Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda Agriotes

Šipek, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:327342

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda *Agriotes*

DIPLOMSKI RAD

Martina Šipek

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Fitomedicina

Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda *Agriotes*

DIPLOMSKI RAD

Martina Šipek

Mentor: Prof.dr.sc. Renata Bažok

Neposredna voditeljica: Doc.dr.sc. Maja Čačija

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Martina Šipek**, JMBAG 0119002520, rođen/a 10.02.1990. u Zagrebu, izjavljujem

da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda *Agriotes*

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog 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 diplomski 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 diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Martine Šipek**, JMBAG 0119002520, naslova

Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda *Agriotes*

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	prof. dr. sc. Renata Bažok	mentor	_____
	doc. dr.sc. Maja Čačija	neposredni voditelj	_____
2.	prof. dr. sc. Marijana Barić	član	_____
3.	izv. prof. dr. sc. Dinka Grubišić	član	_____

Sadržaj

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD 1

2. CILJ RADA 3

3. PREGLED LITERATURE 4

3.1. Sistematika 4

3.2. Rasprostranjenost 4

3.2.1. Porodica Elateridae 4

3.2.2. Rod *Agriotes* 5

3.3. Morfologija 5

3.4. Vrste roda *Agriotes* 7

3.5. Biologija i ekologija 9

3.6. Gospodarski značajne biljke domaćini, ishrana i štete 11

3.7. Metode prognoze pojave i suzbijanje 13

3.7.1. Metode utvrđivanja brojnosti i prognoze pojave žičnjaka 13

3.7.2. Pragovi odluke 19

3.7.3. Suzbijanje žičnjaka 20

3.8. Identifikacija vrsta žičnjaka 24

3.8.1. Morfološka identifikacija 25

3.8.2. Molekularna identifikacija 25

4. MATERIJALI I METODE 27

4.1. Morfološka identifikacija 29

4.2. Molekularna identifikacija 30

4.3. Obrada podataka 31

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 33

5.1. Rezultati identifikacije i izračun pogreške 34

5.2. Brojnost i dominantnost žičnjaka roda *Agriotes* 36

5.3. Statistička analiza brojnosti i dominantnosti žičnjaka roda *Agriotes* 39

6. RASPRAVA 41

6.1. Rezultati identifikacije i izračun pogreške 41

6.2. Brojnost i dominantnost žičnjaka roda *Agriotes* 44
6.2.1. Brojnost i dominantnost vrste *A. brevis* 44
6.2.2. Brojnost i dominantnost vrste *A. lineatus* 45
6.2.3. Brojnost i dominantnost vrste *A. obscurus* 46
6.2.4. Brojnost i dominantnost vrste *A. sputator* 46
6.2.5. Brojnost i dominantnost vrste *A. ustulatus* 46
6.3. Statistička analiza brojnosti i dominantnosti žičnjaka roda *Agriotes* 47
7. ZAKLJUČCI 50
8. LITERATURA 52
ŽIVOTOPIS 59

Popis slika

Slika 1. Najzastupljenije vrste roda *Agriotes* u Hrvatskoj (Izvor: http://www.elateridae.com/index.php) 8
Slika 2. Metode utvrđivanja zaraze i prognoze pojave (modificirano prema Maceljski, 2002). 14
Slika 3. Feromonski mamci YATLORf (lijevo) i VARb3 (desno), (Izvor: Čačija, 2015) 18
Slika 4. Racionalna strategija integrirane zaštite od žičnjaka, (Izvor: Furlan, 2005) 21
Slika 5. Područje i Lokacije sa kojih su sakupljani žičnjaci; a) Lokacije označene na karti Hrvatske, b) Lokacije na karti izbliza, (Izvor: https://www.google.hr/maps/) 28
Slika 6. Fotografije devetog abdominalnog segmenta žičnjaka. Lijevo je prikaz žičnjaka koji ne pripada rodu *Agriotes* i desno je slika žičnjaka koji pripada rodu *Agriotes,* (Izvor: Šipek, 2013). 29
Slika 7. Abdominalni dio (zadak) vrsta žičnjaka determiniranih u prikupljenom uzorku: A - *A. brevis*; B – *A. lineatus*; C – *A. sputator*; D – *A.ustulatus,* (Izvor: Šipek i Majić, 2013) 33
Slika 8. Sekvence DNA žičnjaka roda Agriotes vizualizirani na agaroznom gelu. Linija 1: DNA biljeg za veličinu (100 – 1000 bp). Linija 2: A. *ustulatus*, 323 bp; Linija 3: *A. sputator*, 168 bp; Linija 4: *A. lineatus*, 293 i 455 bp; Linija 5: *A. brevis*, 168 i 462 bp (Izvor: Čačija, 2015) 33
Slika 9. Postotak pogreške morfološke identifikacije za svaku pojedinu vrstu roda Agriotes 35
Slika 10. Udio žičnjaka identificiranih morfološki (A) i molekularno (B), utvrđenih na dvije lokacije istraživanja 37
Slika 11. Brojnost svake pojedine vrste žičnjaka identificiranih morfološki i molekularno na dvije lokacije istraživanja 37
Slika 12. Indeks dominantnosti morfološke (A) i molekularne (B) identifikacije i klasifikacija zastupljenosti žičnjaka roda *Agriotes*. Klasifikacija prema Tischler i Hydeman (Balarin, 1974.): eudominantna vrsta (>10%), dominantna vrsta (od 5 % do 10%), subdominantna vrsta (od 1 % do 4,99 %), recedentna vrsta (od 0,5 % do 0,99 %), subrecedentna vrsta (od 0,01% do 0,49 %). 38

Popis tablica

Tablica 1. Mogući odnos intenziteta zaraze žičnjacima i metode primjene zemljišnih insekticida, (Izvor: Maceljski, 2002) 23
Tablica 2. Lokaliteti s kojih su sakupljani uzorci od 2009 do 2011 godine i podaci o poljima, (Izvor: Čačija, 2015) 28
Tablica 3. Početnice (ime i sekvenca) korištene u Multiplex PCR, (Izvor: Čačija, 2015, prema Staudacher i sur., 2011a) 30
Tablica 4. Prikaz rezultata morfološke i molekularne identifikacije žičnjaka na dva istraživana lokaliteta 34
Tablica 5. Prikaz rezultata morfološke i molekularne identifikacije 5 vrsta žičnjaka na dva istraživana lokaliteta 35
Tablica 6. Prosječna brojnost žičnjaka vrsta roda Agriotes na istraživanim lokacijama i rezultat analize varijance Dvostranim Studentovim t-testom 39
Tablica 7. Prosječni indeksi dominantnosti vrsta roda Agriotes na istraživanim lokacijama i rezultat analize varijance Dvostranim Studentovim t-testom 39

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice Martine Šipek, naslova:

Usporedba morfološke i genetske identifikacije ličinki vrsta roda *Agriotes*

Žičnjaci roda *Agriotes* su polifagni štetnici i dokazano je da postoje razlike u štetnosti vrsta. Cilj ovog istraživanja je bio determinirati ličinke pet najštetnijih vrsta (*Agriotes brevis* Candeze, *Agriotes lineatus* Linnaeus, *Agriotes obscurus* Linnaeus, *Agriotes sputator* Linnaeus i *Agriotes ustulatus* Schäller) na temelju morfologije i na temelju genetske analize DNA, te utvrditi pouzdanost korištenih metoda identifikacije. U istraživanju od 2009. do 2011. godine na području središnje Hrvatske, prikupljeno je ukupno 191 jedinka, koje su identificirane pomoću morfoloških ključeva i molekularnom analizom njihovih genoma. Iz dobivenih rezultata izražena je dominantnost pojedine vrste, te pouzdanost metoda identifikacije. Utvrđeno je da je pogreška morfološke identifikacije 31,94%, zbog velike sličnosti između vrsta. Molekularna identifikacija je do vrste uspješno provedena za sve jedinke, čime je dokazana njezina pouzdanost. Prema brojnosti i dominantnosti, najzastupljenije su vrste *A. brevis*, i *A. sputator* (eudominantne). Vrste *A. lineatus* i *A. ustulatus* su zastupljene u manjem broju (subdominantne), a vrsta *A. obscurus* nije utvrđena. Statističkom analizom utvrđeno je da nema signifikantnih razlika između dobivenih rezultata, što upućuje da postotak pogreške morfološke identifikacije nije značajan. Prema dobivenim rezultatima sugerirano je kombinirano korištenje morfološke i molekularne identifikacije za potpuno razlikovanje vrsta žičnjaka, u svrhu održivog razvoja poljoprivredne proizvodnje i u skladu sa održivom zaštitom bilja.

Ključne riječi: Žičnjaci, *Agriotes*, molekularna identifikacija, morfološka identifikacija.

Summary

Of the master's thesis – student **Martina Šipek,** entitled:

Comparison of morphological and molecular identification of larvae of genus *Agriotes*

The wireworms of the genus *Agriotes* are polyphagous pests and it is proven that there are differences in damage caused by different species. The aim of this study was to determine the larvae of the five most common species (*Agriotes brevis* Candeze, *Agriotes lineatus* Linnaeus, *Agriotes obscurus* Linnaeus, *Agriotes sputator* Linnaeus i *Agriotes ustulatus* Schäller) based on morphology and genetic DNA analysis and to determine the reliability of the identification methods. In the 2009-2011 research in Central Croatian area, a total of 191 individuals were collected and identified by morphological keys and molecular analysis of their genomes. From the results obtained, the dominance of a particular species and the reliability of the identification method was expressed. It was found that the error of morphological identification was 31.94% due to the great similarity between the species. Molecular identification was successfully performed for all individuals, proving its reliability. According to the dominance level, the most common species is *A. brevis*, and *A. sputator* (eudominant). Species *A. lineatus* and *A. ustulatus* are less represented (subdominant), and species *A. obscurus* was not found. Statistical analysis found that there were no significant differences between the obtained results, indicating that the error in morphological identification was not significant. According to the results, the combined use of morphological and molecular identification is suggested for the complete differentiation of the wireworms, for the purpose of sustainable agricultural production and in accordance with the sustainable plant protection.

Keywords: Wireworms, *Agriotes*, morphological identification, molecular identification.

1. UVOD

Klisnjaci su odrasli oblici kornjaša iz reda Coleoptera, porodice Elateridae. Njihove ličinke zbog svog izgleda nazivaju se žičnjaci ili drotari. Nastanjuju različita staništa u svijetu uključujući pašnjake, oranice i šumsko tlo (Čamprag, 1997). Odrasli oblici ne uzrokuju gospodarski važne štete, ali njihova prisutnost indikator je njihovih ličinki u tlu (Sufyan, 2012). Ličinke određenih rodova su polifagni štetnici i mogu pričinjavati velike gospodarske štete raznih poljoprivrednih kultura. Veći dio života provode u tlu, glavninu šteta pričinjavaju u proljeće, hraneći se korijenjem biljaka i sjemenkama, čime prorjeđuju sklop, smanjuju prinos i kakvoću proizvoda. Velike štete mogu dovesti do potrebe presijavanja dijela ili cijele površine usjeva (Bažok, 2006.; Ćosić i sur., 2008).

U svijetu razlikujemo oko 400 rodova i 9 000 vrsta unutar porodice Elateridae (Lawrence i Newton, 1995), dok su u Hrvatskoj Čačija i sur. (2011) utvrdili 60 različitih rodova. U centralnoj Europi ima oko 150 vrsta od gospodarske važnosti (Furlan i Toth, 1999). Za naše klimatske uvijete je najštetniji rod *Agriotes* Eschscholtz (Bažok, 2006; Maceljski, 2002), u Europi se može izdvojiti 8 najznačajnijih vrsta navedenog roda, od kojih se 5 vrsta smatra štetnima u Zapadnoj Hrvatskoj (Bažok i Igrc Barčić, 2010). Najzastupljenije i najznačajnije vrste roda *Agriotes* su: *Agriotes brevis* Candeze, *Agriotes lineatus* Linnaeus, *Agriotes obscurus* Linnaeus, *Agriotes sputator* Linnaeus i *Agriotes ustulatus* Schäller (Maceljski, 2002).

Žičnjake prema životnom ciklusu dijelimo u dvije skupine. Prvu skupinu čine vrste kojima prezimljavaju i ličinka i odrasli oblik (*A. brevis, A. lineatus, A. sputator i A. obscurus*), a u drugu skupinu spada *A. ustulatus* kojem je prezimljujući oblik isključivo ličinka (Bažok, 2006). Razvoj prve skupine traje 3-4 godine, odnosno proteže se kroz 4-5 kalendarskih godina, dok razvoj druge skupine traje dvije godine, odnosno prolazi kroz tri kalendarske godine što vrstu *A. ustulatus* zbog kraćeg razvojnog ciklusa čini jednom od najštetnijih vrsta (Maceljski, 2002).

Suzbijanje žičnjaka nije moguće uspješno provoditi kurativno (nakon napada), nego je potrebno preventivno suzbijanje (Bažok, 2006), zbog toga je vrlo bitna gustoća populacije, odnosno prognoza napada. Sve *Agriotes* vrste u prošlosti su tretirane kao jedna, a određivanje zastupljenosti pojedinih vrsta roda *Agriotes* u novije se vrijeme provodi uz pomoć feromonskih mamaca koji love odrasle mužjake pomoću selektivnih feromona ekstrahiranih iz ženki

najštetnijih Europskih vrsta klisnjaka (Furlan i Toth, 1999; Furlan, 2005; Sufyan i sur.,2013). Ličinke, žičnjaci, najčešće se prate i sakupljaju metodom pregleda tla i metodom ukopavanja zrnatih mamaca (Bažok, 2007).

Determinacija rodova i vrsta žičnjaka može se provoditi morfološki i molekularno (genetski). Ličinke pojedinih rodova jednostavno je razlikovati na temelju morfoloških osobina uz pomoć brojnih ključeva (Klausnitzer, 1994), pri čemu su vrste roda *Agriotes* uglavnom grupirane zajedno. Morfološka determinacija žičnjaka unutar roda *Agriotes* vrlo je zahtjevna i većinom se sa sigurnošću razlikuju samo odrasli oblici (determinirani specifičnim feromonima) prema kojima određujemo zastupljenost vrsta, stoga je morfološka identifikacija ličinki provedena u puno manjem opsegu (Bažok i Igrc Barčić, 2010). Uvođenje molekularnih metoda, molekularnih markera za determinaciju (Ellis i sur., 2009.; Staudacher i sur., 2011a) olakšalo je identifikaciju vrsta roda *Agriotes* te je omogućilo precizno utvrđivanje zastupljenosti pojedinih vrsta na određenom području.

2. CILJ RADA

Dokazano je da postoje razlike u štetnosti vrsta roda *Agriotes* (Furlan, 2011) pa je za uspješnu prognozu šteta neophodno odrediti dominantnu vrstu ličinke. Pri tome je važno utvrditi pouzdanu metodu identifikacije i postoje li razlike u pouzdanosti između morfološke i genetske metode koje se koriste u svrhu identifikacije.

Cilj rada je determinirati ličinke pet najštetnijih vrsta roda *Agriotes* (*A. brevis, A. lineatus, A. obscurus, A. sputator , A. ustulatus*), prikupljene na dvije lokacije, na temelju morfologije i na temelju genetske analize DNA. Temeljem dobivenih podataka o sastavu vrsta utvrditi pouzdanost korištenih metoda i razlike morfološke i molekularne identifikacije.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Sistematika

Sistematska pripadnost roda *Agriotes* (Maceljski, 2002):

Koljeno: Arthropoda; Člankonošci

Razred: Hexapoda (Insecta); kukci

Red: Coleoptera; kornjaši, (tvrdokrilci)

Podred: Polyphaga

Superporodica: Elateroidea

Porodica: Elateridae

Podporodica: Elaterinae

Rod: *Agriotes* Eschscholtz

3.2. Rasprostranjenost

3.2.1. Porodica Elateridae

Prema sistematskoj pripadnosti porodica Elateridae ubraja se u red Coleoptera i najveća je porodica unutar superporodice Elateroidea sa oko 400 rodova i 9 000 vrsta širom svijeta i kontinuiranim otkrivanjem novih (Lawrence i Newton, 1995; Parker, 1994; Barsics i sur., 2013). Od navedenih rodova i vrsta unutar porodice Elateridae izdvojeno je 12 rodova svjetski poznatih kao gospodarski štetnici (Ritter i Richter, 2013). U Europi opisano je 693 vrste svrstane u 89 rodova (Cate, 2007), od kojih je 150 vrsta izdvojeno kao gospodarski značajne (Furlan i Toth, 1999), a na području bivše Jugoslavije nađeno je približno 250 vrsta (Čamprag, 1997). U Hrvatskoj su Čačija i sur. (2011) utvrdili da porodica Elateridae trenutno broji 176 vrsta unutar 60 rodova. Prevladavaju rodovi *Agriotes, Melanotus, Selatosomus, Athous, Limonius* i *Corymbites* (Stanković i Maceljski, 1973, cit, Čačija, 2015),

manje štete u istočnim dijelovima Hrvatske može prouzročiti vrsta *Selatosomus latus*, a još možemo naći: *Melanotus brunnipes* i *Athous niger* koji su prvenstveno predatori. Za naše prostore i klimatske uvijete najštetniji je rod *Agriotes* zastupljen od 88% do 98%, pa i do 100% u ukupnoj fauni žičnjaka (Maceljski, 2002).

3.2.2. Rod *Agriotes*

Rod *Agriotes* ubraja se u porodicu Elateridae, red Coleoptera. Žičnjaci roda *Agriotes* jedni su od svjetski najrasprostranjenijih i najopasnijih gospodarskih štetnika (Ritter i Richter, 2013). U svijetu je poznato 200 vrsta iz ovog roda, na prostoru palearktičke regije opisano je 100 vrsta, a noviji rezultati već spominju 145 vrsta (Löbl i Smetana, 2007, cit. Čačija, 2015). U Europi je većinom 8 vrsta od velike gospodarske važnosti, međutim postoje velike razlike u njihovoj regionalnoj distribuciji (Furlan, 2005). Cate (2007) navodi da je na području Centralne Europe zabilježeno 18 vrsta od čega Furlan i Toth (2007) izdvajaju 9 značajnih za poljoprivrednu proizvodnju: *A. brevis, A. lineatus, A. litigiosus, A. obscurus, A. proximus, A. rufipalpis, A. sordidus, A. sputator* i *A. ustulatus.* Parker i Howard (2001) su u Velikoj Britaniji utvrdili 60 vrsta i zaključili da su za gospodarske štete najodgovornije tri vrste: *A. lineatus, A. obscurus i A. sputator*. U Njemačkoj su također navedene iste tri vrste kao gospodarski najznačajnije i najčešće povezane sa štetama na različitim usjevima (Burghause i Schmitt, 2011; Lehmhus i Niepold, 2015). U Hrvatskoj je trenutno nađeno 15 vrsta ovog roda (Čačija i sur., 2011), a najzastupljenije i gospodarski najznačajnije vrste su: *Agriotes brevis* Candeze, *Agriotes lineatus* Linnaeus, *Agriotes obscurus* Linnaeus, *Agriotes sputator* Linnaeus i *Agriotes ustulatus* Schäller (Maceljski, 2002).

3.3. Morfologija

Klisnjaci su kornjaši uska tijela tamne boje, dugački najčešće 7-15 mm. Pronotum je s obje strane izdužen prema natrag (Maceljski, 2002). Duguljasti su i dorzoventralno spljošteni, a glava im je većinom tamnija od tijela. Ticala su obično građena od 11 članaka pilaste strukture i imaju relativno kratke noge (Sufyan, 2012). Imaju fleksibilan zglob na bazi pokrilja i dodatni nastavak na članku sa ventralne strane tijela koji ulazi u abdominalni dio, odlika koju ima samo nekoliko vrsta kornjaša i omogućava im da pobjegnu od potencijalne opasnosti. Kada klisnjak osjeti opasnost povlači noge i pada na zemlju kako bi se sakrio

među lišćem i vegetacijom. Ovakav pad često kornjaša može ostaviti na leđima, što odgovara situaciji u kojoj su mnogi kukci bespomoćni. Klisnjaci tada iskoriste svoj fleksibilan zglob da izviju tijelo, pa kralješnim nastavkom odskoče i tijelo naglo isprave uz zvuk klika. Takav pokret baca kukca u zrak i ponovno na tlo, te će ponavljati taj pokret sve dok ne uspije sletjeti na noge (Sufyan, 2012). Prema tome što mogu brzo pobjeći od predatora i prema zvuku koji proizvedu za vrijeme tog pokreta u hrvatskom su jeziku dobili ime klisnjaci, a na engleskom se često nazivaju: *click beetles, snapping beetles* i *skipjacks*. Ponekad se nazivaju i proljetnim kukcima (*spring beetles*) jer odrasli oblici iz tla izlaze u proljeće (Barsics i sur., 2013).

Jaja klisnjaka su okruglasta do ovalna, sjajna, bijela do žućkasta, veličine od 0,4 do 0,8 mm (Čamprag, 1997). Prosječna širina jaja je 0,48 mm, a površina im je glatka i ljepljiva, često prekrivena sa zrncima zemlje (Sufyan i sur., 2014). Nalaze se u grozdastim nakupinama u gornjim slojevima tla, dubina ovisi o vlažnosti tla. Više nakupina može biti jedna pored druge (Furlan, 1996). Većinom se nalaze na 2-3 cm dubine, 2 do 40 jaja po nakupini različitih veličina i oblika. Zadržavaju istu boju i oblik sve do nekoliko sati prije izlaza ličinke. Jaja se većinom ne uspiju razviti ako se nalaze u suhom tlu (Sufyan i sur., 2014), jer apsorbiraju vodu iz tla i povećavaju volumen 1,5 puta, stoga ukoliko nedostaje vlage ne razvijaju se i ugibaju (Čamprag, 1997).

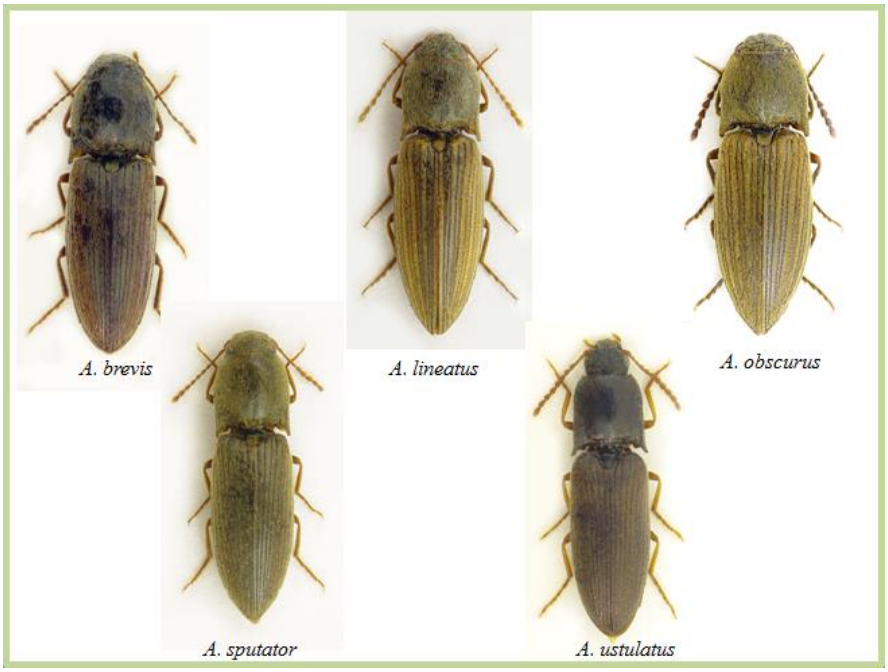
Ličinke klisnjaka (žičnjaci, drotari) žute su boje, uskog i izduženog , tvrdog, segmentiranog tijela. Narastu do 35 mm duljine i nalikuju na komadić mjedene žice po čemu su i dobili ime (Maceljski, 2002). Kad se tek izlegu iz jaja ličinke su bijele boje, duge 1.5 mm, a kako rastu prelaze u zlatno žutu boju. Imaju tri para kratkih nogu na prsnim člancima odmah iza crno smeđe glave sa usnim ustrojem za grizenje i žvakanje (Anon, 1983, cit. Sufyan, 2012). Ličinkama roda *Melanotus* zadak završava sa tri izrasline poput trozuba, a ličinkama rodova *Selatosomus, Athous, Limonius* i *Corymbites* zadak je račvast (Maceljski, 2002). Vrste najraširenijeg roda *Agriotes* imaju specifično suženi zadnji abdominalni segment (deveti abdominalni segment) sa dvije male tamne točke na dorzalnoj strani po čemu se mogu razlikovati od drugih rodova (Sufyan, 2012).

Kukuljica je slobodna (*pupa libera*), mliječno bijele boje i mijenja boju u žućkastu nešto prije izlaska odraslog oblika (Furlan, 1998).

Determinacija rodova i vrsta na temelju opisane morfologije koristi se dugi niz godina. Odrasli oblici, klisnjaci, se lako identificiraju morfološkim ključevima prema boji, obliku i veličini (Klausnitzer, 1994; Traugott i sur., 2015). Ličinke, žičnjaci, također se identificiraju morfološki razlikama na glavi ili zatku, ali je determinacija do vrste puno teža zbog jako velike sličnosti unutar roda (Staudacher i sur., 2011a; Ritter i Richter, 2013; Traugott i sur., 2015).

3.4. Vrste roda *Agriotes*

Na području Europe Furlan i Toth (2007) izdvajaju 9 vrsta roda *Agriotes* koje su značajne za poljoprivrednu proizvodnju i gospodarski najštetnije: *A. brevis, A. lineatus, A. litigiosus, A. obscurus, A. proximus, A. rufipalpis, A. sordidus, A. sputator* i *A. ustulatus.* Na području Hrvatske pronađeno je 15 vrsta: *A. brevis*, *A. gallicus*, *A. infuscatus*, *A. lineatus*, *A. litigiosus*, *A. medvedevi*, *A. modestus*, *A. obscurus*, *A. pallidulus*, *A. pilosellus*, *A. proximus*, *A. rufipalpis*, *A. sordidus*, *A. sputator* i *A. ustulatus*. Starija literatura naglašava 4 gospodarski najštetnije vrste u Hrvatskoj: *A. lineatus*, *A. obscurus*, *A. sputator* i *A. ustulatus* (Kovačević, 1960; Maceljski, 1975), dok je zbog svog štetnog utjecaja u novije vrijeme dodana još i vrsta *A. brevis* (Maceljski, 2002; Bažok, 2007; Bažok i Igrc Barčić, 2010), (slika 1.). Vrsta *A. rufipalpis* jedna je od gospodarski štetnih vrsta, ali u Hrvatskoj nije zastupljena u velikom broju, dok u Mađarskoj nanosi velike štete (Maceljski, 2002).



Slika 1. Najzastupljenije vrste roda *Agriotes* u Hrvatskoj (Izvor: http://www.elateridae.com/index.php)

Vrsta *A. brevis* je u novije vrijeme zastupljena na području Republike Hrvatske, posebno u sjeverozapadnom dijelu zemlje (Maceljski, 2002), dok je u Italiji gospodarski najznačajnija vrsta žičnjaka i jedna od najznačajnijih u Europi (Toth i sur., 2002). Klisnjaci imaju tamno smeđe tijelo sa crvenkastim rubom i nogama. Duljina tijela im je od 6 do 8 mm i po veličini su manji od ostalih značajnih vrsta. Ličinke narastu do 22 mm i preferiraju vlažna tla (Toth, 1984). Za razvoj ove vrste potrebno je 3 do 4 godine, odnosno, 4-5 kalendarskih godina (Maceljski, 2002).

Odrasli klisnjaci *A. lineatus* su dugački 8 do 10 mm i široki 2,5 do 3 mm. Tijelo im je tamno žućkasto smeđe boje, a glava tamnija sa žućkastim dlačicama. Ticala i noge su svijetlo smeđe i imaju svjetlije smeđe pruge koje se spuštaju paralelno po pokrilju (Sufyan, 2012). Ličinke narastu od 25 do 27 mm duljine, a razvoj traje 3 do 4 godine, odnosno odvija se unutar 4-5 kalendarskih godina. Najvažnija je vrsta u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, mjestimice je zastupljena s više od 95% jedinki u populaciji žičnjaka, a zbog higrofilnosti najčešće je u vlažnim tlima riječnih dolina (Maceljski, 2002).

Odrasli oblici *A. obscurus* su tamnosmeđe boje sa relativno velikim pronotumom, širim od tijela, prekrivenim gustim rupicama (Sufyan, 2012). Pronotum je zaobljen na rubovima i tamniji od ostatka tijela jer im je pokrilje prekriveno žućkasto-sivim dlačicama sa laganim paralelnim crtama tamnije smeđe boje. Ticala su im malo duža od glave i pronotuma (Sufyan

i sur., 2014). Dugački su od 8 do 10 mm i široki 2,5 do 3 mm (Sufyan, 2012), nemaju izražen spolni dimorfizam, ženke su u prosjeku duže za 0,39 mm i šire za 0,11 mm od mužjaka (Sufyan i sur., 2014). Žičnjaci narastu do 25 mm (Toth, 1984). U Hrvatskoj je ova vrsta mnogo manje zastupljena i slična je vrsti *A. ustulatus*, a za razvoj vrste su potrebne 4, odnosno 5 kalendarskih godina (Maceljski, 2002).

Druga po brojnosti u Slavoniji i Baranji je vrsta *A. sputator* (Maceljski, 2002). Odrasli oblik je nešto robusnijeg tijela, smeđe crvenkasti, sa malo tamnijim sjajnim pronotumom. Dugački su 6 do 8,5 mm i 2 mm široki (Sufyan, 2012). Žičnjaci narastu do 18,5mm, a cjelokupni razvoj vrste traje 4 godine, odnosno 5 kalendarskih godina (Maceljski, 2002).

Imago vrste *A. ustulatus* je skoro crne boje, sa žućkasto smeđim pokriljem, ticala i noge su žućkasto smeđe boje (Sufyan, 2012). Zabilježen je polimorfizam u boji i veličini ove vrste, prema boji utvrđena su dva oblika: svijetli sa tamnom glavom i žuto smeđim pokriljem i tamni sa kompletno crnim tijelom (Furlan, 1996). U istočnom dijelu Hrvatske dominantna je vrsta, odrasli oblik dug je između 8 i 11 mm, a ličinke su 25 mm duljine (Maceljski, 2002). Najveća je vrsta među gospodarski najznačajnijim u Hrvatskoj (Toth, 1984). Ličinke *A. ustulatus* mogu se lako razlikovati od ličinki drugih *Agriotes* vrsta. Na devetom abdominalnom segmentu, koji je jače izdužen na kaudalnoj strani, imaju čekinje koje izlaze iz malih bradavica (Furlan, 1998). Ženke su duže i šire od mužjaka i imaju kraća ticala (Furlan, 2006). Razvoj vrste traje samo dvije godine, odnosno prolazi kroz tri kalendarske godine (Maceljski, 2002).

3.5. Biologija i ekologija

S obzirom na životni ciklus, žičnjaci se se dijele u dvije skupine. Prvu skupinu čine vrste kojima prezimljuju i ličinka i odrasli oblik. Imaju višegodišnji razvoj u kojem prezimljuju ličinke različitih stadija te se kukulje. Odrasli krajem ljeta, početkom jeseni, izlaze iz kukuljice i ostaju u tlu na prezimljenju, te u proljeće izlaze iz tla. U ovu skupinu se ubrajaju *A. brevis*, *A. lineatus*, *A. obscurus* i *A. sputator*. Drugu skupinu čini vrsta *A. ustulatus* koja prezimljuje isključivo kao ličinka. Tijekom svibnja se kukulji i odrasli oblici izlaze krajem svibnja i u lipnju (Bažok, 2007). Vrste kojima prezimljavaju odrasli oblici, imago živi nekoliko mjeseci i liježu jaja kroz dugi period, a vrste kojima odrasli oblik ne prezimljava žive nekoliko dana i liježu jaja puno kraće (Furlan, 2004).

Razvoj vrsta roda *Agriotes* proteže se kroz više godina i razlikuje se između vrsta (Barsics i sur., 2013). Razvoj jedne generacije, ovisno o vrsti, traje od dvije do četiri godine, odnosno proteže se od tri do pet kalendarskih godina (Maceljski, 2002; Bažok, 2007). Razvoj iste vrste, svakog pojedinog stadija, ovisi i o vanjskim uvjetima, posebice o temperaturi, zbog kojih može vremenski varirati (Furlan, 1998; Maceljski, 2002; Furlan, 2004). Kao donji prag razvoja smatra se 10°C, a optimalna temperatura za razvoj je 20°C. Suma efektivnih temperatura potrebna za razvoj jaja je 200-300°C, za ličinke oko 3300°C, za kukuljice 120-130°C, a za potpuno sazrijevanje odraslog oblika 200°C (Maceljski, 2002; prema bugarskim i ruskim autorima).

Životni ciklus i ponašanje navedenih 5 vrsta žičnjaka slični su. Pojava odraslih iz prve skupine proteže se od travnja do kraja kolovoza, a vrsta *A. ustulatus* pojavljuje se krajem svibnja do kraja lipnja i početkom srpnja (Bažok, 2006). Prvo se pojavljuju mužjaci, pa onda ženke, žive skrivenim načinom života i kreću se navečer, dok je dnevna aktivnost manja zbog jačeg intenziteta svijetla i više temperature (Čamprag, 1997). Od početka do kraja ljeta klisnjaci odlažu jaja u površinski sloj tla, jedna ženka može odložiti između 70 i 500 jaja, a razvoj jajeta traje 2-4 tjedna (Maceljski, 2002). Vrste prve skupine liježu jaja u svibnju i početkom lipnja (Miles, 1942), a *A. ustulatus* dostiže vrhunac ovipozicije u srpnju i početkom kolovoza (Furlan, 1996). Uspješnost ovipozicije je puno veća na vlažnom tlu prekrivenom travom, nego na suhom golom tlu jer jaja ugibaju ako nemaju dovoljno vlage, te više tek izleglih ličinki preživljava u tlu sa vegetacijskim pokrovom zbog bolje obrane od prirodnih neprijatelja, povoljnog izvora hrane i dovoljno vlage (Gough i Evans, 1942; Parker i Howard, 2001).

Ličinke se tijekom prve godine presvuku 2-5 puta i dostižu oko 5-6 mm, a u vrijeme prije i poslije presvlačenja par dana miruju. Druge godine narastu 12-14 mm i tijelo im očvrsne (Maceljski, 2002). Ličinke prolaze od 8 do 14 razvojnih stadija ovisno o vrsti i klimatskim uvjetima (Sufyan, 2012). Tijekom cijelog razvoja, ako su uvjeti u tlu povoljni žičnjaci ostaju u gornjih 12 cm tla (Miles, 1942) i vrlo malo se kreću sa mjesta gdje su se izlegli ukoliko imaju dovoljno hrane i vlage (Hemerik i sur., 2003).

Ličinke za vrijeme višegodišnjeg razvoja migriraju horizontalno i vertikalno. Vertikalnu migraciju uvjetuje potreba za vlažnijim horizontima i za višom temperaturom, pa se stoga i ljeti i zimi spuštaju dublje u tlo (Maceljski, 2002; Jung i sur., 2012). Dubina na kojoj će se naći ličinke ovisi prvenstveno o klimatskim uvjetima u kasnu jesen, zimu i proljeće, te o vlažnosti

tla u ostatku godine. Mogu biti na dubini oko 60 cm preko zime i do 20 cm u proljeće (Furlan, 1998). Horizontalne migracije izazvane su potragom za hranom. Ličinke u tlu osjećaju vrlo niske koncentracije ugljikovog dioksida u tlu koji luči korijenje biljaka i dnevno mogu prijeći desetak centimetara (Maceljski, 2002).

Kukuljenje se zbiva u tlu i traje 2-4 tjedna (Maceljski, 2002). Većina posljednjih stadija preobraze se u kukuljice, pa u odrasle oblike preko ljeta. Kukulje se u tlu do dubine od 30 cm i većinom ostaju u tlu do proljeća ili izlaze u ranu jesen ukoliko odrasli ne prezimljuje (Furlan, 2004).

Točne informacije o životnom ciklusu različitih vrsta dobivaju se različitim istraživanjima u odgovarajućim laboratorijskim uvjetima u kavezima koji oponašaju prirodne uvjete u polju (Furlan, 1996; 1998; 2004).

3.6. Gospodarski značajne biljke domaćini, ishrana i štete

Žičnjaci su polifagni zemljišni štetnici kulturnog bilja koji predstavljaju veliku prijetnju gospodarski važnim kulturama diljem svijeta (Toth, 1984; Furlan, 2004; Parker i Howard, 2001; Ćosić i sur., 2008). Prvenstveno su sve vrste fitofagne, tip hrane utječe na njihov razvoj jer mlade ličinke trebaju živo bilje da bi rasle i razvijale se (Furlan, 1998). Osim živih biljaka hrane se i organskom tvari, te životinjama. Traugott i sur. (2008) u svom istraživanju naglašavaju da se 10% populacije vrste *A. obscurus* hrani životinjskim plijenom. Zabilježena je i pojava kanibalizma na područjima gdje je velika gustoća populacije ličinki, a hrane nedostaje (Furlan, 1998). Unatoč izuzetcima, živi biljni materijal glavna je i osnovna hrana žičnjaka u njihovom razvoju i ne može se zamijeniti organskom tvari ili životinjskim plijenom (Barsic i sur., 2013).

Žičnjaci predstavljaju veliki problem u proizvodnji ratarskih i ostalih kultura. Najveća šteta koju uzrokuju je prorjeđivanje biljnog sklopa ishranom podzemnim organima biljke (Maceljski, 2002; Ćosić i sur., 2008). Hrane se kašom u koju pretvaraju korijenje i druge podzemne biljne organe (Maceljski, 2002). Mogu oštetiti sjeme, tek proklijale biljke i korjenčiće mladih biljaka. Osjetljivost usjeva na napad žičnjaka je vrlo varijabilna i ovisi o vrsti biljke i stadiju rasta i razvoja, te o fazi u kojoj se nalaze ličinke (Furlan, 2004). Kritičan period za biljke je vrijeme klijanja kada se ličinke ubušuju u naklijalo sjeme ili se hrane podzemnim dijelovima biljke, pa ostaju velike plješine na poljima i zakržljale biljke koje zaostaju u razvoju (Ćosić i sur., 2008).

Najveće štete nanose usjevima rijetkog sklopa. Najugroženiji usjevi su kukuruz, šećerna repa i suncokret, zatim duhan, krumpir i povrće. Napadaju gomolje krumpira, korijen mrkve i repe, katkad i samo sjeme kukuruza (Maceljski, 2002). Uz to Miles (1942) navodi da mogu prouzročiti velike štete na voću kao što su jagode, a Bohm i sur. (2008) posebice izdvajaju povrće kojem je ekonomski važan dio ispod zemlje (mrkva, celer i cikla) sa naglaskom pojačanog napada na područjima ekološke proizvodnje povrća. Kod jakog napada zabilježene su i velike štete na strnim žitaricama ko što su pšenica, ječam, riža i zob (Maceljski, 2002; Reddy i Tangtrakulwanich, 2014). Zbog njihove polifagnosti, povećana kultivacija usjeva, prvenstveno uništavanje korova, uzrokuje još jači napad na samu kulturu, ponajviše kod kukuruza i krumpira (Parker i Howard, 2001). Više žičnjaka na jednoj biljci mogu potpuno uništiti biljku šećerne repe s 4-6 pari listova ili kukuruz visok pedesetak centimetara (Maceljski, 2002).

Svaki stadij ličinke žičnjaka prolazi kroz tri faze : faza učvršćivanja mandibula, faza hranjenja i faza pred presvlačenje. U fazi učvršćivanja mandibula (8-12% ukupnog vremena razvoja) ličinka se ne hrani, kao niti u fazi pred presvlačenje (71% ukupnog vremena razvoja) kada samo apsorbira vodu i priprema se za prelazak u idući stadij (Furlan, 1998). Intenzivna faza hranjenja traje različito kod različitih vrsta. Kod *A. ustulatus* traje manje od 20% ukupnog razvojnog vremena, dok kod *A. obscurus* 29% ukupnog razvojnog vremena (Furlan, 1998; Evans i Gough, 2008). Stoga žičnjaci generalno imaju dva intenzivna aktivna perioda u godini u kojima može doći do ozbiljnih oštećenja usjeva u različitim slojevima tla, ovisno o vlažnosti tla i temperaturi. To su razdoblja od ožujka do svibnja, te od rujna do listopada (Parker i Howard, 2001; Barsics i sur., 2013). Na područjima sa blagom klimom napad na usjeve može trajati i cijelu godinu, čak i preko zime (Barsics i sur., 2013). Mladi žičnjaci, kraći od 5mm ne smatraju se opasnima jer ne mogu nanijeti gospodarski značajne štete (Parker i Howard, 2001). Druge godine razvoja najveće štete rade ličinke koje se u trećoj godini preobraze u odrasle oblike (*A. ustulatus*), *A. lineatus* ličinke nanose štete i treće godine razvoja, a ličinke *A sputator* štete pune tri godine (Maceljski, 2002). Ličinke pri nedostatku hrane imaju i mogućnost gladovanja koja se povećava sa starošću ličinke. Zadnji stadiji mogu preživjeti i do jednu godinu bez hrane na temperaturi od 20°C (Furlan, 2004).

Prema Staudacher i sur. (2011b) moglo bi se utvrditi postoje li određeni uzorci u preferencama žičnjaka i u izboru hrane preko detekcije DNA biljke u zemljišnim štetnicima temeljenoj na PCR metodi. Ipak, zbog njihove polifagnosti, ličinke ne rade veće razlike između biljaka čijim se

korijenjem hrane pa tako oštećuju stotine vrsta kulturnih i korovskih biljaka (Maceljski, 2002). Unatoč mišljenju da različita biljna prehrana može utjecati na razvoj ličinki, Furlan (1998) u svom istraživanju sa 8 različitih vrsta usjeva utvrđuje da nema statistički značajne razlike između razvoja ličinki na različitoj ishrani.

3.7. Metode prognoze pojave i suzbijanje

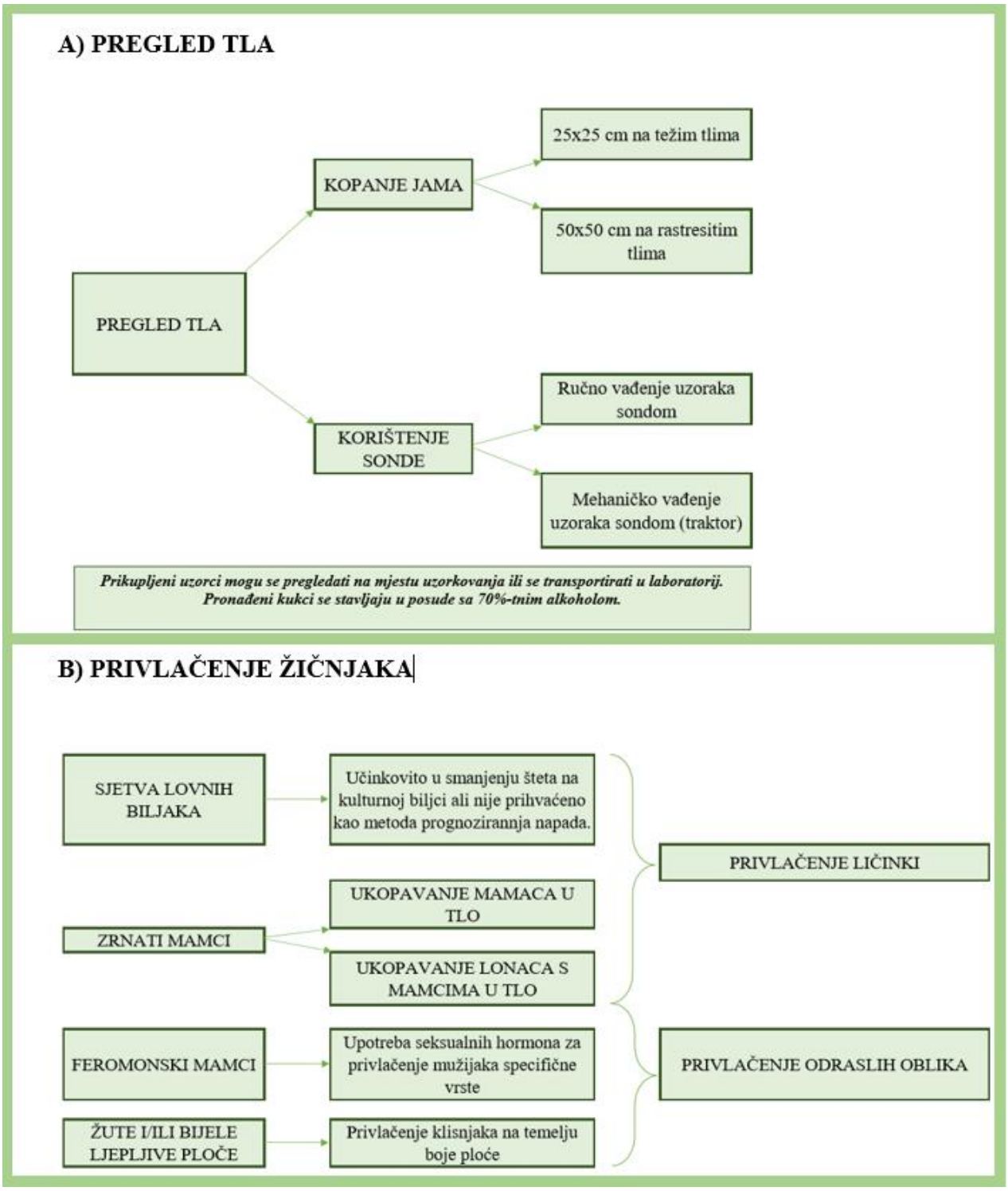
Unatoč velikim razlikama u biologiji, štetnosti, moguće i u otpornosti na različite mjere zaštite, između pojedinih vrsta žičnjaka, Maceljski (2002) navodi da se podaci o štetnosti, pragovi odluke i/ili mjere zaštite još uvijek odnose na sve žičnjake, ne na pojedine vrste. Glavni je razlog nedostatak saznanja i dokaza koji bi dovoljno uputili na razlike u otpornosti na mjere zaštite i insekticide između pojedinih vrsta. Proces implementacije integrirane zaštite od ovih štetnika je zbog nepoznavanja pojedinih vrsta vrlo značajan predmet istraživanja u Europi zadnjih 20 godina, s ciljem dobivanja novih informacija i kreiranja još točnijeg plana za implementaciju integrirane strategije u budućnosti (Furlan, 2005).

Najvažniji korak u suzbijanju žičnjaka temelji se na preventivnim metodama utvrđivanja brojnosti žičnjaka prije sjetve (ili sadnje). Kako bi se donijela odluka o suzbijanju, potrebno je utvrditi točnu brojnost i, ako je moguće, vjerojatnost štete bazirano na dobivenoj brojnosti (Bažok, 2007; Parker i Howard, 2001). Utvrđivanjem brojnosti može se prognozirati pojava žičnjaka i donijeti odluka o preventivnom suzbijanju prije ili tijekom sjetve (ili sadnje), jer suzbijanje nakon sjetve (ili sadnje) više nije moguće. Žičnjaci žive u tlu i hrane se korijenjem i podzemnim dijelovima biljke, pa se insekticidi ne mogu nakon sjetve unijeti u tlo kako bi doprli do žičnjaka, stoga kurativne metode suzbijanja nisu moguće (Maceljski, 2002).

3.7.1. Metode utvrđivanja brojnosti i prognoze pojave žičnjaka

Točna slika o brojnosti žičnjaka, a time i o potrebi suzbijanja, dobiva se utvrđivanjem stanja u tlu – brojnosti žičnjaka u tlu. Brojnost žičnjaka moguće je utvrditi pregledom tla (traženjem žičnjaka) ili korištenjem mamaca kojima se žičnjaci privlače na određena mjesta (Maceljski,2002). Metoda koja se najčešće koristi je pregled tla, a nakon toga ukopavanje zrnatih mamaca pod foliju i uzorkovanje tla sondom (Bažok, 2007), dok se učinkovitost upotrebe feromonskih mamaca na različitim vrstama žičnjaka još uvijek istražuje u brojnim

znanstvenim radovima (Toth i sur., 2012; Radescu i Rosca, 2010; Toth i sur., 2002; Furlan i Toth 1999). Pregled svih metoda utvrđivanja brojnosti i prognoze pojave prema Maceljskom (2002) nalaze se na slici 2., a u nastavku su najvažnije metode detaljnije opisane.



Slika 2. Metode utvrđivanja zaraze i prognoze pojave (modificirano prema Maceljski, 2002).

3.7.1.1. Pregled tla kopanjem jama i uzorkovanjem tla sondom

Pregled tla smatra se najstarijom metodom utvrđivanja brojnosti žičnjaka (Furlan, 2005), a i najčešće korištenom (Bažok, 2007).

Pregled tla se obavlja prije sjetve ili sadnje kulture, kopanjem jama 25 x 25 cm na težim tlima, odnosno 50 x 50 cm na lakšim tlima. Na malim parcelama potrebno je iskopati najmanje pet do osam jama, na parcelama od jedan do pet hektara, potrebo je imati osam do deset jama, dok na parcelama od pet do deset hektara potrebno je iskopati deset do petnaest jama. Sadržaj tla iz jama stavlja se na plastičnu foliju, usitni rukama do grudica manjih od jednog centimetra i subjektivno pregledava. Svi pronađeni žičnjaci, po potrebi i druge vrste štetnika, sakupljaju se u bočice sa 70 %-tnim etanolom. Nakon pregleda jama 25 x 25 cm, ukupan broj pronađenih žičnjaka množi se sa 16, a kod jama 50 x 50 cm broj se množi sa četiri te se dobiveni broj dijeli s brojem pregledanih jama na parceli kako bi se dobio broj žičnjaka po m^2 (Maceljski, 2002).

Uzorkovanje tla može se obavljati i uzorkovanjem sondom kao zamjena za kopanje jama. Može se koristiti ručna sonda ili sonda na hidraulični uređaj traktora (Tothova sonda). Ručna sonda se koristi za iskopavanje uzoraka tla na dubini od 30 do 50 cm. S površine od jednog hektara uzima se 30 uzoraka, dijagonalno po polju (Maceljski, 2002).

Korištenje metoda pregleda tla kopanjem jama i sondom zahtjevno je i potrebna je stručnost i vrijeme. Bažok (2006) navodi da je za pregled jedne jame dimenzija 25 x 25 cm potrebno oko jedan sat, a na težim tlima i više vremena. Uzorci tla se pregledavaju odmah na polju ili se mogu dopremiti u laboratorij u plastičnim vrećama. Uzorci tla u laboratoriju mogu se staviti na Tullgrenove lijevke sa 0.5 centimetara mrežaste površine na dnu. Uslijed isušivanja tla i pod utjecajem svijetla i zagrijavanja površine tla, žičnjaci padaju u donju bočicu s etanolom (Maceljski, 2002; Furlan, 2005). Izdvajanje ličinki na ovaj način puno je preciznije nego subjektivni vizualni pregled na mjestu uzorkovanja, ali proces izdvajanja traje najmanje dva tjedna. Prema Furlanu (2005), može trajati i do 30 dana, što navodi kao vrlo skup i dugotrajan proces. U situacijama u kojima je razina zaraze žičnjacima niža, metode pregleda tla su vrlo podložne greškama pri uzorkovanju i iziskuju stručnost osobe koja vrši procjenu (Barsics i sur, 2013; Parker i Howard, 2001).

Iz navedenih razloga pregled tla često se ne provodi nego se o tretiranju odlučuje „na slijepo“ (Bažok, 2006), ali se navedene metode vrlo često koriste u istraživačke svrhe (Furlan, 2005).

3.7.1.2. Metoda ukopavanja zrnatih mamaca

Metoda ukopavanja zrnatih mamaca temelji se na privlačenju žičnjaka na klice i korjenčiće koji izlučuju CO_2 i privlače žičnjake na postavljeni izvor hrane. Jednostavnija je metoda u usporedbi sa pregledom tla, osjetljivija i oduzima puno manje vremena, ali mora biti provedena u kontroliranim uvjetima. Površine na kojima se koristi ova metoda za utvrđivanje brojnosti žičnjaka ne smiju imati druge biljke čije korijenje producira CO_2 – površine moraju biti gole, očišćene od korova (Furlan, 2005).

Kao mamci, najčešće se koriste žitarice i kombinacija kukuruza i pšenice (Furlan, 2005; 2011), a prema najnovijim istraživanjima najčešća kombinacija je 30 ml sjemenki pšenice i 30 ml sjemenki kukuruza (Furlan, 2014).

Prema Bažok (2007), rupe promjera 23 cm i dubine 15 cm se dva do tri tjedna prije sjetve kopaju na dva do četiri mjesta. U rupe se stavlja šaka do dvije netretiranog sjemena pšenice i kukuruza namočenog u vodi barem 24 sata. Mamci se zatrpavaju tlom i pokriju crnom plastičnom folijom koja služi kao solarni kolektor za zagrijavanje tla i brže klijanje sjemena. Mamci ostaju u tlu minimalno dva tjedna, te se nakon toga pregledava sadržaj mamaca i tlo oko mamaca. Prema Furlan (2014) mamci se stavljaju u plastične lonce promjera 11 cm, sa izbušenim otvorima u dnu. Sa donje i gornje strane mamaca stavlja se perlit, vermikulit ili neki drugi porozni supstrat. Lonci se zaliju, ukopavaju u tlo u kojem se nalaze deset do petnaest dana, te se nakon toga vade i pregledavaju. Ukoliko se može nekoliko dana čekati na rezultate, uzorci prikupljeni ovom metodom se također mogu prebaciti u laboratorij i staviti na mrežicu Tullgrenovih lijevaka ispod kojih je posudica sa 70 %-tnim etanolom. Žičnjaci padnu u posudicu sa etanolom pod utjecajem svijetla i isušivanja tla (Maceljski, 2002).

Ako uspoređujemo metodu zrnatih mamaca sa klasičnim pregledom tla, Bažok (2007) navodi kako su ove metode jednako pouzdane u prognoziranju pojave žičnjaka. Istraživanjima je dokazano da metoda zrnatih mamaca može rezultirati sa dva do četiri puta više žičnjaka dok oduzima 2/3 manje vremena (Parker, 1994). Posebno je istaknuta razlika u slučajevima manje

zaraze krumpira – kod smanjene populacije žičnjaka zrnati mamci su puno osjetljiviji, daleko učinkovitiji i precizniji od pregleda tla (Parker, 1996). Prema svemu navedenome, Benefer i sur. (2012a) preporučaju kombinirano korištenje pregleda tla kopanjem jama i postavljanjem zrnatih mamaca, pravilno reflektirajući distribuciju žičnjaka u tlu kako bi se postigli najbolji rezultati.

3.7.1.3. Metoda korištenja seksualnih feromona

Otkrićem feromona koji privlače odrasle oblike – klisnjake, otvaraju se nove mogućnosti lakšeg utvrđivanja brojnosti ali i suzbijanja odraslih oblika. Feromoni su specifični za svaku pojedinu vrstu klisnjaka i važni su u integriranoj zaštiti (Maceljski, 2002), a Furlan (2005) ovu metodu praćenja naziva najosjetljivijom u svrhu detekcije niskih populacija. Kao najveće prednosti feromonskih mamaca ističu se specifičnost za pojedinu vrstu, učinkovitost u malim količinama i bezopasnost za ljude i druge životinje (Witzgall i sur., 2010, cit. Barsics i sur., 2013). Feromoni kao sredstvo za privlačenje odraslih mužjaka mogu se koristiti u integriranom suzbijanju žičnjaka na nekoliko načina: (1) praćenje i istraživanje biologije i ekologije vrste; (2) praćenje pojave i predikcije šteta u svrhu određivanja potrebe za suzbijanjem; (3) određivanje lokacija i distribucije žičnjaka i pojedinih vrsta i (4) kontrola jačine napada suzbijanjem mužjaka (Bažok i Igrc Barčić, 2010).

Feromoni koji privlače odrasle oblike prvi put su opisani od strane Ruskih istraživača krajem osamdesetih (Furlan, 2005). Nakon sedam godina istraživanja, krajem 1990-ih godina otkriven je kemijski sastav feromona specifičnih za najvažnije Europske vrste žičnjaka, te feromonske klopke „visokih kapaciteta“ (Furlan i sur., 2001a, cit. Furlan, 2005).

Seksualni feromoni ekstrahirani su iz ženki klisnjaka. Osnovne komponente feromona koji se koriste u klopkama za vrste roda *Agriotes* su geranil i (*E,E*)-farnezil esteri (Borg-Karlson i sur., 1988, cit. Barsics i sur., 2013.). Za vrstu *A. brevis* izolirani su spojevi *(E,E)*-farnesil butirat + geranil butirat; za vrstu *A. lineatus* izolirani su spojevi geranil oktanoat + geranil butirat (Toth i sur., 2012); za vrstu *A. obscurus* najvažniji spojevi su geranil heksanoat i geranil oktanoat (Borg-Karlson i sur., 1988, cit. Bažok i Igrc Barčić, 2010); za vrstu *A. sputator* geranil butirat i za vrstu *A. ustulatus* E,E- farnesil – acetat (Toth i sur., 2012). Toth i sur. (2012) ističu i mogućnost

da su korišteni feromoni ne samo seksualni, nego i agregacijski zbog prisutnosti ženki pojedinih vrsta u feromonskim klopkama.

Postoje različite vrste klopki prilagođene pojedinoj vrsti klisnjaka i njihovoj biologiji. Za ulov klisnjaka koriste se YATLORf klopke pogodne za sve vrste, dok se VARb klopke mogu koristiti za vrste koje preferiraju letenje (Furlan i sur, 2001a, cit. Furlan, 2005). Razmak između klopki na polju treba biti minimalno 30 metara, trebaju se pregledavati svaki tjedan uz uzimanje svih sakupljenih kukaca i u klopkama se trebaju mijenjati feromonski mamci svakih 30 dana (Bažok i Igrc barčić, 2010). Na Slici 3. se nalaze najčešće korištene feromonske klopke.



Slika 3. Feromonski mamci YATLORf (lijevo) i VARb3 (desno), (Izvor: Čačija, 2015)

Učinkovitost primjene seksualnih feromona u svrhu praćenja dinamike pojave klisnjaka i u svrhu istraživanja biologije vrsta dokazana je brojnim istraživanjima (Bažok i Igrc Barčić, 2010; Radescu i Rosca, 2010; Kozina i sur., 2012; Sufyan i sur., 2014), a materijali i metode koje se najčešće koriste opisane su i dokazane u brojnim znanstvenim radovima (Furlan, 2005; Toth i sur., 2003). Odnos i prostorna povezanost broja odraslih i broja ličinki za sve ekonomski značajne vrste žičnjaka nema svoju dokazanu korelaciju i prema tome potrebna su dodatna

istraživanja koja bi dokazala odnos broja odraslih sa određivanjem štete i distribucije ličinki određene vrste (Benefer i sur, 2012a; Čačija, 2015). Ivezić i sur. (2007) prema svim prikupljenim podacima i prednostima korištenja feromonskih mamaca ističu kako će daljnje istraživanje i korištenje ove metode dovesti do signifikantnog smanjenja korištenja insekticida s ekonomskim i ekološkim benefitima.

3.7.2. Pragovi odluke

Prag odluke ili kritičan broj je onaj broj žičnjaka na metru kvadratnom koji je kriterij za odluku korištenja preventivnih mjera zaštite prije ili tijekom sjetve ili sadnje. Pred sjetvu kukuruza, šećerne repe, suncokreta, povrća, duhana i krumpira u zapadnim vlažnijim područjima, pragom odluke smatra se 3-5 žičnjaka na m^2, a u istočnim aridnim područjima (istočna Slavonija i Baranja) 1-3 žičnjaka/m^2. Rasponi ovise o stupnju zakorovljenosti (kod više korova uzima se viša brojka), očekivanom prinosu (kod višeg prinosa uzima se niža brojka) i očekivanim vremenskim prilikama u vrijeme nicanja (ako je vrijeme hladnije, nicanje je sporije i uzima se niža brojka). Ove brojke mogu biti i znatno veće u zakorovljenim i navodnjavanim usjevima. Za strne žitarice se vrlo rijetko planira zaštita od žičnjaka jer su štete znatno manje zbog njihovog gustog sklopa. Zaštita bi bila potrebna ako bi po metru kvadratnom bilo više od 15 žičnjaka u aridnim područjima, te 25 žičnjaka u vlažnijim područjima. Prema najnovijim spoznajama, pragove odluke će biti potrebno prilagoditi štetama svake pojedine vrste žičnjaka (Maceljski, 2002).

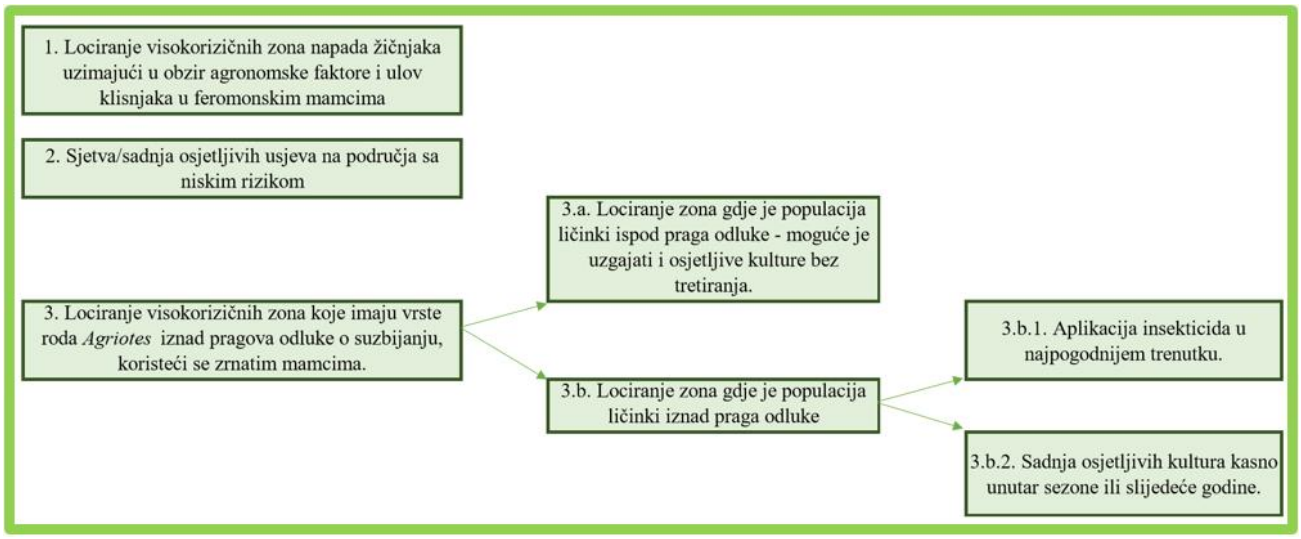
Ako se koriste zrnati mamci, Furlan (2014) navodi da je potreban ulov od jedne ličinke *A. brevis* i više od pet *A. ustulatus* po zrnatom mamcu da bi se prouzročila šteta koja može utjecati na prinos kukuruza. Pritom, naglašava da, ukoliko se koriste navedeni pragovi odluke, trebaju biti ispunjeni određeni uvjeti: (1) štetnici nemaju dostupne alternativne izvore hrane; (2) prosječna temperatura tla treba biti viša od 8^oC na dubini od 10 cm u trajanju od 10 dana; (3) vlažnost tla treba biti blizu poljskog kapaciteta tla, a dani u kojima je vlažnost veća ne uzimaju se u obzir jer žičnjaci nisu aktivni. Prema Bažok (2007) i Furlan (2014) prag odluke u korištenju zrnatih mamca je jedan žičnjak po mamcu, dok Furlan (2014) jednu ličinku po loncu tumači kao zarazu od oko 15 ličinki po m^2. Furlan (2005) dodatno naglašava da štete ovise i o biljnoj vrsti koja se uzgaja, na primjer 10-20 ličinki *A. ustulatus* može kompletno uništiti dvije biljke salate, ali neće prouzročiti značajne štete na kupusu.

S obzirom da korelacija između broja odraslih oblika svih ekonomski značajnih vrsta i distribucije i šteta ličinki nije utvrđena, Ritter i Richter (2013) navode kako nije moguće generalizirati pragove odluke o suzbijanju koristeći se samo rezultatima dobivenim ulovom odraslih oblika. Bažok i Igrc Barčić (2010) koristile su broj odraslih oblika za određivanje dominacije određene vrste na nekom području preko gustoće populacije koja se dobiva brojem sakupljenih odraslih oblika feromonskim mamcima u jednoj sezoni. Čačija (2015) određuje dominaciju ulovljenih odraslih oblika i ličinki te direktno izračunava korelacijske koeficijente između indeksa dominantnosti klisnjaka i žičnjaka na istom području. Prema dobivenim rezultatima, dolazi do zaključka da nema statistički značajne povezanosti između brojnosti klisnjaka i žičnjaka za vrste *A. brevis*, *A. sputator*, *A. obscurus* i *A. lineatus*, ali je za vrstu *A. ustulatus* utvrdila jaku i statistički opravdanu pozitivnu korelaciju između indeksa dominantnosti klisnjaka i žičnjaka. Prema navedenome, rezultati sa pozitivnom korelacijom mogu se koristiti za predviđanje dominantnosti ličinki prema dominantnosti odraslih u svrhu boljeg poznavanja rasprostranjenosti i pojave ovih štetnika.

3.7.3. Suzbijanje žičnjaka

Kao što je prethodno napomenuto, žičnjaci se mogu suzbijati samo preventivno, prije ili tijekom sjetve, zbog njihove biologije i ishrane nemoguće ih je suzbijati kurativno kada su štete već vidljive. Dizanjem svijesti o integriranoj zaštiti bilja u Europi mnogi u tlu perzistentni insekticidi zabranjeni su zbog negativnog utjecaja na okoliš, druge netargetirane životinjske vrste i zdravlje ljudi (Barsics i sur., 2013) stoga je prognoza zaraze prije odluke suzbijanja još više naglašena. Prema opsegu suzbijanja žičnjaci su štetnici koji se u Hrvatskoj suzbijaju na najvećim površinama (Maceljski, 2002). Unatoč tome, preventivno suzbijanje se također mora zasnivati na stručnom predviđanju potrebe suzbijanja jer je suzbijanje „za svaki slučaj“ štetno i skupo. Iz ekoloških i gospodarskih razloga, bolje je pretrpjeti štete od žičnjaka nego provoditi totalno suzbijanje na pamet (Maceljski, 2002).

Prema Furlan (2005) racionalna strategija integrirane zaštite predstavlja najoptimalniju metodu u suzbijanju žičnjaka, a bazira se na nekoliko najvažnijih koraka koji su opisani na slici 4.



Slika 4. Racionalna strategija integrirane zaštite od žičnjaka, (Izvor: Furlan, 2005)

3.7.3.1. Agrotehničke mjere za smanjenje zaraze

Na brojnost žičnjaka djeluje svaka mehanička obrada – svaka agrotehnička mjera smanjuje brojnost žičnjaka (Maceljski, 2002). Izlaganjem žičnjaka predatorima i mehaničkim premještanjem i ozljeđivanjem žičnjaka smanjuje se njihova mogućnost štete (Ritter i Richter, 2013; Parker i Howard, 2001). Općenito, sve mjere njege usjeva koje povoljno utječu na brzi rast biljaka smanjuju štete, a korištenje mineralnih gnojiva na bazi amonijaka šteti žičnjacima (Maceljski, 2002). Dodatno, povoljno je i izbjegavanje trave u plodoredu jer travnati pokrivač promovira ovipoziciju i pospješuje preživljavanje jaja i ličinki (Furlan i sur., 2009). Zaključno, privremeni prekidi i promjene plodoreda, promjene agrotehničkih mjera, te sjetva/sadnja kulture imajući u vidu i životni ciklus žičnjaka, mogu uvelike smanjiti populaciju žičnjaka i zarazu kulturne biljke (Furlan, 2007).

Sadnja ili sjetva određenih kultura također može smanjiti broj žičnjaka: heljda, lan, konoplja, proso, grah (Maceljski, 2002), dok je i odabir kulture s obzirom na zarazu i mogućnost šteta vrlo bitan. Identifikacija i korištenje varijeteta koji su manje osjetljivi na napad određenih vrsta žičnjaka može pomoći da biljka preživi najosjetljiviji period. Jary (1942) je izložio koje kulture bi trebalo uzgajati s obzirom na stupanj zaraze žičnjacima (cit. Barsics i sur., 2013). Furlan (2005) navodi kako se osjetljive kulture ne bi trebale uzgajati na područjima gdje je dokazana zaraza koja prelazi ekonomske pragove odluke o suzbijanju, a Parker i Howard (2001) naglašavaju da se krumpir ne sadi na područja visoke zaraze ili da se sadi u vrijeme kada ličinke

ne nanose štete kako bi se izbjegle ekonomski značajne štete. Također, potrebno je osigurati brzo klijanje i nicanje biljke: jače oštećeno može biti sjeme slabije kvalitete koje sporije niče, pa je stoga ključno koristiti kvalitetno i zdravo sjeme, te sjetvu/sadnju vršiti pravovremeno kako se ne bi produžio period klijanja i nicanja (Maceljski, 2002).

Najvažniji prirodni neprijatelji žičnjaka su trčci (Carabidae). U jednom danu odrasli trčak može pojesti 2-4, ponekad i više ličinki žičnjaka (Maceljski, 2002), a hrane se i odraslim klisnjacima (Ritter i Richter, 2013). Osim predatora, najviše obećavajući su parazitoidi – entomopatogene gljive (EPF) i entomopatogene nematode (EPN), ali još uvijek njihovo djelovanje nije u potpunosti dokazano, niti su komercijalizirani za upotrebu protiv žičnjaka (Ritter i Richter, 2013). Od entomopatogenih gljiva, najučinkovitijom se u istraživanjima pokazala vrsta *Metarhizium anisopliae*. Prema istraživanju Ansari i sur. (2009) određeni sojevi ove entomopatogene gljive mogu infestirati i uzrokovati smrtnost 90 – 100 % jedinki *A. lineatus* unutar tri tjedna od inokulacije što upućuje da bi se sojevi *M. anisopliae* mogli koristiti za kontrolu i suzbijanje žičnjaka. Od entomopatogenih nematoda, u istraživanjima se pokazalo da su određeni sojevi *Heterorhabditis bacteriophora* učinkoviti u suzbijanju *A. lineatus*. Ansari i sur. (2009) dokazali su 67% smrtnosti ove vrste žičnjaka tri tjedna nakon inokulacije, a ističu i pojačanu učinkovitost EPF i EPN u kombinaciji sa insekticidima.

Tijekom vegetacijskog perioda, žičnjake se može preusmjeravati sa kulture na korove. Korištenjem herbicida samo unutar redova (prskanjem u trake) omogućuje se razvoj korova između redova i preusmjerava napad žičnjaka sa kulturne biljke na korove (Maceljski, 2002). Time se smanjuje upotreba zemljišnih insekticida i herbicida, što je ekonomski i ekološki prihvatljivo i održivo. Čak ciljanom sadnjom biljaka koje preusmjeravaju napad sa kulture može se uvelike smanjiti jačina napada. Vernon i sur. (2000) navode da je sadnjom pšenice između redova jagoda, propadanje sadnica smanjeno sa 43% na 5.3%, dok Thalinger i sur. (2011) sadnjom lovnih biljaka u kukuruzu zaključuju da veći diverzitet (mješavina različitih lovnih biljaka) pruža žičnjacima raznoliku ponudu i preusmjerava napad sa kukuruza na lovne biljke.

3.7.3.2. Korištenje zemljišnih insekticida

Kada je brojnost žičnjaka na nekom području iznad praga odluke primjenjuju se zemljišni insekticidi. Insekticidi se mogu koristiti na tri različita načina: po čitavoj površini (primjena širom), lokalizirano tretiranjem u traku ili brazdu i lokalizirano tretiranjem sjemena. Primjena širom zahtjeva najveći utrošak insekticida, vrlo je štetna za prirodne neprijatelje i može pogodovati razvoju drugih štetnika, stoga nije preporučljiva iz ekonomskih i ekoloških razloga. Lokalizirano tretiranje u traku različite širine uz sjeme se rijetko koristi, dok se tretiranje u brazdu uz sjeme koristi puno češće zajedno sa sjetvom/sadnjom. Tretiranje sjemena je najracionalniji način primjene insekticida. Određena doza insekticida nanosi se na sjeme još u sjemenskim poduzećima i takvo sjeme se daje proizvođačima. Na ovaj način sjeme je zaštićeno od slabijeg i srednje jakog napada – ali ne i od jakog napada (Maceljski, 2002). Tretiranjem sjemena količina insekticida je signifikantno smanjena, a jednako učinkovita kao i tretiranje cijele površine (Barsics i sur., 2013; Furlan, 2005). Insekticidi koji se koriste za tretiranje sjemena, prema Chaton i sur. (2008) trebaju imati određene karakteristike: (1) moraju biti učinkoviti kroz cijeli period hranjenja žičnjaka: (2) ne smiju se disperzirati u atmosferu kod mehaničke obrade; (3) trebaju biti slabo topivi u vodi sa visokim afinitetom za tlo; (4) moraju ostati aktivni nakon sjetve, okvirno mjesec dana za kukuruz, kako bi spriječili štete u najintenzivnijim fazama ishrane žičnjaka. Koja god metoda tretiranja da se koristi, sjeme mora biti zaštićeno aktivnom tvari u kritičnim fazama rasta, s ciljem odvraćanja žičnjaka od sjemena koje niče i klijanaca. Ako je kukuruz zaštićen u prva tri tjedna rasta, ekonomske štete mogu biti minimizirane (Waliwitiya i sur., 2005, cit. Barsics i sur. 2013). Brojnost žičnjaka određuje i metodu korištenja insekticida, prema Maceljski (2002) intenzitet zaraze na određenim kulturama nalaže najučinkovitiji način suzbijanja, prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Mogući odnos intenziteta zaraze žičnjacima i metode primjene zemljišnih insekticida, (Izvor: Maceljski, 2002)

Kulture	Broj žičnjaka po m2	Preporučena metoda
HUMIDNIJA PODRUČJA		
Kukuruz, šećerna repa, suncokret, krumpir, povrće	više od 20 -30	Primjena širom
	5-10 do 20-30	Primjena u red ili u traku
	3-5 do 5-15	Tretiranje sjemena
ARIDNIJA PODRUČJA		
Kukuruz, šećerna repa, suncokret, krumpir, povrće	više od 15-20	Primjena širom
	5-8 do 15-25	Primjena u red ili u traku
	1-2 do 5-10	Tretiranje sjemena

Prema načinu djelovanja razlikujemo sistemične (želučane) i nesistemične (kontaktne) insekticide. Sistemične insekticide biljka upija putem korijena pa na žičnjake djeluju želučano, ne samo kontaktno, te stoga mogu djelovati i na druge štetnike koji se hrane nadzemnim dijelovima biljke (Maceljski, 2002).

Prema popisu dozvoljenih sredstava za zaštitu bilja u 2017. godini (Ministarstvo poljoprivrede, FIS baza, 2017), na tržištu je dostupno 11 zemljišnih ineskticida koji se koriste za zaštitu protiv žičnjaka, a ubrajaju se u skupine piretroida, karbamata, neonikotinoida i organo-fosfornih insekticida. Iz skupine kontaktnih želučanih piretroida koriste se dva sredstva na bazi aktivne tvari teflutrin. Primjenjuju se tretiranjem tla u redove tijekom sjetve ili sadnje pšenice, šećerne repe, kukuruza, suncokreta i povrtnih kultura. Iz skupine kontaktnih karbamata koristi se jedno sredstvo na bazi aktivne tvari metiokarba, tretiranjem sjemena kukuruza, suncokreta i uljane repice. Od sistemičnih neonikotinoida koriste se tri sredstva na bazi tiametoksama, te po jedno sredstvo na bazi imidakloprida, klotianidina i tiakloprida. Sva sredstva ove skupine se koriste tretiranjem sjemena šećerne repe, ozimih žitarica, krumpira i kukuruza. Od kontaktnih organo-fosfornih insekticida dozvoljeno je korištenje dva sredstva na bazi aktivne tvari klorpirifosa. Primjenjuju se u trake tijekom sjetve ili sadnje kukuruza, žitarica, šećerne repe, duhana i suncokreta.

3.8. Identifikacija vrsta žičnjaka

Dok je klisnjake vrlo lako razlikovati, kao i ličinke različitih rodova, ličinke roda *Agriotes* vrlo je zahtjevno, gotovo nemoguće, determinirati do vrste obzervacijom morfologije, morfološkom identifikacijom (Traugott i sur., 2015). Najveći problem kod morfološke/mikroskopske identifikacije predstavljaju individualno varirajuće karakteristike koje se često ne uspiju savršeno očuvati prilikom ulova, a za mikroskopsko prepoznavanje vrsta potrebna je vrlo visoka taksonomska stručnost (Oba i sur., 2015). Morfološka identifikacija odraslih oblika se ne može sa sigurnošću koristiti u korelaciji sa ličinkama jer ličinke dugo žive, provodeći 2-5 godina u tlu prije kukuljenja (Staudacher i sur., 2011a). Pouzdana i učinkovita metoda utvrđivanja vrsta unutar roda *Agriotes* je molekularna identifikacija, analiza njihove genomske DNA (Ritter i Richter, 2013). Molekularna identifikacija prvenstveno služi za identifikaciju organizama koje je teško razlikovati morfološki, kako bi se riješio problem nedostataka tradicionalnih metoda identifikacije (Staudacher i sur., 2011a). Pri izboru metode identifikacije

vrlo je bitno uzeti u obzir nekoliko ključnih faktora: brzina, dostupnost, točnost i cijena (Herbert i Gregory, 2005).

3.8.1. Morfološka identifikacija

U zadnjih 250 godina, taksonomija vrsta se bazira na osnovu morfoloških struktura (Herbert i Gregory, 2005) u slučajevima gdje je moguće vizualno odrediti razlike između vrsta bazirane na njihovim morfološkim svojstvima (Friedheim, 2016). Mikroskopski/morfološki mogu se identificirati ličinke srednjih ili kasnih stadija razvoja uspoređujući njihove abdomene ili dopunski zub na mandibulama (Ritter i Richter, 2013) koristeći se morfološkim ključevima za determinaciju. Postoji nekoliko različitih ključeva i opisa za morfološku determinaciju: Emden (1945) se najčešće koristi u Velikoj Britaniji, Klausnitzer (1994) za determinaciju žičnjaka u Europi, Glen (1950) u Sjevernoj Americi i Calder (1996) u Australiji (cit. Traugott i sur., 2015). Pic i sur. (2008) također izdaju ključeve za determinaciju sa korisnim ilustracijama i dodatnim morfološkim karakteristikama vrsta (cit. Ritter i Richter, 2013). Za pouzdanu morfološku determinaciju potrebno je vrijeme, dobro očuvani cijeli uzorci i velika stručnost u taksonomiji žičnjaka (Traugott i sur., 2015).

3.8.2. Molekularna identifikacija

Molekularna identifikacija vrsta žičnjaka pruža točne, pouzdane i učinkovite rezultate, ali zahtjeva puno vremena i stručnosti (Ritter i Richter, 2013; Ellis i sur., 2009). Zbog štetnosti određenih vrsta ličinki koje je teško razlikovati morfološki unutar roda postoji velika potreba za točnom genomskom analizom vrsta (Oba i sur, 2015; Benefer i sur., 2012b). U Europi se provodi molekularna identifikacija *Agriotes* vrsta i koriste se molekularni markeri i multipleks PCR metoda analize prema Staudacher i sur. (2011a) koji su molekularno identificirali 17 vrsta roda *Agriotes* tipično rasprostranjenih u Centralnoj Europi, uključujući 9 najštetnijih, s ciljem omogućavanja daljnje brze „DNA barkod“ determinacije.

Za ekstrahiranje DNA uzimaju se noge i dijelovi abdomena koji se usitnjavaju ili se mogu koristiti cijele ličinke ukoliko ih je potrebno sačuvati za daljnja istraživanja. Nakon procesa izdvajanja i izolacije DNA vrši se lančana reakcija polimerazom (PCR) u kojoj se umnažaju specifične sekvence DNA koristeći početnice (*primer-e*) za ispitivane vrste žičnjaka (Staudacher

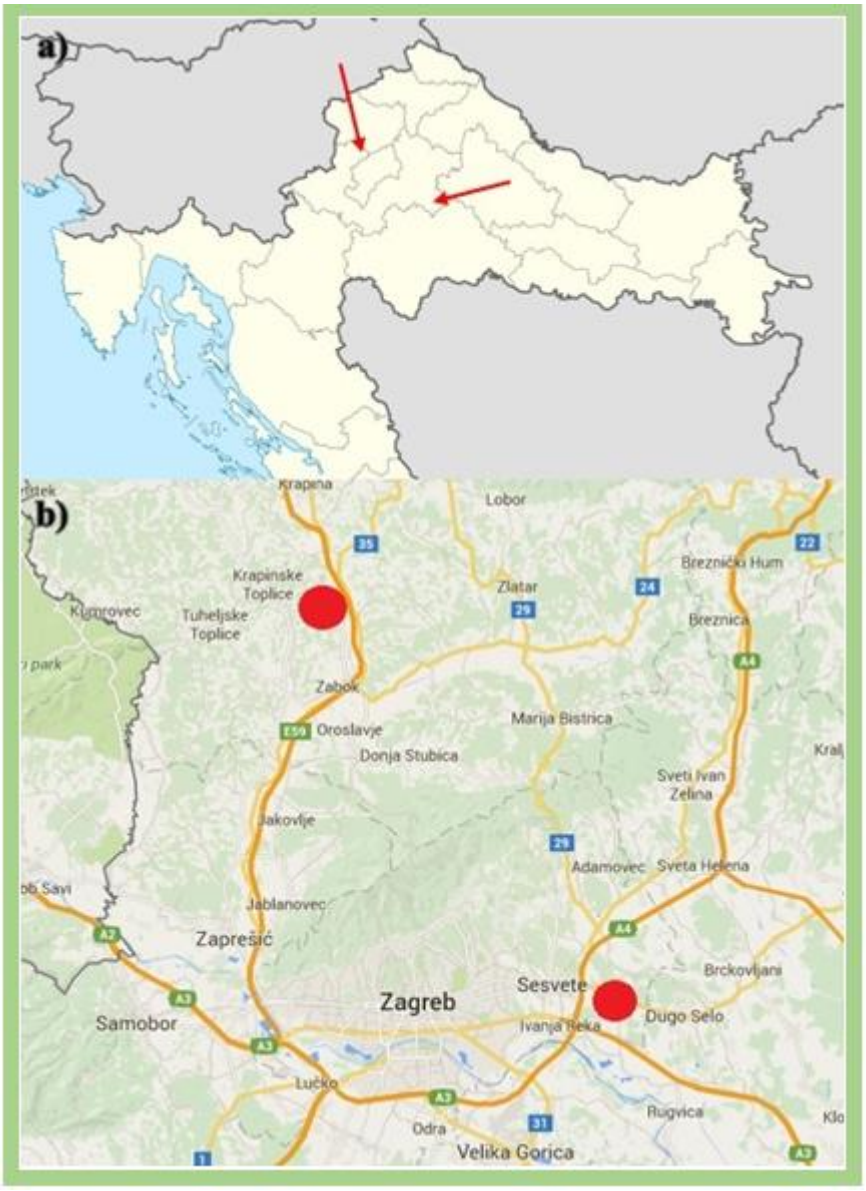
i sur., 2011a). U DNA genomskoj analizi koriste se parovi početnica (*primer-a*) koji specifično umnažaju sekvence (fragmente) DNA čija je duljina karakteristična za određenu vrstu, stoga umnoženi fragmenti DNA predstavljaju DNA pojedinih vrsta karakteristične duljine. Nakon umnažanja željenih sekvenci, produkti DNA se razdvajaju elektroforezom i vizualiziraju fluorescentnom bojom za DNA na UV transiluminatoru. Zajedno s uzorcima, na gel elektroforezi, razdvajan je i DNA marker za veličinu koji sadrži 100 parova baza i točno je poznate veličine. Svaki se gel fotografira te se očitavaju rezultati razdvajanja, odnosno pomoću DNA markera za veličinu na agaroznom gelu iščitava se o kojoj se vrsti radi (Staudacher i sur., 2011a; Oba i sur., 2015).

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje koje se protezalo od 2009. do 2011. godine imalo je u cilju utvrditi distribuciju i dominantnost vrsta žičnjaka i klisnjaka roda *Agriotes* (*A. brevis*, *A. lineatus*, *A. obscurus*, *A. sputator* i *A. ustulatus*), na ukupno 2 lokaliteta u Republici Hrvatskoj na području Središnje Hrvatske: Krapinske Toplice i Šašinovec.

Prikupljanje žičnjaka obavljano je na poljima navedenih lokaliteta u proljeće (travanj i svibanj) i u jesen (listopad) od 2009. do 2011. godine. Tlo je pregledavano standardnim metodama prognoze žičnjaka (Bažok, 2006.): kopanjem jama i ukopavanjem zrnatih mamaca pod foliju u proljeće prije sjetve i u rujnu kada su žičnjaci najbliže površini tla, te vizualnim pregledima biljaka tijekom vegetacije u svibnju prije nego migriraju u dublje slojeve tla. Cilj pregleda bio je sakupiti što je moguće veći broj ličinki koje će se identificirati. S obzirom da su ličinke žičnjaka prisutne cijelo vrijeme u tlu nije bilo važno posebno razdvajati ulove po datumima pregleda. Prikupljeni žičnjaci spremljeni su u označene posude (lokacija, polje i datum) u 70%-tni alkohol etanol i čuvani za daljnje analize.

U svrhu ovog diplomskog rada uzeti su uzorci žičnjaka prikupljeni sa lokaliteta Krapinske Toplice i Šašinovec (slika 5.). Podaci o poljima, na navedenim lokalitetima, sa kojih su sakupljani žičnjaci nalaze se u tablici 2.



Slika 5. Područje i Lokacije sa kojih su sakupljani žičnjaci; a) Lokacije označene na karti Hrvatske, b) Lokacije na karti izbliza, (Izvor: https://www.google.hr/maps/)

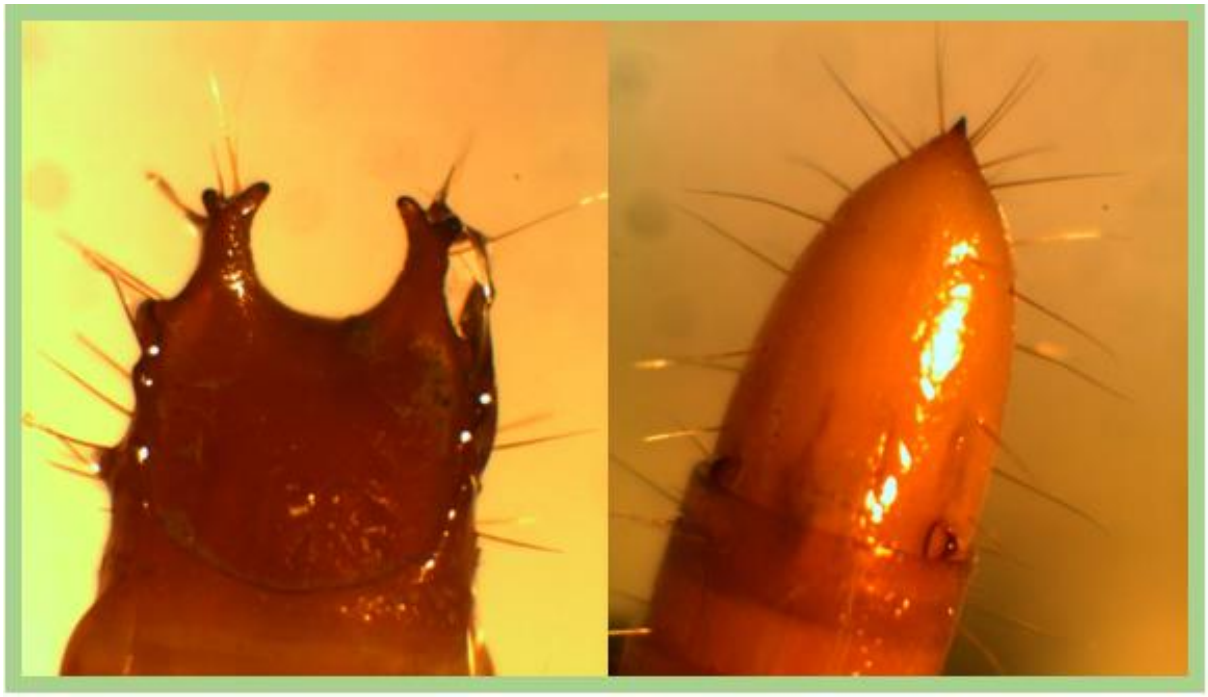
Tablica 2. Lokaliteti s kojih su sakupljani uzorci od 2009 do 2011 godine i podaci o poljima, (Izvor: Čačija, 2015)

Područje	Lokaliteti	Broj polja	GPS koordinate polja	Godina	Predkultura	Kultura
Središnja Hrvatska	Krapinske toplice	4	46°04'53.52"N 15°50'01.68"E	2009/2010	Krumpir	Kukuruz
			46°04'59.83"N 15°50'29.86"E	2009/2010	Kukuruz	Soja
			46°05'09.92"N 15°50'26.11"E	2009/2010	Kukuruz	Kukuruz
			46°05'00.74"N 15°50'14.95"E	2010/2011	Travna smjesa	Travna smjesa
	Šašinovec	4	45°51'14.12"N 16°10'58.93"E	2010/2011	Ječam	Soja
			45°51'06.87"N 16°10'51.74"E	2010/2011	Kukuruz	Kukuruz
			45°51'02.45"N 16°11'22.58"E	2010/2011	Soja	Kukuruz
			45°50'53.96"N 16°11'26.83"E	2010/2011	Kukuruz	Ječam

4.1. Morfološka identifikacija

Iz ukupnog uzorka svakog lokaliteta, na temelju morfološke identifikacije, izdvojene su jedinke koje pripadaju rodu *Agriotes*, te su pomoću morfoloških ključeva determinirane vrste roda *Agriotes* o kojima se radi.

Morfološka identifikacija provedena je pomoću morfoloških ključeva za determinaciju (Klausnitzer, 1994). Svaka jedinka je posebno pregledana pod mikroskopom, te je deveti abdominalni segment fotografiran Zeiss Stemi 2000-C Stereo mikroskopom (2007., Carl Zeiss Microscopy GmbH, Njemačka), a fotografije su pod šifrom pohranjene na računalu. Svaki je žičnjak, za kojeg je nakon morfološkog pregleda i fotografiranja utvrđeno da pripada rodu *Agriotes*, spremljen zasebno pod istom šifrom u Eppendorf 1,5 mL epruvetu sa 70%-tnim alkoholom etanolom za daljnju molekularnu identifikaciju. Slika 6. prikazuje fotografije snimljene mikroskopom prilikom morfološke determinacije.



Slika 6. Fotografije devetog abdominalnog segmenta žičnjaka. Lijevo je prikaz žičnjaka koji ne pripada rodu *Agriotes* i desno je slika žičnjaka koji pripada rodu *Agriotes,* (Izvor: Šipek, 2013).

4.2. Molekularna identifikacija

Morfološki determinirani i izdvojeni žičnjaci roda *Agriotes* determinirani su do vrste analizom njihove genomske DNA, na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Od svakog uzorka žičnjaka, skalpelom je izrezan središnji dio abdomena veličine jedan do dva mm te stavljen u epruvetu od 1,5 ml. U svrhu izdvajanja DNA iz izrezanog dijela tkiva, uzorku je dodano 20 µl PBS pufera (pH 7,2; Sigma-Aldrich, SAD) i tkivo je homogenizirano pomoću nastavka za pipetu (volumen 1000 µl; Sigma-Aldrich, SAD), kojem je vrh prije toga zaobljen plamenom. Svakom je uzorku dodano 5 µl Proteinaze K (20 mg/ml; Qiagen, Njemačka) za razgradnju proteina i 200 µl 10 % otopine Chelex (BioRad, SAD) za zaštitu izdvojene DNA. Inkubacija uzoraka vršena je na termomikseru (Eppendorf, Njemačka) tijekom 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 kako bi se ekstrahirala DNA jedinke na dnu epruvete. Iz svakog uzorka izdvojeno je 100 µl DNA u epruvetu od 1,5 mL, a propisno označeni uzorci su pohranjeni na -26 °C za daljnje analize.

Nakon izolacije DNA, za svaki je uzorak napravljena lančana reakcija polimerazom (PCR) uz istovremeno umnažanje više različitih sekvenci DNA (multipleks PCR (I)), upotrebom Qiagen multiplex PCR kompleta (Qiagen, Njemačka) i specifičnih početnica (Sigma-Aldrich, SAD), prema protokolu Staudacher i sur. (2011a). Početnice korištene u multipleks PCR prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Početnice (ime i sekvenca) korištene u Multiplex PCR, (Izvor: Staudacher i sur., 2011a)

Ime	Sekvenca	Za PCR I i/ili II
Agr-gen-S212	5'-AGATTTACAATGTTATTGTAACAGCA	PCR I i II
Agr-bre/spu-A215	5'-AAGGTGGAAGAAATCAAAATCTC	PCR I i II
Agr-lin/pro-S211	5'-CCCCTTCCCTCTCCCTG	PCR I
Agr-obs/lin/pro-A213	5'-TGCTAAGACAGGTAAGGATAAAAGA	PCR I
Agr-ust-A214	5'-TAAAATTGATGAAATTCCTGCC	PCR I
Agr-obs-S215	5'-GAAATGACCAGATCTACAATGTTATC	PCR I
Agr-bre-A522	5'-TTGCCCCAGCTAATACTGGA	PCR II

Reakcijska smjesa bila je ukupnog volumena 10 µl, a uvjeti za reakciju sljedeći:

- Jedan ciklus početne denaturacije DNA u trajanju 15 minuta pri 95 °C;

- 35 ciklusa koji uključuju: denaturaciju DNA tijekom 30 s pri 94 °C, nalijeganje početnica tijekom 1,5 minuta pri 61 °C (za multipleks PCR (II): 3 minute pri 55 °C) i produljivanje početnica tijekom 1 minute pri 72 °C;
- Jedan ciklus završnog produljivanja početnica tijekom 10 minuta pri 72 °C.

Parovi početnica (*primer-a*) korišteni u analizi specifično umnažaju sekvence (fragmente) DNA čija je duljina karakteristična za određenu vrstu, stoga umnoženi fragmenti DNA predstavljaju DNA pojedinih vrsta karakteristične duljine. Nakon umnažanja željenih sekvenci, produkti DNA su razdvojeni elektroforezom na 1,5 % gelu agaroze (Sigma-Aldrich, SAD) u puferu TBE pri uvjetima od 70 mV, 400 mA, tijekom 40 minuta, te vizualizirani fluorescentnom bojom za DNA (GelRed, Biotium, SAD) na UV transiluminatoru (BioRad, SAD). Zajedno s uzorcima, na gel elektroforezi, razdvajan je i DNA marker za veličinu („DNA Size standard“ od 100 bp; Life Technologies, SAD) koji sadrži 100 parova baza i točno je poznate veličine. Svaki je gel fotografiran te su očitani rezultati razdvajanja, odnosno pomoću DNA markera za veličinu (*„size standard“)* na agaroznom gelu iščitava se o kojoj se vrsti radi.

Kada su bile u pitanje vrste *A. brevis* i *A. sputator* na gelu je dobiven jedan fragment DNA veličine 168 parova baza. Za te uzorke napravljen je drugi multipleks PCR (II) koristeći dodatnu početnicu (Agr-bre-A522), čime su na gelu umjesto jednog razdvojena dva fragmenta DNA karakteristična za navedene vrste (Staudacher i sur., 2011a).

4.3. Obrada podataka

Morfološka analiza obuhvaća 100 žičnjaka roda *Agriotes* prikupljenih na lokalitetu Krapinske Toplice i 91 žičnjak roda *Agriotes* prikupljen na lokalitetu Šašinovec, koji su do vrste identificirani morfološkim ključevima, te pohranjeni u epruvetama i označeni. Istih 100 uzoraka iz Krapinskih Toplica i 91 uzorak iz Šašinovca identificirano je molekularno DNA analizom. Rezultati istog uzorka, dobiveni molekularnom i morfološkom identifikacijom, zabilježeni su.

Prema dobivenim rezultatima utvrđena je brojnost pojedine vrste žičnjaka na svakom lokalitetu Središnje Hrvatske (Krapinske Toplice i Šašinovec).

Iz dobivene brojnosti izračunat je postotak pogreške morfološke identifikacije, uz hipotezu da je molekularna identifikacija 100% točna jer izuzevši ljudski faktor pogreške molekularnom analizom DNA dobiva se točna informacija o kojoj se vrsti radi. Pogreška je dobivena izračunom apsolutne razlike između brojnosti dobivene morfološki i molekularno u usporedbi sa ukupnim uzorkom prikupljenih žičnjaka.

Podaci o brojnosti korišteni su također i za izračun indeksa dominantnosti žičnjaka u ukupnoj populaciji *Agriotes* vrsta na svakom lokalitetu. Indeks dominantnosti, odnosno dominantnost vrste D_1 (%) izračunata je po formuli Balogha (Balarin, 1974):

$$D_1 = \frac{a_1}{\sum a_i} \; x\,100$$

D_1 = dominantnost vrste (%)

a_1 = broj uhvaćenih jedinki iste vrste

$\sum a_i$ = ukupan broj uhvaćenih jedinki svih vrsta

Na temelju indeksa, postotka dominantnosti vrste, vrste su klasificirane prema Tischler i Haydeman (Balarin, 1974):

1. eudominantne vrste: više od 10%,

2. dominantne vrste: 5 – 10%,

3. subdominantne vrste: 1 – 4,99%,

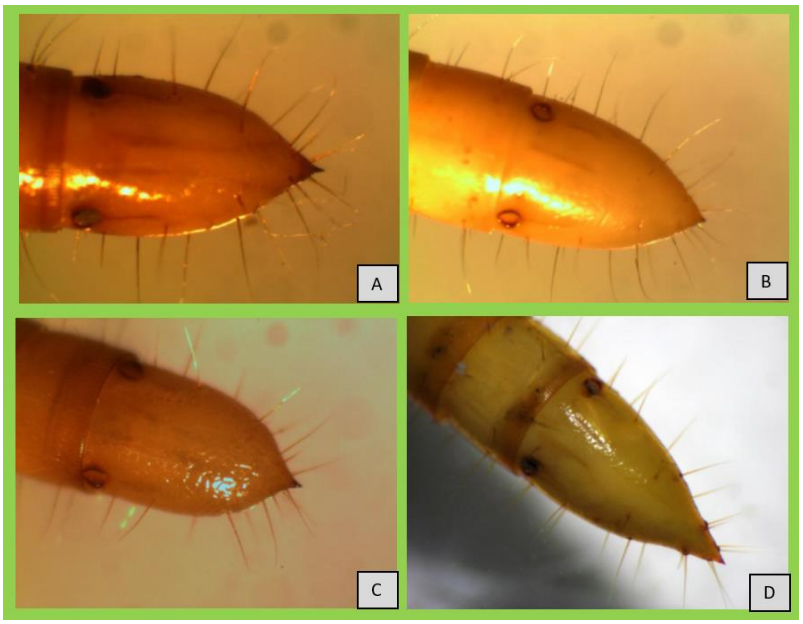
4. recedentne vrste: 0,5 – 0,99%,

5. subrecedentne vrste: 0,01 – 0,49%

Dobiveni rezultati brojnosti i dominantnosti za svaku pojedinu *Agriotes* vrstu su statistički obrađeni analizom varijance s ciljem utvrđivanja razlike između rezultata dobivenih morfološkom i molekularnom identifikacijom. Za statističku obradu primijenjen je Dvostrani Studentov t-test, koristeći lokalitete kao ponavljanja, s postavljenom nultom hipotezom da nema razlike između dvije vrste identifikacije. Cilj je bio utvrditi postoji li razlika između dva seta podataka u normalnoj distribuciji, koristeći se statističkom analizom programa Microsoft Excel.

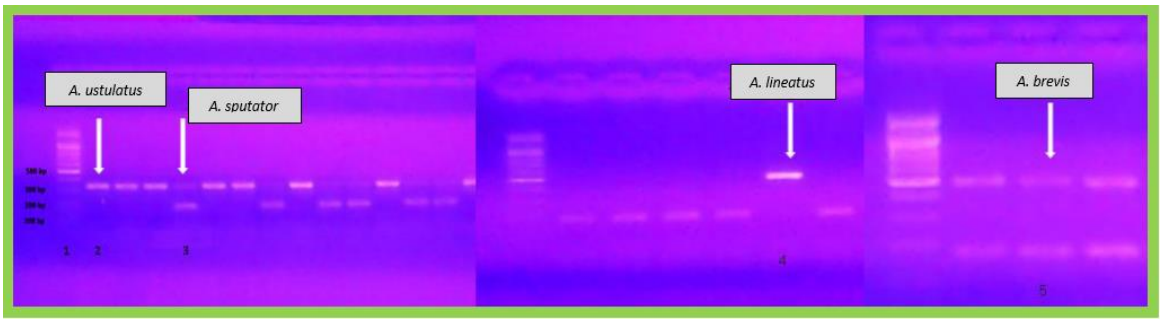
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Na dva lokaliteta (Krapinske Toplice i Šašinovec) prikupljeno je ukupno 191 žičnjak roda *Agriotes* koji su do vrste identificirani koristeći morfološku i molekularnu identifikaciju. U svrhu morfološke identifikacije fotografirani su abdominalni dijelovi svakog žičnjaka i determinirani pomoću morfoloških ključeva (slika 7.).



Slika 7. Abdominalni dio (zadak) vrsta žičnjaka determiniranih u prikupljenom uzorku: A - *A. brevis*; B – *A. lineatus*; C – *A. sputator*; D – *A.ustulatus,* (Izvor: Šipek i Majić, 2013)

Isti morfološki identificirani žičnjaci, identificirani su do vrste analizom njihove genomske DNA, lančanom reakcijom polimerazom, umnažanjem različitih sekvenci DNA (multipleks PCR). Vizualizirane sekvence DNA na agaroznom gelu, specifične za pojedinu vrstu, prikazane su slikom 8.



Slika 8. Sekvence DNA žičnjaka roda *Agriotes* vizualizirani na agaroznom gelu. Linija 1: DNA biljeg za veličinu (100 – 1000 bp). Linija 2: A. *ustulatus*, 323 bp; Linija 3: *A. sputator*, 168 bp; Linija 4: *A. lineatus*, 293 i 455 bp; Linija 5: *A. brevis*, 168 i 462 bp (Izvor: Čačija, 2015)

5.1. Rezultati identifikacije i izračun pogreške

Tablica 4. prikazuje dobivene početne rezultate identifikacije žičnjaka roda *Agriotes* na dvije navedene lokacije, koji su identificirani do vrste morfološkom i molekularnom identifikacijom.

Tablica 4. Prikaz rezultata morfološke i molekularne identifikacije žičnjaka na dva istraživana lokaliteta

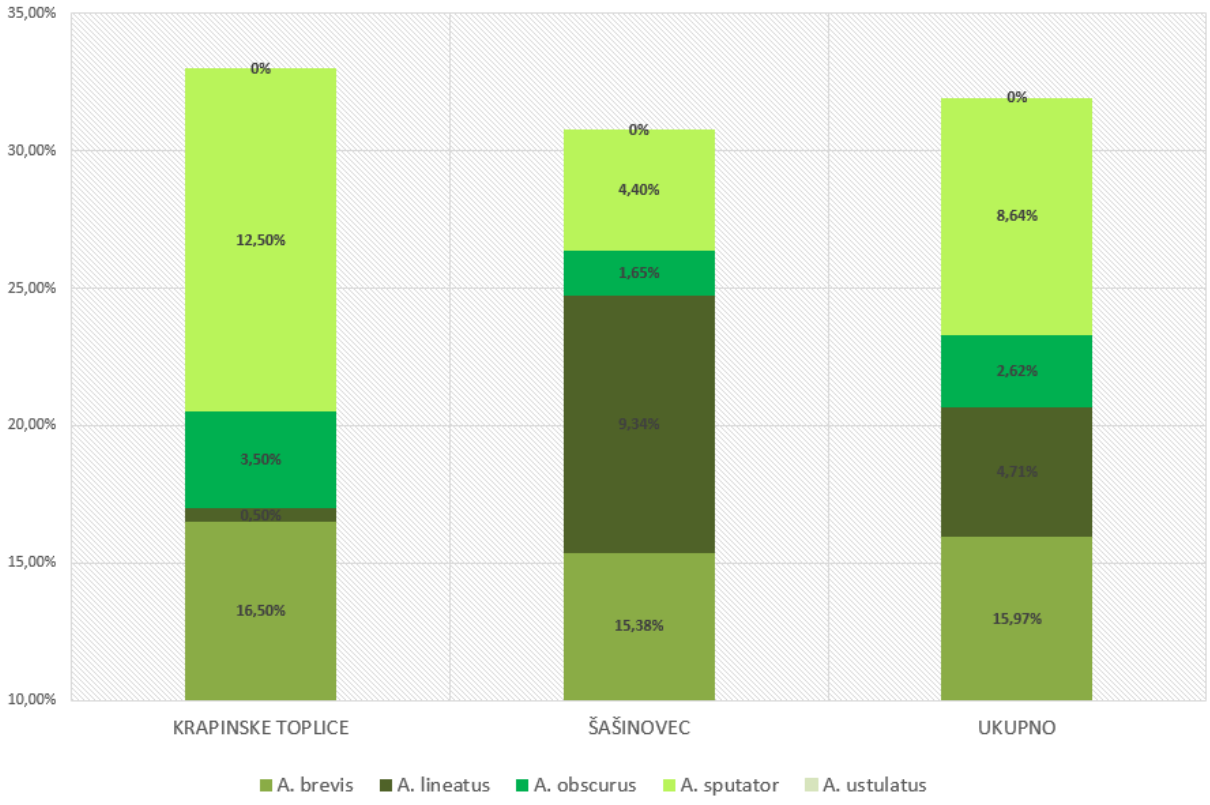
Lokacija	**Krapinske Toplice**		**Šašinovec**	
Ukupni uzorak	100		91	
Identifikacija	**Morfološka**	**Molekularna**	**Morfološka**	**Molekularna**
Vrsta	Broj u ukupnom uzorku			
A. brevis	45	81	35	66
A. lineatus	6	9	7	0
A. obscurus	0	0	0	0
A. sputator	2	9	4	17
A. ustulatus	1	1	8	8
A.brevis/A. sputator	39		34	
A.lineatus/A. obscurus	7		3	

Sve promatrane jedinke (ukupno 191 ličinka prikupljena na dvije lokacije) su do vrste identificirane molekularnom metodom, dok je morfološki do vrste identificirano 108 jedinki (56,54% od ukupno 191 jedinke). 83 jedinke nemaju točnu identifikaciju do vrste, nego se prema morfološkim karakteristikama mogu pripisati dvjema *Agriotes* vrstama i ne može se sa sigurnošću tvrditi o kojoj se vrsti radi. Vrste roda *Agriotes* je vrlo teško morfološki razlikovati. Ličinke roda *Agriotes* vrlo je zahtjevno, gotovo nemoguće, determinirati do vrste observacijom morfologije (Traugott i sur., 2015), a najteže je razlikovati vrste *A. brevis – A. sputator* i *A. lineatus – A. obscurus*. Iz tog razloga neke jedinke nisu identificirane do vrste, nego je pretpostavljeno da pripadaju jednoj od dvije navedene vrste (u tablici 4. *A. brevis/A. sputator*, *A. lineatus/A. obscurus*). Na slici 7 koja prikazuje abdominalne dijelove (zadak) svake identificirane vrste žičnjaka roda *Agriotes*, može se vidjeti kolika je sličnost između jedinki i koliko je zahtjevno identificirati vrste morfološki. U svrhu daljnjeg izračuna i statističke analize brojnosti i dominacije vrsta, žičnjaci za koje morfološki nije sigurno kojoj od dvije navedene vrste pripadaju jednako su raspodijeljeni u te iste dvije vrste, što je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz rezultata morfološke i molekularne identifikacije 5 vrsta žičnjaka na dva istraživana lokaliteta

Lokacija	Krapinske Toplice		Šašinovec	
Ukupni uzorak	100		91	
Identifikacija	**Morfološka**	**Molekularna**	**Morfološka**	**Molekularna**
Vrsta	Broj u ukupnom uzorku			
A. brevis	64,5	81	52	66
A. lineatus	9,5	9	8,5	0
A. obscurus	3,5	0	1,5	0
A. sputator	21,5	9	21	17
A. ustulatus	1	1	8	8

Uz pretpostavku da je molekularna identifikacija 100% točna, a morfološka identifikacija podložna ljudskoj pogrešci i greškama zbog velike sličnosti između vrsta roda *Agriotes* može se izraziti postotak pogreške morfološke determinacije usporedbom brojnosti dobivene morfološkom i molekularnom identifikacijom za svaku pojedinu vrstu, u odnosu na ukupan broj determiniranih jedinki. Ukupno, na oba lokaliteta i u identifikaciji svih promatranih žičnjaka, pogreška u morfološkoj identifikaciji je 31,94%, odnosno ukupno je 61 od 191 ličinke pogrešno identificirana morfološki. Slika 9. prikazuje postotak pogreške morfološke determinacije na svakom lokalitetu zasebno i ukupno na oba lokaliteta, promatrajući pogreške kod identifikacije svake pojedine vrste.

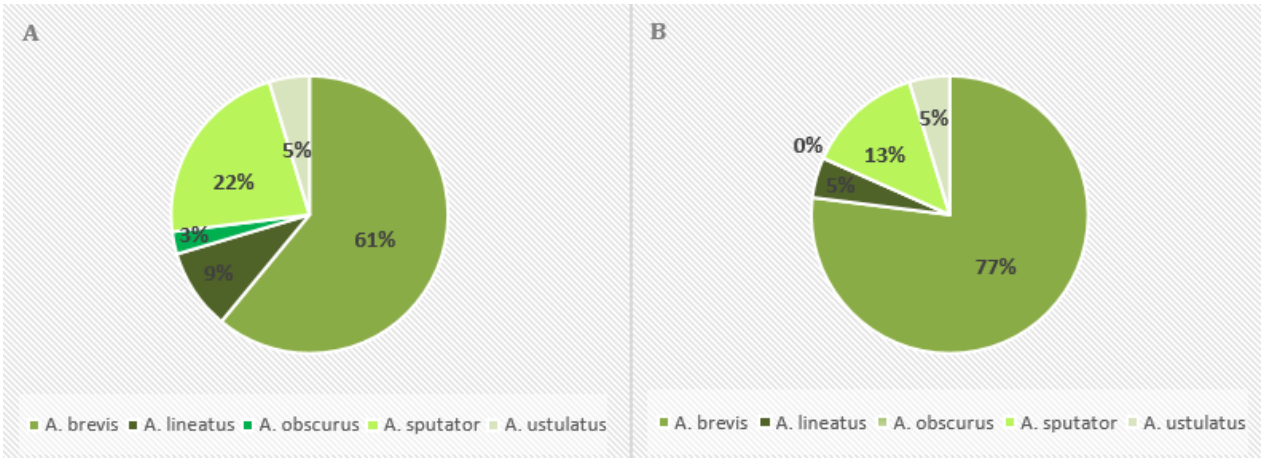


Slika 9. Postotak pogreške morfološke identifikacije za svaku pojedinu vrstu roda *Agriotes*

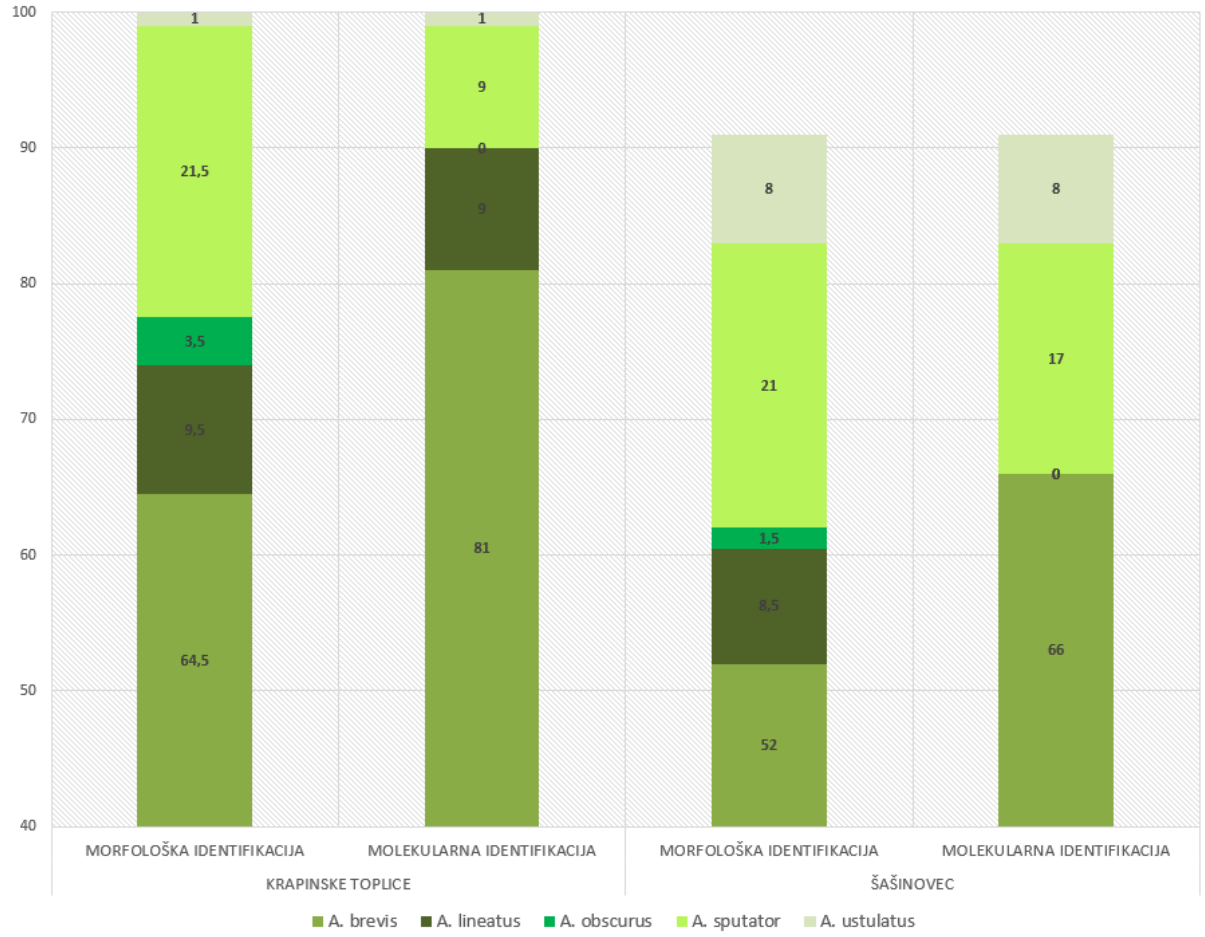
Prema rezultatima pogreške morfološke identifikacije možemo vidjeti da je razlika između istraživanih lokaliteta neznatna. Kod identifikacije žičnjaka iz Krapinskih Toplica ukupno je pogrešno morfološki identificirano 33 od 100 jedinki (33%), a iz Šašinovca 28 od 91 jedinke (30,77%). Najveća pogreška pri determinaciji zabilježena je kod vrste *A. brevis*, 15,97% ukupno, jer je ova vrsta najzastupljenija po brojnosti i sukladno tome ima veću vjerojatnost pogreške pri identifikaciji. Druga najviša pogreška od 8,64% zabilježena je kod identifikacije vrste *A. sputator*, posebice na lokalitetu Krapinske Toplice. Zbog velike sličnosti ove vrste sa najzastupljenijom vrstom *A. brevis*, veliki broj jedinki je morfološki pripisan vrsti *A. sputator* koja je znatno manje zastupljena, posebice na lokalitetu Krapinske Toplice. 4,71% pogreške je zabilježeno pri identifikaciji vrste *A. lineatus*, isključivo zbog veće pogreške na lokalitetu Šašinovec gdje je molekularno dokazano da ova vrsta uopće nije prisutna. Pogreška od 2,62% zabilježena je kod vrste *A. obscurus*, ova vrsta nije prisutna u ukupnom uzorku, tako da je za svaku jedinku za koju je morfološki smatrano da pripada vrsti *A. obscurus* identifikacija pogrešna. Jedina vrsta kojoj se morfološka identifikacija slaže sa molekularnom bez pogreške je *A. ustulatus*. Unatoč tome što je morfološka identifikacija unutar *Agriotes* roda vrlo zahtjevna, gotovo nemoguća, žičnjaci vrste *A.ustulatus* se mogu lakše i točnije identificirati zbog prisutnosti karakterističnih oznaka na zatku koje su specifične samo za ovu vrstu i niti jedna druga vrsta istog roda ih nema (Kaupp i Wurst, 1997, cit. Benitez i sur., 2014).

5.2. Brojnost i dominantnost žičnjaka roda *Agriotes*

Udio pojedine vrste u ukupnom uzorku morfološki i molekularno determiniranih žičnjaka roda *Agriotes* prikazan je na slici 10., dok je brojnost svake morfološki i molekularno identificirane vrste, na dvije istraživane lokacije, prikazana na slici 11.



Slika 10. Udio žičnjaka identificiranih morfološki (A) i molekularno (B), utvrđenih na dvije lokacije istraživanja

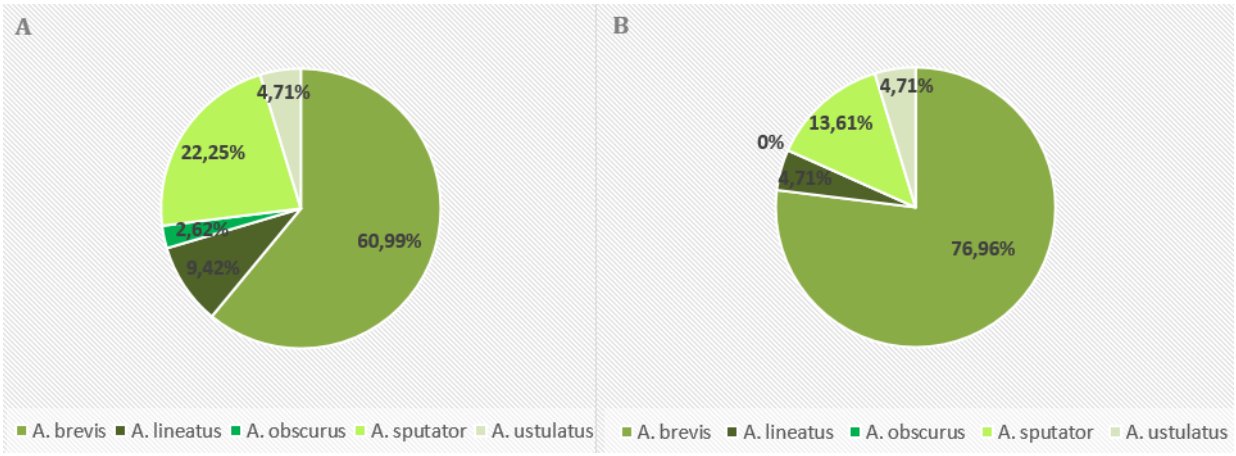


Slika 11. Brojnost svake pojedine vrste žičnjaka identificiranih morfološki i molekularno na dvije lokacije istraživanja

Prema udjelu svake pojedine vrste roda *Agriotes* možemo vidjeti da je prema rezultatima obje identifikacije najzastupljenija vrsta *A. brevis* (61% identificirano morfološki i 77% molekularno), u Krapinskim Toplicama je od 100 jedinki ukupno, prema molekularnoj identifikaciji utvrđeno 81 jedinka ove vrste. Nakon *A. brevis* slijedi *A. sputator* (22% identificirano morfološki i 13% molekularno), sa 17 molekularno identificiranih jedinki od

ukupno 91 u Šašinovcu. *A. lineatus* je zastupljen s 9% morfološki identificiranih i 5% molekularno, dok je udio *A.ustulatus*, kao jedine jednako morfološki i molekularno identificirane vrste, 5%. Žičnjaci vrste *A. obscurus* nisu utvrđeni u uzorku molekularnom identifikacijom, dok je morfološki utvrđen udio od 3%.

Koristeći brojnosti jedinki pojedine vrste i ukupan broj žičnjaka prikupljenih s dvije promatrane lokacije utvrđen je i indeks dominantnosti, odnosno zastupljenosti pojedine vrste u ukupnoj populaciji, te je određena klasifikacija žičnjaka roda *Agriotes* prema Tischler i Haydeman (cit. Balarin, 1974) i rezultati prikazan na slici 12.



Klasifikacija prema indeksu dominantnosti	Identifikacija	*A. brevis*	*A. lineatus*	*A. obscurus*	*A. sputator*	*A. ustulatus*
	Morfološka	eudominantna	dominantna	subdominantna	eudominantna	subdominantna
	Molekularna	eudominantna	subdominantna	nije utvrđena	eudominantna	subdominantna

Slika 12. Indeks dominantnosti morfološke (A) i molekularne (B) identifikacije i klasifikacija zastupljenosti žičnjaka roda *Agriotes*. Klasifikacija prema Tischler i Hydeman (Balarin, 1974.): eudominantna vrsta (>10%), dominantna vrsta (od 5 % do 10%), subdominantna vrsta (od 1 % do 4,99 %), recedentna vrsta (od 0,5 % do 0,99 %), subrecedentna vrsta (od 0,01% do 0,49 %).

Prema ukupnom broju morfološki i molekularno identificiranih jedinki određene vrste, možemo vidjeti da vrsta *A. brevis* ima najveći indeks dominantnosti i prema klasifikaciji smatra se eudominantnom vrstom. Slijedi ju vrsta *A. sputator* koja je također klasificirana kao eudominantna vrsta prema morfološkoj i molekularnoj identifikaciji. Pod vrstu *A. lineatus* je identificirano više jedinki morfološki nego što je molekularno, stoga je, s obzirom na indeks dominantnosti, ova vrsta klasificirana kao dominantna prema morfološkoj identifikaciji i kao subdominantna prema molekularnoj identifikaciji. Vrsta *A. obscurus* molekularno nije utvrđena u ovom istraživanju što je rezultiralo sa najnižim indeksom dominantnosti (nula), a nekoliko jedinki identificirano morfološki rezultiralo je klasifikacijom u subdominantne vrste.

Jedinke vrste *A. ustulatus* su jednako identificirane morfološki i molekularno, te je njihov indeks dominantnosti klasificirao ovu vrstu kao subdominantnu.

5.3. Statistička analiza brojnosti i dominantnosti žičnjaka roda *Agriotes*

Dobiveni rezultati brojnosti i dominantnosti za svaku pojedinu *Agriotes* vrstu su statistički obrađeni analizom varijance s ciljem utvrđivanja razlike između rezultata dobivenih morfološkom i molekularnom identifikacijom. Za statističku obradu primijenjen je Dvostrani Studentov t-test, koristeći rezultate lokaliteta kao ponavljanja, s postavljenom nultom hipotezom da nema razlike između dvije vrste identifikacije sa ciljem utvrđivanja postoji li razlika između dva seta podataka u normalnoj distribuciji, koristeći statističke metoda programa Microsoft Excel.

Dobiveni rezultati statističke analize varijance i signifikantnosti razlike između morfološke i molekularne identifikacije (P) za brojnost i dominantnost pojedine vrste žičnjaka prikazani su u tablicama 6. i 7.

Tablica 6. Prosječna brojnost žičnjaka vrsta roda *Agriotes* na istraživanim lokacijama i rezultat analize varijance Dvostranim Studentovim t-testom

Lokacija	**Krapinske Toplice i Šašinovec**		
Ukupni uzorak	191		
Identifikacija	**Morfološka**	**Molekularna**	**P (Dvostrani Studentov t- test (p<0,05))**
A. brevis	58,25	73,5	0,2587 n.s.
A. lineatus	9	4,5	0,4250 n.s.
A. obscurus	2,5	0	0,1296 n.s.
A. sputator	21,25	13	0,1758 n.s.
A. ustulatus	4,5	4,5	1,00 n.s.

Tablica 7. Prosječni indeksi dominantnosti vrsta roda *Agriotes* na istraživanim lokacijama i rezultat analize varijance Dvostranim Studentovim t-testom

Lokacija	**Krapinske Toplice i Šašinovec**		
Ukupni uzorak	191		
Identifikacija	**Morfološka**	**Molekularna**	**P (Dvostrani Studentov t- test (p<0,05))**
A. brevis	60,99%	76,96%	0,1047 n.s.
A. lineatus	9,42%	4,71%	0,3884 n.s.
A. obscurus	2,62%	0,00%	0,1085 n.s.
A. sputator	22,25%	13,61%	0,2270 n.s.
A. ustulatus	4,71%	4,71%	1,00 n.s.

Interpretacijom rezultata statističke analize varijance možemo vidjeti da, unatoč razlikama u rezultatima kroz brojnost i dominantnost, nema statistički signifikantnih razlika između morfološke i molekularne identifikacije bilo koje vrste roda *Agriotes*.

Pri promatranju rezultata brojnosti, rezultati signifikantnosti za svaku pojedinu vrstu su veći od 0,05 ($p>0,05$) što upućuje da nema statistički signifikantne razlike između rezultata morfološke i molekularne identifikacije (n.s.). Stoga, ne možemo odbaciti nultu hipotezu koja navodi da nema razlike između dvije vrste identifikacije prilikom utvrđivanja brojnosti pojedinih vrsta roda *Agriotes*.

Pri promatranju rezultata indeksa dominantnosti, rezultati signifikantnosti za svaku pojedinu vrstu su veći od 0,05 ($p>0,05$) što upućuje da nema statistički signifikantne razlike između rezultata morfološke i molekularne identifikacije (n.s.). Stoga, ne možemo odbaciti nultu hipotezu koja navodi da nema razlike između dvije vrste identifikacije prilikom određivanja indeksa dominantnosti pojedinih vrsta roda *Agriotes*.

6. RASPRAVA

6.1. Rezultati identifikacije i izračun pogreške

Rezultati morfološke identifikacije dobiveni su pregledom devetog abdominalnog segmenta (zatka) svake jedinke i determinacijom do vrste koristeći morfološke ključeve (Klausnitzer, 1994). Isti morfološki identificirani žičnjaci identificirani su do vrste analizom njihove genomske DNA, lančanom reakcijom polimerazom, umnažanjem različitih sekvenci DNA (multipleks PCR) prema Staudacher i sur., (2011a).

Sve promatrane jedinke (ukupno 191 ličinka prikupljena na dvije lokacije) su do vrste identificirane molekularnom metodom, dok je morfološki do vrste identificirano 108 jedinki (56,54% od ukupno 191 jedinke). Za 83 jedinke nije bilo moguće sa sigurnošću tvrditi o kojoj se vrsti radi: 73 jedinke su označene kao *A.brevis/ A.sputator* i 10 jedinki kao *A.lineatus/ A.obscurus*. Vrste roda *Agriotes* je vrlo teško morfološki razlikovati. Mnogi autori navode kako je ličinke roda *Agriotes* vrlo zahtjevno, gotovo nemoguće, determinirati do vrste obzervacijom morfologije (Traugott i sur., 2015; Lehmhus i Niepold, 2015; Oba i sur., 2015; Ritter i Richter, 2013), a najteže je razlikovati vrste *A. brevis – A. sputator* i *A. lineatus – A. obscurus* bazirajući se samo na morfologiji zatka ličinke. Čak i prema molekularnoj identifikaciji, prema Staudacher i sur. (2011a) u slučaju vrsta *A. brevis* i *A. sputator* na gelu je dobiven jedan fragment DNA i potreban je drugi multipleks PCR (II) koristeći dodatnu početnicu, čime su na gelu razdvojena dva fragmenta DNA karakteristična za navedene vrste, a Lehmhus i Niepold (2015) su u svojoj molekularnoj identifikaciji dobivali rezultate prema kojima se dobivene sekvence DNA mogu determinirati i kao *A. lineatus* i *A. obscurus*, dok su prema morfološkim ključevima oznake na abdomenu također mogle pripadati jednoj od dvije navedene vrste, pri čemu je na mnogim uzorcima došlo do pogrešne morfološke identifikacije. U literaturi se takva identifikacija pripisuje objema vrstama, kao što je i u istraživanju Lehmhus i Niepold (2015) rezultat označen kao *A. lineatus/A. obscurus* i Staudacher i sur. (2011a) koji su rezultat označili *A. brevis/A.sputator* . Naknadno su u ovom radu, nakon inicijalnih rezultata, u svrhu daljnjeg istraživanja takvi rezultati jednako raspodijeljeni u dvije identificirane vrste.

Unatoč tome što je morfološka identifikacija unutar *Agriotes* roda vrlo zahtjevna, gotovo nemoguća, zadak žičnjaka nekih vrsta se može lakše i točnije identificirati zbog prisutnosti karakterističnih oznaka koje pomažu u identifikaciji. Kod vrste *A. ustulatus* na zatku su nalaze karakteristične oznake koje su specifične samo za ovu vrstu i niti jedna druga vrsta istog roda ih nema (Kaupp i Wurst, 1997, cit. Benitez i sur., 2014), na devetom abdominalnom segmentu, koji je jače izdužen na kaudalnoj strani, imaju čekinje koje izlaze iz malih bradavica (Furlan, 1998). Staudacher i sur. (2013) navode vrstu *A. ustulatus* kao jedinu *Agriotes* vrstu koja se u stadiju ličinke može morfološki razlikovati od ostalih vrsta i determinirati, dok za ostale vrste u svom istraživanju najznačajnijih žičnjaka u Austriji koriste molekularnu identifikaciju. Stoga su rezultati morfološke i molekularne identifikacije u ovom radu jednaki i bez pogreške za vrstu *A. ustulatus*. U literaturi se i vrsta *A. sputator* navodi kao morfološki jednostavna za identifikaciju, ali uz znatno detaljniji pregled i korištenje više različitih morfoloških oznaka na tijelu žičnjaka. Lehmhus i Niepold (2015) su u svom istraživanju tri najvažnije štetne vrste žičnjaka u Njemačkoj (*A. lineatus, A. obscurus, A. sputator*) vrlo lako morfološki izdvojili *A. sputator* prema malim granulama na bazi svakog abdominalnog segmenta i prema malim granulama na kukovima između nogu, što nije vidljivo kod preostale dvije vrste. Također vrsti *A. lineatus* nedostaje manja čekinja od ukupno dvije čekinje blizu stigme na abdominalnim segmentima od 1 do 8, te su ličinke nešto svjetlije boje, što može pomoći u distinkciji ove vrste od vrste *A. obscurus* (Sufyan, 2012; Lehmhus i Niepold, 2015). U ovom radu morfološki je pregledavan samo zadnji, deveti, abdominalni segment te je stoga bilo puno teže razlikovati vrstu *A. sputator* i vrstu *A. lineatus* od ostalih *Agriotes* vrsta. U istraživanjima morfološke identifikacije vrste *A. brevis* nema zabilježenih specifičnih karakteristika, Furlan (2014) u istraživanju štetnosti ove vrste na kukuruz u južnoj Europi koristi osobne nepublicirane ključeve razvijene laboratorijskim uzgojem ličinki do odraslih oblika.

S druge strane, molekularna identifikacija genomske DNA može pružati točne i precizne rezultate o kojoj se *Agriotes* vrsti radi (Čačija, 2015; Traugott i sur., 2015; Staudacher i sur., 2011a), te biti jedna od najkorisnijih metoda determinacije za vrste koje je teško identificirati morfološki (Staudacher i sur., 2011a). S vrlo malim uzorkom tkiva žičnjaka, korištenjem odgovarajućih početnica za svaku pojedinu vrstu dobivaju se umnožene sekvence DNA karakteristične za pojedinu vrstu (Staudacher i sur., 2011a). Unatoč tome, proces molekularne identifikacije ne mora nužno biti uspješan i rezultirati s dobivanjem odgovora o kojoj se vrsti

radi. U identifikaciji ličinki riba Friedheim (2016) navodi da je od 4 promatrane jedinke morfološki do vrste identificirana jedna, dok je molekularna PCR metoda bila uspješna samo za 2 jedinke. Za ostale dvije, iz nepoznatih razloga, nije bilo rezultata. Lehmhus i Niepold (2015) navode da je u njihovom istraživanju prema metodologiji Staudacher i sur. (2011a) bilo vrlo zahtjevno jasno pripisati rezultate multiple PCR metode jednoj vrsti iz nepoznatih razloga. Istraživanje su ponovili u dva različita laboratorija i dobili su različite rezultate kao i rezultate koji se ne mogu pripisati samo jednoj vrsti, te su zbog toga morali ponavljati molekularnu analizu sa novokreiranim početnicama. Staudacher i sur. (2013) u svom istraživanju velikog broja (ukupno 1242 ličinke) prikupljenih žičnjaka u Austriji navode mali postotak ličinki za koje nije provedena uspješna kvantifikacija DNA prilikom molekularne identifikacije.

Zbog svega navedenog vezano uz zahtjevnost morfološke identifikacije i zbog vrlo uspješno provedene molekularne identifikacije za sve prikupljene žičnjake, u interpretaciji rezultata ovog istraživanja molekularna identifikacija je smatrana 100% točnom. Izuzevši mogućnost ljudske pogreške, ukoliko je PCR reakcija provedena do kraja i dobivena sekvenca DNA koja odgovara jednoj određenoj vrsti roda *Agriotes*, takav se rezultat smatra točnom identifikacijom vrste (Čačija, 2015).

Prema navedenom, izračunata je pogreška morfološke identifikacije koja je u ukupnom uzorku iznosila 31,94%, odnosno ukupno je 61 od 191 ličinke pogrešno identificirana morfološki. Najveća pogreška pri determinaciji zabilježena je kod vrste *A. brevis*, 15,97% ukupno. A. brevis nema zabilježene signifikantno različite morfološke karakteristike koje bi jasno odvojile ovu vrstu od ostalih vrsta roda *Agriotes*, a i ova vrsta je najzastupljenija po brojnosti u ukupnom uzorku, pa se time mogućnost pogreške povećava sa brojem jedinki koje su identificirane. Druga najviša pogreška od 8,64% zabilježena je kod identifikacije vrste *A. sputator*. Zbog velike sličnosti ove vrste sa najzastupljenijom vrstom *A.brevis*, veliki broj jedinki je morfološki pripisan vrsti *A. sputator* koja je znatno manje zastupljena, posebice na lokalitetu Krapinske Toplice. Kao što je i prethodno naglašeno, *A. sputator* sadrži određene morfološke karakteristike koje mogu razlikovati ovu vrstu od drugih *Agriotes* vrsta, ali je potrebno morfološki pregledavati cijelo tijelo žičnjaka (Lehmhus i Niepold, 2015) dok je u ovom istraživanju pregledavan samo deveti abdominalni segment. 4,71% pogreške je zabilježeno pri identifikaciji vrste *A. lineatus*, isključivo zbog veće pogreške na lokalitetu Šašinovec gdje je molekularno dokazano da ova vrsta uopće nije prisutna. Pogreška od 2,62% zabilježena je kod

vrste *A. obscurus*, ova vrsta nije prisutna u ukupnom uzorku, tako da je za svaku jedinku za koju je morfološki smatrano da pripada vrsti *A. obscurus* identifikacija pogrešna. *A. obscurus* je i morfološki i molekularno vrlo slična vrsti *A. lineatus* i pogreška je prvenstveno prisutna zbog nemogućnosti razlikovanja ove dvije vrste. Jedina vrsta kojoj se morfološka identifikacija slaže sa molekularnom bez pogreške je *A. ustulatus.* Prema literaturi (Kaupp i Wurst, 1997, cit. Benitez i sur., 2014; Staudacher i sur., 2013) ovo je jedina vrsta žičnjaka koja se može pouzdano identificirati morfološki.

Usporedba ove dvije vrste identifikacije, zbog vrlo subjektivne i zahtjevne morfološke determinacije, može rezultirati sa vrlo velikim razlikama u dobivenim rezultatima. Oba i sur. (2015) morfološki i molekularno su identificirali 20 vrsta žičnjaka koji su najčešći štetnici u Japanu i dobili su rezultate da se morfološka identifikacija značajno razlikuje od molekularne, većina jedinki identificirana morfološki pokazala je drugačiji rezultat PCR reakcijom. Prema tome zaključuju da je molekularni pristup identifikaciji velik i koristan pomak za brzu i pouzdanu identifikaciju vrsta žičnjaka u Japanu.

U istraživanju koje su proveli Lehmhus i Niepold (2015), uspoređujući morfološku i molekularnu identifikaciju žičnjaka, došli su do slijedećih rezultata: 50 od ukupno 60 žičnjaka je jednako identificirano molekularno i morfološki, dok se preostalih 10 razlikovalo. Tri žičnjaka je bilo nemoguće morfološki identificirati zbog visokog stupnja istrošenosti (5% od ukupno 60 jedinki); jedan je žičnjak morfološki pripisan vrsti *A. obscurus*, a PCR reakcija pokazala je da se radi o *A. sputator* (1,7% od ukupno 60 jedinki); šest žičnjaka je morfološki identificirano kao *A. obscurus*, dok je PCR reakcija pokazala da se radi o *A. lineatus* (10% od ukupno 60 jedinki). Prema dobivenim rezultatima možemo vidjeti da je ukupna pogreška morfološke identifikacije 16,7%, dok je u ovom istraživanju pogreška 31,94%. Veća pogreška se prvenstveno može pripisati tri puta većem broju identificiranih jedinki, što povećava mogućnost pogreške, i identifikaciji u kojoj se promatra samo deveti/zadnji abdominalni segment, dok su neke od eliminacijskih morfoloških oznaka raspoređene po cijelom tijelu ličinke.

6.2. Brojnost i dominantnost žičnjaka roda *Agriotes*

6.2.1. Brojnost i dominantnost vrste *A. brevis*

Rezultati istraživanja brojnosti i dominantnosti vrste *A. brevis* u središnjoj Hrvatskoj pokazuju da je ova vrsta najbrojnija s najvišim indeksom dominantnosti u usporedbi sa drugim promatranim vrstama. Udio *A. brevis* u ukupnom uzorku je 77% prema molekularnoj identifikaciji, a vrsta je klasificirana prema brojnosti kao eudominantna u obje identifikacije. Razlike između morfološke i molekularne identifikacije bilježe najvišu pogrešku, ali nisu utjecale na svrstavanje ove vrste kao najbrojnije i najdominantnije u usporedbi sa svim drugim identificiranim vrstama.

Iako je ovim istraživanjem utvrđen značajan postotak ove vrste, prema literaturi se *A. brevis* ne spominje u velikoj brojnosti. Bažok i Igrc Barčić (2010) su u svom istraživanju samo jednom utvrdili prisutnost žičnjaka vrste *A. brevis,* Maceljski (2002) navodi kako je u velikom broju prisutna u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, dok Furlan (2011) i Toth (2002) navode ovu vrstu kao jednu od glavnih štetnika ratarskih kultura u Italiji, pet puta štetniju od vrste *A. ustulatus.* S obzirom na štetnost ove vrste i s obzirom na rezultate novijih istraživanja, Čačija (2015) sugerira kako bi bilo korisno u budućim istraživanjima žičnjaka više pažnje posvetiti upravo ovoj vrsti.

6.2.2. Brojnost i dominantnost vrste *A. lineatus*

Rezultati istraživanja brojnosti i dominantnosti vrste *A. lineatus* u središnjoj Hrvatskoj pokazuju da je ova vrsta vrlo slabo zastupljena u usporedbi sa *A. brevis* i *A. sputator*. Udio *A. lineatus* u ukupnom uzorku je 5% prema molekularnoj identifikaciji, a vrsta je klasificirana prema brojnosti kao dominantna u morfološkoj identifikaciji i subdominantna u molekularnoj identifikaciji. Razlike između morfološke i molekularne identifikacije utjecale su na klasifikaciju ove vrste, unatoč tome što je prema morfološkoj identifikaciji ova vrsta dominantna, molekularno je utvrđena manja brojnost i svrstana je u subdominantnu vrstu.

Vrsta *A. lineatus* se u literaturi navodi kao dominantna vrsta ličinki u središnjim krajevima Hrvatske (Bažok, 2007.; Bažok i Igrc Barčić, 2010.; Maceljski, 2002.). Čačija (2015) također navodi da je ova vrsta najzastupljenija u području središnje Hrvatske u usporedbi sa Zapadnom Slavonijom, Podravinom i Gorskom Hrvatskom. U ovom istraživanju, zbog male brojnosti jedinki ove vrste indeks dominantnosti je također nizak, rezultirajući klasifikacijom u subdominantnu vrstu. Dobivena mala brojnost ličinki može se protumačiti nepovoljnim

klimatskim uvjetima za *A. lineatus*. Staudacher i sur. (2013) navode da vrsta preferira područja viših nadmorskih visina, s nižim temperaturama zraka i većom količinom oborina, a autori navode i da vrsti za razvoj pogoduju vlažnija tla (Maceljski, 2002; Staudacher i sur., 2013).

6.2.3. Brojnost i dominantnost vrste *A. obscurus*

Rezultati istraživanja u središnjoj Hrvatskoj pokazuju da nisu pronađene jedinke vrste *A. obscurus*. Morfološki je ova vrsta identificirana kao *A. lineatus/A. obscurus*, pa je, prema morfološkoj identifikaciji, udio ove vrste u ukupnom uzorku 3% i klasificirana je kao subdominantna s obzirom na dobiveni indeks dominantnosti. Razlike između morfološke i molekularne identifikacije utjecale su na klasifikaciju ove vrste, unatoč tome što je prema morfološkoj identifikaciji ova vrsta subdominantna, molekularno nije utvrđena.

6.2.4. Brojnost i dominantnost vrste *A. sputator*

Rezultati istraživanja brojnosti i dominantnosti vrste *A. sputator* u središnjoj Hrvatskoj pokazuju da je ova vrsta po brojnosti slijedi odmah nakon vrste *A. brevis* . Udio *A. sputator* u ukupnom uzorku je 13% prema molekularnoj identifikaciji, a vrsta je klasificirana prema brojnosti kao eudominantna u obje identifikacije. Razlike između morfološke i molekularne identifikacije bilježe pogrešku zbog zamjene sa vrstom *A. brevis*, ali nisu utjecale na svrstavanje ove vrste kao eudominantne.

Čačija (2015) navodi da je u većini Hrvatske najviše ličinki *A. sputator*, s visokim indeksima dominantnosti, a prema Maceljski (2002) zastupljenost ličinki vrste *A. sputator* je visoka samo na području istočne Hrvatske, odmah iza vrste *A. ustulatus* s kojom se pojavljuje zajedno. Stoga Čačija (2015) naglašava da rezultati novih istraživanja ukazuju na povećanje zastupljenosti ovih žičnjaka i u drugim krajevima Hrvatske zbog visokih indeksa dominantnosti na svim istraživanim područjima.

6.2.5. Brojnost i dominantnost vrste *A. ustulatus*

Rezultati istraživanja brojnosti i dominantnosti vrste *A. ustulatus* u središnjoj Hrvatskoj pokazuju da je ova vrsta najmanje zastupljena u usporedbi s drugim pronađenim vrstama.

Udio *A. ustulatus* u ukupnom uzorku je 5%, a vrsta je klasificirana prema brojnosti kao subdominantna. Nema razlike između morfološke i molekularne identifikacije, sve jedinke su jednako identificirane u obje identifikacijske metode i ovo je jedina vrsta koja nema pogrešku pri identifikaciji. Prema literaturi, vrsta *A. ustulatus* se najlakše razlikuje od ostalih pronađenih vrsta zbog specifičnih morfoloških oznaka na zatku (Kaupp i Wurst, 1997, cit. Benitez i sur., 2014; Staudacher i sur., 2013).

Prema Čačija (2015) ova je vrsta najzastupljenija na području Slavonije i Gorske Hrvatske, a najmanje zastupljena na području središnje Hrvatske, a navodi se kao dominantna u istočnim krajevima Hrvatske (Bažok i Igrc Barčić, 2010; Maceljski, 2002). Prema Furlan (1996) preferira više temperature, pa je najzastupljenija u istočnoj i zapadnoj Slavoniji i time manje zastupljena u središnjoj Hrvatskoj.

6.3. Statistička analiza brojnosti i dominantnosti žičnjaka roda *Agriotes*

Dobiveni rezultati brojnosti i dominantnosti za svaku pojedinu *Agriotes* vrstu su statistički obrađeni analizom varijance s ciljem utvrđivanja razlike između rezultata dobivenih morfološkom i molekularnom identifikacijom.

Pri promatranju rezultata brojnosti i dominantnosti, rezultati signifikantnosti za svaku pojedinu vrstu su veći od 0,05 ($p>0,05$) što upućuje da nema statistički signifikantne razlike između rezultata morfološke i molekularne identifikacije (n.s.). Stoga, ne možemo odbaciti nultu hipotezu koja navodi da nema razlike između dvije vrste identifikacije.

Lehmhus i Niepold (2015), uspoređujući morfološku i molekularnu identifikaciju najzastupljenijih vrsta žičnjaka u Njemačkoj, navode da morfološka identifikacija može imati pogreške zbog ljudskih čimbenika, ali također može biti pouzdana metoda za identifikaciju najzastupljenijih žičnjaka ukoliko se pažljivo i stručno provede. Suprotno navedenom, Oba i sur. (2015), u identifikaciji 20 vrsta žičnjaka u Japanu dobivaju rezultate morfološke identifikacije kompletno različite od rezultata dobivenih molekularnom metodom, te naglašavaju kako tradicionalnu morfološku metodu treba što prije revidirati. Staudacher i sur. (2011a) navode kako je molekularna metoda identifikacije najpouzdanija i potrebno ju je unaprjeđivati i što više koristiti.

Prema rezultatima ovog istraživanja, kao i istraživanja Lehmhus i Niepold (2015), morfološka metoda identifikacije može zakazati samo u slučaju vrsta koje su morfološki previše slične da bi se mogle sa sigurnošću razlikovati i kod uzoraka koji su istrošeni pa su izgubili bitne morfološke karakteristike za determinaciju. Na velikom uzorku žičnjaka taj postotak pogreške ne mora biti signifikantan, te su rezultati obje identifikacije primjenjivi u daljnjem istraživanju i zaključivanju.

U slučaju izračunavanja indeksa dominantnosti i klasifikacije vrsta prema Tischler i Hydeman (Balarin, 1974.), zbog puno preciznijeg i osjetljivijeg praga, može doći do svrstavanja vrste u različite grupe, ovisno o tipu identifikacije. Tako se vrste *A. lineatus* i *A. obscurus*, zbog velike sličnosti mogu krivo determinirati i klasificirati što može dovesti do pogrešnih zaključaka što je prema ovim rezultatima problem morfološke identifikacije. Takav rezultat je vidljiv u istraživanju Lehmhus i Niepold (2015) i u ovom istraživanju gdje je morfološki identificirana vrsta *A. lineatus* klasificirana prema brojnosti kao dominantna zbog krivo identificiranih jedinki, dok je u molekularnoj identifikaciji subdominantna. Također, vrsta *A. obscurus* je zbog nekoliko morfološki identificiranih jedinki klasificirana kao subdominantna, a molekularno nije utvrđena.

Friedheim (2016) naglašava da je morfološka metoda identifikacije proučavana i nadopunjavana stoljećima, a da je molekularna metoda relativno nova i potrebno ju je dodatno nadopuniti i validirati. Naglašava kako taksonomski stručnjaci smatraju molekularnu metodu nedostatnom da bi zamijenila morfološku, dok molekularni znanstvenici navode da je morfološka metoda zastarjela. Obje metode identifikacije podložne su pogreškama. Tako Friedheim (2016) i Lehmhus i Niepold (2015) navode da morfološka metoda može biti neadekvatna i u potpunosti podbaciti kod uzoraka koji su istrošeni i degradirani, dok u molekularnoj metodi može doći do kontaminacije uzorka u bilo kojem stadiju procesa što rezultira sa izostankom rezultata ili pogrešnim rezultatom. U slučaju morfološke identifikacije smo svjesni razloga nemogućnosti determinacije, dok je u molekularnom procesu razlog izostanka rezultata ili potvrda točnosti rezultata nepoznata. Korištenjem molekularne identifikacije u potpunosti se eliminira subjektivno određivanje vrsta i oslanja se isključivo na rezultat dobiven sekvencioniranjem DNA, te se proces identifikacije vrsta uvelike olakšava (Herbert i Gregory, 2005), ali isto tako ne postoji garancija da će morfološka metoda biti uspješna i dati konačan odgovor o kojoj se vrsti radi. U svom istraživanju, Friedheim (2016)

navodi prednosti i nedostatke obje metode nakon provođenja identifikacije ličinki riba, te zaključuje kako jedna metoda nadopunjava drugu i preporuča korištenje obje metode u svrhu dobivanja najučinkovitijih i najtočnijih rezultata. Također navodi da postoje velike sličnosti u morfološkim karakteristikama velikog broja organizama, posebice ličinki, i da stručnjaci pristupaju morfološkoj metodi identifikacije subjektivno i vrlo često ne nalaze zajednički konsenzus, ali takav problem može se riješiti uvođenjem univerzalnih metoda identifikacije za svaku pojedinu vrstu. Etzler (2013) jednako zaključuje: kombinirano korištenje morfološke i molekularne identifikacije esencijalno je za potpuno razumijevanje vrsta žičnjaka, jer se u svim projektima utvrđivanja najštetnijih vrsta žičnjaka u Montani morao koristiti kombinacijom morfološke i molekularne identifikacije. Hills (1984) objavljuje pregledni rad prednosti i nedostataka obje metode, konflikte i razlike između metoda i konsenzuse prilikom korištenja obje metode identifikacije istovremeno, te se u novijim istraživanjima stručnjaci referiraju i koriste navedenim pravilima u svrhu maksimalnog iskorištavanja mogućnosti i dobivanja što točnijih rezultata.

7. ZAKLJUČCI

U skladu s postavljenim ciljevima istraživanja, na temelju dobivenih rezultata, zaključeno je slijedeće:

- Nakon provedbe morfološke i molekularne identifikacije 191 jedinke žičnjaka utvrđeno je da je pogreška morfološke identifikacije iznosila 31,94%, odnosno ukupno je 61 od 191 ličinke pogrešno identificirana morfološki. Rezultati upućuju da je morfološka identifikacija podložna pogreškama zbog vrlo velike sličnosti devetog abdominalnog segmenta istraživanih vrsta, te da je vrlo zahtjevno, gotovo nemoguće, ličinke roda *Agriotes* identificirati morfološki korištenjem samo morfoloških oznaka na zatku. U svrhu dobivanja točnijih i pouzdanijih rezultata, morfološka identifikacija bi trebala biti puno preciznija, koristeći se sa svim dostupnim morfološkim ključevima i sa karakterističnim morfološkim oznakama na cijelom tijelu žičnjaka.

- Molekularna identifikacija je do vrste uspješno provedena za sve jedinke u uzorku što upućuje da je za navedene vrste molekularna identifikacija vrlo pouzdana.

- Jednaki rezultati morfološke i molekularne identifikacije dobiveni su identifikacijom vrste *A. ustulatus*. Zbog karakterističnih morfoloških oznaka na zatku, ovu je vrstu lakše razlikovati od ostalih promatranih vrsta, te morfološka identifikacija može biti jednako pouzdana kao i molekularna.

- Prema brojnosti i dominantnosti, u središnjoj Hrvatskoj je najzastupljenija vrsta *A. brevis*, klasificirana kao eudominantna, nakon koje slijedi vrsta *A. sputator*, također klasificirana kao eudominantna. Vrsta *A. lineatus* i vrsta *A. ustulatus* su zastupljene u manjem broju i klasificirane kao subdominantne, dok vrsta *A. obscurus* u ukupnom uzorku nije utvrđena. Dobiveni rezultati su konzistentni sa najnovijim podacima o zastupljenosti žičnjaka u Hrvatskoj.

- Statističkom analizom brojnosti i indeksa dominantnosti utvrđeno je da nema signifikantnih razlika između rezultata dobivenih morfološkom identifikacijom i

rezultata dobivenih molekularnom identifikacijom, što upućuje da postotak pogreške morfološke identifikacije nije značajan. Prema statističkoj analizi razlike između dvije vrste identifikacije signifikantno ne utječu na završni rezultat brojnosti i indeksa dominantnosti pojedine vrste.

- Utjecaj pogreške morfološke identifikacije vidljiv je u klasifikaciji korištenjem indeksa dominantnosti. Zbog puno preciznijeg i osjetljivijeg praga, dolazi do svrstavanja nekih vrsta u različite grupe, ovisno o tipu identifikacije. Tako su vrste *A. lineatus* i *A. obscurus*, zbog velike sličnosti, krivo determinirane i klasificirane. Morfološki identificirana vrsta *A. lineatus* klasificirana je prema brojnosti kao dominantna, dok je u molekularnoj identifikaciji subdominantna. Također, vrsta *A. obscurus* je zbog nekoliko morfološki identificiranih jedinki klasificirana kao subdominantna, a molekularno nije utvrđena.

- Zaključno, prema dobivenim rezultatima i prema pregledu srodnih istraživanja sugerira se kombinirano korištenje morfološke i molekularne identifikacije za potpuno razumijevanje i razlikovanje vrsta žičnjaka. Daljnjim unaprjeđivanjem morfološke identifikacije istraživanjem novih specifičnih uzoraka i morfoloških oznaka pojedine vrste, te razvijanjem veće baze genetskih kodova za pojedine vrste žičnjaka obje se metode mogu koristiti za dobivanje što točnijih rezultata identifikacije vrste, u svrhu održivog razvoja poljoprivredne proizvodnje sa smanjenim korištenjem pesticida, i u skladu sa održivom zaštitom bilja.

8. LITERATURA

1. Ansari, M.A., Evans, M., Butt, T.M. (2009): Identification of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control. Crop Prot. 28: 269-272.
2. Anon, (1983): Wireworms. Leaflet 199. Ministry of Agriculture Fisheries and Food.
3. Balarin, I. (1974): Fauna Heteroptera na krmnim leguminozama i prirodnim livadama u SR Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Zagreb.
4. Barsics, F., Haubrughe, E., Verheggen, F.J. (2013): Wireworms Management: An Overview of the Existing Methods, with Particular Regards to *Agriotes* spp. (Coleoptera: Elateridae). Insects, 4: 117-152.
5. Bažok, R. (2006): Žičnjaci - važni štetnici ratarskih kultura. Glasilo biljne zaštite, 1: 3-10.
6. Bažok, R. (2007): Žičnjaci. Glasilo biljne zaštite, 5: 339-344.
7. Bažok, R., Igrc Barčić, J. (2010): Pheromone applications in maize pest control. Novascience Publishers, New York: 5-20.
8. Benefer, C.M., Knight, M.E., Ellis, J.S., Hicks, H., Blackshaw, R.P. (2012a): Understanding the relationship between adult and larval *Agriotes* distributions: The effect of sampling method, species identification and abiotic variables. Appl. Soil Ecol., 53: 39-48.
9. Benefer, C.M., van Herk, W.G., Ellis, J.S., Blackshaw, R.P., Vernon, R.S., Knight, M.E. (2012b): The molecular identification and genetic diversity of economically important wireworm species (Coleoptera: Elateridae) in Canada. J. Pest. Sci., 86 (1): 19-27.
10. Benitez, H.A., Puschel, T., Lemić, D., Čačija, M., Kozina, A., Bažok, R. (2014): Ecomorphological Variation of the Wireworm Cephalic Capsule: Studying the Interaction of Environment and Geometric Shape. PLOS ONE, 9(7): e102059.
11. Bohm, H., Koppe, W., Dreyer, W. (2008): Monitoring of click beetles (*Agriotes lineatus* and *A. obscurus*) in organically managed farms in Northern Germany. 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy. 1: 16-20.
12. Borg-Karlson, A.K., Ågren, L., Dobson, H., Bergström, G. (1988): Identification and electroantennographic activity of sex-specific geranyl esters in an abdominal gland

of female *Agriotes obscurus* (L.) and *A. lineatus* (L.) (Coleoptera, Elateridae). Cell. Mol. Life Sci. 44: 531-534.

13. Calder, A.A. (1996): Click Beetles: Genera of the Australian Elateridae (Coleoptera).Monogr. Invertebr. Taxon., 2: 1-402.
14. Cate, P. C. (2007): Family Elateridae. U: Catalogue of Palaearctic Coleoptera (ur. Löbl, I., Smetana, A.). Stenstrup: Apollo Books, 4: 89-207.
15. Chaton, P.F., Lemperiere, G., Tissut, M., Ravanel, P. (2008): Biological traits and feeding capacity of *Agriotes* larvae (Coleoptera : Elateridae): A trial of seed coating to control larval populations with the insecticide fipronil. Pestic. Biochem. Physiol., 90: 97-105.
16. Cocquempot, C., Martinez, M., Courbon, R., Blanchet, A.P.C. (1999): Nouvelles données sur l'identification des larves de taupins (Coleoptera : Elateridae): une aide à la connaissance biologique et à la cartographie des espèces nuisibles. In Proceedings of ANPP - 5ème conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier, France: 477–486.
17. Čačija, M., Kozina, A., Bažok, R., Lemić, D. (2011): Catalogue of the family Elateridae Leach, 1815. Book of Abstracts, 22nd SIEEC - Symposium Internationale Entomofaunisticum Europae Centralis XXII, Varaždin, Croatia.
18. Čačija, M. (2015): Distribucija i dominantnost imaga i ličinki vrsta roda *Agriotes* (Coleoptera: Elateridae) u kontinentalnoj Hrvatskoj. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.
19. Čamprag, D. (1997): Skočibube (Elateridae). Design studio Stanišić, Bačka Palanka i Poljoprivredni fakultet, Institut za zaštitu bilja „Dr. Pavle Vukasović“, Novi Sad.
20. Ćosić, J., Ivezić, M., Štefanić, E., Šamota, D., Kalinović, I., Kozman, D., Liška, A., Ranogajec, LJ. (2008): Najznačajniji štetnici, bolesti i korovi u ratarskoj proizvodnji. Poljoprivredi Fakultet Osijek.
21. Ellis, J. S., Blackshaw, R. P., Parker, W., Hicks, H., Knight, M. E. (2009): Genetic identification of morphologically cryptic agricultural pests. Agricultural and Forest Entomology, 11: 115-121.
22. Emden, F.I. (1945): Larvae of British Beetles-5. Elateridae. Entomol. Mon. Mag. 81: 13-37.

23. Etzler, E.F. (2013): Identification of economic wireworms using traditional and molecular methods. Magistarski rad, Montana State University, Bozeman, Montana.
24. Evans, A.C., Gough, H.C. (2008): Observations on some factors influencing growth in wireworms of the genius *Agriotes* Esch. Ann. Appl. Biol., 29: 168-175.
25. Friedheim, S. (2016): Comparison of Species Identification Methods, DNA Barcoding versus Morphological Taxonomy. Biology 301, 54: 74-86.
26. Furlan, L. (1996): The Biology of *Agriotes ustulatus Schaller* (Col., Elateridae). J. Appl. Entomol., 120: 269-274.
27. Furlan, L. (1998): The Biology of *Agriotes ustulatus Schaller* (Col., Elateridae). II. Larval development, pupation, whole cycle description and practical implications. J. Appl. Entomol., 122: 71-78.
28. Furlan, L. (2004): The biology of *Agriotes sordidus* Illiger (Col., Elateridae). J. Appl. Entomol., 128: 696-706.
29. Furlan, L. (2005): IPM approach targeted against wireworms: what has been done and what has to be done. In Proceedings of IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes" Subgroup "Melolontha", Innsbruck, Austria, 91-100.
30. Furlan, L. (2011): The importance of the identification of *Agriotes* larvae to implement IPM in arable crops. Proceedings of the 13th European Meeting "Biological Control in IPM Systems", Innsbruck, Austria, IOBC/wprs Bulletin, 66: 491-494.
31. Furlan, L. (2014): IPM thresholds for *Agriotes* wireworms species in maize in Southern Europe. J. Pest. Sci., 87: 609-617.
32. Furlan L., Toth, M. (1999): Evaluation of the effectiveness of the new *Agriotes* sex pheromone traps in different European countries. Proceedings of the XX IWGO Conference, Adana, Turkey, 171-175.
33. Furlan, L., Toth, M., Yatsinin, V., Ujvary, I. (2001a): The project to implement IPM strategies against *Agriotes* species in Europe: what has been done and what is still to be done. Proceedings of XXI IWGO Conference, Legnaro Italia, 253-262.

34. Furlan, L., Toth, M. (2007): Management and biological control of wireworm populations in Europe: current possibilities and future perspectives. Integrated Control of Soil Insect Pests, IOBC/WPRS, 30: 11-16.
35. Furlan, L., Bonetto, C., Costa, B., Finotto, A., Lazzeri, L. (2009): Observations on natural mortality factors in wireworm populations and evaluation of management options. In Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes" and COST Action 862 "Bacterial Toxins for Insect Control", Pamplona, Spain, 436-439.
36. Glen, R. (1950): Larvae of the elaterid beetles of the tribe Lepturoidini (Coleoptera: Elateridae). Smithsonian Miscellaneous Collections, 111 (11): 246.
37. Gough, H.C., Evans, A.C. (1942): Some notes on the biology of the click beetles *A. obscurus* L. and *A. sputator* L. Ann. Appl. Biol., 29: 275-279.
38. Hemerik, L., Gort, G., Brussaard, L. (2003): Food preference of wireworms analyzed with multinomial. Logit models. J. Insect Behav., 16: 647-665.
39. Hebert, P., Gregory, T.R. (2005): The Promise Of DNA Barcoding For Taxonomy. Systematic Biol., 54 (5): 852-859.
40. Hillis, D.M. (1987): Molecular versus morphological approaches to systematics. Ann. Rev. Syst., 18: 23-42.
41. Ivezić, M., Raspudić, E., Brmež, M., Pančić, S., Majić, I. (2007): Implementation of pheromone traps in detecting click beetles population level in East Croatia. Cereal Research Communications, 35 (2): 513-516.
42. Jary, S.G. (1942): Wireworms and crop production. Ann. Appl. Biol., 29: 150-155.
43. Jung, J., Racca, P., Schmitt, J., Kleinhenz, B.S.W. (2012): Development of a prediction model for wireworms in relation to soil moisture, temperature and type. J. Appl. Entomol., 138 (3): 183-194.
44. Kaupp, A., Wurst, C. (1997): Familie Elateridae – Nachtra¨ge und Berichtigungen. In: Klausnitzer B, editor. Die Larven der Ka¨fer Mitteleuropas. Jena: Gustav Fischer Verlag: 330–345.
45. Klausnitzer, B. (1994): Familie Elateridae. U: Die Larven der Käfer Mitteleuropas. Band 2, Myxophaga/Polyphaga,Teil 1 (ur. Klausnitzer, B.). Gustav Fischer Verlag, Jena, 118–189.

46. Kovačević, Ž. (1960): Problematika zemljišnih štetnika u istočnoj Slavoniji. Sav. Polj., 7/8: 567-580.
47. Kozina, A., Čačija, M., Igrc Barčić, J., Bažok, R. (2012): Influence of climatic conditions on the distribution, abundance and activity of *Agriotes lineatus* L. adults in sex pheromone traps in Croatia. International Journal of Biometeorology, 57 (4): 509–519.
48. Lawrence, J.F., Newton, A.F. (1995): Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson. Museum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa., 779-1006.
49. Lehmhus, J., Niepold, F. (2015): Identification of *Agriotes* wireworms – Are they always what they appear to be?. Journal fur Kulturpflanzen, 67: 129-138.
50. Löbl, I., Smetana, A. (2007): Catalogue of Palaearctic Coleoptera Vol. 4: Elateroidea, Derodontoidea, Bostrichoidea, Lymexyloidea, Cleroidea and Cucujoidea. Apollo Books, 935.
51. Maceljski, M. (1975): Iskustva i rezultati višegodišnjih ispitivanja suzbijanja žičnjaka u kukuruzu. Agr. Glas., 4: 127-141.
52. Maceljski, M. (2002): Poljoprivredna entomologija. Zrinski, Čakovec.
53. Miles, H.W. (1942): Wireworms and agriculture, with special reference to *Agriotes obscurus* L. Ann. Appl. Biol., 29: 176-180.
54. Ministarstvo poljoprivrede (2017): Popis registriranih sredstava za zaštitu bilja na dan 19.09.2017. https://fis.mps.hr/trazilicaszb/. Pristupljeno 19.09.2017.
55. Oba, Y., Ohira, H., Murase, Y., Moriyama, A., Kumazawa, Y. (2015): DNA Barcoding of Japanese Click Beetles (Coleoptera, Elateridae). PLOS ONE, 10(4): e0124857.
56. Parker, W.E. (1994): Evaluation of the use of food baits for detecting wireworms (*Agriotes* spp., Coleoptera: Elateridae) in fields intended for arable crop production. Crop Prot., 13: 271-276.
57. Parker, W.E. (1996): The development of baiting techniques to detect wireworms (*Agriotes* spp., Coleoptera: Elateridae) in the field and the relationship between bait-trap catches and wireworm damage to potato. Crop Prot., 15: 521-527.

58. Parker, W.E., Howard, J.J. (2001): The biology and management of wireworms (*Agriotes spp*.) on potato with particular reference to the U.K. Agricultural and Forest Entomology, 3: 85-98.
59. Pic, M., Pierre, E., Martinez, M., Genson, G., Rasplus, J.Y., Albert, H. (2008): Les taupins du genre *Agriotes* demasques par leurs empreintes genetiques. In proceedings of AFPP – 8eme conference internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier, France: 9.
60. Radescu, R., Rosca, I. (2010): Contributions to the study of wireworms (fam. Elateridae) population structure and biology from Bucharest and the surrounding area with pheromone traps. Scientific Papers, UASVM Bucharest, Series A, LIII: 412-418.
61. Reddy, G.V.P, Trangtrakulwanich, K. (2014): Potential application of pheromones in monitoring, mating, disruption and control of click beetles (Coleoptera: Elateridae). Hindawi Publishing Corporation, Entomology, 2014: 1-8.
62. Ritter, C., Richter, E. (2013): Control methods and monitoring of *Agriotes* wireworms (Coleoptera: Elateridae). Journal of Plant Diseases and Protection, 120 (1): 4-15.
63. Staudacher, K., Pitterl, P., Furlan, L., Cate, P.C., Traugott, M. (2011a): PCR-based species identification of *Agriotes* larvae., Bulletin of Entomological Research, 101: 201-210.
64. Staudacher, K., Wallinger, C., Schallhart, N., Traugott, M. (2011b): Detecting ingested plant DNA in soil-living insect larvae. Soil. Biol. Biochem., 43: 346-350.
65. Staudacher, K., Schallhart, N., Pitterl, P., Wallinger, C., Brunner, N., Landl, M., Kromp, B., Glauninger, J., Traugott, M. (2013): Occurrence of *Agriotes* wireworms in Austrian agricultural land. J. Pest. Sci., 86: 33-39.
66. Sufyan, M., (2012): Biology, Monitoring and Management of Economically Important Wireworm Species (Coleoptera: Elateridae) in Organic Farming. Doktorska disertacija, Institute Of Organic Agriculture, Pakistan.
67. Sufyan, M., Neuhoff, D., Furlan, L. (2014): Larval development of *Agriotes obscurus* under laboratory and semi-natural conditions. Bulletin of Insectology, 67 (2): 227-235.

68. Thalinger, B., Staudacher, K., Schallhart, N., Wallinger, C., Juen, A., Traugott, M. (2011): Trap crops as a means to manage *Agriotes* larvae in maize. IOBC/WPRS., 66: 473.
69. Toth, Z. (1984): Click Beetles (Elateridae) in the Soils of Central Europe – Their Distribution and Description. Part I. (Gen: *Agriotes*). Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 19(1-2): 13-29.
70. Toth, M., Furlan, L., Yatsynin, V.G., Ujvary, I., Szarukan, I., Imrel, Z., Subchev, M., Tolasch, T., Francke, W. (2002): Identification of seks pheromone composition of black beetle *Agriotes brevis* Candeze. J. Chem. Ecol., 28 (8): 1641-1652.
71. Tóth, M., Furlan, L., Vuts, J., Toshova, T., Subchev, M., Velchev, D.I., Szarukán, I. (2012): Pheromones of click beetles (Coleoptera: Elateridae): sex or aggregation pheromones?. Plant Protection institute, Center of Agriculutural research, Hungary. Research presentation presented at the ESA Meeting, Knoxville TN, USA.
72. Traugott, M., Schallhart, N., Kaufmann, R., Juen, A. (2008): The feeding ecology of Elaterid larvae in Central European arable land: New perspectives based on naturally occurring stable isotopes. Soil. Biol. Biochem., 40: 342-349.
73. Traugott, M., Benefer, C.M., Blackshaw, R.P., van Herk, W.G., Vernon, R.S. (2015): Biology, ecology, and control of elaterid beetles in agricultural land. Annu. Rev. Entomol., 60: 313-334.
74. Vernon, R.S., Kabaluk, T., Behringer, A. (2000): Movement of *Agriotes obscurus* (Coleoptera : Elateridae) in strawberry (Rosaceae) plantings with wheat (Gramineae) as a trap crop. Can. Entomol., 132: 231-241.
75. Waliwitiya, R., Isman, M.B., Vernon, R.S., Riseman, A. (2005): Insecticidal activity of selected monoterpenoids and rosemary oil to *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). J. Econ. Entomol., 98: 1560-1565.
76. Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. (2010): Sex Pheromones and Their Impact on Pest Management. J. Chem. Ecol., 36: 80-100.

ŽIVOTOPIS

Martina Šipek rođena je u Zagrebu, 10.02.1990. godine. Od 2004. Do 2008. godine je pohađala Prirodoslovnu školi Valdimira Preloga u Zagrebu, smijer: Ekološki tehničar. Od 2009. do 2011. godine pohađala je Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij i stekla titulu Prvostupnice inženjerke Agroekologije, te od 2012. do 2014. godine diplomski studij i stekla titulu Magistre inženjerke Agroekologije s najvišim pohvalama. Od 2013. do 2017. godine pohađa diplomski studij Fitomedicine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2013. do 2015. godine radi u „ID Guardian d.o.o“, Zagreb, kao projekt menadžer, a od 2015. do 2017. godine kao operativni direktor, voditelj EU projekata i mentor na stručnom osposobljavanju. Iskusni je korisnik u razumijevanju, govoru i pisanju engleskog jezika (C2 razina) i temeljni korisnik u razumijevanju, govoru i pisanju talijanskog i njemačkog jezika (A1 razina). Digitalno kompetentna i iskusni korisnik mrežnih sistema, vješto barata sa operativnim sustavima Microsoft Office i Apple iOS. Poznaje osnove softwerskih programa: GIS, Adobe Ilustrator, Adobe Photoshop i SAP finance. Visoke poslovne i komunikacijske vještine stekla je kroz višegodišnje radno iskustvo s međunarodnim klijentima i u vođenju timova od 10 i više članova. Komunikacijske i prezenterske vještine stekla je kroz sudjelovanje u različitim poduzetničkim seminarima i konferencijama. Volonter je i UN ambasador dobre volje u poticanju dostupnosti školovanja u izbjegličkim kampovima u Africi, gdje je i sudjelovala u projektu „Instant Classroom“ kao učitelj u ženskim školama izbjegličkog kampa u Keniji.