

ISSN 2623-6575

UDK 63

GLASILO FUTURE

PUBLIKACIJA FUTURE - STRUČNO-ZNANSTVENA UDRUGA ZA PROMICANJE ODRŽIVOG RAZVOJA, KULTURE I MEĐUNARODNE SURADNJE, ŠIBENIK

VOLUMEN 8 BROJ 3

PROSINAC 2025.

Glasilo Future

Stručno-znanstveni časopis

Nakladnik:

FUTURA



Sjedište udruge: Šibenik

Adresa uredništva:

Bana Josipa Jelačića 13 a, 22000 Šibenik, Hrvatska / Croatia

☎ / 📠: +385 (0) 022 218 133

✉: urednistvo@gazette-future.eu / editors@gazette-future.eu

🌐: www.gazette-future.eu

Uredivački odbor / Editorial Board:Izv. prof. dr. sc. Boris Dorbić – glavni i odgovorni urednik / *Editor-in-Chief*Emilija Friganović, dipl. ing. preh. teh., univ. mag. nutr., v. pred. – zamjenica g. i o. urednika / *Deputy Editor-in-Chief*Ančica Sečan, mag. act. soc. – tehnička urednica / *Technical Editor*

Prof. dr. sc. Željko Španjol – član

Mr. sc. Milivoj Blažević – član

Vesna Štibrčić, dipl. ing. preh. teh. – članica

Antonia Dorbić, mag. art. – članica

Gostujući urednik / *Guest editor* / (2025) 8(3) – Izv. prof. dr. sc. Ivan Juran**Međunarodno uredništvo / International Editorial Board:**

Dr. sc. Gean Pablo S. Aguiar – Savezna republika Brazil (Universidade Federal de Santa Catarina)

Prof. dr. sc. Kiril Bahcevandziev – Portugalska Republika (Instituto Politécnico de Coimbra)

Prof. dr. sc. Martin Bobinac – Republika Srbija (Šumarski fakultet Beograd)

Prof. dr. sc. Zvezda Bogevska – Republika Sjeverna Makedonija (Fakultet za zemjodjelski nauki i hrana Skopje)

Dr. sc. Bogdan Cvjetković, prof. emeritus – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Margarita Davitkovska – Republika Sjeverna Makedonija (Fakultet za zemjodjelski nauki i hrana Skopje)

Prof. dr. sc. Dubravka Dujmović Purgar – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Josipa Giljanović – Republika Hrvatska (Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu)

Prof. dr. sc. Semina Hadžiabulić – Bosna i Hercegovina (Agromediteranski fakultet Mostar)

Prof. dr. sc. Péter Honfi – Mađarska (Faculty of Horticultural Science Budapest)

Prof. dr. sc. Mladen Ivčić – Bosna i Hercegovina (Univerzitet PIM)

Doc. dr. sc. Anna Jakubczak – Republika Poljska (Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy)

Dr. sc. Željko Jurjević – Sjedinjene Američke Države (EMSL Analytical, Inc., North Cinnaminson, New Jersey)

Prof. dr. sc. Mariia Kalista – Ukrajina (National Museum of Natural History of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv)

Dr. sc. Tajana Krička, prof. emeritus – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Dejan Kojić – Bosna i Hercegovina (Univerzitet PIM)

Slobodan Kulić, mag. iur. – Helenska Republika (Federation Panhellenique del' Omithologie)

Prof. dr. sc. Branka Ljevnaić-Mašić – Republika Srbija (Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu)

Prof. dr. sc. Zvonimir Marijanović – Republika Hrvatska (Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu)

Semir Maslo, prof. – Kraljevina Švedska (Primary School, Lundäkerskolan, Gislaved)

Prof. dr. sc. Ana Matin – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Elizabeta Miskoska-Milevska – Republika Sjeverna Makedonija (Fakultet za zemjodjelski nauki i hrana)

Prof. dr. sc. Bosiljka Mustač – Republika Hrvatska (Sveučilište u Zadru)

Prof. dr. sc. Ayşe Nilgün Atay – Republika Turska (Mehmet Akif Ersoy University – Burdur, Food Agriculture and Livestock School)

Doc. dr. sc. Andrea Paut- Republika Hrvatska (Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu)

Doc. dr. sc. Nibir Pratim Choudhury – Republika Indija (The Assam Royal Global University, Guwahati, Assam)

Prof. dr. sc. Tatjana Prebeg – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Bojan Simovski – Republika Sjeverna Makedonija (Fakultet za šumarski nauki, pejzažna arhitektura i ekoinženering „Hans Em“ Skopje)

Prof. dr. sc. Davor Skejić – Republika Hrvatska (Građevinski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Azra Skender – Bosna i Hercegovina (Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću)

Akademik prof. dr. sc. Mirko Smoljić, prof. struč. stud. – Republika Hrvatska (Sveučilište Sjever, Varaždin/Koprivnica, Odjel ekonomije)

Prof. dr. sc. Nina Šajna – Republika Slovenija (Fakulteta za naravoslovje in matematiko)

Doc. dr. sc. Mladenka Šarolić, prof. struč. stud. – Republika Hrvatska (Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu)

Prof. dr. sc. Andrej Šušek – Republika Slovenija (Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Maribor)

Prof. dr. sc. Elma Temim – Bosna i Hercegovina (Agromediteranski fakultet Mostar)

Doc. dr. sc. Merima Toromanović – Bosna i Hercegovina (Biotehnički fakultet Univerziteta u Bihaću)

Prof. dr. sc. Marko Turk – Republika Hrvatska (Visoka poslovna škola PAR)

Prof. dr. sc. Ivana Vitasović Kosić – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Doc. dr. sc. Bojana Voučko – Republika Hrvatska (Prehrambeno-biotehnoški fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Ana Vujošević – Republika Srbija (Poljoprivredni fakultet Beograd)

Sandra Vuković, mag. ing. – Republika Srbija (Poljoprivredni fakultet Beograd)

Prof. dr. sc. Vesna Židovec – Republika Hrvatska (Agronomski fakultet Zagreb)

Prof. dr. sc. Denisa Žujo Zekić – Bosna i Hercegovina (Nastavnički fakultet Mostar)

Grafička priprema: Ančica Sečan, mag. act. soc.

Objavljeno: 28. prosinca 2025. godine.

Časopis izlazi u elektroničkom izdanju dva puta godišnje, krajem lipnja i prosinca, a predviđena su i dva specijalna izdanja tijekom godine iz biotehničkog područja.

Časopis je besplatan. Rukopisi i recenzije se ne vraćaju i ne honoriraju.

Autori/ce su u potpunosti odgovorni/e za sadržaj, kontakt podatke i točnost engleskog jezika.

Umnožavanje (reproduciranje), stavljanje u promet (distribuiranje), priopćavanje javnosti, stavljanje na raspolaganje javnosti odnosno prerada u bilo kojem obliku nije dopuštena bez pismenog dopuštenja Nakladnika.

Sadržaj objavljen u Glasilu Future može se slobodno koristiti u osobne i obrazovne svrhe uz obavezno navođenje izvora.

Časopis je indeksiran u CAB Abstract (CAB International).

Riječ gostujućeg urednika

Poštovani čitatelji Glasila Future,

pred vama je tematski broj stručno-znanstvenog časopisa „Glasilo Future“, u potpunosti posvećen štetnim organizmima u poljoprivredi. Riječ je o temi koja u suvremenom kontekstu zauzima središnje mjesto ne samo u znanstvenoj zajednici, već i u izravnim, svakodnevnim iskustvima poljoprivrednih proizvođača te široj javnosti koja ovisi o sigurnosti opskrbnih lanaca.

Štetni organizmi, među kojima se svojom štetnošću i prilagodljivošću posebno ističu određene vrste kukaca i korova, predstavljaju jedan od najozbiljnijih ograničavajućih čimbenika stabilne i održive poljoprivredne proizvodnje. Njihova prisutnost ne uzrokuje samo izravne gubitke u prinosu i narušavanje kvalitete proizvoda, već dugoročno ugrožava ekonomsku isplativost proizvodnje i globalnu prehrambenu sigurnost. U današnjim agroekosustavima ovaj je izazov postao još složeniji. Sinergijsko djelovanje klimatskih promjena, intenzivna poljoprivreda i globalizirana trgovina stvorili su idealne uvjete za širenje invazivnih vrsta i pojavu novih, do sada nepoznatih, štetnika na našim prostorima.

Na kraju, poseban fokus ovog broja stavili smo na psihološki i sociološki aspekt našeg odnosa s prirodom – fenomen entomofobije. Strah od kukaca često nadilazi njihovu stvarnu biološku opasnost, a ukorijenjen je u kulturnim predrasudama i često senzacionalističkom medijskom izvještavanju. Takva percepcija nepravedno stigmatizira cijelu skupinu organizama, zanemarujući pritom njihovu nezamjenjivu ekološku ulogu.

Primarni cilj ovog izdanja nije samo puko prezentiranje znanstvenih rezultata, već snažan doprinos racionalnijem razumijevanju uloge štetnih organizama. Vjerujemo da je edukacija temeljena na provjerenim činjenicama jedini put ka smanjenju neopravdanog straha i promjeni javne percepcije. Znanstveno utemeljeno znanje ključan je alat za donošenje odgovornih odluka – od primjene preciznih agrotehničkih mjera na terenu do oblikovanja informiranog javnog mnijenja.

Vjerujem da će radovi okupljeni u ovom broju „Glasila future“ biti nezaobilazan izvor informacija za znanstvenike, studente i stručnjake iz prakse. Neka ovo izdanje posluži kao platforma za daljnji, prijeko potrebni dijalog između znanosti i društva o svim izazovima i perspektivama koje donosi moderna poljoprivreda.

Izv. prof. dr. sc. Ivan Juran



Glasilo Future

Stručno-znanstveni časopis

FUTURA – stručno-znanstvena udruga za promicanje održivog razvoja, kulture i međunarodne suradnje, Bana Josipa Jelačića 13 a,
22000 Šibenik, Hrvatska

(2025) 8(3) 01–95

SADRŽAJ:

	Str.
<i>Izvorni znanstveni rad (original scientific paper)</i>	
<i>B. Dorbić, Lucija Dorbić Jurlin, Denisa Žujo Zekić, E. Kajtaž</i>	
Stavovi i percepcije o fobiji prema kukcima Attitudes and perceptions about insect phobia	01–13
<i>Pregledni rad (scientific review)</i>	
<i>Maja Čačija, Vanja Smiljanić, Zrinka Drmić, Katarina Martinko, I. Juran</i>	
Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja Molecular methods of pests detection and identification in plant protection	14–43
<i>I. Juran, Maja Mesić, Tanja Gotlin Čuljak, Katarina Martinko, Maja Čačija</i>	
Štetni kukci EPPO „Alert“ liste iz reda Lepidoptera Insect pests of EPPO „Alert“ list from order Lepidoptera	44–62
<i>Maja Čačija, Dora Badurina, Zrinka Drmić, Dinka Grubišić, I. Juran</i>	
Korisni kukci iz reda Diptera kao prirodni neprijatelji štetnih kukaca u poljoprivredi Insects of the order Diptera as natural enemies of agricultural insect pests	63–79
<i>Valentina Šoštarčić, Maja Šćepanović</i>	
Biologija i ekologija obične dikice (<i>Xanthium strumarium</i> L.) Biology and Ecology of the Common Cocklebur (<i>Xanthium strumarium</i> L.).....	80–92
<i>Obavijesti (notices)</i>	
<i>B. Dorbić</i>	
Obavijest o ispravcima Notice of corrections	93–93
<i>Upute autorima (instructions to authors)</i>	94–95

Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja

Molecular methods of pests detection and identification in plant protection

Maja Čaćija^{1*}, Vanja Smiljanić¹, Zrinka Drmić², Katarina Martinko¹, Ivan Juran¹

Pregledni rad (scientific review)

doi: 10.32779/gf.8.3.2

Citiranje/Citation³

Sažetak

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 brojčano pouzdaniju 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. Prednosti molekularnih metoda su te što su visoko osjetljive i omogućuju brzu identifikaciju malih količina uzoraka, čime se smanjuje rizik od pogrešne identifikacije vrsta. U usporedbi s klasičnim metodama detekcije i identifikacije štetnika, molekularne 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.

Abstract

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

¹ Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska.

* E-mail: mcacija@agr.hr (dopisna autorica).

² Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Centar za zaštitu bilja, Gorice 68b, 10000 Zagreb, Republika Hrvatska.

³ Prezime, I. (2025). Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja. *Glasilo Future*, 8(3), 14–43. / Prezime, I. (2025). Molecular methods of pests detection and identification in plant protection. *Glasilo Future*, 8(3), 14–43.

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 advantages of molecular methods are that they are highly sensitive and enable rapid identification of small amounts of samples, thus reducing the risk of misidentification of species. Compared to classical methods of detection and identification of pests, molecular methods are more expensive due to the need for specialized equipment and require high expertise for application and analysis of results.

Key words: detection, identification, molecular methods, resistance, insect pests.

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; Sheikha, 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 et al., 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 et al., 2018). Cilj rada je pregledom literaturnih izvora 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.

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 lovki ili 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 et al., 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 preliminarnu 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 et al., 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 lovke za hvatanje. Korištenje referentnih materijala, mikroskopskih analiza i konzultacije sa stručnjacima, također mogu olakšati identifikaciju (Bažok et al., 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 mamacima i olfaktornim mamacima (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005).

Olfaktorni atraktanti su hranidbeni mameci 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 ljepljivom. U Hrvatskoj se rabe feromoni za praćenje velikog broja štetnika (jabukovog savijača, grozdovih moljaca, kukuruzne zlatice, sovice gama, kupusnog moljca, kupusne i povrtne sovice, klisnjaka 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 noćnih 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 fluorescentne lampe. Obojeni atraktanti rabe se u praćenju tako što štetnika privlače pojedine boje. Najčešće se koriste žute, plave i bijele ploče premazane nesušivim ljepljivom. 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 privlače tripse, a bijele se koriste za praćenje malinova pupara i šljivine osice. Lovne ljepljive trake i daske starija su metoda, zamijenjene su ljepljivim pločama (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005).



Slika 1. Žuta ljepljiva ploča (Izvor: Ubuy.hr, 2025)

Figure 1. Yellow sticky trap (Source: Ubuy.hr, 2025)

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; Pajač Živković et al., 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 et al., 2017; Pajač Živković et al., 2020). Pri pojavi štetnika automatski sustav za praćenje odmah ga identificira što omogućava ručni pregled snimljenih fotografija (Marić et al., 2016; Pajač Živković et al., 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 et al., 2009; Pajač Živković et al., 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 et al., 2016; Pajač Živković et al., 2020). Praćenje štetnika može pružiti uvid u učinkovitost primjene insekticidnog tretmana, smanjiti njihovu uporabu i pomoći pri boljem razumijevanju populacije štetnika u poljoprivredi (Potamitis et al., 2017; Pajač Živković et al., 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 (Pajač Živković et al., 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 palmina 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 et al., 2016).

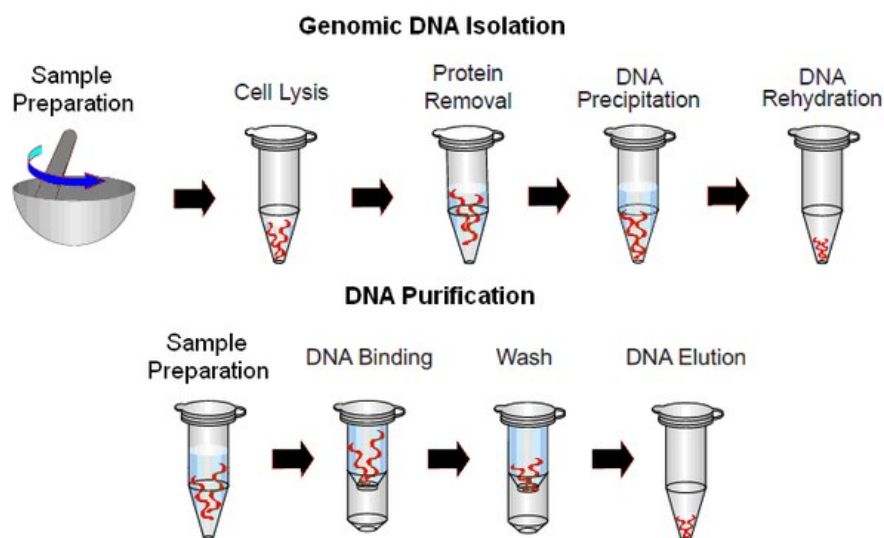
Tradicionalne metode detekcije i identifikacije štetnika imaju nekoliko prednosti. One su jednostavne, zahtijevaju samo osnovnu opremu bez potrebe za naprednom tehnologijom pa su time i lako dostupne. Cijena ovih metoda je niža u usporedbi sa primjerice molekularnim metodama i mogu se koristiti za identifikaciju 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 i nije moguće otkriti niske populacije štetnika (Radhika et al., 2023).

Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika

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) (Plejić, 2021).

Izolirana DNA koristi se za različite molekularne analize, kao što su sekvenciranje gena, PCR (lančana reakcija 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 ispire hladnim alkoholom kako bi se uklonile nečistoće. Na kraju se taložena DNA otapa u puferu ili destiliranoj vodi za daljnje analize (slika 2.) (Alberts et al., 2002).



Slika 2. Postupak izolacije DNA (Izvor: Indiamart, 2025)

Figure 2. Genomic DNA isolation (Source: Indiamart, 2025)

Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcije polimerazom ili polimerazna lančana reakcija (engl. *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.

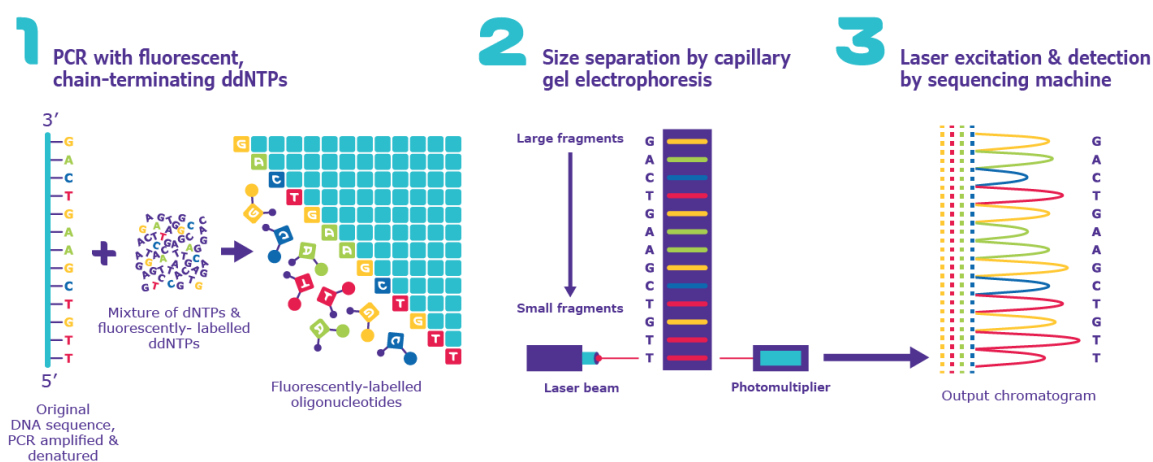
Tijekom toplinske denaturacije, dvolančana DNA denaturira se na dvije odvojene niti. Zatim se reakcijske smjese ohlade na temperaturi koja dopušta početnicama da se spajaju na ciljane sekvence odvijanih lanaca DNA. Tijekom produljenja početnica, DNA polimeraza tvori novi lanac produžujući vezane početnice s nukleotidima stvarajući komplementarnu kopiju ciljane DNA sekvence. Kod ponovljenog ciklusa, eksponencijalno dolazi do povećanja broja ciljanih sekvenci. Produkti PCR amplifikacije vizualiziraju se na gelu za elektroforezu, u obliku traka bojanjem etidij-bromidom (Erlich, 1989).

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. Nedostaci 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).

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, a 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 3.), 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, 2002; Trupković, 2018).



Slika 3. Sangerova metoda sekvenciranja DNA (Izvor: Sigma-Aldrich, 2025)

Figure 3. Sanger DNA sequencing method (Source: Sigma-Aldrich, 2025)

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 et al., 1994), kao i mogućnost korištenja u različite svrhe, primjerice sekvenciranje genoma (Church i Gilbert, 1984), lociranje rijetkih baza (Sayers i Waring, 1993) i detektiranje mutacija (Ferraboli et al., 1993; Trupković, 2018).

Metoda pirosekvenciranja temelji se na detekciji otpuštenog pirofosfata i emitiranog svjetla u reakcijama polimerizacije (Nyrén i Lundin 1985). 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). 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 et al., 2009).

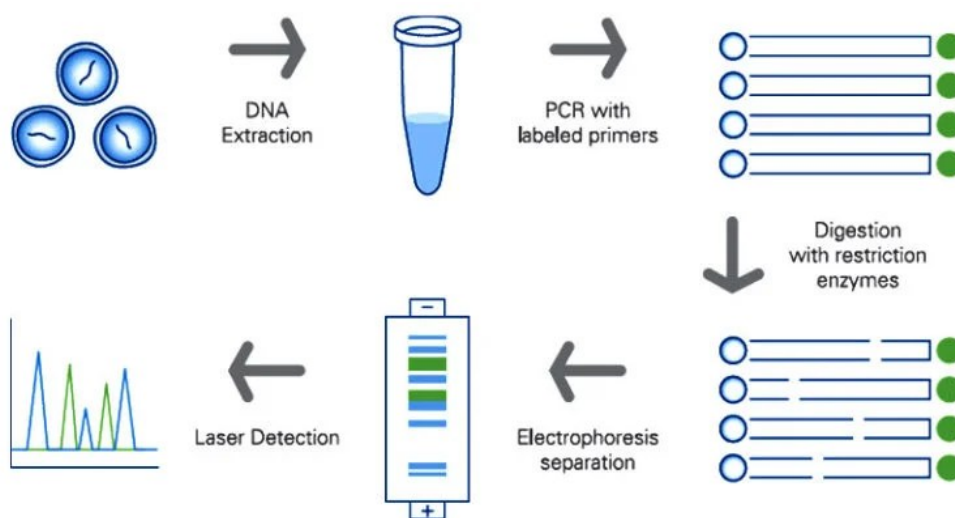
Razvijena je i novogeneracijska metoda, sekvenciranje nanoporama, koja ne koristi fluorescentno označavanje baza. Fragmenti DNA prolaze kroz nanopore i time stvaraju naboj u gustoći električnog strujanja koji se potom izračunava i analizira na uređaju (Greninger et al., 2015). Nanopore mogu biti biološke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

Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP)

Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. 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 4.) (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 i molekularnoj genetici uzgoja biljaka (Beckmann i Soller, 1986).



Slika 4. Tijek provedbe metode RFLP (Izvor: Gowtham, 2025)

Figure 4. RFLP method implementation process (Source: Gowtham, 2025)

DNA barkodiranje

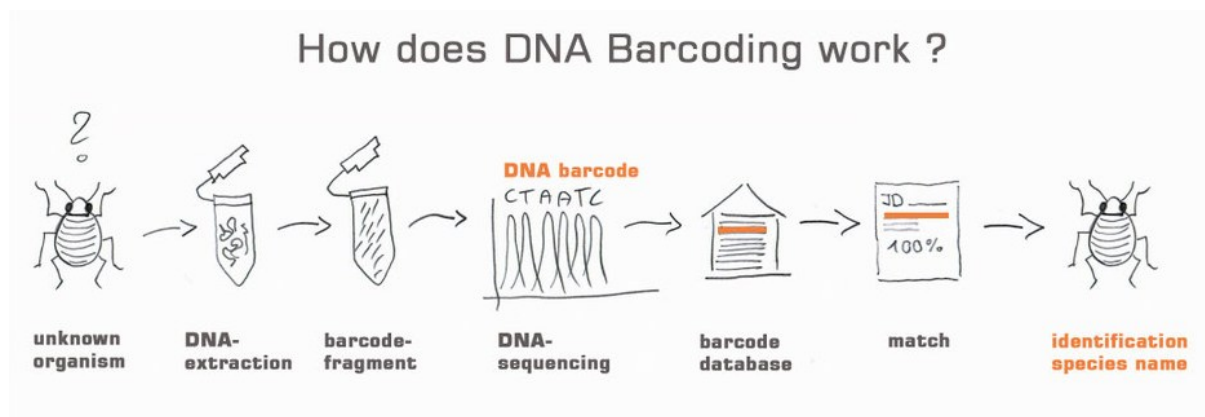
DNA barkodiranje ili genska identifikacija vrsta je standardizirani molekularni sustav identifikacije vrsta. Ova metoda ubrzano se počela razvijati tijekom 1990-ih godina (Polak, 2012). Pojedini dijelovi DNA omogućuju diskriminaciju između vrsta, populacija, odnosno jedinki. Najčešće se za identifikaciju vrsta koriste kratki odsjeci 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 et al., 2002).

Idealan sustav DNA barkodiranja treba ispunjavati sljedeće kriterije (Valentini et al., 2009):

- 1) Sekvencirana regija gena treba 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) Treba biti standardiziran, s istom regijom DNA koja se koristi za različite taksonomske skupine;
- 5) Treba 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 et al., 2009).

Tipičan tijek barkodiranja (slika 5) 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 et al., 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 et al., 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 et al., 2002). 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 et al., 2010).



Slika 5. Tijek DNA barkodiranja (Izvor: Biome-id, 2025)

Figure 5. DNA barcoding process (Source: Biome-id, 2025)

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). 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 s DNA barkodovima živog svijeta, što je posebno korisno u slučajevima vrsta kojima prijete izumiranje (Waterton et al., 2013).

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 et al., 2011).

DNA barkodiranje, osim u taksonomiji, koristi se i u (Kaur, 2015):

- 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.

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP)

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *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 et al., 2003; Kadoić Balaško et al., 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 et al., 2003; Kadoić Balaško et al., 2022).

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,

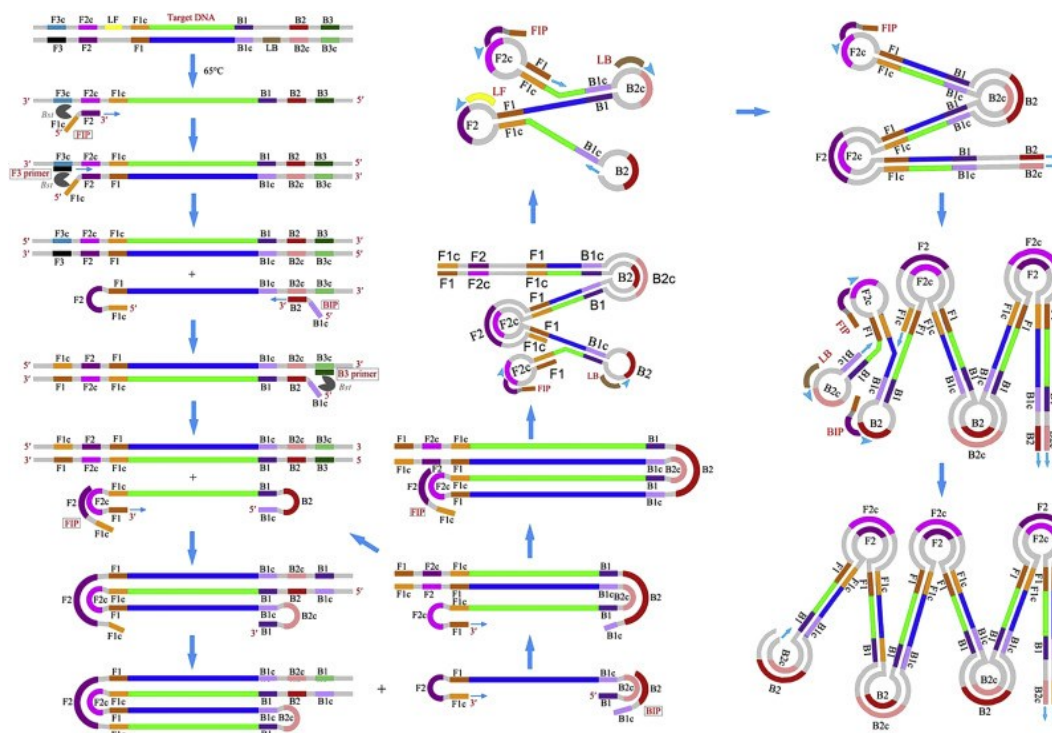
Najvažniji korak u prvoj fazi je stvaranje šablona u obliku jednolančane strukture nalik na petlju (slika 6.) (Ognjanović, 2022).



Slika 6. Shematski prikaz jednolančane DNA strukture nalik na petlju (Izvor: Ognjanović, 2022)

Figure 6. Schematic representation of a single-stranded DNA loop-like structure (Source: Ognjanović, 2022)

U ostalim fazama cilj je dobiti ekspanzionalnu amplifikaciju šablona i zamjenu lanaca, što dovodi do stvaranja dvolančane DNA. Na kraju nastaje kompleksna struktura (slika 7.) (Ognjanović, 2022).



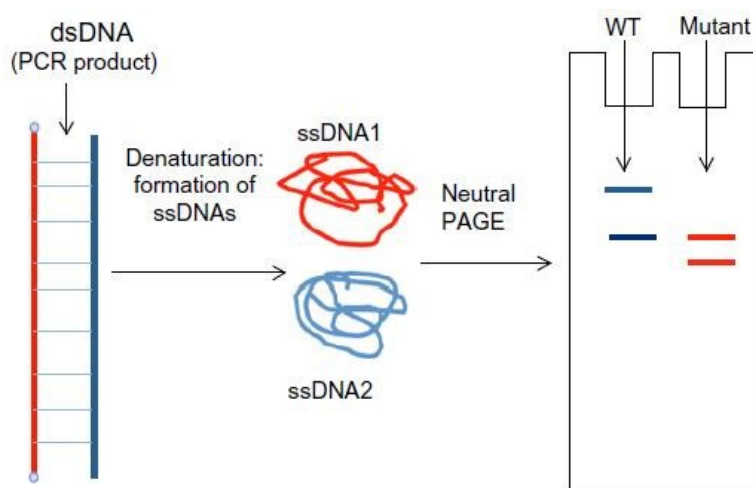
Slika 7. Krajnji proizvod LAMP amplifikacije sa šest petli (Izvor: Li et al., 2016)

Figure 7. The final product of six-loop LAMP amplification (Source: Li et al., 2016)

Jednočlani konformacijski polimorfizam (SSCP)

Jednočlani konformacijski polimorfizam (engl. *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 identifikacija štetnih genotipova (Hayashi, 1991).

Prvi korak SSCP metode je izolacija DNA. Ciljani fragmenti DNA se amplificiraju pomoću PCR metode. Amplificirani fragmenti DNA se denaturiraju da bi se dobili jednočlani fragmenti. Jednočlani fragmenti DNA se razdvajaju elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (slika 8.). Različite konformacije će migrirati različitim brzinama. Gel se boji ili se koriste radioaktivne ili fluorescentne oznake da bi se vizualizirali fragmenti DNA (Hayashi, 1991).



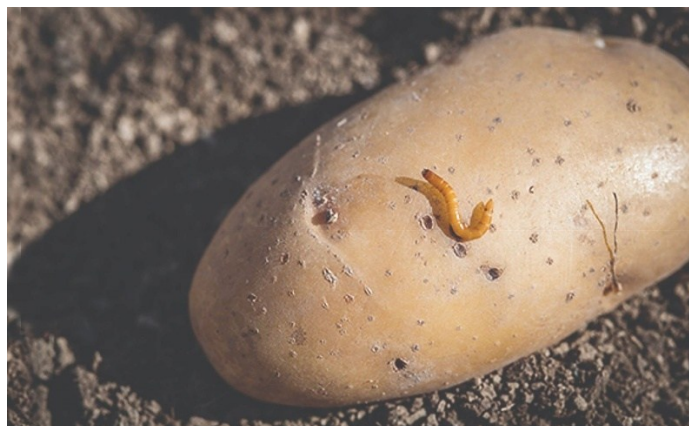
Slika 8. Shematski prikaz SSCP metode (Izvor: Bagyinszky et al., 2014)

Figure 8. Schematic representation of the SSCP method (Source: Bagyinszky et al., 2014)

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 et al., 2004). Prema Šipek (2017), genomski 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 9.) 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. Svaki uzorak je uspješno sekvenciran te su sekvence uspoređene s bazom GenBank čime je napravljena identifikacija vrsta. Rezultati su pokazali brojnost pojedine vrste žičnjaka na lokalitetima Središnje Hrvatske (Šipek, 2017).



Slika 9. Žičnjak (Izvor: Šubić, 2022)

Figure 9. Wireworm (Source: Šubić, 2022)

Metoda PCR korištena je i kod krumpirovih cistolikih nematoda, *Globodera rostochiensis* i *Globodera pallida*, 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 zastupljenost ovih nematoda u Hrvatskoj. Analizirano je 10 populacija uzorkovanih u tri županije. U svim analiziranim populacijama identificirana je vrsta *G. rostochiensis* (Grubišić et al., 2013).

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 (Polak, 2012):

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.

Ono što je smatrano da obuhvaća 16 vrsta, barkodiranjem je utvrđeno da se radi o 73 vrste, te se sve osim dvije mogu 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 s razlikama u ishrani u stadiju ličinke te u spolu. Analiza COI gena provedena je na 446 uzgojenih odraslih jedinki. Time su otkrivena tri nova klastera te klasteri koji kovariraju s već utvrđenim. Ukupno je 10 prikriivenih 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 *Polyctor* spp., *Cobalus* spp. i *Neoxeniades* spp., nisu uspješno razdvojene DNA barkodiranjem. 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 konspecifičnog 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 (Ashfaq i Hebert, 2016): Coleoptera (Woodcock et al., 2013), Diptera (Nagy et al., 2013), Hemiptera (Park et al., 2011), Lepidoptera (Janzen et al., 2005) i Thysanoptera (Rebijith et al., 2014). 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 et al., 2015). 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 et al., 2015). Leptiri su najintenzivnije proučavan red, zastupljen je sa više od 100000 BIN-ova (Wilson et al., 2013). Kod dvokrilaca je također potvrđena učinkovitost DNA barkodiranja (Virgilio et al., 2012). 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 et al., 2014). Slično tome, ličinke *Camptomyia corcitalis* i *C. heterobia*, koje uzrokuju teške štete u proizvodnji Shitake gljiva lako se razlikuju pomoću crtičnog koda (Shin et al., 2013). 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 et al., 2008).

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

Tijekom 2017. i 2018. godine u Hrvatskoj su provedene analize genetske strukture populacija jabukina savijača (*Cydia pomonella*), ekonomskog štetnika jabuke diljem svijeta. Korišten je jabukin savijač integriranih i ekoloških voćnjaka uporabom SNP metode (Kadoić Balaško et al., 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 et al., 2022).

Glavni štetnici roda *Spodoptera*: *S. exigua* (mali kukuruzni moljac), *S. frugiperda* (jesenska sovica), *S. litura* (lisna sovica) 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. Uzorci 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 fluorescenciju pod UV svjetlom (Nam et al., 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 sovica). Metoda je pokazala visoku rezoluciju u razlikovanju sličnih vrsta kukaca koje je teško razlikovati drugim metodama (Song et al., 2023).

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. Glavni uzrok pojave rezistentnosti je učestala primjena insekticida istog mehanizma djelovanja. Zbog pojave rezistentnosti kod sojeva štetnika u poljoprivredi nastaju 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).

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 et al., 2021).

Molekularne metode istraživanja rezistentnosti temeljene su na genotipizaciji mutacija karakterističnih kod određenog tipa rezistentnosti (Delye et al., 2016; Štivičić et al., 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 et al., 2007; Štivičić et al., 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 et al., 2016; Štivičić et al., 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 et al., 2020).

Zaključak

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 et al., 2003). Mnoge molekularne metode mogu se automatizirati, što olakšava analizu većeg broja uzoraka u kratkom vremenu (Marković et al., 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 (Mareković et al., 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 (Mareković, 2008).

Napomena

Ovaj rad proizašao je iz završnog rada Vanje Smiljanić, naslova „Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja”, studentice prijediplomskog studija Fitomedicina na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu (vidi literaturu).

Literatura

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Keith, R., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.

Ashfaq, M., Hebert, P. D. N. (2016). DNA barcodes for bio-surveillance: regulated and economically important arthropod plant pests. *Genome*, 59(11), 933–945. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0024>.

Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S., Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 535-551. <https://doi.org/10.2147/CIA.S51571>.

Barres, B., Corio-Costet, M. F., Debieu, D. D., Délye, C., Fillinger-David, S., Grosman, J., Micoud, A., Siegwart, M., Walker, A. S. (2016). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, 21 (10), 834-853. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>.

Bass, C., Nikou, D., Donnelly, 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), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-111>.

Bažok, R., Čačija, M., Karoglan Kontić, J., Kramarič, M., Lemić, D., Stolz, M., Székács, A., Takács, E. (2022). *Zaštita bilja u ekološkoj poljoprivredi - Priručnik za edukatore*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu. <https://topplantportal.eu/mod/book/view.php?id=1064&chapterid=501> (pristupljeno 28. ožujka 2024.).

Bažok, R., Lemić, D. (2017). Rezistentnost štetnika na insekticide. *Glasilo biljne zaštite*, 17(5), 429-438.

Beckmann, J. S., Soller, M. (1986). Restriction Fragment Length Polymorphisms in Poultry Breeding. *Poultry Science*, 65(8), 1474-1488. <https://doi.org/10.3382/ps.0651474>.

Biome-id (2025). DNA Barcoding Service. <https://www.biome-id.com/english-1/dna-barcoding/> (pristupljeno 22. prosinca 2025).

Boland, E. J., Pillai, A., Odom, M. W., Jagadeeswaran, P. (1994). Automation of the Maxam-Gilbert chemical sequencing reactions. *Biotechniques*, 16(6), 1088-1095.

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. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00018-1).

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. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/23/235101>.

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. <https://doi.org/10.1007/s00300-007-0402-z>.

Church, G. M., Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *PNAS*, 81(7), 1991-1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.7.199>.

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“ by Petrovskii, Petrovskaya and Bearup. *Physics of Life Reviews*, 11 (3), 533-535. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2014.06.011>.

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. <https://doi.org/10.1002/ps.4058>.

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., Korlach, J., Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323(5910), 133-138. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>.

Erlich, H. A. (1989). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. London: Palgrave Macmillan.

Etzler, F. E., Wanner, K. W., Morales-Rodriguez, A., Ivie, M. A. (2014). DNA barcoding to improve the species-level management of wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology*, 107(4), 1476-1485. <https://doi.org/10.1603/EC13312>.

Ferraboli, S., Negri, R., Mauro, E., Barlati, S. (1993). One-lane chemical sequencing of 3' fluorescent-labeled DNA. *Analytical biochemistry*, 214(2), 566-570. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1539>.

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. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9709-8>.

Footitt, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02297.x>.

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. <https://doi.org/10.1603/EC13521>.

Gowtham, B. (2025). Mitochondrial DNA analysis as a forensic tool. *Microbe Notes*. <https://microbenotes.com/mitochondrial-dna-analysis/> (pristupljeno 22. prosinca 2025.).

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. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0220-9>.

Grubišić, D., Pajač 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.

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125635>.

Hartl, D. L., Jones, E. W. (1992). *Genetics Principles and Analysis. Fourth Edition*. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers.

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. <https://doi.org/10.1101/gr.1.1.34>.

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. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

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. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12354>.

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. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260279>.

Indiamart (2025). Transiom Genomics DNA Extraction Kit. <https://www.indiamart.com/proddetail/dna-extraction-kit-21293661691.html> (pristupljeno 22. prosinca 2025.).

Ivanović, M., Koprivica, M., Milijašević, S., Dukić, N., Duduk, B. (2004). Primena molekularnih metoda u dijagnostici bolesti. *Pesticidi i fitomedicina*, 19(4), 223-231.

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.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1715>.

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 of Food Protection*, 76(1), 144-149. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-168>

Kadoić Balaško, M., Lemić, D., Mikac, K. M., Bažok, R. (2021). Multidisciplinirani pristup istraživanju rezistentnosti kod kukaca. *Glasilo Future*, 4(4), 22-36. <https://doi.org/10.32779/gf.4.4.2>

Kadoić Balaško, M. (2022). *Genomic changes associated with insecticide resistance in economically important insect pests in Croatia* (Disertacija). Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

Kaur, S. (2015). DNA Barcoding and Its Applications. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(2), 602-604.

Lazcka, O., Del Campo, J., Munoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1205-1217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>.

Li, J.-j., Xiong, C., Liu, Y., Liang, J.-s., Zhou, X.-w. (2016). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Emergence as an alternative technology for herbal medicine identification. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1956. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01956>.

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* (Arecaceae: Arecaceae) Trees and Offshoots in Saudi Arabian Orchards. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 622-628. <https://doi.org/10.1093/jee/tov398>.

Mareković, I. (2008). *Značenje molekularnih metoda u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija uzrokovanih bakterijama* (Disertacija). Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet.

Mareković, I., Bošnjak, Z., Plečko, V. (2014). Evaluacija real-time PCR metode za izravnu identifikaciju mikobakterija u kliničkim uzorcima. Knjiga sažetaka, CROCMID 2013, 10. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 7. hrvatski kongres o infektivnim bolestima, Rovinj, Hrvatska.

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), Opatija, Hrvatska, 508-512. <http://dx.doi.org/10.1109/MIPRO.2016.7522197>.

Marković, E. (2021). *Mračna strana evolucije - Kako evoluiraju špiljske životinje* (Završni rad). Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet.

Miresmailli, S., Badulescu, D., Mahdavian, M., Zamar, R. H., Isman, M. B. (2009). Integrating plant chemical ecology, sensors and artificial intelligence for accurate pest monitoring. U: Tomatoes:

Agricultural Procedures, Pathogen Interactions and Health Effects (Aube, E. D., Poole, F. H., ur.). New York: Nova Science Publishers, Inc., 1-17.

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*, 151, 126-140. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.08.023>.

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>.

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), 883. <https://doi.org/10.3390/insects12100883>.

Narayanan, S. (1991). Applications of restriction fragment length polymorphism. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 21(4), 291-296.

Nyrén, P., Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 504-509. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90211-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90211-8).

Ognjanović, M. (2022). LAMP metoda - budućnost jednostavnije amplifikacije nukleinskih kiselina? https://issuu.com/supha.450/docs/supha_12/s/17181102 (pristupljeno 08. svibnja 2024.).

Oštrec, L.J., Gotlin Čuljak, T. (2005). *Opća entomologija*. Čakovec: Zrinski d. d.

Pajač 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.

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), 429-434. <https://doi.org/10.1017/S0007485310000714>.

Plejić, E. (2021). *Infracrvena spektroskopija nukleinskih kiselina* (Završni rad). Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet.

Polak, B. (2012). *Barkodiranje života* (Završni rad). Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet.

- 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>.
- 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), 15-31. <https://ijisae.org/index.php/IJISAE/article/view/4197>.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N. (2007). The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology*, 7(3), 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>.
- 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), 1328-1347.
- Rhoads, A., Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>.
- Rizvanović-Smajlović, A., Elez-Burnjaković, N. (2013). DNA barcoding - Način identifikacije odabranih vrsta leptira kupusara iz Bosne i Hercegovine. *Prilozi fauni Bosne i Hercegovine*, 9, 37-43.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyérén, P. (2001). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical biochemistry*, 242(1), 84-89. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432>.
- Russell, P. (2002). *iGenetics*. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Sayers, E. W., Waring, M. J. (1993). Footprinting titration studies on the binding of echinomycin to DNA incapable of forming Hoogsteen base pairs. *Biochemistry*, 32(35), 9094-9107. <https://doi.org/10.1021/bi00086a014>.
- 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>.
- Sciaretta, A., Calabrese, P. (2019). Development of Automated Devices for the Monitoring of Insect Pests. *Current Agriculture Research Journal*, 7(1), 19-25. <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.7.1.03>.
- Sheikha, A.F. (2019). Tracing insect pests: is there new potential in molecular techniques? *Insect Molecular Biology*, 28(6), 759-772. <https://doi.org/10.1111/imb.12601>.

Shin, S., Jung, S., Lee, H., Lee, S. (2013). Molecular identification of dipteran pests (Diptera: Sciaroidea) from shiitake mushroom. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 200-209. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12057>.

Sigma-Aldrich (2025). Sanger Sequencing Steps & Method. Merck KGaA. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing> (pristupljeno 22. prosinca 2025.).

Smiljanić, V. (2024). *Molekularne metode detekcije i identifikacije štetnika u zaštiti bilja* (Završni rad). Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

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 s(3), 911. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030911>.

Stoddart, D., Heron, A. J., Mikhailova, E., Maglia, G., Bayley, H. (2009). Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *PNAS*, 106(19), 7702-7707. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901054106>.

Strunjak Perović, I., Topić Popović, N. (1999). PCR kao dijagnostička metoda u akvakulturi. *Croatian Journal of Fisheries*, 57(4), 181-188.

Šipek, M. (2017). *Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda Agriotes* (Završni rad). Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

Štivičić, A., Pajač Živković, I., Lemić, D. (2020). Metode utvrđivanja rezistentnosti u entomološkim znanostima. *Fragmenta phytomedica*, 34(6), 27-38.

Šubić, M. (2022). Kako suzbijati žičnjake u povrtnjaku. *Gospodarski list*. <https://gospodarski.hr/rubrike/povrcarstvo-rubrike/kako-suzbijati-zicnjake-u-povrtnjaku/> (pristupljeno 22. prosinca 2025.).

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>.

Toor, R. F., Foster, S. P., Anstead, J. A., Mitchinson, S., Fenton, B., Kasprowicz, 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>.

Trupković, R. (2018). *Nove metode sekvenciranja DNA* (Završni rad). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Turnock, W. J. (2012). Insect Pests. The Canadian Encyclopedia. <https://thecanadianencyclopedia.ca/en/article/insect-pests> (pristupljeno 18. svibnja 2024.).

Ubuy.hr (2025). Walbest yellow sticky traps 20 pack gnat trap gnat killer fruit fly paper fly traps indoor sticky fungus gnat sticky traps insects. <https://www.ubuy.hr/en/product/1PT9DOL1C-walbest-yellow-sticky-traps-20-pack-gnat-trap-gnat-killer-fruit-fly-paper-fly-traps-indoor-sticky-fungus-gnat-sticky-traps-insects> (pristupljeno 22. prosinca 2025.).

Ustugi, J., Toshihide, K., Motomi, I. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14(2), 107-124. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>.

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>.

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), e31581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031581>.

Waterton, C., Ellis, R., Wynne, B. (2013). *Barcoding nature: shifting cultures of taxonomy in an age of biodiversity loss*. London: Routledge.

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), e79969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079969>.

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>.

Primljeno: 4. studenoga 2025. godine

Received: November 4, 2025

Prihvaćeno: 27. prosinca 2025. godine

Accepted: December 27, 2025