

**Ivana KRIŽANAC, Maja PINTAR, Mladen ŠIMALA, Adrijana NOVAK**  
 Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Centar za zaštitu bilja, Zagreb  
 ivana.krizanac@hapih.hr

## **DNA BARKODIRANJE KAO ALAT ZA IDENTIFIKACIJU KARANTENSKIH VRSTA KUKACA**

### **SAŽETAK**

Broj prioriternih i reguliranih vrsta štetnika na karantenskim listama Europske unije sve je veći. Specijalisti dijagnostičari, posebice entomolozi, susreću se s novim vrstama, ali i razvojnim stadijima (ličinke ili jaja) za koje je precizna identifikacija na temelju morfoloških obilježja nemoguća. Molekularna dijagnostika pruža potporu u identifikaciji vrsta karantenskih štetnih organizama i drugih invazivnih vrsta. DNA barkodiranje metoda je kojom se organizmi mogu precizno identificirati na temelju slijeda nukleotida (sekvencija) u odabranom genu ili genima. Već duže se koristi kao alat za identifikaciju vrsta više skupina životinja, biljaka i mikroorganizama. Za identifikaciju vrsta kukaca kao standardni „barkod“ najčešće se koristi fragment 5' regije mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (COI). Slijed nukleotida u ciljanom fragmentu DNA (DNA sekvencija) uspoređuje se s DNA sekvencijama iz referentnih baza podataka.

**Ključne riječi:** molekularna dijagnostika, DNA sekvencija, COI, identifikacija vrste, nedestruktivna ekstrakcija DNA, invazivne vrste

### **UVOD**

Pojava mnogih izvaneuropskih vrsta, ponajviše suprotropskih i tropskih, na području EU-a sve je češća zbog intenzivne trgovine biljem i biljnim proizvodima. Zbog klimatskih je promjena udomaćivanje donedavno egzotičnih vrsta sve lakše, a sve veći broj invazivnih vrsta može značajno promijeniti ekosustav. Područje Mediteranskog bazena u ovom je smislu posebno osjetljivo, a zbog globalnog zatopljenja postalo je jedno od svjetskih žarišta biološke invazije (Pyšek i sur., 2020.). Kada je invazivna vrsta ujedno i štetnik na poljoprivrednim kulturama, njezina pojava i udomaćivanje mogu imati i štetan ekonomski učinak na poljoprivredu.

Dijagnostički laboratoriji u kojima se identificiraju vrste organizama štetnih za bilje čine temelj uspješnoga praćenja pojave karantenskih štetnih organizama u Republici Hrvatskoj. Kada gledamo Provedbenu uredbu komisije (EU) 2021/2285, kukci i grinje prednjače po broju karantenskih i drugih reguliranih vrsta. Samo u dijelu A (popisu štetnih organizama koji nisu prisutni na teritoriju Europske unije) navodi se više od 200 vrsta kukaca i grinja. U nekoliko slučajeva

navode se cijele skupine, kao na primjer Cicadomorpha, poznati vektori bakterije *Xylella fastidiosa*, s navedenih 49 vrsta ili porodica Tephritidae sa 75 vrsta. Precizna identifikacija vrste kukca, koja je obvezna u biljnoj karanteni, zahtjeva visoku razinu specijalističkog znanja. Problem koji je sve izraženiji u službenim dijagnostičkim laboratorijama uglavnom je nedostatak entomologa specijalista za pojedine skupine kukaca. Stručnjaka koji se bave određenom skupinom kukaca i mogu identificirati pojedine vrste na temelju morfologije općenito je malo. Uz to, većina njih i ne radi u službenim laboratorijama, već ponajprije u znanstvenim ustanovama (Löbl i sur., 2023.). To su neki od razloga što se u entomologiji sve više i sve češće koriste molekularne metode identifikacije vrsta. Iako je molekularna dijagnostika primarno podrška i potvrda morfološkoj identifikaciji, susrećemo se i s uzorcima razvojnih stadija kukaca koje je zbog morfoloških sličnosti i nepostojanja relevantnih ključeva nemoguće identificirati klasičnom morfološkom identifikacijom.

### KONCEPT, POVIJEST I RAZVOJ DNA BARKODIRANJA

Barkodiranje je razvijeno kao jedinstven, praktičan i pouzdan način identifikacije vrsta nakon nagla razvoja molekularnih metoda u prirodnim znanostima. Pretpostavljalo se da svaka vrsta opisana klasičnim biološkim pristupom ima jedinstven slijed nukleotida u pojedinim dijelovima genoma. Ta jedinstvenost trebala bi činiti pojedinu populaciju „vrstom“. Reprezentativan slijed nukleotida tako je u prenesenu značenju „barkod“, koji se može „očitati“ ako se uspoređi s podacima iz relevantnih baza podataka (Hebert i sur., 2003.).

Ideja o barkodiranju životinjskih vrsta počinje u devedesetim godinama 20. stoljeća. Razvoj metode i cijela studija bili su motivirani istraživanjima dubokomorskih zajednica i otkrićem više od 200 novih vrsta beskralješnjaka. Univerzalne početnice kojima se umnaža fragment od 710 parova baza mitohondrijskog gena za COI (Folmer i sur., 1994.) u nepromijenjenu se obliku koriste i danas. Cilj je svakog taksonomskog sustava točna identifikacija vrsta, a korištenjem COI barkoda uspješnost identifikacije vrsta iz reda Lepidoptera bila je 100 % na uzorku od 200 primjeraka (Hebert i sur., 2003.). Nakon uspješne primjene metode, predložen je naziv DNA barkodiranje za identifikaciju vrsta u životinjskom carstvu korištenjem kratkih fragmenata DNA mitohondrijskog gena za COI. U istom radu predviđeno je korištenje DNA barkodiranja na muzejskim primjercima bez uništavanja vrijednih kolekcija te razvoj COI baze podataka koja će barkodove povezati s taksonomskim i morfološkim podacima za pet do 10 milijuna vrsta unutar 20 godina (Hebert i sur., 2003.).

Jedna od najvećih prepreka u korištenju metode bila je nedostupnost DNA sekvencija u referentnim i javno dostupnim bazama podataka. Kako se metoda sve više koristila, tako su se i baze podataka „punile“ podacima i DNA sekvencijama sve više vrsta organizama. Tu moramo spomenuti Konzorcij za

barkodiranje života (*The Consortium for the Barcode of Life – CBOL*) koji je pokrenut 2004. godine, a posebno iz njega proizišlu organiziranu bazu podataka *BOLD systems* (Ratnasingham i Hebert, 2007) koja objedinjuje molekularne i morfološke podatke te podatke o rasprostranjenosti svake pojedine vrste.

Poslije su predloženi i ciljani geni za korištenje u barkodiranju biljaka (Hollingsworth i sur., 2009.) i gljiva (Schoch i sur., 2012.). Odabrana genska regija, bilo za životinje ili biljke i mikroorganizme, mora imati dovoljno veliku varijabilnost između vrsta (kako bi bila dovoljno specifična za vrstu), a s malom varijabilnosti unutar vrste. Za neke invazivne biljne vrste i mikroorganizme koristi se multigenska analiza jer identifikacija nije moguća korištenjem samo jednog genskog markera (EPPO PM 7/129 (2), 2021).

Velik napredak u validaciji postupaka za barkodiranje karantenskih bakterija i fitoplazmi postignut je u okviru trogodišnjeg FP7 projekta **Quarantine Organisms Barcoding of Life** (QBOL) i nastavljen kroz EUPHRESO II dodavanjem barkodiranja za invazivne biljke. Na europskoj se razini kroz aktivnosti dijagnostičkih panela Europske organizacije za zaštitu bilja (European Plant Protection Organisation, EPPO), europskih (EURL) i nacionalnih referentnih laboratorija (NRL) razvija, testira i validira sve više molekularnih metoda, uključujući barkodiranje, u dijagnostici karantenskih štetnih organizama.

DNA barkodiranje kukaca se tako, 30 godina nakon originalno objavljena znanstvenog rada (Folmer i sur., 1994.) i 20 godina nakon opsežne studije i prijedloga imena metode (Hebert i sur., 2003.), mijenja iz istraživačke metode koja se koristi u velikim projektima u rutinsku dijagnostičku metodu. U dijagnostičkom protokolu EPPO PM 7/129 (2) (2021) opisani su protokoli koji se koriste za identifikaciju karantenskih člankonožaca, bakterija, fitoplazmi, gljivica, nematoda i invazivnih biljaka u radu dijagnostičkih laboratorija.

## PRIMJENA, PREDNOSTI I NEDOSTATCI

Osnovni je princip metode od začetaka ostao isti: ekstrakcija DNA -> PCR -> sekvenciranje -> uređivanje i sklapanje sekvencije DNA -> pretraživanje referentnih baza podataka (EPPO PM 7/129 (2), 2021). Usprkos tome što se metoda nije u osnovi mijenjala, mnogo je (malih i velikih) promjena pridonijelo većoj pouzdanosti rezultata. DNA barkodiranje za kukce najčešće se koristi za potvrdu morfološke identifikacije pri prvom nalazu karantenske vrste u Hrvatskoj i/ili Europi te za identifikaciju preimaginalnih razvojnih stadija. Na primjer, morfološka identifikacija vrste *Bactrocera zonata* (Saunders, 1842) moguća je tek u posljednjem, 3. razvojnom stadiju ličinke (EPPO PM 7/114 (2), 2023). Laboratorij za molekularnu biologiju i Laboratorij za zoologiju Centra za zaštitu bilja u protekle su tri godine optimizirali nekoliko metoda

nedestruktivne ekstrakcije DNA iz uzoraka kukaca. Za vrste koje nalazimo u malom broju ili u potencijalno miješanim populacijama različitih vrsta ova je metoda ekstrakcije DNA posebno korisna jer nam omogućuje da istu jedinku koristimo i za molekularnu i za morfološku identifikaciju vrste. Osim toga, bilo je potrebno i uskladiti zahtjeve za način prikupljanja, čuvanja i pohrane uzoraka kako bi oni svojom kvalitetom bili prikladni za različite metode identifikacije u oba laboratorija. Obvezno korištenje „proofreading“ polimeraze u PCR reakciji smanjuje mogućnost pogrešaka pri umnažanju ciljanog fragmenta DNA. Nakon što se dobivene sekvencije uredi i sklopi konsenzus sekvencija, provjerava se njezina kvaliteta kako bi se zadovoljili minimalni kriteriji za prihvatljivost (*Phred Quality Score*  $\geq 40$ ) i dijagnostičku valjanost identifikacije vrste. Organizam se identificira pronalaženjem najbliže sekvencije u bazama podataka, a najviše koristimo BOLD IDS i NCBI GenBank. Kod tumačenja rezultata uzimaju se u obzir rezultati dobiveni u obje baze podataka. Pritom je bitno razmotriti i razlike u pouzdanosti baza podataka. Prednost je NCBI GenBank baze puno veći broj pohranjenih sekvencija i veća vjerojatnost za pronalazak sekvencije rijetkih i egzotičnih vrsta, ali su one istodobno manje kvalitetne od onih u BOLD IDS. BOLD IDS organizirana je baza podataka koja za kukce objedinjava sekvenciju DNA s podacima o morfologiji i rasprostranjenosti vrste te fotografijama muzejskih primjeraka. Time se povećava pouzdanost dobivenih rezultata. Još jedna baza podataka, EPPO Q-Bank, također je na raspolaganju za korištenje. U usporedbi s BOLD IDS i NCBI GenBank, broj sekvencija u EPPO Q-Bank značajno je manji i većim dijelom ograničen na karantenske štetne organizme, ali su podatci o sekvencijama potpuni i višestruko provjereni (EPPO PM 7/129 (2), 2021).

## ZAKLJUČCI

Zbog brzog dobivanja rezultata za velik broj uzoraka, DNA barkodiranje sve se više koristi u dijagnostičkim laboratorijima. Molekularne metode važne su za istraživanja filogenetičkih odnosa, filogeografije, polimorfnih vrsta, identifikaciju kriptičnih vrsta i kompleksa vrsta (kao npr. *Bactrocera dorsalis*) te za identifikaciju preimaginalnih stadija. Löbl i suradnici (2023.) stoga su zaključili da bi nove tehnologije ipak trebale biti sredstvo za stjecanje znanja, a ne sam cilj. Najbolje rezultate možemo postići kada se molekularne metode i morfološka identifikacija vrsta međusobno nadopunjuju.

## DNA BARCODING AS A TOOL FOR IDENTIFICATION OF QUARANTENE INSECT SPECIES

### SUMMARY

DNA barcoding has been used for many years as a tool for species identification of several groups of animals, plants and microorganisms. For the

identification of insect species, a fragment of the 5' region of the mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome c oxidase (COI) is most often used as a standard "barcode". The sequence of the target DNA fragment (DNA sequence) is compared with DNA sequences from reference databases. The number of priority and regulated pest species on the quarantine lists of the European Union is increasing. Diagnostic specialists, especially entomologists, encounter new species for the first time, as well as developmental stages (larvae or eggs) for which precise identification based on morphological characteristics is impossible. Molecular diagnostics provides support in the identification of species of quarantine harmful organisms and other invasive species.

**Key words:** molecular diagnostics, DNA sequence, COI, species identification, non-destructive DNA extraction, invasive species

## LITERATURA

**EPPO PM 7/114 (2) *Bactrocera zonata*** (2023.). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 53, 493-504.

**EPPO PM 7/129 (2) DNA barcoding as an identification tool for a number of regulated pests** (2021). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 51 (1), 100–143.

**Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.** (1994.). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

**Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R.** (2003.). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.

**Hollingsworth, P. M., Forrest, L., Spouge, J., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., CBOL Plant Working Group** (2009.). A DNA barcode for land plants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences of the United States of America*, 106 (31), 12794-12797.

**Löbl, I., Klausnitzer, B., Hartmann, M., Krell, F. T.** (2023.). The Silent Extinction of Species and Taxonomists—An Appeal to Science Policymakers and Legislators. *Diversity*, 15, 1053. <https://doi.org/10.3390/d15101053>

**Pyšek, P., Hulme, P.E., Simberloff, D., Bacher, S., Blackburn, T.M., Carlton, J.T., Dawson, W., Essl, F., Foxcroft, L.C., Genovesi, P., Jeschke, J.M., Kühn, I., Liebhold, A.M., Mandrak, N.E., Meyerson, L.A., Pauchard, A., Pergl, J., Roy, H.E., Seebens, H., van Kleunen, M., Vilà, M., Wingfield, M.J., Richardson, D.M.** (2020.). Scientists' warning on invasive alien species. *Biological Reviews*, 95, 1511–1534.

**Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N.** (2007.). BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364.

**Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Fungal Barcoding Consortium** (2012.). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (16), 6241–6246.

**Službeni list Europske unije** (2021.). PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/2285 od 14. prosinca 2021. o izmjeni Provedbene uredbe (EU) 2019/2072 u

pogledu uvrštavanja na popis štetnih organizama, zabrana i zahtjeva za unos bilja, biljnih proizvoda i drugih predmeta u Uniju i njihovo premještanje unutar Unije te o stavljanju izvan snage odluka 98/109/EZ i 2002/757/EZ i provedbenih uredbi (EU) 2020/885 i (EU) 2020/1292; [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2021/2285/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/2285/oj) (pristupljeno 22. 5. 2024.)

**stručni rad**