

Metode utvrđivanja rezistentnosti u entomološkim znanostima

Štvičić, Anita; Pajač Živković, Ivana; Lemić, Darija

Source / Izvornik: **Fragmenta phytomedica, 2020, 34, 27 - 38**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:227466>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



**METODE UTVRĐIVANJA REZISTENTNOSTI U ENTOMOLOŠKIM
ZNANOSTIMA**Anita ŠTIVIČIĆ¹, Ivana PAJAČ ŽIVKOVIĆ², Darija LEMIĆ²¹Volim ljuto.com, Gajeva 37, 10297 Igrišće²Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za poljoprivrednu zoologiju,
Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb
dlemic@agr.hr

Prihvaćeno: 10-11-2020

SAŽETAK

Ponovni neuspjeh tretiranja ili sposobnost kukaca da prežive primjenu insekticida najčešće je posljedica razvoja rezistentnosti štetnih kukaca na insekticide. Danas je pojava rezistentnosti kukaca zabilježena u gotovo cijelom svijetu, a prvi put je ustanovljena 1947. godine u kućne muhe na pripravak DDT. Najnovija istraživanja govore o 1000 različitih vrsta kukaca koji su razvili rezistentnost na jedan ili više insekticida. Jedino rana detekcija rezistentnosti omogućuje uspješnu provedbu antirezistentnih strategija. Metode kojima se utvrđuje rezistentnost kukaca na insekticide općenito se mogu podijeliti u četiri skupine: biološke, biokemijske, imunološke te molekularne. Cilj je ovoga rada bio opisati svaku od navedenih metoda te istaknuti njihove prednosti i/ili nedostatke za primjenu u poljoprivredi. Biološke se metode najčešće koriste u praksi, najjednostavnije su i najjeftinije za provedbu te daju detaljniji uvid u mehanizam nastanka rezistentnosti. Glavni je nedostatak što zahtijevaju žive jedinke za ispitivanje. Biološke su metode zbog toga radno intenzivne, mogu oduzeti puno vremena za provedbu i zahtijevati veliki istraživački prostor. Prednost je biokemijskih metoda što zahtijevaju opremu osnovnih laboratorija. Međutim moraju se provoditi na živom materijalu pod umjetnim ili kontroliranim uvjetima što ponekad može utjecati na aktivnost enzima u usporedbi s uvjetima na terenu. Imunološke metode temelje se na antitijelima koja su napravljena za velike biokemijske molekule odgovorne za razvoj rezistentnosti kukca na određeni insekticid. Imunološke su metode jednostavne za upotrebu, međutim zbog specifičnosti antitijela vrlo se rijetko koriste u utvrđivanju rezistentnosti na većim područjima. Molekularne metode istraživanja rezistentnosti temelje se na genotipizaciji mutacija karakterističnih kod određenog tipa rezistentnosti. Omogućuju otkrivanje rezistentnih genotipova u populaciji dovoljno rano što omogućava daljnje praćenje i

uvođenje antirezistentnih programa. Međutim podrazumijevaju detaljne analitičke procedure koje zahtijevaju skupu opremu i osoblje s visokim tehničkim vještinama za izvođenje ispitivanja.

Ključne riječi: insekticidi, kukci, metode, rezistentnost

METHODS FOR DETERMINING RESISTANCE IN ENTOMOLOGICAL SCIENCES

SUMMARY

Repeated failure in pest control or the ability of insects to survive insecticide application is most often due to the development of pest resistance to insecticides. Today, the occurrence of insect resistance is known almost everywhere in the world. The first evidence of resistance was in 1947, the resistance of the housefly to DDT. The latest research shows 1000 different insect species that have developed resistance to one or more insecticides. Only the early detection of resistance enables the successful implementation of anti-resistance strategies. The methods used to determine insect resistance to insecticides can generally be divided into four groups: biological, biochemical, immunological and molecular. The aim of this paper was to describe each of these methods and to show their advantages and/or disadvantages for use in agriculture. In practice, biological methods are the most common, simplest and cheapest to implement, while others require more expensive laboratory equipment and qualified personnel, but also provide a more detailed insight into the mechanism of resistance. The main disadvantage is that they require live specimens for testing. Biological methods are therefore labor intensive, can be time consuming to implement and require a large research space. The advantage of biochemical methods is that they require the equipment of basic laboratories. However, they must be performed on living material under artificial or controlled conditions which can sometimes affect enzyme activity compared to field conditions. Immunological methods are based on antibodies made for large biochemical molecules responsible for the development of insect resistance to a particular insecticide. Immunological methods are easy to use however due to the specificity of the antibody they are very rarely used in the determination of resistance in larger areas. Molecular methods of resistance research are based on the genotyping of mutations characteristic of a particular type of resistance. They enable the detection of resistant genotypes in the population early enough, which allows further monitoring and introduction of anti-resistant programs. However, they involve detailed analytical procedures that require expensive equipment and staff with high technical skills to perform the tests.

Key words: insecticides, insects, methods, resistance

UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) rezistentnost se definira kao sposobnost kukca da preživi djelovanje insekticida tako da postane otporan na njegove otrovne učinke prirodnim odabirom i mutacijama (Davidson, 1957). Znanstvenici Odbora za utvrđivanje rezistentnosti na insekticide (Insecticide Resistance Action Committee - IRAC) rezistentnost definiraju kao nasljednu promjenu osjetljivosti populacija štetnika koja se ogleda u ponovnom neuspjehu primijenjenog insekticida da postigne očekivanu razinu učinkovitosti kada se koristi u skladu s preporukama. Rezistentnost se može definirati kao nasljedna sposobnost toleriranja doze insekticida koja bi bila smrtonosna za većinu jedinki u određenoj populaciji iste vrste. Rezistentnost kukaca na insekticide vidi se kada populacija kukaca prestane reagirati ili ne reagira jednako na primijenjene insekticide (Javed i Agurla, 2017). Bez obzira na točnu definiciju, u praksi su potrebni odgovarajući alati (biološki, biokemijski i/ili molekularni) kako bi se prepoznao ključni mehanizam koji uzrokuje rezistentnost i kako bi se provodio nadzor na razini jedinke ili rezistentne populacije (WHO, 2012).

Rezistentnost kukaca na insekticide svaki dan postaje sve veći problem u poljoprivredi. U većine kukaca javlja se problem rezistentnosti na gotovo sve glavne skupine insekticida. Prvi slučaj rezistentnosti kukaca zabilježen je 1947. na DDT. Callaghan (1991) navodi kako je na insekticide u svijetu otporno najmanje 447 vrsta člankonožaca. Trinaest godina kasnije Miller (2004) navodi da je ta brojka dosegla 1000 rezistentnih vrsta. Četrdesetih godina prošlog stoljeća, poljoprivrednici u SAD-u izgubili su 7 % svojih usjeva zbog rezistentnih kukaca, dok se taj postotak 1980. godine povećao na 13 % (Javed i Agurla, 2017). Danas su, zbog razvijene rezistentnosti, štetnici velika prijetnja i ljudskom zdravlju što potvrđuje činjenica da su komarci prenositelji malarije rezistentni na gotovo sve insekticide koji se koriste za njihovo suzbijanje.

Uvođenjem svake nove grupe insekticida prvi slučajevi rezistentnosti pojavljuju se unutar 20 godina od prvih primjena. Rezistentnost kukaca na insekticide ključni je čimbenik koji se treba uzeti u obzir pri razvijanju strategija suzbijanja štetnika. Da bi se to postiglo potrebno je pratiti pojavu i razvoj rezistentnosti štetnika na poljoprivrednim, šumskim i nepoljoprivrednim staništima. Radi praćenja (monitoringa) i utvrđivanja rezistentnosti razvijene su različite metode kojima se može dijagnosticirati rezistentnost. Cilj je ovoga rada bio opisati postojeće metode utvrđivanja rezistentnosti te istaknuti njihove prednosti i/ili nedostatke za primjenu u poljoprivredi.

METODE UTVRĐIVANJA REZISTENTNOSTI

Corbel i N'Guessan (2013) navode kako se metode za utvrđivanje rezistentnosti općenito mogu podijeliti u četiri skupine, a to su:

1. biološke metode (biotestovi)
2. biokemijske metode
3. imunološke metode
4. molekularne metode

1. Biološke metode - biotestovi

Najčešća metoda otkrivanja rezistentnosti trenutno je zasnovana na biološkim metodama. Biološke metode dizajnirane su tako da otkriju razlike u fenotipskom odgovoru na jednu ili više molekula pesticida. Živi klonovi štetnika (štetnici koji se reproduciraju aseksualno) ili prirodne populacije štetnika izlažu se djelatnoj tvari insekticida koja je cilj istraživanja, a učinkovitost se uspoređuje s posljedicama izlaganja istoj djelatnoj tvari sigurno osjetljive populacije. Najčešći su čimbenici koju se istražuju smrtnost, preživljavanje/oporavak i daljnji rast. Kada se osmišljavaju biološka istraživanja, osjetljive se populacije moraju pažljivo izabrati kako bi točno prikazale raznolikosti u osjetljivosti. Uvijek je dobro prikupiti i upotrijebiti nekoliko osjetljivih referentnih populacija s nekoliko različitih lokacija ili umjetno uzgojenu osjetljivu populaciju u laboratoriju (Kranthi, 2005; Burgos, 2015; Ishii i Hollomon, 2015). Biološke metode podrazumijevaju standardiziranu primjenu istraživane djelatne tvari uzimajući u obzir svojstva insekticida (npr. način primjene, ciljani razvojni stadij, način prodora u štetnika, očekivane reakcije na biologiju štetnika...) i biološke karakteristike štetnika (npr. tretiranje svih genotipova vrste u odgovarajućem razvojnem stadiju). Za ispravno tumačenje rezultata nužno je poznavanje čimbenika koji određuju statističku analizu (veličina uzorka, repeticije, broj doza itd.).

Uporaba biotestova u istraživanju rezistentnosti

Biotestovima možemo otkriti razinu rezistentnosti istraživanih populacija. Pojam razina rezistentnosti (eng. resistance level-RL ili resistance ratio-RR) govori nam koliki je omjer koncentracije pesticida potreban da bi se postigla jednaka učinkovitost protiv rezistentnih populacija i referentnih osjetljivih populacija. Razina rezistentnosti istraživanih populacija određuje se nakon analize krivulja koje pokazuju učinak pojedinih insekticida kod primjene različitih doza (tzv. dose-response krivulja) na istraživane i referentne populacije štetnika. Razina rezistentnosti određuje se na temelju vrijednosti učinkovitih koncentracija ili minimalnih vrijednosti inhibitorskih koncentracija (IC) (Sebaugh, 2011). Informacije na kraju biotesta mogu se upotrijebiti za razlikovanje rezistentnih od osjetljivih genotipova, za potvrđivanje početka pojave rezistentnosti, mogu procijeniti stanje rezistentnosti u polju i/ili

usporediti jačinu rezistentnosti među genotipovima. Biotestovi se mogu upotrijebiti za uvid u prirodu mehanizma nastanka rezistentnosti te se mogu razlikovati posebno rezistentnost uzrokovana genetskim modifikacijama koje utječu na ciljano mjesto insekticida (target site resistance: TSR) i rezistentnost uzrokovana mehanizmima koji ne utječu na ciljano mjesto insekticida (non-target site resistance: NTSR) kao što je pojačani metabolizam štetnika, smanjenje prodiranja insekticida u štetnika i slično. Te se razlike mogu temeljiti na opažanjima iz kombiniranih učinaka pesticida (sinergizam, antagonizam) i drugih molekula (npr. drugih pesticida i slično) (Burgos, 2015).

Glavna je prednost biotestova njihova jednostavnost. Uglavnom zahtijevaju osnovnu i jeftinu opremu i potrošni materijal. Biotestovi se mogu upotrijebiti za otkrivanje rezistentnosti bez obzira na mehanizam nastanka iste. Različiti insekticidi uspješno se mogu uspoređivati, posebno kod vrsta štetnika koji imaju aseksualnu reprodukciju. Glavni je nedostatak biotestova taj što zahtijevaju žive jedinke za ispitivanje. To zahtijeva rast ili razmnožavanje štetnika i njihov uzgoj sve do početka istraživanja. Biotestovi su zbog toga radno intenzivni, mogu oduzeti puno vremena za provedbu i zahtijevati veliki istraživački prostor. Biotestovi mogu biti zahtjevni za postavljanje, posebno zbog izbora ključne diskriminirajuće doze (doza pesticida koja pri kontroliranim uvjetima potpuno uništava ili zaustavlja rast svih genotipova za koje se smatra da su osjetljivi). Sve jedinke koje prežive i nastave rast nakon primjene diskriminirajuće doze smatraju se rezistentnima. Biološke su metode često specifične za jednu vrstu štetnika u obliku opreme, dizajna, procedure izlaganja insekticidu, kriterija ocjenjivanja, vremena trajanja i analize podataka (Sebaugh, 2011; Burgos, 2015).

2. Biokemijske metode

Većina pesticida djeluje na načelu vezanja i inaktiviranja proteina koji su od životne važnosti za štetnike. Njihova učinkovitost ovisi o broju molekula pesticida koji dosežu mjesto vezanja. Biokemijske se metode često upotrebljavaju za karakterizaciju mehanizama nastanka rezistentnosti (Debieu i sur., 2013), ali mogu biti korisne i za otkrivanje rezistentnosti u situacijama kada su već objašnjeni mehanizmi njihovog nastanka (Siegwart i sur., 2011; Délye i sur., 2013). Biokemijske metode također otkrivaju je li do rezistentnosti došlo na ciljanom mjestu djelovanja (TSR) ili je došlo do metaboličkog razvoja rezistentnosti izvan ciljanog mjesta djelovanja pesticida (NTSR).

Razvoj rezistentnosti na ciljanom mjestu djelovanja (TSR) može rezultirati strukturnim promjenama ciljanog mjesta djelovanja insekticida koje u konačnici smanjuju afinitet za vezivanje insekticida. Rezistentnost može biti dijagnosticirana u *in vitro* ili *in vivo* istraživanjima pomoću više inhibicijske koncentracije (IC_{50} , srednja inhibicijska koncentracija: koncentracija insekticida koja sprječava 50 % aktivnosti ciljanog enzima) ciljanog enzima u prisutnosti insekticida u rezistentnim jedinkama (genotipovima) u odnosu na osjetljive

jedinke (Srigiriraju i sur., 2010a; Srigiriraju i sur., 2010b; Laleve i sur., 2014; Dayan i sur., 2015). Ako je došlo do razvoja rezistentnosti izvan mjesta djelovanja (NTRS), zbog prekomjerne ekspresije određenog gena doći će do povećanja enzimatske aktivnosti (Kwon i sur., 2014). Ovakav uzrok rezistentnosti razlikuje se od strukturalnih promjena kod TSR te se jednostavno određuje mjerenjem aktivnosti enzima (Zayed i sur., 2006; Lorentz i sur., 2014; Lee i sur., 2015).

Analize metaboličkih enzima

Neutralizacija insekticida pomoću enzima koji sudjeluju u metabolizmu široko je rasprostranjena i često se događa kod člankonožaca (Siegwart i sur., 2015). Glavne skupine enzima koje su uključene u katabolizam i/ili sekvestraciju insekticida jesu citokrom P450 ovisan o oksidazi, glutation-s-transferaza, glikoziltransferaze i karboksilesterase (Kranthi, 2005; Li i sur., 2007; Syed i Yadav, 2012; Délye, 2013). U rezistentnim genotipovima kod razgradnje insekticida enzimi su prenamnoženi u rezistentnoj jedinki (Puinean i sur., 2010) ili su modificirani, što rezultira učinkovitijom razgradnjom insekticida kao rezultat povećanja specifičnih aktivnosti (Cui i sur., 2015). Analize temeljene na kolorimetriji ili flurimetriji mogu se upotrebljavati za otkrivanje varijacija u aktivnosti enzima koji razgrađuju insekticide pomoću specifičnih supstrata (Reyes i sur., 2012). Također se ELISA tehnika može koristiti ako su komercijalno dostupna odgovarajuća antitijela (Devonshire i sur., 1992; Reade i Cobb, 2002; Nauen i sur., 2015). Međutim ako enzimatski testovi nisu relevantni ili nisu tehnički izvedivi, mogu se provesti i druga ispitivanja. Najčešća tehnika u tom slučaju uključuje radioaktivno obilježavanje insekticida za *in vivo* praćenje penetracije insekticida, njegovu translokaciju, izlučivanje (Hayashi i sur., 2001; Omrane i sur., 2015), degradaciju preko metabolita za detekciju insekticida (Ma i sur., 2013; Nauen i sur., 2015) ili vezanje (Collavo i sur., 2013; Laleve i sur., 2014). Takvi testovi zahtijevaju pristup radioaktivno obilježenim insekticidima i skupu laboratorijsku opremu (LC-MS: tekućinska kromatografija – masena spektrometrija, HPLC-MS: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti- masena spektrometrija), stoga se rijetko koriste u praćenju rezistentnosti (Collavo i sur., 2013).

Prednost je većine biokemijskih metoda ta što zahtijevaju opremu osnovnih laboratorija. Biokemijske metode imaju nekoliko zajedničkih točaka s biološkim metodama – rezultati moraju biti usporedivi s osjetljivim referencama i iste se trebaju pomno i pažljivo odabrati. Treba se definirati granična vrijednost za određenu aktivnost ili IC_{50} insekticida kako bi se mogli razlikovati osjetljivi od rezistentnih organizama. Biokemijska istraživanja moraju se obaviti na živom materijalu pod umjetnim ili kontroliranim uvjetima što nekad može utjecati na aktivnost enzima u usporedbi s uvjetima na terenu (Xie i sur., 2011; Dermauw i sur., 2013).

3. Imunološke metode

Imunološke metode općenito se temelje na antitijelima koja su napravljena za velike biokemijske molekule koje su odgovorne za razvoj rezistentnosti kukca na određeni insekticid. Ove metode često koriste ili ELISA test ili dip-stick format za otkrivanje učestalosti rezistentnih kukaca u populaciji na polju. Imunološke metode dostupne su samo za utvrđivanje specifično povišenih esteraza i to u laboratorijima koji imaju pristup antiserumu. Jedan od antiseruma razvijen je protiv E4 karboksilaze u zelenoj breskvinolj lisnoj uši. Pročišćena 1 gG frakcija iz antiseruma koristi se za utvrđivanje razlika između više rezistentnih populacija zelene breskvine uši (Devonshire i sur., 1986). Osjetljivost je ove metode vrlo visoka jer se njome mogu ustanoviti jasne razlike između rezistentnih fenotipova (Devonshire i sur., 1992).

Osim za zelenu breskvinu lisnu uš razvijena su dva imunokromatografska seta testova (u obliku trakica) za otkrivanje rezistentnosti žutih kukuruznih sojica na djelatne tvari iz skupina karbamata i organofosfornih insekticida (Kranthi, 2005). Testovi se temelje na polikonskim antiserumima napravljenim za utvrđivanje rezistentnosti koja je povezana s esterazama. Kako bi se uspješno utvrdila rezistentnost na određenom području od npr. 20 km², potrebno je testirati 20 -40 jedinka pomoću opisanih trakica za utvrđivanje rezistentnosti. Trakice su određenih dimenzija i sadrže sklop nitroceluloznih membrana na plastičnoj podlozi. Sadrže i malene filtarske jastučice koji omogućavaju uvlačenje insekticida kapilarnim tokom. Rezultati testa gotovi su za 10 minuta (Kranthi, 2005). Ova je metoda jednostavna za upotrebu, međutim zbog specifičnosti esteraza i antiseruma vrlo se malo koristi u monitoringu rezistentnosti na većim područjima.

4. Molekularne metode

Molekularnim se metodama istražuju deoksiribonukleinska (DNK) i ribonukleinska kiselina (RNK) i otkrivaju geni ili mutacije koje su povezane s rezistentnošću. Polazni je materijal živo ili mrtvo tkivo, iz jednoga ili skupnih genotipova (npr. populacije). Za molekularna istraživanja mora se ekstrahirati dovoljna količina DNK-a ili RNK-a. Molekularni se testovi mogu klasificirati u dvije skupine koje se temelje na prirodi tehnologije koja se koristi. Prva skupina jesu robusne (rugged) analize pri kojima se koristi jednostavna oprema i tehnika za otkrivanje svega nekoliko mutacija u limitiranom broju uzoraka, a potencijalno su pogodne za uporabu u polju. Druga kategorija molekularnih istraživanja je ona u kojoj se koristi oprema visoke tehnologije (hi-tech) za istraživanje rezistentnosti. Uporaba specijalizirane visoke tehnologije i opreme ima potencijal za mogućnosti istodobnog otkrivanja višestruke rezistentnosti nastale mutacijama u velikim uzorcima. Međutim ovakvi se testovi još uvijek ne koriste dovoljno za utvrđivanja rezistentnosti štetnika na insekticide (Barrès i sur., 2016).

Genotipiziranje

Mnoga molekularna istraživanja rezistentnosti temelje se na genotipizaciji mutacija karakterističnih kod određenog razvoja rezistentnosti. Robusni se testovi koriste za genotipizaciju nakon umnožavanja DNK-a. Umnožavanje DNK-a temelji se na PCR-u, zahtijeva osnovnu opremu za molekularnu biologiju i može se provesti na izravno izoliranom DNK-u (Délye i sur., 2016).

Hi-tech genotipski testovi vrlo su precizni, ali uključuju detaljne analitičke metode za koje je potrebna skupa oprema i osoblje s visokim tehničkim vještinama za izvođenje ispitivanja. Općenito pružaju najtočnije informacije i koriste se osim za otkrivanje i za kvantificiranje mutacija u genomu štetnika (Bass i sur., 2007). Glavna je prednost takvih kvantitativnih molekularnih testova za istraživanje rezistentnosti u odnosu na druga ispitivanja da imaju vrlo nizak prag detekcije (Black i Vontas, 2007). Hi-tech testovi omogućuju otkrivanje rezistentnih genotipova u populaciji dovoljno rano što omogućava daljnje praćenje i uvođenje antirezistentnih programa (Délye i sur., 2013; Walker i sur., 2013; Siegwart i sur., 2015). Robusni testovi ostaju kao alternativa ako se analizira samo nekoliko uzoraka ili je nedostupna uporaba specifične hi-tech opreme (Barrès i sur., 2016).

Sekvenciranje

Sekvenciranjem se obuhvaća cijeli spektar nukleotidnih varijacija iz područja interesa istraživanja i omogućuje otkrivanje i identifikaciju svih mutacija na ključnim mjestima za osjetljivost insekticida (i pesticida općenito). Tehnologija *next generation sequencing* (NSG) otvorila je nove mogućnosti za točno otkrivanje i kvantifikaciju mutacija koje su odgovorne za rezistentnost štetnika na pesticide (Wride i sur., 2014) i omogućuje sekvenciranje jednog ili više dijelova DNK-a/RNK-a nastalih u procesu umnožavanja. U jednom NSG ciklusu može se analizirati nekoliko serija genotipova (Délye i sur., 2016). NSG analiza isplativa je samo u velikim istraživanjima s velikim brojem uzoraka (Barrès i sur., 2016).

ZAKLJUČAK

Redovito praćenje rezistentnosti kukaca nužno je da bi se proaktivno reagiralo u njihovom suzbijanju. Ako se na vrijeme ne detektira, rezistentna populacija s vremenom može postati dominantna i fiksna na određenom području. Kako je intenzivna poljoprivreda ovisna o zaštiti bilja temeljenoj na pesticidima, rano otkrivanje razvoja rezistentnosti ključ je za održavanje učinkovitosti kemijskih pripravaka posebno u trenutnom globalnom programu smanjenja uporabe zaštitnih sredstava. Stoga je potrebno češće provoditi praćenje učinkovitosti insekticida (pesticida općenito) te time postići rano otkrivanje rezistentnosti na pojedine djelatne tvari. Odabir metode utvrđivanja rezistentnosti najčešće ovisi o financijskim mogućnostima te institucijskoj

opremi. Biološke metode najčešće se koriste u praksi, najjednostavnije su te najjeftinije za provedbu, dok sve ostale metode iziskuju skuplju laboratorijsku opremu i za to kvalificirane djelatnike. Međutim dok biološke metode daju osnovni odgovor o pojavi rezistentnosti, biokemijske, imunološke, a posebice molekularne metode daju detaljniji uvid u sam mehanizam nastanka rezistentnosti na razini stanice/molekule/gena što je od ključne važnosti u razumijevanju rezistentnosti i odabiru pravilne i učinkovite antirezistentne strategije.

LITERATURA

BASS, C., NIKOU, D., BONNELLY, M. J., WILLIAMSON, M. S., RANSON, H., BALL, A., VONTAS, J., FIELD, L. M. (2007). Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high throughput assays with existing methods. *Malaria Journal*, 6: 111.

BARRÈS, B., MARIE-FRANCE, C.C., DEBIEU, D., DÉLYE, C. (2016). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, 21(10): 834-853

BLACK, W. C. T., VONTAS, J. G. (2007). Affordable assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in insects. *Insect Mol. Biol.*, 16: 377–387.

BURGOS, N. R. (2015). Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. *Weed Sci.*, 63: 152–165.

CALLAGHAN, A. (1991). Mechanisms and detection of insecticide resistance: a review. *Science Progress*, 75: 423-438.

COLLAVO, A., STREK, H., BEFFA, R., SATTIN, M. (2013). Management of an ACCase-inhibitor-resistant *Lolium rigidum* population based on the use of ALS inhibitors: weed population evolution observed over a 7-year field-scale investigation. *Pest Manag. Sci.*, 69: 200–208.

CORBEL, V., N'GUESSAN, R. (2013). Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review. Dostupno na: <<http://dx.doi.org/10.5772/56117>>. Pristupljeno: 22.05.2020.

CUI, F., LI, M. X., CHANG, H. J., MAO, Y. M., ZHANG, H. Y., U, L. X., YAN, S. G., LANG, M. L., LUI, L., QIAO, C. L. (2015). Carboxylesterase-mediated insecticide resistance: quantitative increase induces broader metabolic resistance than qualitative change. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 121: 88–96.

DAVIDSON, G. (1957). Insecticide resistance in *Anopheles sudaicus*. *Nature*, 180(4598): 1333-1335.

DAYAN, F. E., OWENS, D. K., WATSON, S. B., ASOLKAR, R. N., BODDY, L. G. (2015). Sarmentine, a natural herbicide from *Piper* species with multiple herbicide mechanisms of action. *Front Plant Sci.*, 6: 222.

DEBIEU, D., BACH, J., MONTESINOS, E., FILLINGER, S., LEOUX, P. (2013). Role of sterol 3-ketoreductase sensitivity in susceptibility to the fungicide fenhexamid in *Botrytis cinerea* and other phytopathogenic fungi. *Pest Manag. Sci.*, 69: 642–651.

DÉLYE, C. (2013). Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manag. Sci.*, 69: 176–187.

DÉLYE, C. JASIENIUK, M., LE CORRE, C. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet.*, 29: 649–658.

DÉLYE, C., CAUSSE, R., MICHEL, S. (2016). Genetic basis, evolutionary origin and spread of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Pest Manag. Sci.*, 72: 89–102.

DERMAUW, W., WYBOUW, N., ROMBAUTS, S., MENTEN, B., VONTAS, J., GRBIĆ, M., CLARK, R.M., FEYEREISEN, R., VAN LEEUWEN, T. (2013). A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110: E113–E122.

DEVONSHIRE, A. L., MOORES, G. D., FFRENCH-CONSTANT R. H. (1986). Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon numuli* (Schrank) (Homoptera: Aphidae). *Bull. Ent. Res.*, 76: 97–107.

DEVONSHIRE, A. L., DEVINE, G. J., MOORES G. D. (1992). Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphidae). *Bull. Ent. Res.*, 82: 459–464.

HAYASHI, K., SCHOONBEEK, H. J., SUGIURA, H., DE WAARD, M. A. (2001). Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decreased accumulation of the azole fungicide oxpoconazole and increased transcription of the ABC transporter gene BcatrD. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 70: 168–179.

ISHII, H., HOLLOMON, D. W. (2015). *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management*, Springer.

JAVED, S., AGURLA, R. (2017). Molecular tools for detection of insecticide resistance. *International Journal of Multidisciplinary Advanced Research Trends*. 4(3).

KRANTHI, K. R. (2005). *Insecticide Resistance – Monitoring, Mechanisms and Management Manual*, Central Institute for Cotton Research. India. str. 78–82.

KWON, D. H., CHOI, J. Y., JE, Y. H., LEE, S. H. (2014). The overexpression of acetylcholinesterase compensates for the reduced catalytic activity caused by resistance-conferring mutations in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 212–219.

LAVEVE, A., GAMET, S., WALKER, A. S., DEBIEU, D., TOQUIN, V., FILLINGER, S. (2014). Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environ. Microbiol.*, 16: 2253–2266.

LEE, S. H. KIM, Y. H., KWON, D. H., CHA, D. J., KIM, J. H. (2015). Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: implications for pesticide resistance and tolerance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 120: 118–124.

LI, X., SCHULER, M. A., BERENBAUM, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 231–253.

LORENTZ, L., GAINES, T. A., NISSEN, S. J., WESTRA, P., STREK, H. J., DEHNE, H. W., RUIZ-SANTAELLA, J. P., BEFFA, R. (2014). Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations. *J. Agric. Food. Chem.*, 62: 8134–8142.

MA, Y., CHEN, L., QIU, J. (2013). Biodegradation of beta cypermethrin by a novel *Azoarcus indigenus* strain HZ5. *J. Environ. Sci. Health B*, 48: 851–859.

MILLER, G. T. (2004). *Sustaining the Earth*. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California.

NAUEN, R., WÖLFEL, K., LEUEKE, B., MYEIDAKIS, A., TSAKIRELI, D., RODITAKIS, E., TSAGKARAKOU, A., STEPHANOU, R., VONTAS, J. (2015). Development of a lateral flow test to detect metabolic resistance in *Bemisia tabaci* mediated by CYP6CM1, a cytochrome P450 with broad spectrum catalytic efficiency. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 121: 3–11.

OMRANE, S., SGHYER, H., AUDÉON, C., LANEN, C., DUPLAIX, C., WALKER, A. S., FILLINGER, S. (2015). Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter are responsible for the MDR phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environ. Microbiol.*, 17: 2805–2823.

PUINEAN, A. M., FOSTER, S. P., OLLIPHANT, L., DENHOLM, I., FIELD, L. M., MILLAR, N. S., WILLIAMSON, M. S., BASS, C. (2010). Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet.*, 6.

READE, J. P. H., COBB, A. H. (2002). New, quick tests for herbicide resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds) based on increased glutathione S-transferase activity and abundance. *Pest Manag. Sci.*, 58: 26–32.

REYES, M., ROCHA, K., ALARCÓN, L., SIEGWART, M., SAUPHANOR, B. (2012). Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 102 (1): 45-50.

SEBAUGH, J.L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat.*, 10: 128–134.

SIEGWART, M., BITTERN COURT MONTEIRO, L., OLIVARES, J. (2011). Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations. *J. Econ. Entomol.*, 104: 636–645.

SIEGWART, M., GRAILLOT, B., BLACHÉRE-LOPEZ, C., BESSE, S. (2015). Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Front. Plant Sci.*, 6: 381.

SRIGIRIRAJU, L., SEMTNER, P. J., ANDERSON, R. D., BLOOMQUIST, J. R. (2010a). Monitoring for MACE resistance in the tobacco adapted form of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) in the eastern United States. *Crop Prot.*, 29: 197–202.

SRIGIRIRAJU, L., SEMTNER, P. J., BLOOMQUIST, J. R. (2010b). Monitoring for imidacloprid resistance in the tobacco-adapted form of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), in the eastern United States. *Pest Manag. Sci.*, 66: 676–685.

SYED, K., YADAV, J. S. (2012). P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 38: 339–363.

WALKER, A. S., MICLOUD, A., RÉMUSON, F., GROSMAN, J., GREDET, M., LEROUX, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manag. Sci.*, 69: 667–678.

WHO (2012). Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM). U: WHO/HTM/GMP/20125. Ured. Organization WH. Geneva, Švicarska.

WRIDE, D. A., POURMAND, N., BRAY, W. M., KOSARCHUK, J. J., NISAM, S. C., QUAN, T. K., BERKELEY, R. F., KATZMAN, S., HARTZOG, G. A., DOBKIN, C. E., LOKEY, R. S. (2014). Confirmation of the cellular targets of benomyl and rapamycin using next-generation sequencing of resistant mutants in *S. cerevisiae*. *Mol. Biosyst.*, 10: 3179–3187.

XIE, W., WANG, S., WU, Q., FENG, Y., PAN, H., JIAO, X., ZHOU, L., YANG, X., FU, W., TENG, H., ZHANG, Y. (2011). Induction effects of host plants on insecticide susceptibility and detoxification enzymes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.*, 67: 87–93.

ZAYED, A. B. B., SZUMLAS, D. E., HANAFI, H. A., FRAYAUFF, D. J., MOSTAFA, A. A., ALLAM, K. M., BROGDON, W. G. (2006). Use of bioassay and microplate assay to detect and measure insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic areas of Egypt. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22: 473–482.