reakcijska smjesa za PCR sadrži DNA polimerazu, deoksinukleotide, ciljano specifične oligonukleotidne početnice i odgovarajući pufer za optimalnu aktivnost i stabilnost DNA polimeraze (Erlich, 1989).

Faze PCR reakcije su (Erlich, 1989):

- 1) toplinska denaturacija dvolančane DNA na 94-96 °C, 20-30 sekundi,
- 2) spajanje početnica na temperaturi 50-60 °C, 20-40 sekundi,
- 3) produljenje početnica na temperaturi oko 72 °C, 30-60 sekundi.

Tijekom toplinske denaturacije, dvočlana DNA denaturira se na dvije odvojene niti (slika 6.). Zatim se reakcijske smjese ohlade na temperaturi koja dopušta početnicama da se spajaju na ciljane sekvence odvijanih lanaca DNA. Tijekom produljenja početnica, DNA polimeraza tvori novi lanac produžujući vezane početnice s nukleotidima stvarajući komplementarnu kopiju ciljane DNA sekvence. Kod ponovljenog ciklusa, eksponencijalno dolazi do povećanja broja ciljanih sekvenci (Erlich, 1989). Produkti PCR amplifikacije

vizualiziraju se na gelu za elektroforezu, u obliku traka bojanjem etidij-bromidom (Erlich, 1989).



Slika 6. Faze PCR reakcije

Izvor: <https://byjus.com/question-answer/identify-and-explain-steps-a-b-and-c-in-the-pcr-diagram-given-below/>

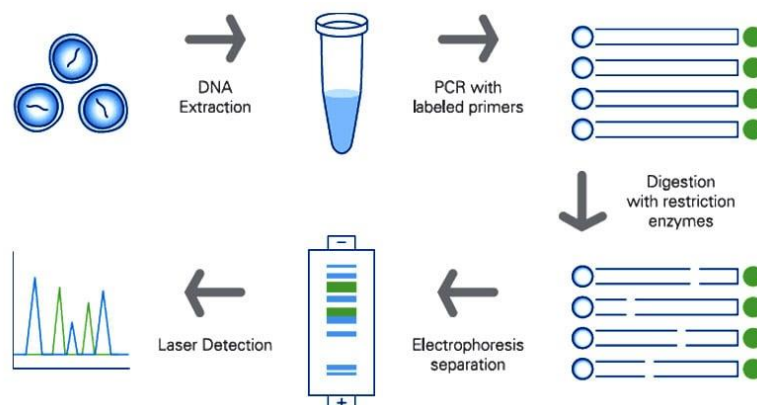
PCR kod štetnih kukaca koristi se za amplifikaciju specifičnih sekvenci DNA koje pomažu u identifikaciji vrsta, otkrivanju genetskih varijacija, istraživanju otpornosti na pesticide i drugim genetičkim analizama. Prednosti ove tehnike su te da daje brze i precizne podatke, a to omogućuje djelovanje u smislu sprečavanja daljnjeg širenja štete i bolesti. PCR može umnožiti traženu sekvencu nukleinske kiseline bilo kojeg porijekla velik broj puta u nekoliko sati. Nedostatci metode očituju se u mogućem dobivanju pogrešnih pozitivnih rezultata. Prilikom provođenja ove metode važno je voditi računa o apsolutnoj čistoći radnog prostora, aparata i potrošnog materijala (Strunjak Perović i Topić Popović, 1999).

3.4. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP)

Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (*Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)) predstavlja najosjetljiviji alat za otkrivanje razlika DNA unutar ili između vrsta. RFLP je bio važan alat u istraživanju genetičkih varijacija prije pojave modernijih tehnika poput sekvenciranja DNA. Ova tehnika omogućuje analizu genetičke varijabilnosti unutar populacija ili između različitih vrsta štetnih kukaca. U ovoj metodi prvo se ekstrahira DNA iz kukaca, zatim se uzorak DNA reže restrikcijskim enzimima koji prepoznaju specifične nizove baznih parova i režu DNA na određenim mjestima. Nakon što su DNA fragmenti izrezani provodi se elektroforeza na agaroznom gelu. Fragmenti se odvajaju prema veličini. DNA fragmenti prenose se s gela na membranu pomoću tehnike *Southern blotting*. Membrana se inkubira s DNA sondom koja je komplementarna specifičnim sekvencama unutar fragmenta DNA. Sonda veže odgovarajuće fragmente. Nakon hibridizacije, membrana se izlaže autoradiografskom filmu ili nekoj drugoj metodi detekcije (slika 7.) (Beckmann i Soller, 1986).

Molekularna osnova RFLP-a leži u gubitku ili dobitku restrikcijskog mjesta zbog točkaste mutacije unutar sekvence prepoznavanja enzima, ili zbog molekularnog događaja poput umetanja, brisanja ili inverzije. Obje situacije rezultiraju razlikom u duljini genomskih restrikcijskih fragmenata koji se mogu otkriti na Southern blotovima (Beckmann i Soller, 1986).

RFLP markeri su genetski markeri s nekoliko prednosti u usporedbi s konvencionalnim markerima. Oni opisuju izravno genotip umjesto fenotipa i stoga nisu pod utjecajem okoliša. Broj RFLP markera koji se mogu mapirati ograničen je samo molekularnim razlikama koje postoje između dostupnih genotipova. RFLP donosi važan doprinos molekularnoj genetici uzgoja biljaka (Beckmann i Soller, 1986).



Slika 7. Tijek provedbe metode RFLP

Izvor: <https://microbenotes.com/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp/>

3.5. DNA barkodiranje

DNA barkodiranje ili genska identifikacija vrsta je standardizirani molekularni sustav identifikacije vrsta. Ova metoda ubrzano se počela razvijati tijekom 1990-ih godina (Polak, 2012). Pojedini dijelovi DNA omogućuju diskriminaciju između vrsta, populacija, odnosno jedinki. Najčešće se za identifikaciju vrsta koriste kratki odsječci mitohondrijske DNA koji se nazivaju „barcode“. DNA barkodiranje je skup kratkih genetičkih markera koji se koristi za identifikaciju i klasifikaciju vrsta. Paul Hebert i ostali istraživači su u Kanadi, 2002. godine predložili DNA barkodiranje kao nov način identifikacije vrsta, koji je baziran na kratkim sekvencama DNA. Ovo otkriće omogućuje identifikaciju vrsta čak i kada to nije moguće pomoću morfoloških karakteristika, kao što je slučaj kada se jedinka nalazi u nezreloj fazi razvoja ili kada se vrsta morfološki adaptirala u novoj sredini (Hebert i sur., 2002).

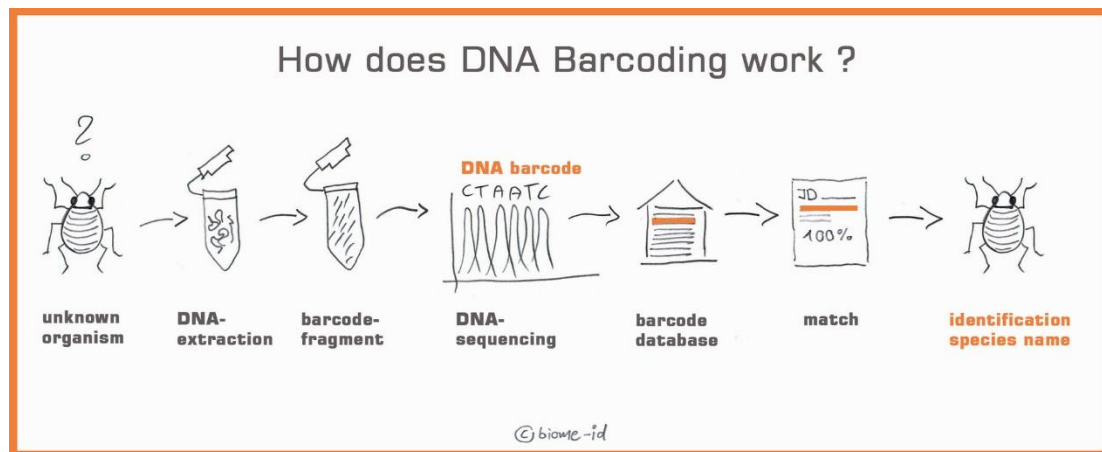
Idealan sustav DNA barkodiranja trebao bi ispunjavati sljedeće kriterije (Valentini i sur., 2009):

- 1) Sekvencirana regija gena trebala bi biti gotovo identična jedinki iste vrste, ali različita među vrstama;
- 2) Ciljana regija DNA treba sadržavati dovoljno filogenetičke informacije za dodjeljivanje nepoznatih ili još ne kodiranih vrsta u njihovu taksonomsku skupinu;
- 3) Ciljana regija treba biti dovoljno kratka da se dopusti umnožavanje degradirane DNA;
- 4) Trebao bi biti standardiziran, s istom regijom DNA koja se koristi za različite taksonomske skupine;
- 5) Trebao bi biti izuzetno robustan, s izrazito očuvanim početnim mjestima i visokim umnožavanjem i sekvenciranjem DNA.

Dakle, idealni marker za barkodiranje trebao bi biti varijabilan, standardiziran, filogenetski informativan, izuzetno robustan i kratak. Takav marker još ne postoji ili nije pronađen (Valentini i sur., 2009).

Tipičan tijek barkodiranja (slika 8.) jest da se prvo od uzorka koji treba biti barkodiran uzima uzorak tkiva (npr. noga kukca). Iz uzetog uzorka izolira se DNA, razbijanjem staničnih membrana pomoću različitih tehnika. Sljedeći korak je amplifikacija DNA pomoću polimerazne lančane reakcije (PCR). PCR omogućava umnožavanje odabranih dijelova DNA (Floyd i sur., 2010). Za barkodiranje se obično koristi specifičan gen ili dio gena koji je dovoljno konzerviran unutar vrsta, kao što je COI gen (citokrom c oksidaza I) kod životinja (Hebert i sur., 2002). Protein citokrom oksidaza označen kao podjedinica 1 (COI) dobro je očuvan kod svih aerobnih organizama i biokemijski dobro istražen. On sudjeluje u transportu elektrona i stoga je važan

u procesu oksidativne fosforilacije i protona na unutarnjoj membrani mitohondrija. Upotrebom univerzalnih robusnih početnica moguće ga je umnožiti kod gotovo svih životinjskih koljena. Brzina molekularne evolucije ovog gena je i do tri puta veća u odnosu na gene za rRNA te omogućuje razlikovanje ne samo vrsta nego i divergentnih linija unutar vrsta (Hebert i sur., 2002; Ćukušić i sur., 2019). Amplificirani fragmenti DNA se potom sekvenciraju. Dobivene DNA sekvence se uspoređuju s postojećim sekvencama u bazama podataka (*Barcode of Life Data Systems* - „BOLD“) analizom sličnosti i razlika u sekvencama, te se tako određuje identitet vrste i moguće je otkriti nove vrste (Floyd i sur., 2010).



Slika 8. Tijek DNA barkodiranja

Izvor: <https://www.biome-id.com/english-1/molecular-services-1/dna-barcoding/>

Kako bi određivanje nepoznatih DNA barkodova funkcioniralo, za usporedbu je potrebna opsežna baza DNA barkodova poznatih vrsta s pridruženim morfološkim određenim primjercima. Ratnasingham i Hebert su 2007. godine uspostavili BOLD bazu. BOLD je baza DNA barkodova (za carstva Animalia, Plantae, Fungi i Protista) i bioinformatička platforma koja omogućuje korisnicima određivanje svojstava, upravljanje podacima, analizu sekvenci te korištenje statističkih metoda za rekonstrukciju filogenetskih stabala. BOLD baza komunicira između postojećih genetičkih repozitorija kao što je *National Center for Biotechnology Information* – NCBI i *Global Biodiversity Information Facility* - GBIF, odnosno povučene su i postojeće COI sekvence iz Banke gena – *GenBank* (Ratnasingham i Hebert 2007; Ćukušić i sur., 2019). U cilju stvaranja nacionalnih baza DNA barkod sekvenci pojedine države pokreću inicijative za barkodiranje života (npr. ABOL – Austrija, GBOL – Njemačka, FinBol – Finska itd.). Razvijaju se i kampanje s ciljem prikupljanja DNA barkodova svih vrsta unutar specifičnih taksonomskih grupa (npr. za mrave *Formicidae barcode of life*, za ptice *All Birds Barcoding Initiative*, za tulare *Trichoptera Barcode of Life* itd.). Cilj je stvoriti opsežu referentnu bazu podataka sa DNA barkodovima živog svijeta. Budući da vrste brzo nestaju klasična taksonomija ne stigne ih opisati (Waterton i sur., 2013; Ćukušić i sur., 2019).

Prednosti DNA barkodiranja su višestruke. Primjeri su identifikacija vrste u bilo kojoj fazi rasta i razvoja, identifikacija prijenosnika bolesti, identifikacija štetnika u poljoprivredi u bilo kojem stadiju razvoja čime je omogućena kontrola nad njima i manja uporaba pesticida te zaštita prirodnih resursa kao i zaštita ugroženih vrsta (Rizvanović Smajlović i Elez Burnjaković, 2013). Nedostatak DNA barkodiranja je taj da ne može otkriti sve kandidate neopisanih vrsta, posebno za nedavno divergentne skupine (Ustugi i sur., 2011).

DNA barkodiranje, osim u taksonomiji, koristi se i u:

- a) suzbijanju poljoprivrednih štetnika – određivanje štetnika u bilo kojem razvojnom stadiju omogućuje bolju kontrolu i smanjuje troškove;
- b) određivanje vektora zaraze – omogućuje stručnjacima koji nisu biolozi da prepoznaju vektore patogena kao što su pojedine vrste komaraca;
- c) kontroli ilegalne trgovine – omogućuje određivanje bioloških materijala i tako omogućuje sprječavanje unosa nedozvoljenih proizvoda ili živih primjeraka skupina čija trgovina je zabranjena;
- d) zaštiti rijetkih životinja – omogućuje kontrolu podrijetla hrane i proizvoda od ugroženih životinja koji se mogu naći na tržištu;
- e) prehrambenoj i kozmetičkoj industriji – omogućuje određivanje sadržaja proizvoda i time kontrolu točnosti podataka navedenih na deklaraciji (Kaur 2015; Ćukušić i sur., 2019).

3.6. Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP)

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (*Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)) je novija metoda koja provodi analizu cijeloga genoma. Ova se metoda koristi za identifikaciju i proučavanje genetskih varijacija na nivou jednog nukleotida u DNA. Kroz genotipizaciju pomoću SNP metode moguće je analizirati genetsku strukturu, diferencijaciju, protok gena, rasprostranjenost i sposobnost prilagodbe štetnika (Brumfield i sur., 2003; Kadoić Balaško i sur., 2022).

Prvi korak ove metode jest prikupljanje uzoraka. DNA se izolira iz uzorka pomoću ekstrakcije. Određuju se specifični SNP markeri koji će se analizirati. Ciljani dijelovi DNA koji sadrže SNP- ove amplificiraju se pomoću PCR-a. Slijedi sekvenciranje amplificiranih produkata i identifikacija SNP-ova (Hartl i Jones, 1992).

Prednosti ove metode su mogućnost detekcije malih genetskih varijacija sa visokom preciznošću. Metoda je brza i jednostavna te se može koristiti za širok spektar istraživačkih ciljeva (Brumfield i sur., 2003; Kadoić Balaško i sur., 2022).

3.7. Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP)

Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (*Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)) jedna je od metoda izotermalne amplifikacije nukleinskih kiselina. Prednosti ove metode su visoka specifičnost, što je posljedica uporabe 4-6 početnica, dizajniranih da prepoznaju 6-8 različitih regija u ciljanoj DNA sekvenci. Reakcija se odvija na jednoj temperaturi, obično 60-65°C, pa za izvođenje LAMP-a nije potrebna upotreba termociklera za preciznu izmjenu temperature u zavisnosti od faze reakcije, koji je neophodan za izvođenje PCR-a. LAMP metoda ne zahtjeva prethodno izdvajanje DNA ili RNA molekula (Ognjanović, 2022).

Reakcija LAMP metode najčešće je podijeljena na tri faze (Ognjanović, 2022):

- 1) Stvaranje početnog materijala za reakciju,
- 2) Ciklična amplifikacija,
- 3) Elongacija sa reciklizacijom,

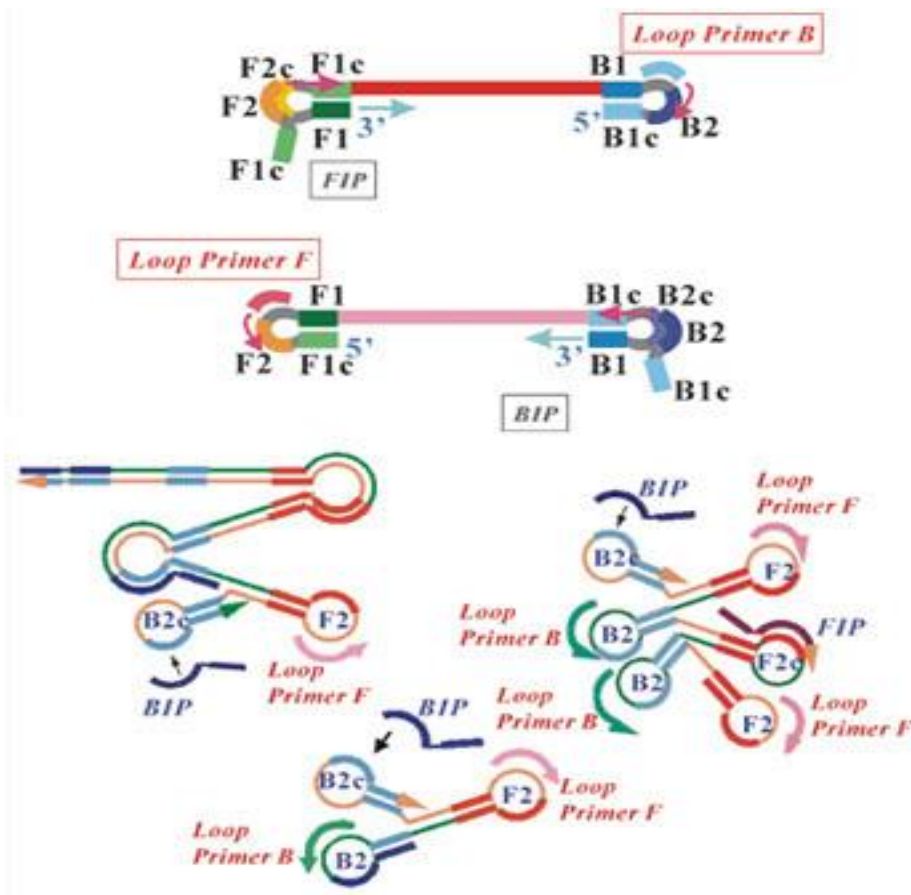
Najvažniji korak u prvoj fazi je stvaranje šablona u obliku jednolančane strukture nalik na petlju (slika 9.) (Ognjanović, 2022).



Slika 9. Shematski prikaz jednolančane DNA strukture nalik na petlju

Izvor: https://issuu.com/supha.450/docs/supha_12/s/17181102-

U ostalim fazama cilj je dobiti eksponencijalnu amplifikaciju šablona i zamjenu lanaca, što dovodi do stvaranja dvolančane DNA. Na kraju nastaje kompleksna struktura (slika 10.) (Ognjanović, 2022).

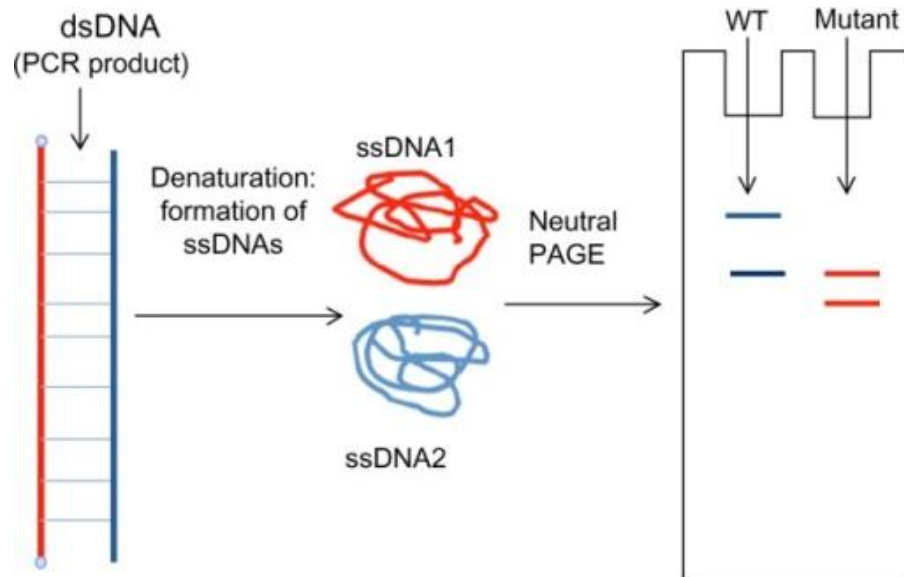


Slika 10. Krajnji proizvod LAMP amplifikacije sa šest petlji
Izvor: https://issuu.com/supha.450/docs/supha_12/s/17181102-

3.8. Jednočlani konformacijski polimorfizam (SSCP)

Jednočlani konformacijski polimorfizam (*Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP)) je tehnika koja služi za detekciju genetskih varijacija i mutacija u fragmentima DNA. Metoda može biti vrlo korisna zbog sposobnosti razlikovanja različitih genotipova na osnovu razlika u sekvencama DNA. Ona se zasniva na principu da jednočlane molekule DNA sa različitim sekvencama mogu formirati različite sekundarne strukture pod određenim uvjetima. Različite konformacije mogu se razdvojiti elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, time se omogućuje detekcija i identifikacije štetnih genotipova (Hayashi, 1991).

Prvi korak SSCP metode je izolacija DNA. Ciljani fragmenti DNA se amplifiraju pomoću PCR metode. Amplificirani fragmenti DNA se denaturiraju da bi se dobili jednočlani fragmenti. Jednočlani fragmenti DNA se razdvajaju elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (slika 11.). Različite konformacije će migrirati različitim brzinama. Gel se boji ili se koriste radioaktivne ili fluorescentne oznake da bi se vizualizirali fragmenti DNA (Hayashi, 1991).



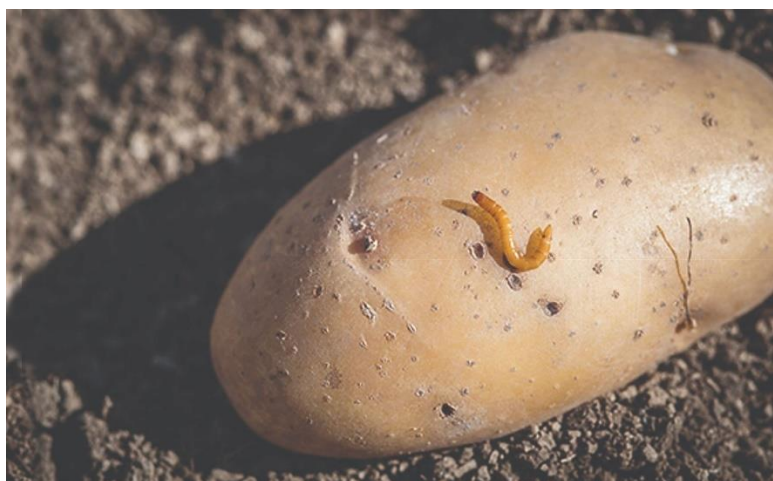
Slika 11. Shematski prikaz SSCP metode

Izvor: Bagyinszky i sur. (2014)

4. Primjeri primjene molekularnih metoda u zaštiti bilja

Razvojem molekularnih metoda identifikacije vrsta otvorene su nove mogućnosti u rješavanju problema povezanih s tradicionalnim metodama identifikacije (Ivanović i sur., 2004). Prema Šipek (2017.) Genomska DNA je kompletna genetska informacija koja se nalazi u jezgri svake žive stanice organizma. Ona sadrži sve genetičke upute potrebne za razvoj i funkcioniranje organizma. Žičnjaci roda *Agriotes* (slika 12.) prikupljeni na različitim lokacijama u Hrvatskoj uspješno su determinirani do vrste analizom njihove genomske DNA. Za to su korišteni srednji dijelovi abdomena žičnjaka, veličine 1-2 mm koji su stavljeni u epruvetu od 1,5 ml.

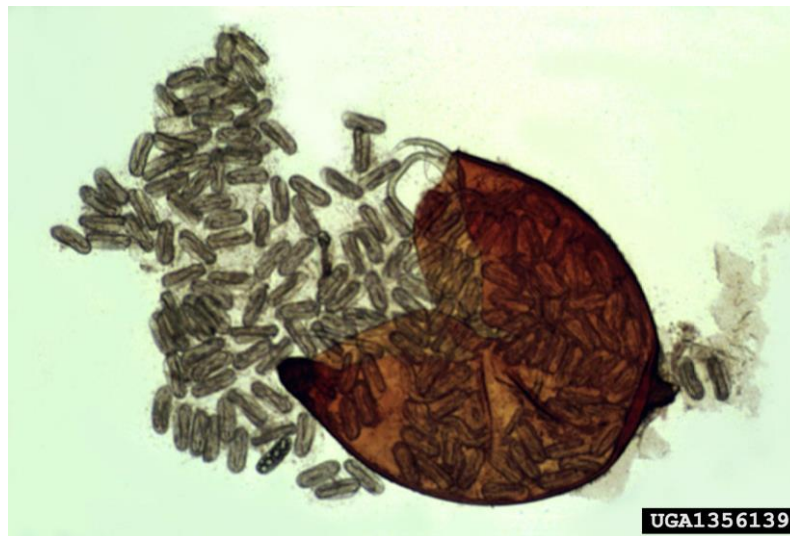
Da bi se mogla izdvojiti DNA iz izrezanog dijela tkiva, uzorku je dodano 20 μ l PBS pufera (pH 7,2) i tkivo je homogenizirano pomoću nastavka za pipetu (volumen 1000 μ l). Svakom uzorku dodano je 5 μ l proteinaze K (20 mg/ml) za razgradnju proteina i 200 μ l 10 % otopine Chelex za zaštitu izdvojene DNA. Inkubacija uzoraka vršena je na termomikseru 60 minuta pri temperaturi 58 °C, nakon toga 20 minuta pri temperaturi 94 °C, uz neprestano miješanje pri 1000 rpm. Uzorci su centrifugirani pri 13,2 rpm tijekom 10 minuta da bi se ekstrahirala DNA jedinke na dnu epruvete. Iz svakog uzorka izdvojeno je 100 μ l DNA u epruvetu od 1,5 ml, a propisno označeni uzorci su pohranjeni na -26 °C za daljnje analize. Nakon izolacije, za svaki je uzorak napravljen PCR. Rezultati su pokazali brojnost pojedine vrste žičnjaka na lokalitetima Središnje Hrvatske. Zaključak je da 83 vrste nemaju točnu identifikaciju do vrste pa nije moguće točno tvrditi o kojoj se vrsti radi (Šipek, 2017).



Slika 12. Žičnjak

Izvor: <https://gospodarski.hr/rubrike/povrcarstvo-rubrike/kako-suzbijati-zicnjake-u-povrtnjaku/>

Metoda PCR korištena je i kod krumpirovih cistolikih nematoda, *Globodera rostochiensis* (slika 13.) i *Globodera pallida* (slika 14.), važnih ekonomskih štetnika krumpira. Sve identifikacije ovih vrsta temeljile su se na morfološkim karakteristikama. Metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) provedena je prvi put u Hrvatskoj na ovim uzorcima kako bi se uvele brze i pouzdane molekularne metode analize tih vrsta. Cilj je bio utvrditi sastav ovih nematoda u Hrvatskoj. Analizirano je 10 populacija uzorkovanih u tri županije. U svim analiziranim populacijama identificirana je vrsta *G. rostochiensis* (Grubišić i sur., 2013).



Slika 13. Vrsta *Globodera rostochiensis*

Izvor: [https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356139-](https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356139)



Slika 14. Vrsta *Globodera pallida*

Izvor: [https://images.wur.nl/digital/collection/nematode_pict/id/672/-](https://images.wur.nl/digital/collection/nematode_pict/id/672/)

RFLP metoda korištena je za identifikaciju i razlikovanje štetnih kukaca koji utječu na poljoprivredne usjeve. Istraživači su koristili DNA iz uzoraka kukaca i primijenili enzime za restrikciju koji režu DNA na specifičnim mjestima. Fragmenti su analizirani pomoću elektroforeze u agaroznom gelu, što je omogućilo identifikaciju različitih genetskih profila među kukcima (Narayanan, 1991).

Provedeno je istraživanje porodice Tachinidae (mušice). One parazitiraju u tisućama vrsta gusjenica Costa Rice, a mogu biti i opće parazitoidne ili specijalizirane za određenu vrstu ili rod gusjenica. Istraživanje je provedeno na 400 vrsta uzgojenih i 390000 u divljini ulovljenih jedinki koje su pripadnice 3500 vrsta na području Costa Rice. Smatra se da je barem 90 % jedinki specijalizirano za jednu ili nekoliko blisko srodnih vrsta (Polak, 2012). Polak (2012.) u svom radu navodi da je u istraživanju u kojemu bi se potpuno definirala parazitoidna svojstva, provedeno DNA barkodiranje na 2134 jedinke koje su prvotno svrstane u 16 morfološki usporedivih vrsta sa najizraženijim opće parazitoidnim karakteristikama i dobivene su 73 mitohondrijske linije sa 4 %-tnom razlikom u sekvencama. Te su linije testirane neovisnim markerima jezgre (28S i ITS1) i trenutno se smatraju odvojenim vrstama. Kako bi se opće parazitoidno svojstvo potpuno definiralo, provedene su analize COI sekvenci kao barkoda kod 16 najizraženijih opće parazitoidnih vrsta, uzgojenih na mnogo vrsta gusjenica, sve su uzgajane 10 - 100 puta. Te vrste parazitiraju u provjerenim, definiranim domaćinima. Dobivene su 64 vrste specijaliziranih parazitoida i devet opće parazitoidnih vrsta.

Ovaj rezultat pridaje još veći značaj istraživanju barkoda provedenog kod 20 morfološki različitih vrsta roda *Belvosia*, drugog pripadnika Tachinida koji obitava na istom staništu. Potvrđene su sumnje o podcijenjenoj bioraznolikosti parazitoida. Uspješno su provedene analize barkoda. Uzeta je po jedna mušica iz svakog od 2134 uzgojena legla i 14 od 16 vrsta bilo je moguće pouzdano razlikovati putem barkodova. Svaka od 14 vrsta pripala je u zaseban, nepreklopljivi klaster sekvenci u NJ stablu. Klasteri barkodova među vrstama razlikovali su se >5 %, ali je intraspecijska divergencija bila visoka, kod nekih čak preko 10 %, što ukazuje na postojanje više kriptičnih vrsta. Uključen je niz ekoloških faktora kao što su gusjenice domaćini, njihova ishrana i 12 ekosustav te neovisni genetički markeri, da bi se ispitalo da li ovi podaci u cijelosti podupiru hipotezu da svaki klaster sekvenci predstavlja morfološki prikrivene vrste. Hipoteza se pokazala ispravnom i 16 vrsta je raspoređeno u 73 kriptične vrste. Dvije su vrste *Hyphantrophaga virilis* i *Lespesia aletiae*, pouzdano odgovarale već dodijeljenim imenima. Klasterima vrsta su pridodana alfanumerička privremena imena, gdje ime odražava rod u koji su svrstane u inventaru, makar ta imena nisu čvrsta mjerila determinacije. Činilo se i da klaster unutar jedne od 16 vrsta nije odgovarao ekološkim podacima ili je pak bilo samo malih razlika u odnosu na sekvence susjednih klastera. Zbog ovoga su analizirana i dva neovisna markera jezgre. Kao i kod *Belvosia*, analizirane su ITS1 i D2 regije 28S. Ove dodatne analize nisu provedene kod svih jedinki, za koje postoje barkodovi, jer je svrha bila identifikacija vrsta i otkrivanje prikrivenih vrsta među opće parazitoidnim vrstama. Spajanjem ovih rezultata (COI

barkodovi, ekološki čimbenici i jezgrine sekvence), 73 vrste je bilo moguće rasporediti u četiri uzorka:

1. Barkodirani opće parazitoidni organizmi ostaju opći parazitoidi;
2. Barkodirana opće parazitoidna vrsta postaje dvije opće parazitoidne vrste;
3. Barkodirani opći parazitoid postaje nekoliko specijaliziranih i jedan opći parazitoid;
4. Barkodirani opći parazitoid je kompleks specijaliziranih parazitoida (Polak, 2012).

Ono što je smatrano da obuhvaća 16 vrsta ispalo je barkodiranjem 73 vrste, te se sve osim dvije mogu se identificirati putem barkoda (Polak, 2012).

Leptiri iz porodice Hesperidae široko su rasprostranjeni. Vrsta *Astrartes fulgurator* veliki je leptir iz ove porodice. Uzgojem ove vrste u velikim količinama iz gusjenica ulovljenih u divljini utvrđeno je da je polifagan (hrani se velikim brojem vrsta), čime je potaknuta sumnja da se ne radi o samo jednoj vrsti. Otkriveno je 6 do 7 malih morfoloških varijacija sa razlikama u ishrani u stadiju ličinke te u spolu. Analiza COI gena provedena je na 446 uzgojenih odraslih jedinki. Time su otkrivena 3 nova klastera te klasteri koji kovariraju sa već utvrđenim. Ukupno je 10 prikrivenih vrsta koje variraju od parapatrijskih do simpatrijskih. Druga analiza na uzgojenim leptirima iz ACG (Area de Conservacion Guanacaste) u Costa Rici pokazala je da unutar roda gdje je jedna vrsta, postoje i četiri nove, slične vrste. Te vrste razlikuju se u odraslim stadijima, reproduktivnim organima mužjaka i ženki te u uzorcima boja. Blisko srodne vrste poput *Polycator*, *Cobalus* i *Neoxeniades*, nisu uspješno razdvojene barkodovima. Nemogućnost razdvajanja ovih vrsta je zbog prekratkog fragmenta u koji nisu uključene dijagnostičke regije, dok su cjeloviti barkodovi (650 pb) pouzdano razdvojili vrste u svakom paru leptira. U početku, program sistematičnog barkodiranja svake ACG vrste macrolepidoptera sadržavao je nekoliko primjeraka vrste *Perichares philates*, koji je bio opisan kao politipski i paneotropski. Prva dva uzorka pokazala su divergenciju unutar njihovog konspicijalnog klastera u NJ stablu, što je potaklo potragu za gusjenicama *P. philates* i detaljnije ispitivanje svih stadija životnog ciklusa. Daljnje NJ statističke analize sve većih uzoraka otkrile su četiri klastera. Iz toga proizlazi pitanje koji dodatni dokazi opravdavaju razdvajanje vrsta *Perichares* na čije postojanje ukazuju DNA barkodovi. Jedna je potvrda prehrana ličinki. Morfološke karakteristike su varljive, teško ih je točno definirati. Trenutna klasifikacija temelji se na analizama iz sredine 20. stoljeća, gdje su srodne vrste često, bez opravdana razloga, klasificirane kao podvrste. Mnogo tih tropskih vrsta za koje se smatra da se hrane različitim biljkama, obuhvaćaju setove prehrambeno specijaliziranih vrsta. Barkodiranjem 422 morfološki slične vrste, utvrđeno je postojanje dvije ili više bioloških vrsta. Analize su nepotpune, zbog toga što je barkodiranje provedeno samo kod vrsta unutar ACG-a. Potrebno je uložiti trud u prikupljanje više vrsta ACG jedinki kad god se pojavi odstupanje u NJ stablu (Polak, 2012).

Identifikacija DNA barkodiranjem pokazala se uspješnom za pet redova kukaca koji imaju najveći broj štetnika: Coleopteraa (Woodcock 2013; Ashfaq i Hebert, 2016), Diptera (Nagy 2013; Ashfaq i Hebert, 2016), Hemiptera (Park, 2011; Ashfaq i Hebert, 2016), Lepidoptera (Janzen, 2005; Ashfaq i Hebert, 2016) i Thysanoptera (Rebijith 2014; Ashfaq i Hebert, 2016). Od 3541 vrsta europskih kornjaša, 92,2 % dodijeljeni su različitim BIN-ovima koji su se podudarali s poznatom morfološkom vrstom, dok je većina drugih vrsta dodijeljena u dva ili tri BIN-a, što pokazuje da predstavljaju kriptične komplekse vrsta (Hendrich, 2015; Ashfaq i Hebert, 2016). Kod ispitivanja 1849 kanadskih rilčara dodijeljeno je 1849 BIN-ova, ali je otkriveno i 27 vrsta s velikim razlikama koje upućuju na kriptične vrste (Gwiazdowski, 2015; Ashfaq i Hebert, 2016). Leptiri su najintenzivnije proučavan red, zastupljen je sa više od 100000 BIN-ova (Wilson, 2013; Ashfaq i Hebert, 2016). Kod dvokrilaca je također potvrđena učinkovitost DNA barkodiranja (Virgilio, 2012; Ashfaq i Hebert, 2016). Vrsta *Liriomyza langei* (Diptera), štetnik lisni miner porijeklom iz Kalifornije, morfološki se ne razlikuje od invazivne vrste *L. huidobrensis*. Međutim, te se vrste lako razlikuju pomoću crtičnog koda, što je čimbenik koji je omogućio analizu njihove distribucije (Scheffer, 2014; Ashfaq i Hebert, 2016). Slično tome, ličinke *Camptomyia corcitalis* i *C. heterobia*, koje uzrokuju teške štete u proizvodnji *Shitake* gljiva lako se razlikuju pomoću crtičnog koda (Shin, 2013; Ashfaq i Hebert, 2016). Lisne uši su globalno važni štetnici i glavni prijenosnici mnogih biljnih bolesti, ali ih je teško identificirati jer većina posjeduje nevjerojatnu fenotipsku plastičnost i raznolikost stadija. DNA barkodiranje pokazalo se kao učinkovit alat za razlikovanje vrsta jer je intraspecifična udaljenost mala kod većine vrsta, dok su kongenerične udaljenosti velike (Footit, 2008, Ashfaq, 2016).

DNA barkodiranje ima široku primjenu u programima integriranog upravljanja štetnim organizmima (Etzler, 2014; Ashfaq i Hebert, 2016) i biološkog nadzora (Jones, 2013; Ashfaq i Hebert, 2016). Budući da DNA barkodiranje pouzdano identificira i nezrele i odrasle jedinke (Shin, 2013; Ashfaq i Hebert, 2016), te može razlikovati domaće i unesene štetnike (Chown, 2008; Ashfaq i Hebert, 2016), koristi se za pomoć pri upravljanju kompleksima vrsta u poljoprivrednim sustavima (Frewin i sur., 2014; Ashfaq i Hebert, 2016). Te su primjene važne zbog otpornosti na insekticide koja može varirati između blisko srodnih vrsta, pa čak i između genotipova iste vrste (Toor, 2008; Ashfaq i Hebert, 2016).

Tijekom 2017. i 2018. godine u Hrvatskoj su provedene analize genetske strukture populacija jabukina savijača (*Cydia pomonella*) (slika 15.), ekonomskog štetnika jabuke diljem svijeta. Korišten je jabukin savijač integriranih i ekoloških voćnjaka uporabom SNP metode (Kadoić Balaško i sur., 2022.). Rezultati analize genetske strukture populacija štetnika iz integriranih i ekoloških sustava uzgoja jabuke iz Hrvatske pokazali su nisku genetsku varijabilnost istraživanih populacija. Ipak, utvrđeno je da se jedinke iz ekološkog i iz integriranog uzgoja značajno razlikuju u odnosu na populaciju uzgojenu u laboratoriju, koja nikada nije bila izložena utjecaju insekticida (Kadoić Balaško i sur., 2022).



Slika 15. Jabukin savijač

Izvor: <https://www.chromos-agro.hr/jabucni-svijac/>

Glavni štetnici roda *Spodoptera*: *S. exigua* (mali kukuruzni moljac), *S. frugiperda* (jesenska soвица), *S. litura* (lisna soвица) i *S. littoralis* (mediteranski kukuruzni moljac), uzrokuju ozbiljne štete na različitim poljoprivrednim kulturama širom svijeta. Da bi se štetnici mogli razlikovati, korištena je LAMP metoda. Metoda je bila učinkovita za širok raspon koncentracija DNA i pružila je točne rezultate u roku od 70 minuta. Uzori su sakupljeni u Koreji i drugim zemljama. DNA je ekstrahirana iz tkiva ličinki ili odraslih jedinki metodom inkubacije na 95 °C tijekom 5 minuta. Specifične početnice su dizajnirane za ciljane sekvence mitohondrijske DNA i optimizirane za LAMP reakciju na 61 °C tijekom 60 minuta. Reakcija je provedena na četiri osnovne početnice, uz dodatak početnice za povećanje učinkovitosti reakcije kod *S. exigua*. Proizvodi LAMP reakcije detektirani su vizualno korištenjem boje SYBR Green I, gdje su pozitivni rezultati pokazivali florescenciju pod UV svjetlom (Nam i sur., 2021).

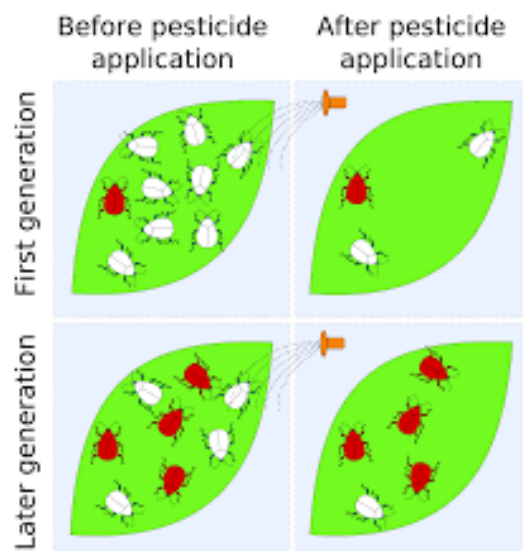
Za identifikaciju štetnih kukaca korištena je i SSCP metoda koja omogućuje analizu varijacija u genetskom materijalu na temelju promjena u konformaciji jednolančanih DNA. Istraživači su koristili specifične genske regije za izolaciju DNA iz uzorka kukaca, a zatim su analizirali konformaciju jednolančanih DNA pomoću SSCP metode kako bi otkrili varijacije koje odgovaraju različitim vrstama. SSCP metode je uspješno identificirala nekoliko vrsta kukaca poput *S. frugiperda* i *Helicoverpa armigera* (žuta kukuruzna soвица). Metoda je pokazala visoku rezoluciju u razlikovanju sličnih vrsta kukaca koje je teško razlikovati drugim metodama (Song i sur., 2023).

5. Primjena molekularnih metoda u istraživanju rezistentnosti

Štetnici razvijaju rezistentnost na insekticide čime uzrokuju ozbiljne posljedice za sve sudionike u lancu poljoprivredne proizvodnje. Rezistentnost se definira kao postupni porast otpornosti jedne populacije štetnika na insekticid koji se koristi za suzbijanje tog štetnika (slika 16). Glavni uzrok pojave rezistentnosti je primjena klasičnih kemijskih insekticida u suzbijanju štetnika. Zbog pojave rezistentnosti kod sojeva štetnika u poljoprivredi stvaraju se ozbiljne posljedice. Dolazi do ugrožavanja prodaje i plasmana pojedinog insekticida, ugrožavanja poslovnih uspjeha kompanija koje se bave njihovom proizvodnjom i plasmanom, poljoprivredni proizvođači ne uspijevaju zaštititi poljoprivredne kulture od štetnih vrsta zbog smanjene učinkovitosti insekticida čime dolazi do značajnih gubitaka. Također, koriste se skuplji insekticidi čime dolazi do smanjene rentabilnosti proizvodnje (Bažok i Lemić, 2017).

Postoje različiti tipovi rezistentnosti. Fiziološki uvjetovana rezistentnost definira se kao svojstvo organizma da biokemijskim reakcijama umanjuje djelovanje insekticida. Morfološki uvjetovana rezistentnost očituje se u sprečavanju prodora insekticida u tijelo. Psihofizički uvjetovana rezistentnost očituje se u promijenjenom ponašanju kukca što dovodi do smanjenog kontakta s insekticidom. Odredišno-položajna uvjetovana rezistentnost teži sprečavanju djelovanja insekticida na mjestu njegova specifična djelovanja (Bažok i Lemić, 2017).

Da bi se rezistentnost spriječila, potrebno je poznavati čimbenike koji utječu na njezinu pojavu. Čimbenici mogu ovisiti o čovjeku, odnosno o primjeni agrotehničkih mjera i mjerama zaštite bilja. Pojedine vrste kukaca različito su sklone mutacijama pa time i razvoju rezistentnosti. Genetska svojstva vezana na učestalost mutacija i neke druge osobine kukaca važne su jer utječu na brzinu razvoja rezistentnosti. To uključuje broj generacija koje kukac razvije tijekom godine, broj potomaka, način razmnožavanja i pokretljivost. Kod kukaca koji imaju više generacija genetski se materijal više izmjenjuje, veći je broj tretiranja pa je vjerojatnost da se rezistentnost brže razvije. Na taj način djeluje i broj potomaka u generaciji. Kukci koji se razmnožavaju nespolno izravno prenose genetički materijal na potomstvo pa se brže razvija rezistentnost. Kod manje osjetljivih stadija rezistentnost se javlja brže. Također, važni su mehanizam djelovanja insekticida. Rezistentnost se sprečava primjenom nepesticidnih mjera, mehaničkim mjerama, uzgojem otpornih sorata i hibrida. Najbolja strategija jest prevencija, tj. pratiti razvoj populacije štetnika u polju ili na terenu (Bažok i Lemić, 2017).



Slika 16. Prikaz razvoja rezistentnosti kukca na insekticid

Izvor: <https://images.app.goo.gl/Gu2mbVqTShi4buu27->

Kukuruzna zlatica (*Diabrotica virgifera virgifera*), krumpirova zlatica (*Leptinotarsa decemlineata*) i jabukin savijač (*C. pomonella*) najvažniji su štetnici ratarskih i voćarskih kultura u svijetu i u Hrvatskoj. Sve tri vrste razvile su rezistentnost na insekticide ili na strategije suzbijanja. Poznavanjem evolucijskih promjena i ukupne genetske raznolikosti populacije nekog štetnika moguće je pružiti korisne informacije za razumijevanje genetskih uzoraka povezanih sa svakim stupnjem razvoja otpornosti štetnika, time se praćenje i suzbijanje mogu prilagoditi rezistentnosti pojedinačne vrste štetnika. SNP je vrlo pristupačna i dostupna metoda koja služi za generiranje važnih podataka o brojnim vrstama jer se analizira cijeli genom. Upotreba SNP-a je važna za bolje razumijevanje populacijske genetike kukuruzne i krumpirove zlatice te jabukinog savijača. Takvi podaci, koji uključuju utvrđivanje promjene genoma povezane s razvojem rezistentnosti ključni su za provedbu antirezistentnih programa kao sastavnog dijela integrirane zaštite bilja od štetnika (Kadoić Balaško i sur., 2021).

Molekularne metode istraživanja rezistentnosti temeljene su na genotipizaciji mutacija karakterističnih kod određenog tipa rezistentnosti (Delye i sur., 2016; Štivičić i sur., 2020). Tako je moguće dovoljno rano otkriti rezistentne genotipove u populaciji čime se omogućuje praćenje i uvođenje antirezistentnih programa. Potrebne su detaljne analitičke procedure, skupa oprema i osposobljeno osoblje za izvođenje ispitivanja (Bass i sur, 2007; Štivičić i sur., 2020). Molekularnim se metodama istražuju deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA) i otkrivaju geni ili mutacije koje su povezane s rezistentnošću. Materijal koji se koristi jest živo ili mrtvo tkivo, iz jednoga ili skupnih genotipova (npr. populacije). Za molekularna istraživanja mora se ekstrahirati dovoljna količina DNA ili RNA.

Molekularni testovi klasificiraju se u dvije skupine koje se temelje na prirodi tehnologije koja se koristi. Prva skupina su robusne (*rugged*) analize gdje se koristi jednostavna oprema i tehnika za otkivanje svega nekoliko mutacija u limitiranom broju uzoraka, a potencijalno su pogodne za uporabu u polju. Druga kategorija su metode gdje se koristi oprema visoke tehnologije (*hi-tech*) za istraživanje rezistentnosti. Korištenje specijalizirane visoke tehnologije i opreme ima potencijal za istovremeno otkrivanje rezistentnosti uzrokovane mutacijama u velikim uzorcima. Ovakvi se testovi još ne koriste dovoljno za utvrđivanja rezistentnosti štetnika na insekticide (Barres i sur., 2016; Štivičić i sur., 2020).

Molekularne metode pružaju detaljniji uvid u sam mehanizam nastanka rezistentnosti na razini stanice, molekule ili gena. To je važno za primjenu odgovarajuće antirezistentne strategije (Štivičić i sur., 2020).

6. Prednosti i nedostaci molekularnih metoda detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja

Molekularne metode u detekciji i identifikaciji štetnika imaju brojne prednosti. Visoko su osjetljive što omogućuje identificiranje štetnika u vrlo malim količinama. Ove metode često omogućuju bržu detekciju i identifikaciju štetnika u usporedbi s tradicionalnim metodama. Moguće je precizno identificirati određene vrste ili sojeve štetnika, čime se smanjuje mogućnost pogrešne identifikacije. Ove metode omogućuju praćenje genetičkih promjena koje su povezane sa rezistentnosti. Moguća je identifikacija novih ili nepoznatih vrsta, što je korisno u istraživačke svrhe ili u situacijama kada su tradicionalne metode nedostatne (Hulten i sur., 2003). Mnoge molekularne metode mogu se automatizirati, što olakšava analizu većeg broja uzoraka u kratkom vremenu (Marković i sur., 2021).

Pored prednosti, molekularne metode imaju i određene nedostatke. Velik nedostatak su troškovi, oprema i reagensi molekularnih metoda mogu biti skupi, što ograničava njihovu primjenu. Primjer su termociklari za PCR ili sekvencirajući uređaji (Marković, 2014). Za izvedbu molekularne metode potrebno je određeno znanje i vještine. Iako su molekularne metode brže od tradicionalnih metoda identifikacije, one i dalje zahtijevaju određeno vrijeme za obradu uzoraka i analizu rezultata. Analize su složene. Kao i kod svih laboratorijskih tehnika, postoji potencijal za pogreške u pripremi uzoraka, manipulaciji opremom ili interpretaciji rezultata, što može dovesti do netočnih rezultata. Često zahtijevaju čiste i dobro očišćene uzorke kako bi se osigurala točna analiza (Marković, 2008).

7. Zaključci

- 1) Štetnici predstavljaju ozbiljan problem u zaštiti bilja, značajno utječući na produktivnost i kvalitetu usjeva širom svijeta. Tradicionalne metode detekcije i identifikacije štetnika, iako su korisne, imaju određena ograničenja koja ometaju pravovremenu i preciznu identifikaciju. Zbog toga, povećana je potreba za uporabom molekularnih metoda.
- 2) Molekularne metode pružaju brojne prednosti u odnosu na tradicionalne. Razvoj molekularnih metoda omogućio je ne samo detekciju i identifikaciju štetnika, već i detekciju genetičkih promjena koje dovode do rezistentnosti na insekticide. To je od izuzetne važnosti za praćenje i upravljanje rezistentnošću, čime se poboljšava učinkovitost programa zaštite bilja.
- 3) Unatoč visokim troškovima i tehničkim zahtjevima, prednosti ovih metoda, kao što su visoka osjetljivost, brzina i preciznost, čine ih nezamjenjivim alatima u poljoprivredi. Primjena molekularnih metoda u praksi zaštite bilja predstavlja značajan korak naprijed u borbi protiv štetnika.
- 4) Uz kontinuirani razvoj tehnologije i smanjenja troškova, molekularne metode postat će još pristupačnije i učinkovitije, omogućujući održivu i produktivnu poljoprivredu u budućnosti.

8. Popis literature

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Keith R., Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
2. Ashfaq M., Hebert P.D.N. (2016). DNA barcodes for bio-surveillance: regulated and economically important arthropod plant pests. *Canadian Science Publishing*, 1(1): 2017.
3. Bagyinszky E., Youn Y.C., An S.S., Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 9: 535-551.
4. Barres B., Marie France C.C., Debieu D., Delye C. (2016). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, 21(10): 834-853.
5. Bass C., Nikou D., Bonnelly, M. J., Williamson, M. S., Ranson H., Ball A., Vontas, J., Field L. M. (2007). Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high throughput assays with existing methods. *Malaria Journal*, 6: 111.
6. Bažok R. (2022). *Zaštita bilja u ekološkoj poljoprivredi - Priručnik za edukatore*. Topplant. <https://topplantportal.eu/mod/book/view.php?id=1064&chapterid=501> (pristupljeno 28. ožujka 2024).
7. Bažok R., Lemić D. (2017). Rezistentnost štetnika na insekticide. *Glasilo biljne zaštite*, 17(5): 429-438.
8. Beckmann J.S., Soller M. (1986). Restriction Fragment Length Polymorphisms in Poultry Breeding. *Poultry Science*, 65(8): 1474-1488.
9. Boland E.J., Pillai A., Odom M. W., Jagadeeswaran P. (1994). Automation of the Maxam-Gilbert chemical sequencing reactions. *Biotechniques*, 16(6): 1088-1092, 1094-1095.
10. Brumfield, R.T., Beerli, P., Nickerson, D.A., Edwards, S.V. (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 (5): 249-256.
11. Chang S., Huang S., Liu H., Zhang P., Liang F., Akahori R., Li S., Gyarfás B., Shumway J., Ashcroft B., He J., Lindsay S. (2012). Chemical recognition and binding kinetics in a functionalized tunnel junction. *Nanotechnology*, 23(23): 235101.
12. Chown S., Sinclair B., Vuuren B. (2008). DNA barcoding and the documentation of alien species establishment on sub-Antarctic Marion Island. *Polar Biology*, 31(5): 651-655.
13. Church G.M., Gilbert W. (1984). Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(7): 1991-1995.
14. Codling E.A. (2014). Pest insect movement and dispersal as an example of applied movement ecology: Comment on "Multiscale approach to pest insect monitoring: Random walks, pattern formation, synchronization, and networks". *Physics of Life Reviews*, 11(3): 533-535.
15. Ćukušić A., Podnar M., Kučinić M. (2019). First steps of systemic DNA barcoding in Croatia- example of caddisfly fauna (Trichoptera). *Natura Croatica*, 28(2): 305-323.

16. Delye C., Causse R., Michel S. (2016). Genetic basis, evolutionary origin and spread of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Pest management science*, 72: 89-102.
17. Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., DeWinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D, Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Korf J., Turner S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910): 133-138.
18. Erlich H.A. (1989). *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. Palgrave Macmillan London.
19. Etzler F.E., Wanner K.W., Morales-Rodriguez A., and Ivie M.A. (2014). DNA barcoding to improve the species-level management of wireworms (*Coleoptera: Elateridae*). *Journal of Economic Entomology*, 107(4): 1476-1485.
20. Ferraboli S., Negri R., Mauro E., Barlati S. (1993). One-lane chemical sequencing of 3' fluorescent-labeled DNA. *Analytical biochemistry*, 214(2): 566-570.
21. Floyd R., Lima J., Waard J., Humble L., Hanner R. (2010). Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions*, 12: 2947-2954.
22. Foottit R.G., Maw H.E.L., Von Dohlen C.D., Hebert P.D.N. (2008). Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8(6): 1189-1201.
23. Frewin A.J., Scott Dupree C., Murphy G., Hanner R. (2014). Demographic trends in mixed *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) cryptic species populations in commercial poinsettia under biological control and insecticide-based management. *Journal of Economic Entomology*, 107(3): 1150-1155.
24. Greninger A.L., Naccache S.N., Federman S., Yu G., Mbala P., Bres V., Stryke D., Bouquet J., Somasekar S., Linnen J.M., Dodd R., Mulembakani P., Schneider B.S., Muyembe-Tamfum J.J., Stramer S.L., Chiu C.Y. (2015). Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis *Genome medicine*, 7: 99.
25. Grubišić D., Pajac Živković I., Gotlin Čuljak T., Brmež M., Benković Lačić T., Mešić A. (2013). First molecular detection of Croatian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *Entomologia Croatica*, 17(1): 35-40.
26. Gwiazdowski R.A., Foottit R.G., Maw H.E.L., Hebert P.D.N. (2015). The Hemiptera (Insecta) of Canada: constructing a reference library of DNA barcodes. *PLoS ONE*, 10(4): e0125635..
27. Hartl D.L., Jones E.W. (1992). *Genetics Principles and Analysis*. Fourth Edition. Jones and Bartlett Publishers.

28. Hayashi K. (1991). PCR- SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR methods and applications*, 1(1): 34-38 .
29. Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. A., Waard J.R. (2002). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*, 270(1512): 313-321.
30. Hendrich L., Moriniere J., Haszprunar G., Hebert P.D.N., Hausmann A., Kohler F., Balke M. (2015). A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources*, 15(4): 795-818.
31. Hulten M.A., Dhanjal S., Pertl B. (2003). Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction*, 126(3); 279-297.
32. Ivanović M., Koprivica M., Milijašević S., Dukić N., Duduk B. (2004). Primjena molekularnih metoda u dijagnostici bolesti (Pregledni rad). 223-231. <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/0352-9029/2004/0352-902904042231.pdf> (pristupljeno 02. ožujka 2024.)
33. Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M., Hallwachs W., Remigio E., Hebert P.D.N. (2005). Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462): 1835-1845.
34. Jones Y.L., Peters S.M., Weland C., Ivanova N.V., Yancy H.F. (2013). Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Identification of the U.S. Food and Drug Administration's "Dirty 22," contributors to the spread of foodborne pathogens. *Journal Food Protection*, 76(1): 144-149. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-168> (pristupljeno 15. travnja 2024.)
35. Kadoić Balaško M. (2021). Multidisciplinirani pristup istraživanju rezistentnosti kod kukaca. *Glasilo Future*, 4(4): 22-36.
36. Kadoić Balaško M. (2022). Genomic changes associated with insecticide resistance in economically important insect pests in Croatia (Završni rad). Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
37. Kaur S. (2015). DNA Barcoding and Its Applications. *International Journal of Engineering Research and Science*, 3(2): 602-604.
38. Lazcka O., Campo J., Munoz F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *ScienceDirect*, 22(7): 1205-1217.
39. Mankin R.W., Ayedh H., Aldryhim Y., Rohde B. (2016). Acoustic Detection of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) and *Oryctes elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) in *Phoenix dactylifera* (Arecales: Arecaceae) Trees and Offshoots in Saudi Arabian Orchards. *Journal of economic Entomology*, 109(2):2016. 622-628. <https://doi.org/10.1093/jee/tov398> (pristupljeno 28. travnja 2024).
40. Mareković I. (2008). Značenje molekularnih metoda u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija uzrokovanih bakterijama. (Disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:953645> (pristupljeno 07. travnja 2024.)

41. Mareković I., Bošnjak Z., Plečko V. (2014). Evaluacija real-time PCR metode za izravnu identifikaciju mikobakterija u kliničkim uzorcima. Prilog sa skupa u zborniku. <https://www.croris.hr/crosbi/publikacija/prilog-skup/605872> (pristupljeno 08. ožujka 2024.)
42. Marić M., Orović I., Stanković S. (2016). Compressive Sensing based image processing in Trapview pest monitoring system. 39th International Convention on Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics, MIPRO Croatian society. 508-512. <http://dx.doi.org/10.1109/MIPRO.2016.7522197> (pristupljeno 12. travnja 2024.)
43. Marković E. (2021). Mračna strana evolucije- Kako evoluiraju špiljske životinje. (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet, Biološki odsjek. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:995693> (pristupljeno 17. travnja 2024.)
44. Miresmaillil S., Badulescu D., Mahdavian M., Zamar R. H., Isman M. B. (2009). Integrating plant chemical ecology, sensors and artificial intelligence for accurate pest monitoring. Tomatoes: Agricultural Procedures, Pathogen Interactions and Health Effects. 1-17. https://www.bib.irb.hr:8443/1109179/download/1109179.Pajac_Zivkovic_i_sur_Vol_3_4_br_6.pdf (pristupljeno 07. svinja 2024).
45. Mul M. F., Ploegaert, J. P. M., George D. R., Meerburg B. G., Dicke M., Groot, Koerkamp P. W. G. (2016). Structured design of an automated monitoring tool for pest species. *Biosystems Engineering*. 126-140. https://www.bib.irb.hr:8443/1109179/download/1109179.Pajac_Zivkovic_i_sur_Vol_3_4_br_6.pdf (pristupljeno 19. svibnja 2024).
46. Nagy Z.T., Sonet G., Mortelmans J., Vandewynkel C., Grootaert P. (2013). Using DNA barcodes for assessing diversity in the family Hybotidae (*Diptera, Empidoidea*). *ZooKeys*, 365. 263–278. <https://doi.org/10.3897/zookeys.365.6070> (pristupljeno 04. svibnja 2024.)
47. Nam, H.Y., Kim J.H., Lee S.H., Heckel D.G., Kim J. (2021). Development of a LAMP-Based Molecular Species Diagnosis Method for Four Major Agricultural Pests in the Genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/insects12100883> (pristupljeno 12. travnja 2024.)
48. Narayanan S. (1991). Applications of restriction fragment length polymorphism. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 21(4), 291-296. <http://www.annclinlabsci.org/content/21/4/291.short> (pristupljeno 18. ožujka 2024.)
49. Nyren P. i Lundin A. (1995). *Analyt. Biochem. Mycrob.* 504-509.
50. Ognjanović M. (2022). LAMP metoda- budućnost jednostavnije amplifikacije nukleinskih kiselina? https://issuu.com/supha.450/docs/supha_12/s/17181102 (pristupljeno 08. svibnja, 2024).
51. Oštrec LJ. i Gotlin Čuljak T. (2005). Opća entomologija. Zrinski d.d. Čakovec
52. Pajac Živković I., Miklečić I., Kapuđija D., Škorić M., Lemić D. (2020). Učinkovitost „Trapview“ sustava za automatsko praćenje jabukova savijača. *Fragmenta phytomedica*, 34(6). 1-15.

- https://www.bib.irb.hr:8443/1109179/download/1109179.Pajac_Zivkovic_i_sur_Vol_3_4_br_6.pdf (pristupljeno 28. travnja 2024).
53. Park D.-S., Suh S.J., Hebert P.D.N., Oh H.W., Hong K.-J. (2011). DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (*Hemiptera: Pseudococcidae*) and armored scales (*Hemiptera: Diaspididae*). *Bulletin of Entomological Research* 101(4): 2011. 429–434. <https://doi.org/10.1017/S0007485310000714> (pristupljeno 22. ožujka 2024.)
 54. Plejić E. (2021). Infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno- matematički fakultet. <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pmf:10174> (pristupljeno 01. svibnja 2024.)
 55. Polak B. (2012). Barkodiranje života (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno- matematički fakultet, biološki odsjek. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:185014> (pristupljeno 22. travnja 2024.)
 56. Potamitis I. (2017). Automated Remote Insect Surveillance at a Global Scale and the Internet of Things. *Robotics*, 6(3). 1-19. <https://doi.org/10.3390/robotics6030019> (pristupljeno 09. ožujka 2024.)
 57. Radhika R., Unhelkar B., Chakrabarti P., Shankar S. S. (2023). A Novel Deep Learning Models for Efficient Insect Pest Detection and Recommending an Organic Pesticide for Smart Farming. *International Journal of Intelligent Systems and Applications in Engineering*. 12(9):2024. 15-31. <https://ijisae.org/index.php/IJISAE/article/view/4197> (pristupljeno 03. travnja 2024.)
 58. Ratnasingham S. i Hebert P.D.N. (2007). The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology*, 7(3):2007. 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x> (pristupljeno 13. travnja 2024.)
 59. Rebijith K.B., Asokan R., Krishna V., Ranjitha H.H., Kumar N.K.K., Ramamurthy V.V. (2014). DNA barcoding and elucidation of cryptic diversity in thrips (*Thysanoptera*). *The Florida Entomologist* 97(4):2014. 1328–1347. <https://www.jstor.org/stable/24364094> (pristupljeno 03. ožujka 2024.)
 60. Rhoads A. i Au K.F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002> (pristupljeno 04. svibnja, 2024.)
 61. Rizvanović- Smajlović A., Elez Burnjaković N. (2013). DNA barcoding- Način identifikacije odabranih vrsta leptira kupusara iz Bosne i Hercegovine, 9. 37-43.
 62. Ronaghi M., Karamohamed S., Petterson B., Uhlén M., Nyrén P. (2001). *Analyt. Biochem. Microbes*. 84-89.
 63. Russell P. (2002). *iGenetics*. San Francisco.
 64. Sayers E.W. i Waring M.J. (1993). Footprinting titration studies on the binding of echinomycin to DNA incapable of forming Hoogsteen base pairs. *Biochemistry*. 32(35). <https://doi.org/10.1021/bi00086a014> (pristupljeno 03. svibnja 2024.)
 65. Scheffer S.J., Lewis M.L., Gaimari S.D., Reitz S.R. (2014). Molecular survey for the invasive leafminer pest *Liriomyza huidobrensis* (*Diptera: Agromyzidae*) in California uncovers

- only the native pest *Liriomyza langei*. *Journal of Economic Entomology*, 107(5). 1959–1964. <https://doi.org/10.1603/EC13279> (pristupljeno 13. travnja 2024.)
66. Sciaretta A. i Calabrese P. (2019). Development of Automated Devices for the Monitoring of Insect Pests. *Current Agriculture Research Journal*, 7(1). <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.7.1.03> (pristupljeno 22. ožujka 2024.)
 67. Sheika A.F. (2019). Tracing insect pests: is there new potential in molecular techniques?. *Insect Molecular Biology*. 28(6):2019. 759-772. <https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imb.12601> (pristupljeno 03. travnja 2024.)
 68. Shin S., Jung S., Lee H., Lee S. (2013). Molecular identification of dipteran pests (*Diptera: Sciarioidea*) from shiitake mushroom. *Molecular Ecology Resources*, 13(2). 200–209. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12057> (pristupljeno 17. ožujka 2024.)
 69. Song Y., Li H., He L., Zhang H., Zhao S., Yang X., Wu K. (2023). Interspecific Competition between Invasive *Spodoptera frugiperda* and Indigenous *Helicoverpa armigera* in Maize Fields of China. *Agronomy*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy13030911> (pristupljeno 19 travnja 2024.)
 70. Stoddart D., Heron A.J., Mikhailova E., Bayley H. (2009). Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Trends in development and applications, Frontiers in Microbiology*, 106(19). 7702-7707. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901054106> (pristupljeno 02. svibnja 2024.)
 71. Strunjak Perović I., Topić Popović N. (1999). PCR kao dijagnostička metoda u akvakulturi. *Croatian Journal of Fisheries*, 57(4). 181-188. <https://hrcak.srce.hr/4287> (pristupljeno 23. travnja 2024.)
 72. Šipek M. (2017). Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda *Agriotes* (Završni rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Poljoprivredna zoologija. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:327342> (pristupljeno 20. travnja 2024.)
 73. Štivičić, A., Pajač Živković, I., Lemić, D. (2020). Metode utvrđivanja rezistentnosti u entomološkim znanostima. *Fragmenta phytomedica*, 34 (6). 27-38. <https://hrcak.srce.hr/251558> (pristupljeno 12. svibnja 2024.)
 74. Tedersoo L., Sanchez- Ramirez S., Koljalg U., Bahram M., Doring M., Schigel D., May T., Ryberg M., Abarenkov K. (2018). High- level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*. 90. 135-159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0> (pristupljeno 04. travnja 2024.)
 75. Toor R.F., Foster S.P., Anstead J.A., Mitchinson S., Fenton B., Kasprovicz L. (2008). Insecticide resistance and genetic composition of *Myzus persicae* (*Hemiptera: Aphididae*) on field potatoes in New Zealand. *Crop Protection*, 27(2). 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.05.015> (pristupljeno 17. travnja 2024.)
 76. Trupković R. (2018). Nove metode sekvenciranja DNA (Završni rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Odjel za kemiju.

- <https://repozitorij.kemija.unios.hr/islandora/object/kemos:227> (pristupljeno 02. svibnja 2024.)
77. Turnock W.J. (2012). Insect Pests. The Canadian Encyclopedia. Historica Canada.
78. Ustugi J., Toshihide K., Motomi I. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14(2):2011. 107-124. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x> (pristupljeno 22. ožujka 2024.)
79. Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2). 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011> (pristupljeno 19. travnja 2024.)
80. Virgilio M., Jordaens K., Breman F.C., Backeljau T., De Meyer M. (2012). Identifying insects with incomplete DNA barcode libraries, African fruit flies (*Diptera: Tephritidae*) as a test case. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031581> (pristupljeno 03. ožujka 2024.)
81. Waterton C., Ellis R., Wynne B. (2013). Barcoding nature : shifting cultures of taxonomy in an age of biodiversity loss. <https://tecnoscienza.unibo.it/article/view/17182/16083> (pristupljeno 19. ožujka 2024.)
82. Wilson J.J., Sing K.W., Sofian Azirun M. (2013). Building a DNA barcode reference library for the true butterflies (*Lepidoptera*) of Peninsula Malaysia: What about the subspecies? *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079969> (pristupljeno 13. ožujka 2024.)
83. Woodcock T.S., Boyle E.E., Roughley R.E., Kevan P.G., Labbee R.N., Smith A.B., (2013). The diversity and biogeography of the *Coleoptera* of Churchill: insights from DNA barcoding. *BMC Ecology*, 13(40). 1472–6785. <https://link.springer.com/article/10.1186/1472-6785-13-40> (pristupljeno 01. travnja 2024.)

Popis slika:

Slika 1. Žuta ljepljiva ploča

<https://plantella.hr/proizvodi/bio-plantella-rumene-lepljive-plosce/> pristupljeno: 02.05.2024.

Slika 2. Plava ljepljiva ploča

<https://pseno.hr/novo-u-internet-trgovini-ljepljive-ploce/> pristupljeno: 12.05.2024.

Slika 3. Struktura DNA

<https://www.mometrix.com/academy/dna/> pristupljeno: 15.05.2024.

Slika 4. Postupak izolacije DNA

<https://www.indiamart.com/proddetail/dna-extraction-kit-21293661691.html> pristupljeno: 23.05.2024.

Slika 5. Sangerova metoda sekvenciranja DNA

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing> pristupljeno: 01.06.2024.

Slika 6. Faze PCR reakcije

<https://byjus.com/question-answer/identify-and-explain-steps-a-b-and-c-in-the-pcr-diagram-given-below/> pristupljeno: 27.05.2024.

Slika 7. Tijek provedbe metode RFLP

<https://microbenotes.com/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp/> pristupljeno: 01.06.2024.

Slika 8. Tijek DNA barkodiranja

<https://www.biome-id.com/english-1/molecular-services-1/dna-barcoding/> pristupljeno: 25.05.2024.

Slika 9. Shematski prikaz jednolančane DNA strukture nalik na petlju

https://issuu.com/supha.450/docs/supha_12/s/17181102 pristupljeno: 02.05.2024.

Slika 10. Krajnji proizvod LAMP amplifikacije sa 6 petlji

https://issuu.com/supha.450/docs/supha_12/s/17181102 pristupljeno: 02.05.2024.

Slika 11. Shematski prikaz SSCP metode

[The genetics of Alzheimer's disease | CIA \(dovepress.com\)](https://www.dovepress.com/article/10.4236/genetics.2024.121001) pristupljeno 31.08.2024.

Slika 12. Žičnjak

<https://gospodarski.hr/rubrike/povrcarstvo-rubrike/kako-suzbijati-zicnjake-u-povrtnjaku/> pristupljeno : 05.05.2024.

Slika 13. Vrsta *Globodera rostochiensis*

<https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1356139-> pristupljeno: 13.03.2024.

Slika 14. Vrsta *Globodera pallida*

https://images.wur.nl/digital/collection/nematode_pict/id/672/ pristupljeno: 18.04.2024.

Slika 15. Jabukin savijač

<https://www.chromos-agro.hr/jabucni-svijac/> pristupljeno: 19.04.2024.

Slika 16. Prikaz razvoja rezistentnosti kukca na insekticid

<https://images.app.goo.gl/Gu2mbVqTShi4buu27> pristupljeno: 01.04.2024.

Životopis

Vanja Smiljanić rođena je 03.05.2002. godine u Požegi, Hrvatska. Po završetku osnovne škole 2017. godine upisuje Opću gimnaziju u Požegi. Agronomski fakultet u Zagrebu upisuje 2021. godine, smjer Fitomedicina. Svakodnevno volontira u udruzi „Noina Arka“. Aktivno se služi engleskim jezikom.