



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Оливера Попов

**Дејство одабраних пестицида на релативну експресију гена
за каталазу и супероксид дисмутазу
кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)**

-завршни (мастер) рад-

Ментор:

др Жељко Д. Поповић, ванредни професор

Нови Сад, 2022.



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Оливера Попов

**Дејство одабраних пестицида на релативну експресију гена
за каталазу и супероксид дисмутазу
кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)**

-завршни (мастер) рад-

Ментор:

др Жељко Д. Поповић, ванредни професор

Нови Сад, 2022.

Захвалница

*Захвалност пре свега желим да упутим свом ментору **ванр. проф. др Жељку Д. Поповићу**, на пруженој несебичној подршци, поверењу, стрпљењу и помоћи, како током целокупних студија, тако и током тумачења резултата и израде рада.*

*Велику захвалност дугујем **проф. др Данијели Којић**, **проф. др Јелени Пураћ** и **научном сараднику др Снежани Гошић-Дондо** на омогућеним условима за сам рад, као и на корисним сугестијама током извођења експеримента.*

*Посебну захвалност дугујем и колегама из Лабораторије за биохемију и молекуларну биологију, Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, **Иви Узелац**, **Милошу Аврамову**, **Николи Кривокући**, **Јелени Спремо** и **Вањи Татић** на дружењу, бескрајном стрпљењу и великој подршци у свим корацима израде рада.*

*Захваљујем се драгом колеги **Драгану Грчку**, без кога реализација овог експеримента не би била могућа.*

*Такође велику захвалност дугујем колегама из Института за ратарство и повртарство; мојој драгој колегиници **Ивани Бајић** и мом ментору **вишем научном сараднику др Живку Ђурчићу** на огромној подршци, разумевању и указаном поверењу.*

*Велику захвалност дугујем и својој дивној породици – **мами Љиљи**, **тати Драгану**, **брату Влади** и **баки Латинки**, као и својим пријатељима, на подршци и свим упућеним речима охрабрења и љубави током целог школовања. Хвала вам на свему.*

Оливера

Списак скраћеница (по абecedном реду):

A

ADS – систем антиоксидативне заштите, *енгл.* antioxidative defense system

AFPs – антифриз протеини, *енгл.* anti-freeze proteins

ANOVA – анализа варијансе, *енгл.* analysis of variance

APx – аскорбат пероксидаза, *енгл.* ascorbate peroxidase

B

Bt – *лат.* *Bacillus thuringiensis*

C

CAT – каталаза, *енгл.* catalase

cDNK – комплементарна ДНК, *енгл.*

complementary DNA

Ct – праг детекције, *енгл.* cycle threshold

D

DEPC – диетил пирокарбонат, *енгл.*

diethyl pyrocarbonat

dNTP – деоксинуклеозид трифосфат,

енгл. deoxynucleoside triphosphate

DNA – дезоксирибонуклеинска

киселина, *енгл.* deoxyribonucleic acid

E

EC – концентрат за емулзију, *енгл.*

emulsion concentrate

EDTA – етилендиаминтетрасирћетна

киселина, *енгл.* ethylenediaminetetraacetic

acid

F

FA – масне киселине, *енгл.* fatty acids

FO – Фобос

G

GR – глутатион редуктаза, *енгл.* glutation reductase

GSH-Px – глутатион пероксидаза, *енгл.* glutation peroxidase

GST – глутатион-S-трансфераза, *енгл.* glutation-S-transferase

I

INPs – протеини иницијатори

кристализације, *енгл.* ice nucleating proteins

O

OD – оптичка густина, *енгл.* optical density

OS – оксидативни стрес, *енгл.* oxidative stress

P

PCR – ланчана реакција полимеразе,
енгл. polymerase chain reaction

Q

qPCR – квантитативни PCR, *енгл.*
quantitative PCR

R

ROS/RNS – реактивне врсте
кисеоника/азота, *енгл.* reactive
oxygen/nitrogen species

ROS – реактивне кисеоничне врсте,
енгл. reactive oxygen species

RNaza – рибонуклеаза, *енгл.*
ribonuclease, RNase

RNK – рибонуклеинска киселина,
енгл. ribonucleic acid

RT-PCR – PCR реверзном
транскрипцијом, *енгл.* reverse
transcription PCR

RSS – реактивне сумпорне врсте, *енгл.*
reactive sulfur species

S

SOD – супероксид дисмутаза, *енгл.*
superoxide dismutase

SO – Сонидо

SE – Семафор

T

TBE – трис-боратни-ЕДТА пуфер,
енгл. Tris/borate/EDTA

Tris – трисаминометан, *енгл.*
trisaminomethane

Списак слика

Слика 1. Животни циклус кукурузног пламенца (преузето са Интернет 4, прилагођено).	4
Слика 2. Одрасле јединке кукурузног пламенца; лево женка, десно мужјак (преузето из Franeta 2018).....	5
Слика 3. Приказ развојних стадијума кукурузног пламенца: а,б-јаја, ц- ларва, д-лутка (преузето из Franeta 2018, прилагођено).....	6
Слика 4. Приказ негативног дејства реактивних кисеоничних врста: а. здрава ћелија, б. ћелија на коју делују реактивне кисеоничне врсте, ц. мртва ћелија (преузето са Интернет 5, прилагођено).....	10
Слика 5 Приказ атома уобичајене електронске конфигурације, слободног радикала и антиоксиданса (преузето са Интернет 6, прилагођено).....	11
Слика 6. Четири изоформе SOD ензима (преузето са Интернет 7).	16
Слика 7. Каталаза у еритроцитима, код људи (лево); једнофункционална бактеријска каталаза (у средини); бактеријска Mn- каталаза (десно) (преузето са Интернет 8).	19

Списак графика

График 1. Релативна експресија гена за супероксид дисмутазу дијапаузирајућих гусеница након инсектицидног третмана (К-контола, ФО-Фобос, ЛЕ-Лепинокс, СЕ-Семафор, СО-Сонидо). Резултати су изражени преко ΔCq вредности. Статистичка значајност резултата је утврђена употребом једнофакторске ANOVA-е и <i>post hoc</i> Фишеровог теста за ниво значајности $p < 0,05$. Статистички значајне разлике између експерименталних група означене су различитим словним ознакама изнад стубића.....	40
График 2. Релативна експресија гена за каталазу дијапаузирајућих гусеница након инсектицидног третмана(К-контола, ФО-Фобос, ЛЕ-Лепинокс, СЕ-Семафор, СО-Сонидо). Резултати су изражени преко ΔCt вредности. Статистичка значајност резултата је утврђена употребом једнофакторске ANOVA-е и <i>post hoc</i> Фишеровог теста за ниво значајности $p < 0,05$ Статистички значајне разлике између експерименталних група означене су различитим словним ознакама изнад стубића.	41

Списак табела

Табела 1. Запремине компоненти реакционе смеше за једну реакцију RT-PCR-а-----	33
Табела 2. Програм реакције реверзне транскрипције. -----	33
Табела 3. Почетнице коришћене за квантитативну PCR анализу. -----	34
Табела 4. Компоненте реакционе смеше за једну реакцију qPCR-а.-----	36
Табела 5. Програм двостепене qPCR анализе.-----	36

- САДРЖАЈ -

1. УВОД	1
1.1. Биологија, морфологија и животни циклус кукурузног пламенца	4
1.2. Дијапауза	8
1.2.1. Карактеристике дијапаузе	8
1.2.2. Дијапауза код врсте <i>Ostrinia nubilalis</i>	9
1.3. Оксидативни стрес	10
1.3.1. Реактивне врсте кисеоника	11
1.3.2. Супероксид анјон	12
1.4. Антиоксидативна заштита	14
1.4.1. Супероксид-дисмутаза	15
1.4.1.1. Бакар, цинк-SOD (Cu,Zn-SOD)	16
1.4.1.2. Манган-SOD (Mn-SOD) и гвожђе-SOD (Fe-SOD)	17
1.4.1.3. Никл-SOD (Ni-SOD)	18
1.4.2. Каталаза	18
1.4.2.1. Једнофункционалне хем-каталазе	20
1.4.2.2. Каталазе-пероксидазе	21
1.5. Сузбијање кукурузног пламенца	21
1.5.1. Агротехничке мере	21
1.5.2. Хемијско сузбијање	22
1.5.2.1. Фобос	23
1.5.2.2. Лепинокс	24
1.5.2.3. Семафор	24
1.5.2.4. Сонидо	25
2. ЦИЉ И ХИПОТЕЗА	26
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	28
3.1. Биолошки материјал и поставка експеримента	29
3.2. Хомогенизација гусеница и изолација укупне РНК	30
3.3. Провера очуваности и одређивање концентрације укупне изоловане РНК	31
3.4. Синтеза комплементарне ДНК	32
3.5. Дизајн почетница	34
3.6. Испитивање ефикасности почетница	34

3.7. Квантитативна PCR анализа и релативна квантификација експресије испитиваних гена	37
3.7.1. Релативна квантификација експресије испитиваних гена	37
3.8. Статистичка обрада података	38
4. РЕЗУЛТАТИ	39
4.1. Релативна експресија испитиваних гена	40
5. ДИСКУСИЈА	43
6. ЗАКЉУЧАК	49
7. ЛИТЕРАТУРА	51
БИОГРАФИЈА	64

1. УВОД

Кукуруз (*лат. Zea mays*) је једногодишња биљка из породице трава (*лат. Poaceae*). Представља једну од основних намирница људи и животиња, што је сврстава у групу економски најзначајнијих биљних култура у прехранбеној индустрији, како на локалном, тако и на глобалном нивоу. Припитомљавање и узгој кукуруза започети су у Северном Мексику, а у Европу је донет крајем XV века. Као ратарска биљка добија на значају тек током XVII века (Revilla и сар., 1998). Данас је кукуруз најзаступљенија биљка на обрадивим површинама широм света и узгаја се на 187.959.116 ha, са годишњим приносом од преко милијарду тона (Интернет 1). Кукуруз има широку примену и користи се како у исхрани људи и животиња, тако и за продукцију заслађивача, густина, етанола, итд (Gwirtz и Garcia-Casal, 2014). Да би се принос кукуруза одржао на високом нивоу, неопходно је да се његова заштита, од економски штетних врста, спроводи што ефикасније. Кукурузни пламенац (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) је најраспрострањенија и најзаступљенија економски штетна врста, како у Србији и Европи, тако и у Сједињеним Америчким Државама. Економски губици које проузрокује присуство кукурузног пламенца у пољу су огромни. Током XX века принос кукуруза у Војводини, услед присуства кукурузног пламенца, смањено се за 80% (Almaši и сар., 2002; Meisclе и сар., 2010). Према подацима Републичког завода за статистику (2014, 2015), у Србији се сеје на око 1.200.000 ha, са годишњом производњом од преко 6.500.000 t. С обзиром на наведени податак, од изузетног је значаја спознаја биолошких механизма кукурузног пламенца (Интернет 2).

Кукурузни пламенац (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) први пут је описан од стране Јакоба Хибнера (*нем. Jacob Hübner*) 1793. године. Широко је распрострањена врста која води порекло из Европе, насељава и Северну Африку и Малу Азију, као и територију бившег Совјетског Савеза, све до крајњег истока Русије (Carinera, 2005). У Француској је 1831. године први пут поменута као економски штетна врста на хмељу, а убрзо потом уочена је и на кукурузу (Caffrey и Worthley, 1927). Пренета је и на амерички континент, где се успешно прилагодила условима станишта (Bourguet и сар., 2000).

Кукурузни пламенац је полифагни инсект из фамилије Crambidae, који припада реду лептира (*лат. Lepidoptera*). У исхрани користи преко 200 самониклих и гајених зељастих биљних врста (Bourguet и сар., 2000). Гусенице кукурузног пламенца се хране листовима и унутрашњошћу стабла кукуруза, чиме слабе биљку, наносећи јој индиректне штете путем смањивања њене физиолошке активности.

Такође, гусенице могу узроковати и директне штете, хранећи се метлицом и клипом, чиме оштећују зрна, а често узрокују и опадање читавог клипа (Ваџок и сар., 2020).

Различите методе сузбијања кукурузног пламенца су у употреби. Према главним принципима деловања методе сузбијања се могу поделити на: механичке, биолошке и хемијске методе. Данас је најзаступљењији хемијски вид сузбијања (Saladini и сар., 2008).

Механичко сузбијање обухвата уништавање биљних остатака и њихово мешање са тлом. Кукурузни пламенац презимљује на биљци, те се уништавањем биљних остатака убрзава труљење и тиме се спречава мировање ларви кукурузног пламенца. Додатно, дубоким преоравањем смањује се излегање лептира у мају (Интернет 3).

Са друге стране, процес биолошке контроле кукурузног пламенца подразумева употребу оса из родова *Trichogramma* и *Ichneumon*. Осе из рода *Ichneumon* паразитирају на јајима кукурузног пламенца, док се ларве врсте *Trichogramma* након излегања хране јајима кукурузног пламенца. Од пресудног значаја за ефикасну биолошку контролу је датум њене примене, који треба да буде што ближе датуму полагања јаја кукурузног пламенца. Осе из родова *Trichogramma* и *Ichneumon* могу се расејати ручно помоћу карата, као и капсулама помоћу дронава (Dionne и сар., 2018).

За хемијско сузбијање постоје регистровани препарати, али њихова ефикасност не зависи само од активне супстанце, већ и од климатских фактора, као и времена и начина примене (Blandino и сар., 2008). Хемијске третмане је идеално примењивати или у тренутку постигнутог максималног лета одраслих мољаца или у време излегања ларви. Оног тренутка када се ларва увуче у стабло биљке кукуруза, третман више није могућ. У многим европским земљама за сузбијање кукурузног пламенца се примењују фолијарни инсектициди широког спектра деловања (Gibb, 2015).

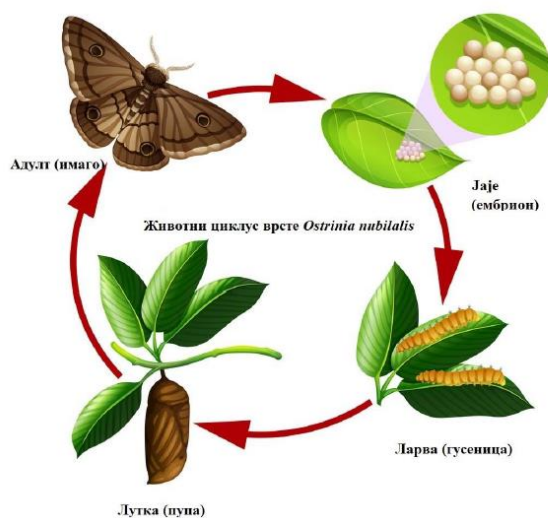
Правовремену примену адекватних инсектицида додатно отежава дијапауза, хипометаболичко стање мировања које омогућава кукурузном пламенцу преживљавање неповољних зимских услова. Током дијапаузе инсект је отпоран на скоро сваки вид третмана (Denlinger, 2008).

Оцена ефикасности хемијског сузбијања се може одредити како кроз морталитет јединки (број јединки које нису преживеле третман), тако и кроз негативне ефекте које је хемијски третман оставио на преживеле јединке.

Испитивање ових последица је много захтевније од стандардних метода оцене ефикасности и подразумева биохемијска испитивања, а једна од могућих метода је мерење оксидативног стреса преживелих јединки. Оксидативни стрес се може дефинисати као озбиљно нарушени баланс између продукције реактивних врста кисеоника и азота са једне стране, и антиоксидативне заштите са друге стране (Halliwell и Gutteridge, 1999). Систем антиоксидативне заштите обухвата ензиме као што су супероксид дисмутаза (*енгл.* superoxide dismutase, SOD), каталаза (*енгл.* catalase, CAT), аскорбат пероксидаза (*енгл.* ascorbate peroxidase, APx), глутатион пероксидаза (*енгл.* glutathione peroxidase, GSH-Px), глутатион-S-трансфераза (*енгл.* glutathione-S-transferase, GST), и глутатион редуктаза (*енгл.* glutathione reductase, GR) као и друге мале молекуле (Franco и Cidlowski, 2009).

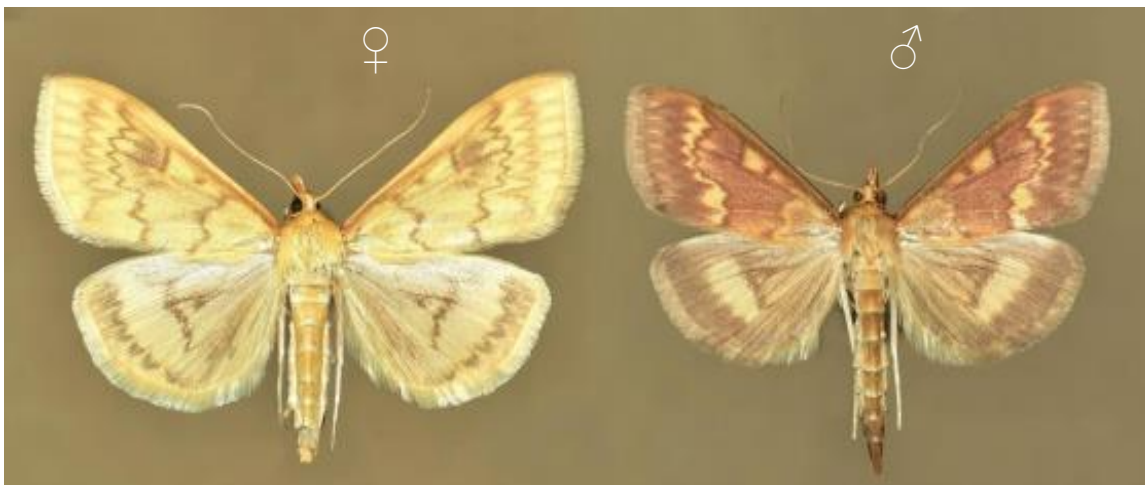
1.1. Биологија, морфологија и животни циклус кукурузног пламенца

Кукурузни пламенац је типични представник реда лептира са холометаболичким развојним циклусом, који током свог онтогенетског развоја пролази потпуну метаморфозу. Потпуна метаморфоза обухвата пролазак кроз сва четири развојна стадијума у току једне генерације: јаје (ембрион), ларва (гусеница), лутка (пупа) и одрасла јединка (имаго) (Ваџа и сар., 2007; Gaspers, 2009) (Сл. 1).



Слика 1. Животни циклус кукурузног пламенца (преузето са Интернет 4, прилагођено).

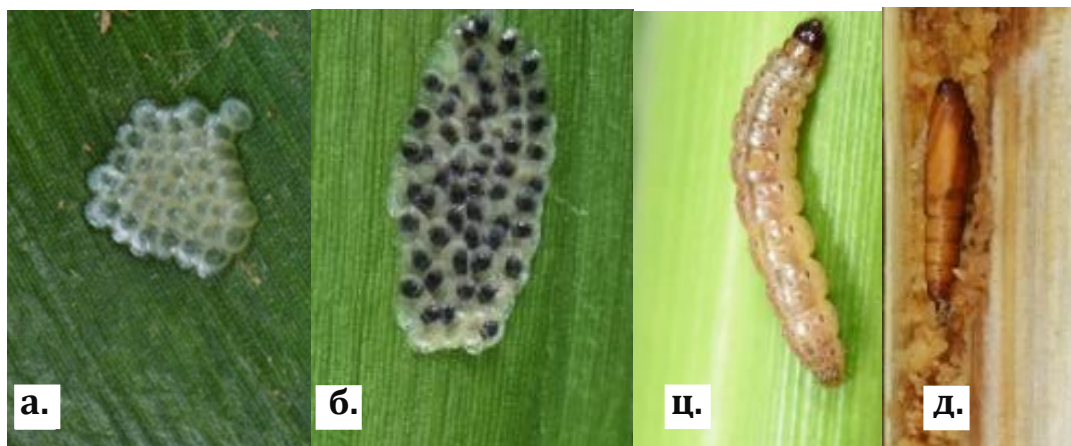
Међу јединкама је изражен полни диморфизам (Сл. 2). Типичан је представник фамилије Crambidae, јер су код оба пола изражени лабиални палпи који су нормално постављени у односу на главу, што је и одлика фамилије. Одрасли мољци имају распон крила од 22 до 30 mm. Очи су крупне и тамне са ситним оцелама које су слабо развијене. Дорзално је торакс тамножуте боје код женки, док је код мужјака светлобраон. Са вентралне стране торакса се слабије уочава разлика између мужјака и женки. Поседују предњи и задњи пар крила који се разликују међу половима. Предњи пар крила мужјака је тамнобраон боје са светлијим базалним регионом и са изразито назубљеном тамножутим линијом која „пресеца“ крило. Задњи пар крила мужјака је униформно тамносиве боје са светлом траком прљаво беле боје. Предњи пар крила женке је тамножуте, понекад сиво-беле боје, са назубљеном линијом браон боје. Рубни део предњих крила женке се такође одликује изразито назубљеном браон линијом. Задњи пар крила је светлије боје, такође са положеном светлом траком (Miguina и Munpor, 2016). Одрасле јединке су активне ноћу, док се током дана налазе у стању мировања причвршћене за биљку, у области густе вегетације и високе влаге у ваздуху (Ваћа и сар., 2007).



Слика 2. Одрасле јединке кукурузног пламенца; лево женка, десно мужјак (преузето из Franeta 2018).

Одрасла јединка живи од 10 до 15 дана и способна је да се пари више пута у току живота. Парење отпочиње одмах након достизања адултног стадијума, када женка отпусти смешу феромона који привлаче мужјака (Glover и сар., 1987). Две недеље протекне од парења до тренутка када женка полегне јаја (овипозиција). Број јаја који женка произведе се креће од 800 до 900 (Fadamiro и Baker, 1999). Женка полаже јаја у групама (Сл. 3а и 3б), у којима их има од 5 до 50 (у просеку 30), на ниже лисне површине или директно на плод (Fadamiro и Baker, 1999). Ако су услови средине

повољни (температура ваздуха од 15°C), јаја ће се развити за 4–9 дана. Развој може да се прати и опажањем морфолошких промена на групи јаја. По полагању јаја су светла, млечно беле боје (Сл. 3а), како се развијају тако постају све тамнија док не достигну мрку боју (Сл. 3б) (Sarajlić, 2015). У погодним условима из 95% јаја се излегне гусеница (Fadamiro и Baker, 1999). Целокупно развиће гусеница траје од три до пет недеља (Кереџи и сар., 2014). Првих 15–20 дана, по излегању, ларве проводе у рукавцима листова кукуруза или на горњим деловима других биљака. У том времену оне се хране и формирају ситне отворе неправилног облика, а након тога се убушују у стабљике и клипове, где настављају са исхраном и развићем. Оштећења на листовима нису од економског значаја, али указују на присуство инсекта. Након убушивања у стабљике хране се сржју стабљика, буше дуге канале који се пуне изметом и број изгрзотина се повећава. Долази до оштећења сунђерастог паренхимског ткива и спроводних снопића, које касније узрокује преламање стабљика испод метлице или клипа, нарочито при јаким ветровима и комбајнирању (Кереџи и сар., 2014).



Слика 3. Приказ развојних стадијума кукурузног пламенца: а,б-јаја, ц- ларва, д-лутка (преузето из Franeta 2018, прилагођено).

Гусенице су дорзално светлобраон или ружичасто сиве боје, са мрком капсулом на глави и светлобраон торакалном плочом (Сл. 3ц). На сваком телесном сегменту имају округле тамне мрље из којих излази по једна длачица. Ларвени стадијум пролази кроз пет ступњева и циклус се завршава у распону од три до пет недеља. Брзина развића ларве је у директној вези са температуром, праг развоја за ларве је око 11°C. Гусеница може нарасти до 2,5 cm (Matteson и Decker, 1965). Улуткавање гусеница може започети на више места: у каналима унутар стабла, ван стабла, и унутар других делова биљака (Сл. 3д). Лутка је по типу пупа, униформне светлобраон боје, издужена,

дуга од 12 до 17 mm и пречника од два до четири mm. Дужина трајања стадијума лутке је у просеку 13 дана код оба пола. Улуткавање се обично одвија у каналима унутар стабла у којима се ларва хранила или унутар пазуха листова за прву генерацију, односно унутар осушених стабљика кукуруза за другу генерацију. Лутка није сакривена у прави кокон, али је заштићена танким слојем свиле који гусеница испреда пре улуткавања (Matteson и Decker, 1965).

До средине XX века сматрало се да кукурузни пламенац има једну генерацију годишње. Међутим, праћењем лета лептира светлосним клопкама, последњих деценија утврђено је да се развија и друга генерација, тако да, поред пролећног, постоји и јасно издвојен летњи лет (Kereši и сар., 2014). Број генерација у току године зависи од температурних услова и падавина, односно *O. nubilalis* може имати једну генерацију (униволтна врста) или више (мултиволтна врста). Кукурузни пламенац у агроеколошким условима Србије образује две генерације годишње (Ћампраг 1994; Almaši и сар., 2002), међутим, у условима топле и влажне јесени, долази до образовања и треће генерације, чиме ова врста постаје мултиволтна.

Животни циклус летње генерације се завршава након њиховог полагања јаја у месецу августу, кад животни циклус зимске генерације отпочиње. Гусенице зимске генерације се излежу из јаја крајем августа. Након достизања петог ступња развоја, гусенице зимске генерације се не улуткавају као гусенице летње генерације, већ улазе у стање дијапаузе. Дијапауза се иницира скраћењем дужине дана и падом температуре (Којић и сар., 2009; Роровић и сар., 2015). Гусенице зимске генерације презимљују у стању мировања до пролећа, најчешће у кукурузовини или у земљишту, у деловима исечених и заораних стабљика кукуруза и других биљака (Kereši и сар., 2014). Гусенице се припремају за улазак у дијапаузу накупљањем енергетске резерве путем интензивне исхране. Унос хране и воде се прекида током дијапаузе, што доводи до свођења стопе метаболизма на минимум. Међутим, током дијапаузе је врло интензивна синтеза заштитних молекула, који омогућавају отпорност гусеница на ниске температуре (Којић и сар., 2009; Роровић и сар., 2015). Дијапауза представља адаптацију кукурузног пламенца на неповољне услове средине током зиме. На пролеће, убрзо по наступању повољних услова, долази до улуткавања гусеница зимске генерације, што је праћено излегањем мољца зимске генерације. Након што женке полегну јаја, завршава се животни циклус зимске генерације кукурузног пламенца (Којић и сар., 2009; Роровић и сар., 2015).

1.2. Дијапауза

1.2.1. Карактеристике дијапаузе

Дијапауза спада у хипобиозе, односно представља стање смањене метаболичке активности (хипометаболичко стање). Дијапауза је обично иницирана разним стресним чиниоцима – скраћењем фотопериода, екстремним температурама, дехидратацијом, смањеним интензитетом процеса укључених у стварање енергије, и повећаним стварањем реактивних кисеоничних врста (*енгл.* reactive oxygen species, ROS) које воде ка оксидативном стресу (Storey и Storey, 2001; Storey и Storey, 2012). Дијапауза је настала као еволутивна адаптација организама, у циљу њиховог што ефикаснијег опстанка. Током дијапаузе организми усклађују свој животни циклус са променљивим условима спољашње средине (Košťál, 2006; Nation, 2008).

Код неких група инсеката улазак у дијапаузу може да наступи чак и када у спољашњој средини владају повољни услови, што упућује на то да је код таквих инсеката она генетички условљена. Дијапауза је стање организма инсекта током ког се успорава или зауставља раст, уз смањење стопе метаболизма, а наступа појачана отпорност на ниске температуре и дехидратацију. Без обзира на то што се стопа метаболизма смањује, нису сви биохемијски циклуси инактивни, већ су они само преусмерени ка синтези заштитних молекула (нпр. криопротектаната) (Којић и сар., 2009; Поповић, 2014). Промене у метаболичкој активности су праћене и променама на молекуларном нивоу, те долази до повећане експресије гена који учествују у регулацији ћелијског циклуса и смрти (MacRae, 2010).

У ком развојном стадијуму јединке ће наступити дијапауза зависи од врсте којој та јединка припада. Дијапауза отпочиње са првим знацима неповољних услова, у циљу обезбеђивања довољно времена јединкама за накупљање хранљивих материја (Košťál, 2006).

Код инсеката који су изложени температурама испод 0°C јавља се ризик од замрзавања телесних течности и оштећења ткивне масе и физиолошкој дехидратацији. У зависности од степена њихове отпорности на замрзавање, постоје различите адаптације инсеката за преживљавање оваквих климатских услова. Неки инсекти избегавају мржњење синтезом антифриз протеина (*енгл.* anti-freeze proteins, AFPs). Антифриз протеини се синтетишу искључиво код инсеката који нису отпорни на замрзавање.

Мањи је број инсеката припада групи оних који су отпорни на замрзавање, а међу њима се налази и *Ostrinia nubilalis*. Код ове групе инсеката долази до постепеног замрзавања 65% телесних течности у екстрацелуларном матриксу, што је праћено експресијом како специфичних протеина иницијатора кристализације (енгл. ice nucleating proteins, INPs), тако и синтезом криопротектаната мале молекулске масе (полихидроксилни алкохоли: глицерол, сорбитол и угљених хидрата-трехалоза, глукоза) који имају улогу да штите мембрану и унутарћелијску течност (Storey и Storey, 1981).

Током дијапаузе долази до катаболичке разградње ускладиштених енергетских резерви и супресије анаболичких процеса, јер се инсекти најчешће не хране током дијапаузе (Storey и Storey, 2001). На основу проналаска накупина лактата као крајњег продукта гликолизе, закључено је да се дијапаузирајуће гусенице ослањају на анаеробни метаболизам (Storey, 1997).

У стању дијапаузе велики број гена је утишан, а мали део је специфично активан са високом стопом. Нарочито су активни гени који кодирају протеине топлотног стреса и гени укључени у антиоксидативну заштиту (Yocum и сар., 2015).

1.2.2. Дијапауза код врсте *Ostrinia nubilalis*

Фактори за улазак у дијапаузу код кукурузног пламенца су: скраћивање обданице крајем лета и почетком јесени и пад температуре након лета. Кукурузни пламенац преживљава зимски период у стању дијапаузе у фази гусенице петог инстара, која поседује толеранцију на смрзавање на температурама од $-20,5^{\circ}\text{C}$ до -25°C . Метаболизам ове гусенице је супресован и усмерен ка синтези и акумулацији криопротектаната, као што су глицерол и трехалоза. На пролеће, када дође до пораста температуре, долази и до значајног пада концентрације глицерола у телу гусенице (Nordin и сар., 1984) и пораста глукозе (Кojić и сар., 2010).

Поред синтезе и акумулације криопротектаната, током периода дијапаузе долази и до реаранжмана липида, пре свега слободних масних киселина (енгл. fatty acids, FA) (Vukašinović, 2014). Код кукурузног пламенца, јачина дијапаузе је максимална од самог тренутка њеног наступања (Beck и Nanес, 1960).

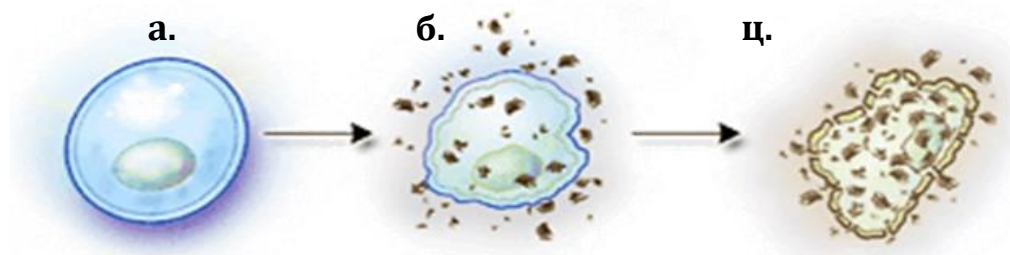
Повећана концентрација реактивних кисеоничних врста је последица деловања еколошког стреса који је и индуковао улазак гусеница у дијапаузу (Monaghan и сар., 2008). Варирање ниске температуре, као и излагање ултравиолетном зрачењу води ка

стварању ROS-а и напоследку ка оксидативном стресу код инсеката (Meng и сар., 2009). Доминантни ROS је супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), који се захваљујући ензиму супероксид дисмутази преводи до водоник-пероксида. Даље разлагање H_2O_2 спроводи каталаза, при чему настају вода и молекулски кисеоник (Felton и Summers, 1995). Код дијапаузирајућих гусеница врсте *Ostrinia nubilalis* у ранијим радовима је забележено повећање количине ROS-а услед излагања ниским температурама ($3^\circ C$), а посебно је забележена повећана концентрација водоник-пероксида (Којић и сар., 2009).

Биолошка активност одређене групе инсеката може да се разуме тек када се у потпуности истражи њихова дијапауза. Ова чињеница има велики значај у пољопривреди, јер и чак најмање нарушавање процеса дијапаузе може довести до смањене стопе преживљавања инсеката (Denlinger, 2008).

1.3. Оксидативни стрес

Оксидативни стрес (*енгл.* oxidative stress, OS) се може дефинисати као неравнотежа између појаве реактивних врста кисеоника и азота способности биолошког система да изврши уклањање ових реактивних интермедијера или да поправи настала оштећења. Оксидативни стрес може да буде узрочник оштећења биомолекула, односно протеина, липида и азотних база. Такође, може да доведе и до инактивације ензима, деградације протеина, оштећења ДНК као и липидне пероксидације. Ниво оштећења који настаје од стране оксидативног стреса може да се упореди са оним који изазива јонизујуће зрачење (Halliwell и Gutteridge, 1999).



Слика 4. Приказ негативног дејства реактивних кисеоничних врста: а. здрава ћелија, б. ћелија на коју делују реактивне кисеоничне врсте, ц. мртва ћелија (преузето са Интернет 5, прилагођено).

Највећу штету по ћелију представљају оштећења настала на липидним компонентама ћелијске мембране, јер смањују њену функционалност и доводе до измена у оквиру њених физичко-хемијских особина, што нарушава виталне функције ћелије (Сл. 4) (Rikans и Hornbrook, 1997).

1.3.1. Реактивне врсте кисеоника

Кисеоник је због своје електронске структуре лако подложен стварању слободних радикала. Непотпуном редукцијом кисеоника настају реактивни облици молекула. Ови радикал молекули се још називају и реактивне кисеоничне врсте (*енгл.* reactive oxygen species, ROS) (Mates и Sanchez-Jimenez, 2000). Реактивне врсте кисеоника могу се поделити на слободне радикале и реактивне нерадикалске агенсе. Слободни радикали представљају елементе и једињења са једним или више неспарених електрона у спољашњој орбитали (Сл. 5). Док су реактивни нерадикалски агенси, елементи и једињења без неспарених електрона у спољашњој орбитали.



Слика 5 Приказ атома уобичајене електронске конфигурације, слободног радикала и антиоксиданса (преузето са Интернет 6, прилагођено).

У радикале се убрајају супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), хидроксил радикал (OH^{\cdot}), хидроксипероксил (HO_2^{\cdot}), алкоксил (RO_2^{\cdot}) и пероксил (PO_2^{\cdot}), док у нерадикале спадају водоник-пероксид (H_2O_2), хипохлорна киселина ($HOCl$), озон (O_3) и синглет кисеоник (1O_2).

Слободни радикали су обично нестабилни и веома реактивни, јер неспарени електрони теже да се спаре са другим електронима (Yoshikawa и Naito, 2002). Реактивне врсте кисеоника се стварају константно у митохондријама и цитосолу као резултат метаболичких процеса као што је респирација. Имају битну улогу у ћелијском сигналингу и хомеостази, нпр. уништавају микробе и патогене путем леукоцита. Постоје и случајеви где супероксидни анјон ($O_2^{\cdot-}$) и водоник-пероксид (H_2O_2) имају улогу митогених чинилаца, односно учествују у митози, тако што унапређују стопу ДНК репликације и пролиферације ћелија у различитим ћелијским културама (Valko и сар., 2007; Pham-Huu и сар., 2008). Поред овога, у нормометаболизму, ROS

представљају и сигналне молекуле који су укључени како у раст и развој ћелија тако и у одбрамбене механизме против патогена и у контроли програмиране ћелијске смрти (Picardo и Passi, 1997). Међутим, негативни ефекти ROS-a настају када се њихов ниво драстично повећа у стању стреса изазваног различитим спољашњим утицајима као што су висока осветљеност, високе или ниске температуре, повећан салинитет, суша, недостатак нутријената или инфекција патогенима (Barata и сар., 2005).

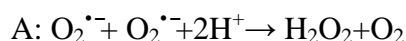
Уколико дође до повећаног стварања ROS-a, последице могу бити оштећење ДНК, протеина и липида, које води у ћелијску смрт. Због тога живи организми поседују широк опсег антиоксиданата и антиоксидативних ензима који уклањају реактивне врсте кисеоника на једноставан начин (Сл. 5).

Прву линију одбране против оксидативног стреса представљају антиоксиданси који укључују различите ензиме и метаболите. Ова једињена уклањају реактивне врсте кисеоника метаболишући их најчешће до елементарног кисеоника и воде, који су безбедни за организам. Управо дејством антиоксиданаса кукурузни пламенац је стекао висок ниво отпорности на инсектициде, чији се механизми деловања заснивају на подизању нивоа ROS-a у ћелији и увођења ћелија у ћелијску смрт (Picardo и Passi, 1997).

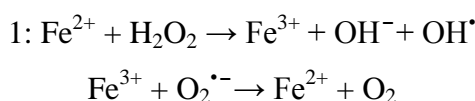
1.3.2. Супероксид анјон

Супероксид анјон настаје у аеробним условима на унутрашњој митохондријској мембрани и у ендоплазматичном ретикулуму (Picardo и Passi, 1997). Представља моновалентну редукцију молекуларног кисеоника (O_2), за коју се сматра да је уједно и радикал (ознака \cdot^-) и анјон са наелектрисањем од -1.

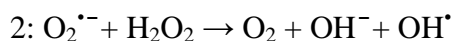
Током путовања електрона дуж електрон-транспортног ланца, одређен број електрона може да „склизне” са њега и да реагује са молекуларним кисеоником, те да на тај начин дође до настанка супероксид анјон радикала. Ово такозвано „цурење” електрона се најчешће дешава на комплексу I и III респираторног ланца (Ighodaro и Akinloye, 2017). Супероксид анјон може да узрокује настанак неколико других облика реактивних врста (Ighodaro и Akinloye, 2017). Хемијским реакцијама може да се ствара хидроксил радикал ($OH\cdot$) на два начина (Ighodaro и Akinloye, 2017): директно и индиректно преко водоник-пероксида (H_2O_2). Водоник-пероксид настаје дисмутацијом (A) супероксид анјона уз помоћ ензима супероксид дисмутазе (*енгл.* superoxide dismutase, SOD), а потом од њега у присуству јона гвожђа настаје хидрокси радикал.



Водоник-пероксид настаје дисмутацијом супероксид анјона, што имплицира да сваки биолошки систем који производи супероксид анјон уједно ствара и H_2O_2 . Међутим, постоје ензими локализовани у пероксизомима који стварају H_2O_2 без стварања $O_2^{\bullet -}$. За разлику од супероксид анјон радикала, водоник-пероксид пролази кроз ћелијске мембране. Када се нађе у ћелији, H_2O_2 реагује са Fe^{2+} или Cu^{2+} у Фентоновој реакцији (1), при чему настаје хидроксил радикал.



Хабер-Вајсова (*енгл.* Haber Weiss) реакција која је метал-катализована (2) подразумева настанак хидроксил радикала из супероксид анјона и водоник-пероксида. За реакцију су неопходни или слободно гвожђе (или бакар) или комплекси са гвожђем (феритин, лактоферин, хемоглобин и миоглобин), који представљају катализаторе реакције (Trenam и сар., 1992). Збирна реакција се може представити на следећи начин:



Хидроксил радикал (OH^{\bullet}) је најопаснији слободни радикал и доводи до највеће токсичности у ћелијама (Devasagayam и сар., 2004). Посебно дејство на липидне мембране могу имати хидроксил радикал и супероксид анјон, при чему отпочиње стварање липидних радикала (L^{\bullet}). Потом настали липидни радикали у присуству кисеоника доводе до настанка липидних пероксил радикала (LOO^{\bullet}) (Lobo и сар., 2010).

Пероксил радикали нападају липидне мембране и доводе до штетног ефекта оксидативног стреса, а то је липидна пероксидација. Јављају се промене у пропустљивости мембране (Lobo и сар., 2010), дисфункционалност мембранских рецептора (Fagoocqi и Horrocks, 1998), као и смањења активности ензима везаних за мембрану (Wills, 1971)

1.4. Антиоксидативна заштита

У циљу осигураног преживљавања тј. одбране ћелија од реактивних врсте кисеоника и азота (*енгл.* reactive oxygen/nitrogen species ROS/RNS), биолошки системи су стекли велики број ензимских и неензимских механизма који их елиминишу или ублажавају њихово негативно дејство. Без обзира на постојеће разлике између механизма заштите, они делују јединствено и синхронизовано, чинећи тзв. систем антиоксидативне заштите (*енгл.* antioxidative defense system, ADS). Молекули који чине ADS могу се разврстати у четири нивоа антиоксидативне одбране (Ighodaro и Akinloye, 2017).

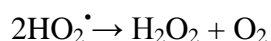
1. У прву линију антиоксидативне одбране спадају три кључна ензима – супероксид дисмутаза (*енгл.* superoxide dismutase, SOD), каталаза (*енгл.* catalase, CAT) и глутатион пероксидаза (*енгл.* glutathione peroxidase, GPx), као и неензимске форме антиоксиданата као што су метал-везујући протеини (трансферин, церулоплазмин), који везују гвожђе или бакар, те на тај начин директно спречавају стварање слободних радикала. Један од есенцијалних ензима за заштиту ћелија од токсичних продуката аеробног метаболизма је SOD, зато што контролише концентрацију O_2 у ћелији (Ighodaro и Akinloye, 2017). Физиолошка улога која се обично приписује каталази је уклањање H_2O_2 каталисањем реакције разлагања H_2O_2 до H_2O и O_2 . Ензим GPx има улогу у редукцији концентрације слободног H_2O_2 .
2. Другу линију антиоксидативне одбране чине већински хидрофилни молекули као што су глутатион, аскорбинска киселина и соли мокраћне киселине (урати), али и липофилни молекули као што су витамин Е и редуковани облик коензима Q10 – убиквинол. Глутатион има важну улогу у антиоксидативној заштити, као и у одржавању редокс хомеостазе у цитоплазми и ћелијским одељцима (Valko и сар., 2007). Урати и аскорбинска киселина представљају јаке редукујуће агенсе који имају способност уклањања слободних радикала, те спречавају прооксидативно деловање јона метала тако што их везују за себе. Витамин Е је главни мембрански антиоксиданс који прекида реакцију липидне пероксидације реагујући са пероксил радикалима, док су каротеноиди добри у уклањању

синглета кисеоника, мада реагују и са другим реактивним врстама (Valko и сар., 2007);

3. Трећу линију антиоксидативне одбране чине *de novo* ензими који представљају систем поправке ДНК оштећења (*енгл.* DNA repair enzyme system) – полимеразе, гликозилазе и нуклеазе, као и протеолитички ензими – протеиназе, протеазе и пептидазе. Ова линија одбране делује тек када је дошло до оштећења проузрокованих од стране ROS (Niki, 1993).
4. Четврту линију антиоксидативне одбране обухвата група молекула који поседују тзв. механизам прилагођавања, односно они користе сигнале неопходне за стварање и деловање слободних радикала како би спречили њихов настанак. Одговарајући молекули се групишу и започињање транспорт са антиоксидативним дејством на циљно место, те се на тај начин неутралише или елиминише циљна врста (Niki, 1993).

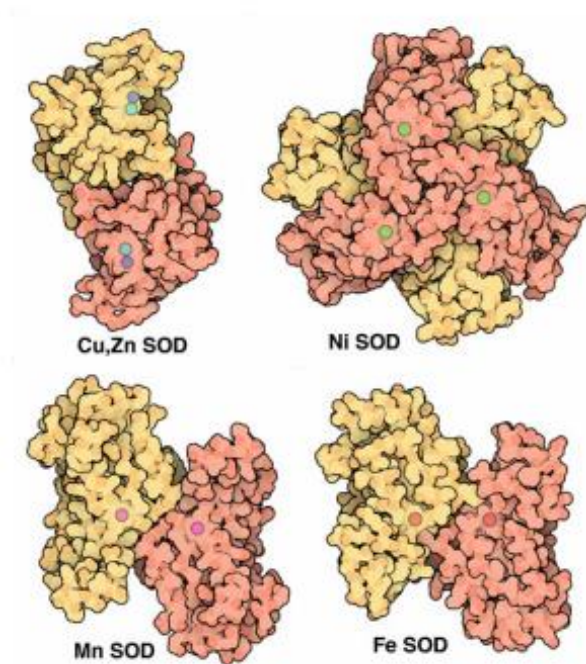
1.4.1. Супероксид-дисмутаза

Дисмутација супероксид анјона ($O_2^{\cdot-}$) је каталисана групом металопротеина под називом супероксид дисмутаза (EC 1.15.1.1). Ови ензими каталишу дисмутацију $O_2^{\cdot-}$ на водоник-пероксид (H_2O_2) и молекул кисеоника (O_2) (McCord и Fridovich, 1969). Реакција се преко протонованог облика супероксид анјон радикала (хидропероксил радикал, HO_2^{\cdot}) може представити на следећи начин:



Као нуспродукт метаболизма кисеоника настаје супероксид анјон ($O_2^{\cdot-}$), те ако његова количина у ћелији није контролисана, може да дође до различитих оштећења. Због тога SOD представља један од есенцијалних ензима за заштиту ћелија од токсичних продуката аеробног метаболизма (McCord и Fridovich, 1969).

Постоје четири изоформе овог ензима сврстане у три велике фамилије супероксид дисмутаза (Сл. 6).

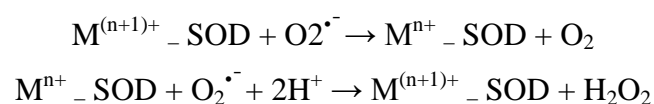


Слика 6. Четири изоформе SOD ензима (преузето са Интернет 7).

У зависности од савијања протеина и металног кофактора постоје три форме SOD ензима:

1. Бакар, цинк тип SOD-а (Cu,Zn-SOD) – везује бакар и цинк;
2. Гвожђе и манган тип SOD-а (Fe-SOD i Mn-SOD) – везују или гвожђе или манган и
3. Никл тип SOD-а (Ni-SOD) – везује никл.

Општи облик реакције, за све изоформе ензима се представља на следећи начин:

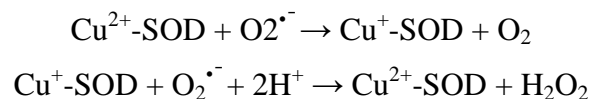


где је М (метални катјон) = (n = 1); Mn (n = 2); Fe (n = 2); Ni (n = 2); Cu, Zn (n = 2). У серији ових реакција, оксидативно стање и наелектрисање металних катјона осцилира између n и n+1, односно износи, +1 и +2 за Cu, или +2 и +3 за остале метале.

1.4.1.1. Бакар, цинк-SOD (Cu,Zn-SOD)

Ова изоформа се састоји од две субјединице и представља хомодимер молекулске масе 32,5 kDa. На активном месту садржи Cu^{2+} и Zn^{2+} јоне (Tainer и сар., 1983). Каталитички активан јон Cu^{2+} бива редукован и оксидован приликом сусрета са

супстратом – супероксид анјон радикалом (Fielden и сар., 1974). Примарна структура ензима показује да је ова изоформа била високо очувана током еволуције (Bannister и сар., 1987). Секундарна структура ове изоформе је β-плоча са мотивом грчког кључа и разликује се од секундарне структуре преостале три изоформе (Tainer и сар., 1982). Изоформа Cu,Zn-SOD је присутна у цитосолу и нуклеусу свих еукариотских ћелија, а у малим количинама се налази и у ћелијској мембрани, липозомима, као и у интермембранском простору митохондрија. Производи се у *in vivo* условима и њен полуживот је 6–10 минута (Hassan, 1988). Изузетно је стабилна и отпорна. Одолева топлотној денатурацији, деловању протеаза и денатуришућих реагенаса, а посебно велика отпорност је уочена приликом третмана хлороформом, етанолом и ацетоном (Forman и Fridovich, 1973). До инактивације Cu,Zn-SOD-а долази након њеног излагања водоник-пероксиду (Beyer и Fridovich, 1987). Реакција дисмутације супероксид анјон радикала се за Cu,Zn-SOD може представити на следећи начин (Tainer и сар., 1983):



У првој реакцији долази до редукције бакра, а супероксид анјон радикал се оксидује, док се у другој реакцији бакар оксидује, а супероксид анјон радикал редукује.

1.4.1.2. Манган-SOD (Mn-SOD) и гвожђе-SOD (Fe-SOD)

Ову фамилију супероксид дисмутаза чине изоформе Mn-SOD и Fe-SOD које су хомотетрамерни протеини или хомологи хомодимери са сличном секундарном структуром, тј. ове изоформе садрже сличне α-хеликсе и β-плоче (Stallings и сар., 1984). Експресија Mn-SOD је обично индукована кисеоником, а ензим се може наћи у митохондријама код еукариота, као и у цитоплазми прокариота. Са друге стране, Fe-SOD је конститутивно експресована у цитосолу прокариота, примитивнијих облика еукариота и у неким зељастим биљкама (Org, 1992). У *in vivo* условима Fe-SOD се конститутивно производи, док је Mn-SOD изоформа индуцибилна (Hassan, 1988).

Индукција Mn-SOD-а изоформе је проучена на више начина, јер је овај ензим од биолошког значаја као део прве линије антиоксидативне заштите. Утврђено је да повећана активност Mn-SOD пружа заштиту током оксидативног стреса. Потврђено је да се инактивација Fe-SOD изоформе врши као и код Cu,Zn-SOD изоформе – до

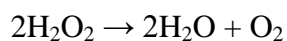
инхибиције активности долази када се ензим нађе у контакту са водоник-пероксидом. Међутим, код Mn-SOD ово није случај (Beyer и Fridovich, 1987). Ако поредимо трајање полуживота Cu,Zn-SOD од 6 до 10 минута и Mn-SOD који има полуживот у трајању од пет до шест часова, уочавамо да је Mn-SOD много стабилнији од Cu,Zn-SOD-a (Beyer и Fridovich, 1987).

1.4.1.3. Никл-SOD (Ni-SOD)

Трећа фамилија SOD ензима, Ni-SOD, је откривена први пут код рода *Streptomyces* (Youn и сар., 1996) и код цијанобактерија (Palenik и сар., 2003). Ова изоформа је продукт *sodN* гена који кодира протеин са N-терминалним крајем дугим 14 аминокиселина. Коначна форма ензима се добија када се уклони N-терминални крај (Youn и сар., 1996). Никл-SOD је мали протеин (дуг 117 аминокиселина) чија аминокиселинска секвенца није хомолога секвенцама осталих SOD. Може да функционише као тетрамер, али доказано је да без никла остаје у облику мономера (Youn и сар., 1996). Код врсте *Streptomyces coelicolor* је примећено да присуство никла доводи до појачане експресије Ni-SOD изоформе, али да истовремено долази до репресије у експресији Fe-SOD (Kim и сар., 1996).

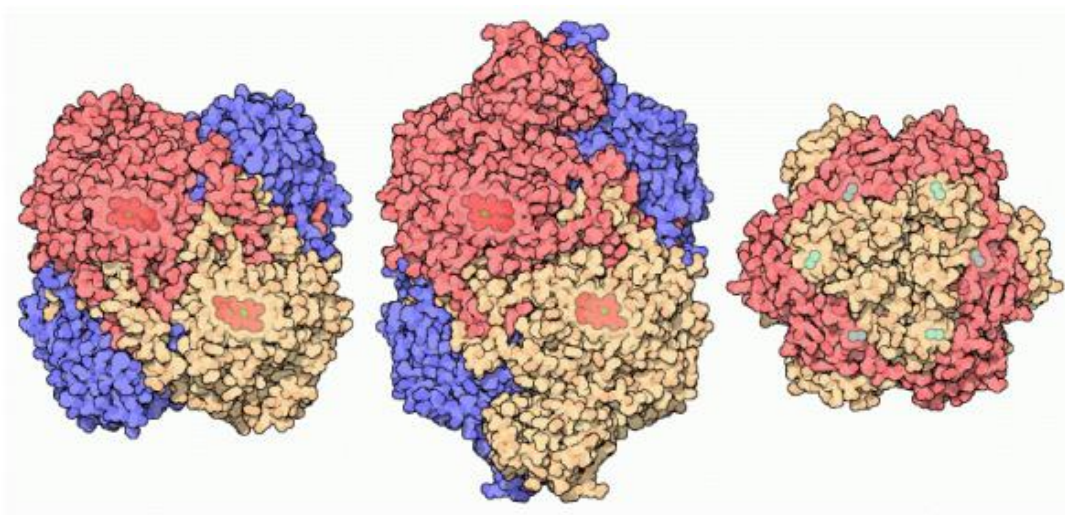
1.4.2. Каталаза

Највише проучавана група ензима су каталазе (EC 1.11.1.6.), односно хидропероксидазе. Назив каталаза први пут је примењен још 1900. године (Loew, 1900). Каталазе имају улогу катализатора у реакцији разградње два молекула водоник-пероксида на воду и кисеоник:



Каталаза је тетрамерни ензим лоциран у пероксизомима. Састоји се из четири полипептидна ланца, где је сваки дуг преко 500 аминокиселина. Делује у широком опсегу рН вредности, између рН 4 и рН 11 (Chelikani и сар., 2004). Каталаза има један од највећих промета (*енгл.* turnover) од свих ензима, јер по молекулу ензима може да разложи више од милион молекула водоник-пероксида. Овај ензим врши детоксикацију у ћелији, па са обзиром на то спада у групу антиоксидативних ензима.

Има две добро познате функције: каталазну активност – катализује реакцију разлагања H_2O_2 на кисеоник и воду, и пероксидазна активност (Ibrahim и сар., 2015). Новија истраживања су показала да каталаза има улогу и оксидоредуктазе, у метаболизму реактивних сумпорних врста (*енгл.* reactive sulfur species, RSS), које имају комплексну улогу у регулацији многобројних ћелијских оксидоредукционих одговора, укључујући дисање, пренос сигнала, експресију гена, ћелијску пролиферацију и смрт (Olson и сар., 2017). Врло рано је примећено да каталаза има заштитну улогу; штити аеробне микроорганизме од смрти узроковане водоник-пероксидом. Такође, познато је да многе бактерије продукују једну или више врста каталаза као одговор на оксидативни стрес (Сл. 7) (Loewen, 1997).



Слика 7. Каталаза у еритроцитима, код људи (лево); једнофункционална бактеријска каталаза (у средини); бактеријска Мн- каталаза (десно) (преузето са Интернет 8).

Постоје три класе протеина који нису повезани по структури, али показују велику каталазну активност (Слика 7). Класа која је најзаступљенија у природи и која је најбоље описана се састоји из једнофункционалних ензима, који садрже хем – једнофункционалне хем-каталазе. Ова класа протеина је подељена у зависности од величине субјединица на: велике (> 75 kDa) и мале (< 60 kDa). Друга, мање заступљена класа такође садржи молекулу хема и састоји се из двофункционалних каталаза-пероксидаза. Ова група је блиско повезана по структури са пероксидазама биљака. Трећа класа укључује каталазе које не садрже хем, већ оне које садрже манган (Klotz и сар., 1997). Поред ове три постоји и четврта, разнолика група, протеина у којој сви садрже хем. Чланови четврте групе су: хлоропероксидазе, пероксидазе биљака и миоглобини, који показују ниску каталазну активност. Ова активност се приписује

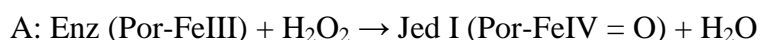
присуству молекула хема у оквиру протеина, јер он сам показује каталитичку активност (Nicholls и сар., 2001).

На основу горе наведених одлика, каталазе могу да се поделе у четири класе, од којих су најбоље проучене прве две класе:

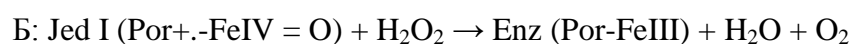
1. једнофункционалне хем-каталазе;
2. каталазе-пероксидазе;
3. каталазе које не садрже хем
4. друге, мање каталазе (Sooch и сар., 2014).

1.4.2.2. Једнофункционалне хем-каталазе

Све хем-каталазе имају заједнички механизам разградње водоник-пероксида. У првој реакцији (А) молекула водоник-пероксида оксидује хем (Por-FeIII) до оксиферил врсте (*енгл.* oxuferryl species) – једињење 1 – Jed I. У овом случају један електрон се уклања са гвожђа, а други са порфириноског прстена хема, при чему настаје порфирин катјонски радикал (*енгл.* porphyrin cation radical) – једињење I



У следећој реакцији (Б) помоћу водоник-пероксида се редукује једињење 1 настало у првој реакцији, при чему се издвајају вода и кисеоник.

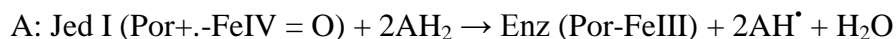


Иако хем-каталазе имају исте реакције, постоји велика разлика у реактивној способности између чланова ове групе. Сматра се да структура саме каталазе утиче на брзину реакције и афинитет ка супстрату (Switala и Loewen, 2002).

Инхибитори каталазе су: азид, аминотриазол и цијанид. Они се везују за гвожђе у хем субјединици и за есенцијални имидазолни прстен. На овај начин инхибитори утичу на стварање ROS-а.

1.4.2.2. Каталазе-пероксидазе

Опште каталитичке реакције у оквиру ове класе се одвијају у два корака, као код једнофункционалних хем-каталаза, упркос постојећим разликама у примарној, терцијарној или кватернарној структури. Ово је првенствено због тога што обе класе каталаза садрже хем у субјединицама. Међутим, пероксидазна реакција представља наредни ниво комплексности укључујући употребу органског донора за редукцију једињења 1, при чему два пута долази до трансфера једног електрона (А).



У присуству одговарајућег органског донора електрона и ниске концентрације H_2O_2 пероксидазна реакција постаје значајна. Међутим, супстрат за пероксидазну активност ових ензима у *in vivo* условима није идентификован (Chelikani и сап., 2004).

1.5. Сузбијање кукурузног пламенца

Имајући у виду све претходно описане особине кукурузног пламенца, ради што ефикаснијег сузбијања ове врсте најчешће се користи интегративни приступ. Ово подразумева примењивање комбинације свих мера које доводе до смањења бројности ове економски значајне врсте. Приступ обухвата коришћење агротехничких мера, гајење отпорних или толерантних хибрида кукуруза, коришћење генетички модификованих организама који испољавају повећану отпорност и толеранцију, интродукцију природних непријатеља или повећање њихових популација и на крају, коришћење хемијског сузбијања употребом инсектицида (Џампраг, 1994).

1.5.1. Агротехничке мере

Предуслов за примену свих осталих мера сузбијања које се налазе у склопу интегративног приступа, код ове економски штетне врсте, јесте примена квалитетних агротехничких мера.

Примарно, агротехничке мере укључују уништавање корова на самом пољу, као и око њега. Кључно је сузбијање корова у цвету, чиме се ограничава допунска исхрана женки и њихова фертилност (Џампраг, 1994). Период задржавања кукурузног пламенца је знатно краћи у пољима без корова, јер јединке ове врсте проводе период

мировања током дана на коровима, те се у њиховом одсуству краће задржавају и одлазе у потрагу за повољнијим условима (Suverkropp и сар., 2008).

У циљу превенције напада друге генерације *O. nubilalis* примењују се такође важне агротехничке мере као што су дубока обрада земљишта и ранија сетва.

Изузетно је важно, такође, да се избегне одлагање времена убирања усева, јер онда гусенице дуже времена оштећују биљке у пољу, што доводи до смањења квалитета плода (Franeta, 2018).

1.5.2. Хемијско сузбијање

Услед неправилног распореда полагања јаја и релативно брзог продирања гусеница унутар биљке, хемијско сузбијање кукурузног пламенца је доста захтевно (Blandino и сар., 2006). Такође, само сузбијање је отежано и неопходним поседовањем адекватне механизације за успешно спровођење овог процеса. Свођење популације кукурузног пламенца на најмању могућу меру је један од битних предуслова за ефикасно деловање инсектицида.

Као ефикасан метод, који штити биљке од момента сетве, показала се примена инсектицида на бази тиаметоксама, тиаклоприда и тефлутрина на семе кукуруза. За сузбијање *O. nubilalis* у Србији су регистровани препарати на бази осам активних супстанци: хлорантранилипрол, хлорантранилипрол + ламбда-цихалотрин, индоксакарб, дифлубензурон, делтаметрин, бифентрин и азадирахтин (Petrović и Sekulić, 2017). Одабиром активних супстанци које припадају различитим хемијским групама смањује се могућност појаве резистенције. Резистенција јединки кукурузног пламенца на хемијске третмане јавља се као последица нестручне употребе инсектицида истог механизма деловања.

Класификација инсектицида је веома разнолика – могу се поделити на више различитих начина. Према начину деловања, инсектициди се деле на: контактне (делују на месту додира са инсектом или биљком), дигестивне (делују након доспевања у систем за варење), инхалационе (делују након удисања), репелентне (делују тако што одбијају извесне штеточине) и регулаторе раста и развоја инсеката.

Према начину примене, инсектициди се могу поделити на: оне које се примењују на земљиште, семе и лист (фолијарно третирање). Такође, инсектициди могу бити несистемични (делују површински) и системични (делују након уласка у биљни организам). Постоје бројне подгрупе на које су подељени пестициди, а неке од њих су:

акарициди (за сузбијање гриња), лимациди или молускоциди (за сузбијање пужева), родентициди (за сузбијање глодара) и афициди (за сузбијање ваши) (Интернет 9).

1.5.2.1. Фобос

Фобос се представља пестицид жуто-мрке боје, са каренцом (време између последње примене и бербе, односно жетве) од 49 дана. Производи се у облику концентрата за емулзију (*енгл.* emulsion concentrate, ЕС). Припада групи несистемичних инсектицида и акарицида са дигестивним и контактним деловањем. Употребљава се при сузбијању економски штетних врста (мољаца, ваши, гриња, итд.) у засадима крушке, јабуке и винове лозе, у усевима стрних жита, кукуруза, кромпира, шећерне репе, уљане репице, дувана, купусњача, краставаца и у украсном биљу (Интернет 10).

Бифентрин је активна супстанца инсектицида Фобос. Хемијски назив бифентрина је 2-метил-бифенил-3-ил-метил(3)-(IRS, ЗРС)-3-(2-хлор-3,3,3-трифлуорпроп-1-фенил)-2,2-диметил-циклопропан-карбоксилат. Бифентрин припада групи супстанци које се називају пиретроиди. Пиретроиди су синтетички деривати природне инсектицидне супстанце пиретрин, која се може наћи у екстракту цветова бухача *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Структурно пиретроиди се карактеришу присуством циклопропанске карбоксилне киселе групе и циклопентенолне групе које су повезане естарском везом. Заједничку карактеристика ових материја је врло кратак полуживот, што је последица фотолабилности. Модификацијом алкохолне компоненте молекула синтетисана је прва генерација пиретроида. Касније су произведени и фотостабилнији пестициди, након модификације киселе компоненте молекула.

Пиретроиди се могу поделити у две категорије: тип 1 и тип 2. Тип 2 пиретроиди садрже α -цијано групу и представљају α -цијано-3-феоксибензил пиретроидне естре. Карактеристика другог типа је повећана биолошка активноцт у односу на тип 1 пиретроиде. Бифентрин је пример треће генерације тип 1 пиретроида. Фобос је откривен, произведен и регистрован у Сједињеним Америчким Државама 1985. године (Riar, 2014). Ова група инсектицида је посебно добила на значају и постала доминантна у употреби након што су се органофосфатни пестициди полако избацивали из употребе услед велике токсичности. Бифентрин је органско једињење које је изграђено од 23 атома угљеника и има молекулску масу од 422,868 Da (Riar, 2014). Дејство пиретроида је базирано на централном нервном систему циљних организама. Механизам деловања ових молекула се заснива на интеракцији са волтажнo-зависним натријумовим

каналима у неуронима. Што доводи до деполаризације нервне мембране услед продуженог уласка јона натријума током ексцитације. Пролонгирана деполаризација доводи до нервне активности која се поновља, те за последицу има хиперексцитацију и смрт (Riar, 2014).

1.5.2.2. Лепинокс

Лепинокс је инсектицид који се користи за сузбијање економски штетних врста из реда лептира (*лат. Lepidoptera*) (Интернет 11). Спада у класу биопестицида, са активном материјом протеином протоксином (провидни кристални протеин са инсектицидним деловањем). Овај протеин је производ бактерије *Bacillus thuringiensis, subsn. kurstaki* (сој EG 2348). *Bacillus thuringiensis* (Bt) је инсектицидна Грам-позитивна бактерија која током спорулације ствара инклузије кристалне структуре. Инклузије садрже две врсте кристалних протеина названих Сру протеини и δ -ендотоксини који су веома токсични за инсекте. Кристални протеини су високо специфични и безбедни за животну средину, те представљају одличну замену за хемијске пестициде и смањују могућност појаве резистенције на пестициде. Ефекат ових токсина на гусенице се постиже ингестијом токсина од стране третиране гусенице, након чега се протоксини растварају и протеолитички активирају, те долази до ослобађања токсичних фрагмената. Током протеолитичке активације, пептиди се одвајају и са аминок- и са карбоксилног краја протоксина (Roh и сар., 2007). Механизам деловања ових токсина је вишестепени процес.

Први корак је везивање активираних токсина за рецепторе који се налазе на апикалној мембрани микровила епителних ћелија средњег црева. После везивања токсина за рецептор, долази до конформационе промене токсина која омогућава његову инсерцију у мембрану. Затим следи олигомеризација токсина, те овај олигомер формира пору која доводи до осмотске лизе ћелије (Roh и сар., 2007).

1.5.2.3. Семафор

Семафор представља несистемични инсектицид којим се спроводи третман семена кукуруза и сунцокрета непосредно пре саме сетве, ради заштите од економски штетних врста. Своје деловање испољава контактано и дигестивно. Нема дејство на инсекте који оштећују надземни део усева. Више дозе испољавају репелентно

деловање на птице. Намењен је сузбијању ларве жичара (фамилија Elateridae). Препарат се наноси на семе, уз додаток воде и константно мешање. Каренца је обезбеђена временом примене препарата, односно биљка је спремна за употребу одмах након жетве, јер довољно времена протекне од момента сетве до убирања плодова (Интернет 12).

Бифентрин је активна материја овог инсектицида, те је механизам деловања овог препарата исти као и код Фобоса.

1.5.2.4. Сонидо

Сонидо се користи се у форми концентроване суспензије. Спада у групу системичних инсектицида за третирање семена кукуруза, у циљу сузбијања ларви жичњака. Приликом бубрења и клијања третирано семе усваја активну материју. Након третмана долази до формирања инсектицидне зоне око семена, која штити семе од могућег напада жичњака. Као и код Семафора, каренца је обезбеђена временом примене препарата (Интернет 13).

Активна материја Сонидо је тиаклоприд који припада групи неоникотиноида, релативно новој класи инсектицида, сличних никотину, који се у пракси најчешће користе. Сматра се да је ова група инсектицида идеална замена за органофосфатне инсектициде, јер се показало да су само незнатно токсични за животну средину. Хемијски назив тиаклоприда је [3-[(6-хлоропиридин-3-ил) метил]-1,3-тиазолидин-2-илиден] цијанамид (Thompson и сар., 2020).

2. ЦИЉ И ХИПОТЕЗА

Имајући у виду чињеницу да је кукурузни пламенац *Ostrinia nubilalis* један од водећих узрочника велике штете на усевима, а самим тим представља економски врло штетну врсту, потребно је спровести велики број различитих истраживања која нам могу пружити детаљан увид у биологију дате врсте. Ради повећања ефикасности хемијске контроле, кључно је пратити одговор ове врсте на инсектицидни третман. Један од могућих одговора је, настанак оксидативног стреса, као последице продукције реактивних кисеоничних радикала у јединкама, након стреса који је проузроковала примена инсектицида. Настанак оксидативног стреса је праћен са активацијом антиоксидативног система заштите, који се огледа, између осталог, кроз продукцију антиоксидативних ензима. Специфични антиоксидативни ензими као и антиоксиданси могу да доведу до значајног смањења штетног дејства инсектицида на организам гусенице.

Циљ истраживања је био испитивање утицаја четири инсектицида: два фолијарна и два инсектицида за третман семена на релативну експресију гена за супероксид дисмутазу и каталазу код кукурузног пламенца.

Радна хипотеза је да се очекује повишена релативна експресија гена за супероксид дисмутазу и каталазу након инсектицидног третмана.

Претпоставка је да ће се јавити одговор како на синтетички тако и на биолошки инсектицид. Међутим, предвиђено је да ће до јачег одговора доћи након примене синтетичког инсектицида, који би требало да доведе до јачег оксидативног стреса у погледу одговора врсте, због карактеристика самих активних материја. Такође, претпоставља се да ће бити разлике у резултатима добијеним након фолијарног третмана и третмана семена, из разлога што се фолијарни инсектициди наносе на површину листа, док инсектициди којима је третирано семе системски улазе у целу биљку.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Биолошки материјал и поставка експеримента

У истраживању као биолошки материјал употребљене су гусенице кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis*, које су преживеле третман инсектицидима. Експеримент је урађен на дијапаузирајућим гусеницама прикупљеним са огледних поља Института за кукуруз „Земун Поље“.

Пре сетве, препарати Семафор (бифентрин) и Сонидо (тиаклоприд) су коришћени за третман семена кукуруза, према упутству произвођача. Третирана зрна кукуруза су посејана машински на огледним пољима Института за кукуруз „Земун Поље“ 3. маја 2019. године. У реду је сејано 20 зрна; размак између биљака је био 25 cm, док је међуредно растојање је било 0,7 m. Фолијарни третман биљака је извршен препаратима Фобос (бифентрин) и Лепинокс (биоинсектицид) 27. јуна 2019. године, уз помоћ моторне прскалице Villager DM 14 PE.

Датум отпочињања бербе кукуруза је био 30. септембар 2019. године. Након завршетка бербе, уклоњени су листови кукуруза и исечене су стабљике до земље, а снопови стабљика су били одложени у пољске лабораторије до момента дисекције. Гусенице су узорковане живе из стабљика, потом им је мерена маса, а затим су замрзаване у течном азоту и чуване на -80°C до момента преношења на Департман за биологију и екологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, где су урађена сва даља испитивања.

Формирано је укупно пет експерименталних група:

1. К – контрола – нетретиране гусенице у стадијуму дијапаузе;
2. ФО – гусенице у стадијуму дијапаузе прикупљене из кукуруза фолијарно третираног синтетичким инсектицидом Фобос;
3. ЛЕ – гусенице у стадијуму дијапаузе прикупљене из кукуруза фолијарно третираног биоинсектицидом Лепинокс;
4. СО – гусенице у стадијуму дијапаузе прикупљене из кукуруза чије је семе третирано синтетичким инсектицидом Сонидо;
5. СЕ – гусенице у стадијуму дијапаузе прикупљене из кукуруза чије је семе третирано синтетичким инсектицидом Семафор.

Свака експериментална група је била сачињена од по три биолошка понављања, а за свако биолошко понављање узете су по две гусенице за изолацију укупне РНК.

3.2. Хомогенизација гусеница и изолација укупне РНК

Из узорака целих гусеница извршена је изолација укупне РНК на леду уз коришћење TRIzol™ Reagent-a, произвођача Invitrogen™ (Масачусетс, САД), према упутству за употребу.

1) Хомогенизација, лизирање узорака и раздвајање фаза:

- ⇒ 50–100 mg целих гусеница је хомогенизовано у авану са тучком, до постизања хомогената у облику праха;
- ⇒ груб хомогенат је пребачен у стерилне тубице од по 2 mL;
- ⇒ ради лизирања ткива, додат је 1 mL TRIzol™ Reagent-a по свакој стерилној тубици;
- ⇒ уследила је инкубација 5 минута на собној температури, ради потпуне дисоцијације нуклеопротеинских комплекса;
- ⇒ затим је додато 0,2 mL хлороформа, без изоамил алкохола, на сваких 1 mL TRIzol™ Reagent-a;
- ⇒ садржај тубица је мешан на вортекс апарату 1 минут;
- ⇒ након вортексирања, уследила је инкубација од 15 минута на собној температури;
- ⇒ узорци су центрифугирани 15 минута на 12.000 g и 4°C, што је довело до раздвајања сваког узорка на три фазе: доњу – органску фазу, која садржи протеине; међуфазу која садржи ДНК молекуле и горњу – водену безбојну фазу која садржи РНК молекуле;
- ⇒ горња фаза је пребачена у нову тубицу помоћу аутоматске пипете, пажљиво, да не би дошло до контаминације ове фазе органском и међуфазом.

2) Таложeње, испирање и растварање укупне РНК:

- ⇒ додато је 0,5 mL изопропанола на сваких 1 mL TRIzol™ Reagent-a коришћеног за лизу ткива;
- ⇒ узорци су мешани на вортекс апарату;
- ⇒ уследила је инкубација у трајању од 10 минута на собној температури;
- ⇒ затим су узорци центрифугирани 10 минута на 12.000 g и 4°C, након чега се створио бели талог (пелет) укупне РНК на дну тубице;

- ⇒ супернатант је пажљиво уклоњен аутоматском пипетом, а талог ресуспендован у минимум 1 mL 70% етанола на сваких 1 mL TRIzol™ Reagent-а коришћеног за лизу;
- ⇒ узорци су кратко вортексовани и центрифугирани 15 минута на 12.000 g и 4°C;
- ⇒ супернатант је пажљиво уклоњен аутоматском пипетом, а талог укупне РНК је сушен 10 минута, водећи рачуна да се не осуши у потпуности;
- ⇒ талог је ресуспендован у 50 µL воде пречишћене од РНазе (*енгл.* ribonuclease-free, RNase-free), уз мешање аутоматском пипетом;
- ⇒ ради потпуног растварања, узорци су инкубирани 15 минута на термоблоку на температури од 60°C.

3.3. Провера очуваности и одређивање концентрације укупне изоловане РНК

У циљу одређивања квалитета и чистоће укупне изоловане РНК извршена је спектрофотометријска анализа на BioSpec-nano (Shimadzu, Јапан) спектрофотометру. На таласним дужинама од 230, 260 и 280 nm мерена је апсорбанца 1 µL узорка укупне РНК. На основу односа апсорбанци на 260 и 230 nm, као и односа на 260 и 280 nm, изведен је закључак да су узорци укупне РНК задовољавајућег квалитета и чистоће.

Експериментално је установљено да раствор чисте нуклеинске киселине при рН 7 у стандардној кварцној кивети ширине 1 cm на 260 nm има апсорбанцу 1, при концентрацији једноланчане РНК од 40 µg/mL. Концентрација укупне РНК се добија коришћењем формуле:

$$\text{РНК} = A_{260} \cdot P \cdot \Phi$$

где је:

A_{260} – измерена апсорбанца узорка РНК на таласној дужини од 260 nm,

P – разблажење,

Φ – фактор 40 (1 OD (*енгл.* optical density) одговара вредности од 40 µg/mL РНК).

Очуваност РНК је утврђена помоћу агарозне гел електрофорезе, користећи следећи протокол:

- ⇒ припремљен је 1% агарозни гел растварањем 1 g агарозе у 100 mL TBE (*енгл.* tris borate EDTA (*енгл.* etylenediaminetetraacetic acid)) пуфера;
- ⇒ ради визуализације РНК, у гел је додато 2,5 μL GelRed[®] Nucleic Acid Stain (Biotium, САД) боје;
- ⇒ гел је изливен у кадицу система за електрофорезу Compact M (Biometra, Немачка);
- ⇒ пре nanoшења на гел, 1 μL узорка РНК и 8 μL воде пречишћене од РНаза су помешани са 1 μL 10x концентрованог пуфера за узорке који садржи формамид, бромфенол-плаво и глицерол;
- ⇒ на гел је нанет по један узорак за сваку експерименталну групу;
- ⇒ у кадицу за електрофорезу је наливена одговарајућа запремина TBE пуфера, док је само развајање трајало 45 минута на 90 V.

По завршетку електрофоретског раздвајања, у комори уређаја BioDoc Analyze (Biometra, Немачка), гел је изложен ултра љубичастом светлу, у циљу визуелизације трака за 28S и 18S рибозомалну РНК и утврђивања евентуалног степена деградације РНК, у случају појаве размаза на гелу. Да би се додатно потврдила очуваност изоловане РНК, гел је усликан у поменутом уређају и квантификовани су интензитети трака код сваког узорка. Израчунат је и RIN (*енгл.* RNA integrity number) број за сваки узорак, дељењем вредности интензитета трака за 28S и 18S рибозомалну РНК.

3.4. Синтеза комплементарне ДНК

Од изоловане укупне РНК, коришћењем комплета High-Capacity cDNA Reverse Transcription произвођача Applied Biosystems[™] (Мичиген, САД), према упутству извршена је синтеза комплементарне ДНК (*енгл.* complementary DNA, cDNA). Препоручено је да се користи до 2 μg укупне РНК по реакцији од 20 μL , тј. да се по реакцији од 20 μL додаје 10 μL укупне РНК. Због тога је концентрација укупне РНК у свим узорцима подешена на 200 ng/ μL додатком стерилне воде третиране DEPC-ом (*енгл.* diethylpyrocarbonate).

Протокол за припрему двоструко концентроване реакционе смеше за реакцију реверзне транскрипције (*енгл.* reverse transcription, RT) био је следећи:

- ⇒ компоненте комплета су одложене на лед до њихове примене;
- ⇒ припремљена је реакциона смеша за RT-PCR (*енгл.* reverse transcription polymerase chain reaction) на основу података у Табели 1;

⇒ Реакциона смеша је благо промешана окретањем тубице горе-доле и одложена на лед.

Табела 1. Запремине компоненти реакционе смеше за једну реакцију RT-PCR-а

Компонента	Запремина (μL)
10x RT пуфер	2,0
25x смеша деоксинуклеозид трифосфата (енгл. dNTP mix) (100 mM)	0,8
10x RT насумичне (енгл. random) почетнице	2,0
MultiScribe™ реверзна транскриптаза	1,0
Вода пречишћена од нуклеаза (енгл. nuclease free)	4,2
Укупно по реакцији	Σ 10,0

Сама реакција реверзне транскрипције је изведена на следећи начин:

- ⇒ припремљене су стерилне тубице од по 0,2 mL, док су се узорци одмрзавали на леду;
- ⇒ испипетирано је по 10 μL 2x концентроване RT реакционе смеше у сваку тубицу;
- ⇒ затим је уследило додавање по 10 μL укупне РНК у сваку тубицу, уз благо мешање аутоматском пипетом;
- ⇒ узорци су кратко центрифугирани, ради уклањања мехурића и сједињавања укупне реакционе смеше;
- ⇒ тубице су држане на леду све до поставке у уређај за RT-PCR

Реакција реверзне транскрипције је изведена на уређају Eppendorf Mastercycler® Gradient S (Хамбург, Немачка), према програму датом у Табели 2.

Табела 2. Програм реакције реверзне транскрипције.

Преинкубација	Температура ($^{\circ}\text{C}$)	Време (min)
1. Преинкубација	25	10
2. Синтеза комплементарне ДНК	37	120
3. Инактивација ензима	54	5
4. Хлађење смеше	4	∞

Након реакције реверзне транскрипције, у сваку тубицу је додато по 140 μL DEPC-третиране воде, у циљу разблаживања комплементарне ДНК осам пута. На овај начин је добијена концентрација комплементарне ДНК од 12,5 ng/ μL , те су разблажени узорци замрзнути на -20°C до даљег коришћења.

3.5. Дизајн почетница

Почетнице које се користе за qPCR се дизајнирају на основу секвенци гена од интереса доступних у бази података NCBI (енгл. National Center for Biotechnology Information). Поручене су од произвођача IDT-Integrated DNA Technologies (Коралвил, САД). Отежавајућа околност приликом дизајна почетница за *sod* и *cat* код *O. nubilalis* је чињеница да геном овог мољца још увек није секвенциран. Овај проблем је превазиђен захваљујући доступности секвенци за *sod* и *cat* код *O. furnacalis*, са којим је утврђено да *O. Nubilalis* може да се укршта (Coates и сар., 2018). Сходно томе гени од интереса поменуте сродне врсте су коришћени у овом експерименту.

Ген за актин је употребљен као референтни, чија је експресија константна у свим експерименталним групама, те је због тога послужио за утврђивање релативне експресије испитиваних гена за супероксид дисмутазу и каталазу. Почетнице за ген актина су купљене од компаније Genet Biotech s.r.o. (Храдец Кралове, Чешка). Секвенце почетница за поменуте гене су приказане у Табели 3.

Табела 3. Почетнице коришћене за квантитативну PCR анализу.

Број	Ген	Секвенца почетница (5' – 3')
1.	Супероксид дисмутаза (SOD)	F:GACTCGCAAATCTCCCTCGT R:GTTGCCGGTAGTCTTGCTGA
2.	Каталаза (CAT)	F:GGCCAGAGACTGCTCATCAA R:GGGCTACACCTTGGGCATTA
3.	Актин	F: CAGAAGGAAATCACAGCTCTAGCC R: ATCGTACTCCTGTTTCGAGATCCA

3.6. Испитивање ефикасности почетница

На уређају CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System произвођача Bio-Rad (Калифорнија, САД) извршена је провера ефикасности и специфичности почетница,

као и релативна квантификација испитиваних гена. За детекцију ампликона коришћен је 2x AMPLIFYME SG Universal Mix произвођача Blirt S.A. (Гдањск, Пољска).

1) Припрема почетница:

- ⇒ тубице са почетницама су кратко центрифугиране на 8.000 rpm, да би се лиофилизат спустио на дно тубица;
- ⇒ почетнице су растворене додавањем стерилне PCR воде, ради подешавања концентрације на 100 μ M;
- ⇒ тубице су вортексоване и кратко центрифугиране, у циљу спуштања садржаја на дно тубица;
- ⇒ затим су тубице постављене на термоблок подешен на 60°C, ради потпуног растварања почетница;
- ⇒ тубице су поново кратко центрифугиране на 8.000 rpm, да би се садржај спустио на дно тубица;
- ⇒ почетнице су разблажене 10 пута коришћењем 90 μ L стерилне PCR воде и 10 μ L почетница концентрације 100 μ M, те је на тај начин је њихова концентрација доведена на радну концентрацију од 10 μ M;
- ⇒ уследило је кратко центрифугирање тубица, ради спуштања садржаја на њихово дно.

2) Припрема реакционих смеша и серија разблажења комплементарне ДНК:

- ⇒ синтетисана комплементарна ДНК, почетнице, 2x AMPLIFYME SG Universal Mix и стерилна PCR вода су чувани на леду након одмрзавања;
- ⇒ аликвоти сваког пула свих експерименталних група су сједињени у једну смешу, ради усредњавања количине транскрипата свих експерименталних група;
- ⇒ направљена је серија разблажења комплементарне ДНК (1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) у стерилним тубицама запремине 0,5 mL;
- ⇒ у стерилним тубицама запремине 0,5 mL направљена је и реакциона смеша, изузимајући комплементарну ДНК, за једну реакцију квантитативног PCR-а (*енгл.* quantitative PCR, qPCR) према подацима у Табели 4;

Табела 4. Компоненте реакционе смеше за једну реакцију qPCR-а.

Компонента	Запремина (μL)
2x AMPLIFYME SG Universal Mix	7,0
Десна (<i>енгл.</i> forward, F) почетница (10 μM)	0,7
Лева (<i>енгл.</i> reverse, R) почетница (10 μM)	0,7
Стерилна PCR вода	1,6
Комплементарна ДНК (12,5 ng/ μL)	4,0
Укупно по реакцији	Σ 14,0

⇒ реакциона смеша за одговарајући број реакција је испипетирана у микротитар плочу са 96 бунарића, а потом је у сваки бунарић додата одговарајућа комплементарна ДНК, за свако разблажење у два техничка репликата;

⇒ микротитар плоча је потом прекривена заштитном фолијом и центрифугирана 2 минута на 200 g, ради спуштања садржаја на дно бунарића.

3) Анализа ефикасности и специфичности почетница спроведена је према двостепеном qPCR програму приказаном у Табели 5.

Табела 5. Програм двостепене qPCR анализе.

Корак	Параметри		
	T ($^{\circ}\text{C}$)	Време (sec)	Услов
1. Активација и почетна денатурација	95	180	/
2. Денатурација	95	5	Вратити се на корак 2 и поновити 44 пута
3. Везивање почетница, екстензија и детекција	60	30	
4. Снимање криве топљења	65-95	5	Повећање температуре за 0,5 $^{\circ}\text{C}$ на сваких 5 sec

4) Након qPCR анализе, помоћу Microsoft Excel-а (Вашингтон, САД) направљени су графикони са C_t (*енгл.* cycle threshold) вредностима и израчунате су ефикасности парова почетница помоћу следеће формуле:

$$\text{Ефикасност (\%)} = (-110 \text{ нагиб праве} - 1) * 100$$

3.7. Квантитативна PCR анализа и релативна квантификација експресије испитиваних гена

На уређају CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System произвођача Bio-Rad (Калифорнија, САД) је извршена квантитативна PCR анализа и релативна квантификација експресије испитиваних гена. Ампликон је детектован употребом 2x AMPLIFYME SG Universal Mix произвођача Bliirt S.A. (Гдањск, Пољска).

1) Квантитативна PCR анализа испитиваних гена:

- ⇒ синтетисана комплементарна ДНК, почетнице, 2x AMPLIFYME SG Universal Mix и стерилна PCR вода су одмрзнути и чувани на леду;
- ⇒ реакциона смеша за одговарајући број реакција за сваки ген, изузимајући комплементарну ДНК, припремљена је у стерилним тубицама од 0,5 mL, према протоколу описаном у поглављу 3.6 и подацима у Табели 4, те је испипетирана у микротитар плочу са 96 бунарића;
- ⇒ потом је у сваки бунарић додата одговарајућа количина комплементарне ДНК сваког узорка у два техничка репликата;
- ⇒ плоча је затим прекривена заштитном фолијом и центрифугирана 2 минута на 200 g, како би се садржај спустио на дно бунарића;
- ⇒ Квантитативна PCR анализа и снимање криве топљења сваке реакције је спроведено према програму описаном у Табели 5.

3.7.1. Релативна квантификација експресије испитиваних гена

Користећи методу по Гангеру и сарадницима (Ganger и сар., 2017) извршена је релативна квантификација експресије испитиваних гена. Према овој методи, Ct вредности референтног и циљних гена у различитим експерименталним групама се коригују логаритмованом ефикасношћу почетница ($\log_{10}E$). Чиме се омогућава да се сва даља прерачунавања обављају на логаритамској скали, те се Ct вредности испитиваних гена одузимају од Ct вредности референтног гена у свакој експерименталној групи, чиме се постиже нормализација експресије испитиваних гена, те се релативна експресија изражава у ΔCt вредностима:

$$\Delta Ct = (\log_{10}E_{\text{реф}} * Ct_{\text{реф}}) - (\log_{10}E_{\text{исп}} * Ct_{\text{исп}})$$

где је:

реф – референтни ген,

исп – испитивани ген.

3.8. Статистичка обрада података

Добијени резултати статистички су обрађени у програму Origin Pro 9.0 (Масачусетс, САД). Примењена је анализа варијансе између различитих узорака применом једнофакторске ANOVA (*енгл.* analysis of variance) анализе и *post hoc* Фишеровог теста (*енгл.* Fisher) за ниво значајности $p < 0,05$. Резултати су приказани графички и табеларно.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Релативна експресија испитиваних гена

За потребе овог рада испитивана је релативна експресија гена који кодирају бакар, цинк супероксид дисмутазу (Cu, Zn SOD) и каталазу. У циљу одређивања експресије употребљен је у хомогенат целих гусеница. Експеримент је извршен на пет група дијапаузирајућих гусеница, од којих једна група представља контролну, док су друге четири групе третиране одабраним инсектицидима. Резултати релативне експресије су приказани графички (График 1 и 2).

Резултати указују на постојање статистички значајне разлике између релативне експресије гена за супероксид дисмутазу и каталазу између контролне групе и група третираних одабраним инсектицидима (График 1 и 2).

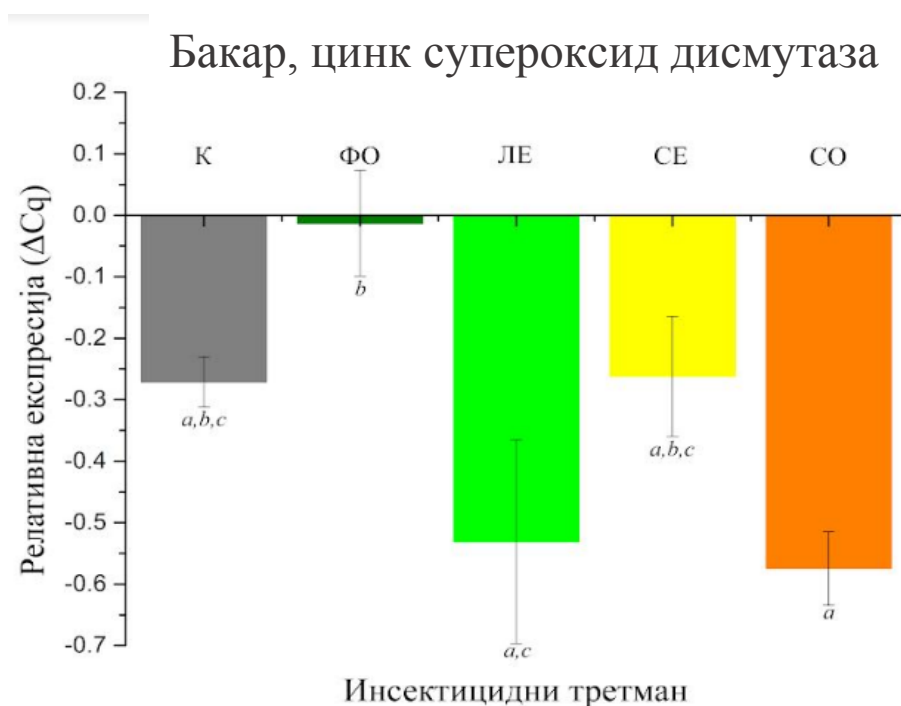


График 1. Релативна експресија гена за супероксид дисмутазу дијапаузирајућих гусеница након инсектицидног третмана (К-контрола, ФО-Фобос, ЛЕ-Лепинокс, СЕ-Семафор, СО-Сонидо). Резултати су изражени преко ΔCq вредности. Статистичка значајност резултата је утврђена употребом једнофакторске ANOVA-е и *post hoc* Фишеровог теста за ниво значајности $p < 0,05$. Статистички значајне разлике између експерименталних група означене су различитим словним ознакама изнад стубића.

Посматрајући Графика 1 опажа се јасна разлика у релативној експресији гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу између третмана са фолијарним и инсектицидима за третман семена. У односу на негативну контролу, статистички најзначајнија разлика у релативној експресији гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу, се опажа након

третмана са синтетичким фолијарним инсектицидом Фобос. Након поменутог третмана долази до значајног појачања релативне експресије датог гена. Инсектицид за третирање семена, Семафор није довео до статистички значајне разлике у релативној експресији гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу након третмана у односу на контролну групу. Фолијарни биопестицид Лепинокс и синтетички пестицид који делује на семе, Сонидо су испољили слично дејство које није статистички значајно, односно довели су до смањења релативне експресију гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу које није статистички значајно, у односу на контролу.

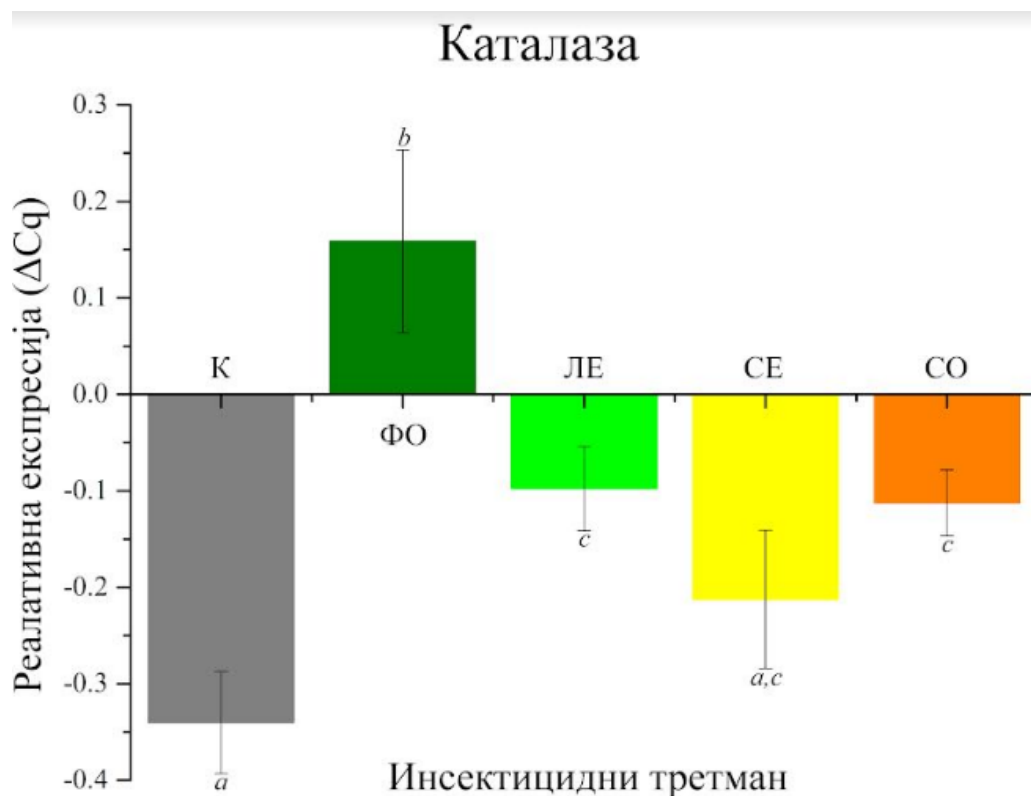


График 2. Релативна експресија гена за каталазу дијапаузирајућих гусеница након инсектицидног третмана (К-контрола, ФО-Фобос, ЛЕ-Лепинокс, СЕ-Семафор, СО-Сонидо). Резултати су изражени преко ΔC_t вредности. Статистичка значајност резултата је утврђена употребом једнофакторске ANOVA-е и *post hoc* Фишеровог теста за ниво значајности $p < 0,05$ Статистички значајне разлике између експерименталних група означене су различитим словним ознакама изнад стубића.

Са Графика 2 се може уочити да постоји статистички значајно виша експресија гена за каталазу након фолијарног третмана инсектицидом Фобос (ФО) у односу на нетретирану контролну групу. У групама третираним бионсектицидом Лепинокс (ЛЕ) и синтетичким пестицидом Сонидо (СО) се може уочити да долази до статистички значајног повећања експресије у односу на контролну групу. Међутим,

пораст релативне експресије гена за каталазу након третмана са инсектицидима Лепинокс и Сонидо је нешто блаже него повећање опажено након третмана са инсектицидом Фобос. Посматрајући групу третирану инсектицидом Семафор (СЕ), уочава се незнатна промена у релативној експресији гена за каталазу односу на контролну групу.

5. ДИСКУСИЈА

Већина инсектицида који су у употреби заснивају своју биоинсектицидну активност на стварању оксидативног стреса код третираних инсеката (Franeta и сар., 2018). Оксидативни стрес изазван применом инсектицида подразумева повећану производњу ROS-а, што доводи до промена у активности ензима попут: SOD, CAT, GR, GST и GSH-Px, као прве линије одбране од процеса оксидоредукције (Franeta и сар., 2018).

У овом истраживању проучаван је ефекат примене одабраних фолијарних (Лепинокс и Фобос) и семенских инсектицида (Семафор, Сонидо) на релативну експресију гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу и каталазу, код гусеница кукурузног пламенца које су преживеле пољски инсектицидни третман. Биљке кукуруза су третиране инсектицидом Фобос у периоду интензивне исхране и убушивања гусеница, што је вероватно пороузроковало уношење веће концентрације пестицида. Ова чињеница се осликава и у резултатима рада, који показују да је највеће повећање релативне експресије гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу (SOD) и каталазу (CAT) управо у овој експерименталној групи, иако ово повећање код SOD-а није било статистички значајно. Применом инсектицида Семафор на семе у случају оба испитивана гена није дошло до статистички значајне промене у експресији у односу на контролну групу. Такође, ни након употребе инсектицида Сонидо и Лепинокс није уочена статистички значајна промена релативне експресије гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу у односу на контролну групу, иако се може уочити тренд њеног снижења. Насупрот томе, резултати релативне експресије гена за каталазу показују да примена инсектицида Сонидо и Лепинокс доводи до статистички значајног повећања релативне експресије овог гена. Генерално посматрано, ни један од четири примењена инсектицида није дао статистички значајне промене у релативној експресији гена за SOD у односу на контролу, док су код гена за CAT три испитивана инсектицида (Фобос, Лепинокс и Сонидо) показали статистички значајно повећање експресије у односу на контролу.

Lu и сар. (2017) су у свом истраживању испитивали релативну експресију и ензимску активност каталазе код мољца *Chilo suppressalis*, који као и кукурузни пламенац припада фамилији Crambidae и реду лептира . Експресију и ензимску активност каталазе су испитивали, између осталог, и након третмана са три различита инсектицида (метоксифенозид, абамектин и хлорантранилпрол). Користили су биоесеј који је обухватао потапање садница пиринча у различита разблажења инсектицида, односно, као што је то случај са Фобосом и Лепиноксом у овом мастер раду, наносили

су инсектициде фолијарно, а мерење генске експресије је такође извршено на преживелим ларвама. Међутим, главна разлика у односу на оглед спроведен у овом мастер раду је та да су аутори спровели оглед у лабораторијским условима, док је у овом мастер раду он изведен у пољским условима, што је значајна разлика у експерименталној поставци. Уочено је да је експресија гена за ензим каталазу била значајно виша код ларви које су третиране абамектином и хлорантранилпролом који имају контактну и дигестивно дејство, као и инсектициди коришћени у нашим експериментима (Фобос, Лепинокс). Међутим, након третмана са метоксифенозидом експресија гена за каталазу је била значајно нижа у односу на контролну групу. С обзиром на то да су сви инсектициди наношени у исто време и на исти начин, овакви резултати се могу оправдати специфичним механизмом деловања сваког појединачног коришћеног инсектицида.

Kim и сар. (2015) су испитивали на који начин хлорид диоксид, комерцијални дезифицијенс, доводи до потпуног леталног ефекта како ларви, тако и одраслих јединки брашнара *Tribolium castaneum*, који такође представља економски штетну врсту инсекта, као и кукурузни пламенац. Хипотеза у овом истраживању је била да хлорид диоксид доводи до значајног повећања нивоа оксидативног стреса код јединки, што води леталном ефекту. Да би тестирали хипотезу мерена је релативна експресија гена за два антиоксидативна ензима: тиоредоксин-пероксидазу и бакар, цинк супероксид дисмутазу. Закључено је да је дошло до статистички значајног повећања експресије гена за SOD након третмана хлорид диоксидом, као што је био случај и у овом мастер раду након третмана Фобосом, фолијарним синтетичким инсектицидом који се показао као најделотворнији у експерименту.

Карвакрол је природно једињење терпена са различитим биолошким активностима. Међутим, неколико студија се посебно фокусирао на његову инсектицидну активност и механизам инсектицидног дејства. Ларве мољца *Lymantria dispar*, као и кукурузни пламенац, припадају реду лептира и представљају економски важне биљоједне инсекте. У истраживању спроведеном 2021. године (Chen и сар., 2021), у циљу даљег изучавања инсектицидног механизма карвакрола, између осталог, истраживан је ефекат карвакрола на експресију антиоксидативних ензима као што су SOD и CAT. Карвакрол су ларве усвајале путем исхране, што је довело до значајног повећања експресије гена за Cu,Zn-SOD и CAT. Овакви резултати су у сагласности са резултатима добијеним у овом експерименту, јер су фолијарни инсектициди Фобос и Лепинокс, које су гусенице усвајале путем исхране, довели до значајног повећања

експресије гена за каталазу, док је код бакар, цинк супероксид дисмутазе ово повећање уочено само након третмана Фобосом.

Трихлорфон је органофосфорни инсектицид који се користи као пољопривредни пестицид за уништавање инсеката, у хуманој медицини као лек за борбу против унутрашњих паразита и као ектопаразитицид у сточарству и аквакултури. Међутим, овај пестицид је изазвао токсичност воде у индустрији циновских слатководних козица *Macrobrachium rosenbergii*. Због тога је 2013. године спроведено истраживање (Chang и сар., 2013) које је имало за циљ да испита утицај трихлорфона на молекуларне и ензимске процесе имунолошког и антиоксидативног одговора циновских слатководних козица које припадају реду Десетоножаца (*лат. Decapoda*). Праћена је генска експресија за Cu,Zn-SOD и CAT у организмима козица третираних додавањем одређене количине трихлорфона у акваријум у ком су козице биле узгајане. Утврђено је да је ниво оксидативног стреса био у порасту након третмана и да је праћен повећаном експресијом гена за супероксид дисмутазу након шесточасовног третмана најјачом концентрацијом. Међутим, дванаесточасовни третман трихлорфоном је довео до потпуно супротних резултата, јер је уочен значајан пад експресије гена за SOD, а напоследку и значајно оштећење ДНК и летални ефекат по козице. Овакви резултати потврђују предходно изведен закључак да је од пресудног значаја време, дужина и количина нанетог инсектицида за успешност третмана. Данас се много чешће уместо органофосфата користи тиаклоприд који припада групи неоникотиноида, а који је коришћен и у овом мастер раду (инсектицид Сонидо), јер је много мање токсичан за животну средину.

Kumar и сар. (2015) су истраживали ефекте комерцијалног избељивача и дезинфекционог средства хлорин диоксид (ClO_2) на мољца *Plodia interpunctella*, који као и кукурузни пламенац спада у ред лептира (*лат. Lepidoptera*). Ово истраживање је засновано на хипотези да је оксидативни стрес индукован ClO_2 главни узрочник леталног ефеката код инсеката. Студија је показала да је ClO_2 довео до угинућа ларви *P. interpunctella* које контаминирају складиштене житарице. Његова активност је била акутна, попут синтетичких неуротоксичних инсектицида. У оквиру овог истраживања праћена је релативна експресија гена за два антиоксидативна ензима: тиоредоксин-пероксидазу и бакар,цинк супероксид дисмутазу. Уочена је повећана експресија SOD-а при нижим концентрацијама ClO_2 , а смањена након примене већих концентрација ClO_2 .

У истраживању спроведеном 2019. године (Kobayashi и сар., 2019) показано је да између осталих испитаних врста SOD-а, ниво релативне експресије Cu,Zn-SOD-а зависи

од узрочника оксидативног стреса (ултраљубичасти зрачења, бактерија, вируса и агрохемијских мера), те да је код свилене бубе *Bombyx mori* релативна експресија Cu,Zn-SOD-а била смањена након 12 часова од тренутка инјектовања ротенона у ларву. Ротенон је кетон природног порекла, који се добија из корена врста породице зевалица (*лат. Fabaceae*), а користи се као инсектицид и свој негативни ефекат испољава преко инхибиције рада митохондрија. Резултати добијени у описаном истраживању су у сагласности са резултатима добијеним у експериментима у овом мастер раду након третмана биоинсектицидом Лепинокс и Сонидо, код којих је уочљив тренд смањења експресије SOD-а.

Године 2014. спроведено је истраживање (Уао и сар., 2014) у коме је праћено како инфекција бактеријом *Bacillus thuringiensis* (Bt), која служи као биоинсектицид, утиче на релативну експресију гена за антиоксидативну заштиту. Увидели су да је релативна експресија гена за протеин налик на каталазу била повећана, након исхране ларви са протеинским продуктом Bt-а. Слични резултати су добијени и у овом мастер раду, где је након третмана Лепиноксом дошло до повећане експресије каталазе.

Liu и сар. (2015) су испитивали ефекат фосфина на ларве воћне мушице *Drosophila melanogaster*. Познато је да је фосфин (PH_3) токсична супстанца за инсекте који наносе велике економске губитке и стога је често у употреби у третманима инсеката. Оксидативно оштећење изазвано PH_3 у организму инсеката штеточина сматра се једним од примарних механизма његове токсичности. У овом експерименту проценили су одговоре неколико оксидативних биомаркера и два главна антиоксидативна ензима, каталазе (CAT) и бакар, цинк супероксид дисмутазе (SOD), након третмана фосфином. Закључили су да код SOD-а долази до повећане генске експресије и активности ензима, док су код CAT активност и експресија гена смањени након третмана са PH_3 , на начин који зависи од времена излагања и саме дозе. Ови резултати су у супротности са резултатима добијеним у овом мастер раду, што се може објаснити начином деловања фосфина који се у форми гаса додавао у кавезе у којима су се налазиле ларве винских мушица, те је испољио инхибиторно дејство на респирацију ларви.

Да би се синтетички пестициди могли као такви користити у пољским или лабораторијским огледима неопходно је да се прво синтетишу, па потом примене на жељене биљке односно инсекте. Синтезу и примену ради човек, те су Ogut и сар. (2011) одлучили да испитају дејство синтетичких пестицида на оксидативни стрес код човека. Тестирали су утицај карбамата, пиреноида и органофосфата. Бифентрин као активна

материја два коришћена инсектицида (Фобос и Семафор) у експерименту спроведеном у овом мастер раду припада групи пиреноида и високо је заступљен у пољопривреди, те је од изузетне важности испитати његов утицај на човека. Људи који су били хронично изложени дејству наведених инсектицида имали су повећан ниво ROS-а, као и повећану активност SOD-а и CAT-а. Повећан ниво оксидативног стреса код људи може да доведе до развоја великог броја болести, а у екстремним ситуацијама и до смртног исхода, те је потребно да се пажљиво и по упутству поступати са поменутих пестицидима.

Чињеница да је експеримент у овом мастер раду извршен на гусеницама које су преживеле инсектицидни третман, а којих је било много мање у поређењу са великим бројем гусеница које су успешно уништене спроведеним третманима, наводи на закључак да инсектициди вероватно индукују значајн ниво оксидативног стреса, а врло могуће и значајније ефекат на експресију гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу и каталазу од претпостављеног. Узимајући у обзир да је ово истраживање извршено у пољским условима, оно представља прелиминарну екотоксиколошку студију. Таква студија има значај не само за сагледавање ефикасности третмана пестицидом, већ и пролонгираних ефеката пестицида на биолошке системе.

Тема овог рада је пионирске природе, имајући у виду да, према нашим сазнањима, не постоје до сада спроведена истраживања у пољу која се баве ефектима комерцијално коришћених пестицида на релативну експресију гена за антиоксидативне ензиме код *O. nubilalis*. Из тог разлога је неопходно спровести додатна истраживања у правцу анализе ефеката датих инсектицида на ову економски веома важну врсту инсекта.

6. ЗАКЉУЧАК

У овом раду је анализирана релативна експресија гена за каталазу и бакар цинк супероксид дисмутазу код ларви кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* које су преживеле пољске третмане одабраним инсектицидима. На основу добијених резултата могу се донети следећи закључци:

- ⇒ Синтетички инсектицид Фобос и биоинсектицида Лепинокс, уколико се фолијарно примењују, доводе до значајног пораста експресије гена за каталазу у односу на контролну нетретирану групу;
- ⇒ Примена синтетичког инсектицида Сонидо на семе такође доводи до значајног пораста релативне експресије гена за каталазу у односу на контролну нетретирану групу;
- ⇒ Синтетички инсектицид Семафор, након семенске примене, није имао статистички значајан утицај на релативну експресију гена за каталазу и бакар, цинк супероксид дисмутазу;
- ⇒ Фолијарни инсектициди Фобос и Лепинокс, као ни семенски инсектицид Сонидо, нису имали статистички значајне ефекте на експресију гена за бакар, цинк супероксид дисмутазу, премда је након третмана Фобосом уочен тренд пораста експресије гена за овај ензим.

Са циљем добијања свеобухватнијих информација које би дале ширу слику биолошких ефеката одабраних инсектицида на систем антиоксидативне заштите инсеката потребно је спровести додатна истраживања на кукурузном пламенцу, како у пољским, тако и у лабораторијским условима.

7.ЛИТЕРАТУРА

A

Almaši, R., Bača, F., Bošnjaković, A., Čamprag, D., Drinić, G., Ivanović, D., Lević, J., Marić, A., Marković, M., Penčić, V., Sekulić, R., Stefanović, L., Šinžar, B., Videnović, Ž. (2002). Bolesti, štetočine i korovi kukuruza i njihovo suzbijanje, Beograd-Zemun: Institut za kukuruz Zemun Polje. Štetočine kukuruza i njihovo suzbijanje. 65(3):65-86.

B

Bača, F., Gošić-Dondo, S., Kaitović, Ž., Hadzistević, D. (2007). European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn) population fluctuation at Zemun Polje between 1986 and 2005. *Maydica*, 52(3): 325–328.

Bannister, J.V., Bannister, W.H. and Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Biochem.*22(5): 111-180.

Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escale, M., Prat, N., Porte, C. (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*. 74(6): 3–19.

Baskin, S. I., i Salem, H.(1997). *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*, Taylor & Francis. Washington SAD.

Bažok, R., Igrc Barčić, J., Kos, T., Gotlin Čuljak, T. Šilović, M., Jelovčan, S., Kozina A. (2009). Monitoring and efficacy of selected insecticides for European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hubn., Lepidoptera: Crambidae) control. *Journal of Pest Science*. 82(3): 311– 319.

Beck, S. D., & Hanec, W. (1960). Diapause in the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübner). *Journal of Insect Physiology*, 4(4), 304-318.

Benaroun J N., Lee D.H. & Goldner A.L. (2001): Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 276: 24261-24267.

Beyer, W.F., Jr., and Fridovich, I. (1987). Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 26(4): 1251-1257.

Blandino, M., Carnaroglio, F., Reyneri, A., Vanara, F., Pascale, M., Haidukowski, M., Saporiti, M. (2006). Impiego di insetticidi piretroidi contro la piralide del mais. *Informatore Agrario*, 62(24): 68–72.

Blandino, M., Reyneri, A., Vanara F., Pascale M., Haidukowski, M., Campagna, C. (2008). Management of fumonisin contamination in maize kernels through the timing of

insecticide application against European corn borer. *Food Additives and Contaminants*. 26(11):1501–1514.

Bourguet, D., Bethenod, M.T., Trouvé, C., Viard, F. (2000). Host-plant diversity of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: What value for sustainable transgenic insecticidal Bt maize?. *Proceedings of the Royal Society of London*. 267(6): 1177–1184.

C

Caffrey, D.J., Worthley, L.H. (1927). A progress report on the investigations of the European corn borer. *Technical Bulletin of the U. S. Department of Agriculture*. 1476(2):1–155.

Čamprag, D. (1994). *Integralna zaštita kukuruza od štetočina*. Novi Sad: Feljton..

Chelikani, P., Fita, I., Loewena, P.C. (2004). Review: diversity of structures and properties among catalases, *CMLS Cell. Mol. Life Sci*. 61(2): 192–208.

Chen YU, Zhang BO, Yang JI, Zou CH, Li TA, Zhang GU, Chen GU. Detoxification, antioxidant, and digestive enzyme activities and gene expression analysis of *Lymantria dispar* larvae under carvacrol. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 24(1): 208-216.

Chang CH, Rahmawaty AT, Chang ZW. 2013. Molecular and immunological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to the organophosphorus insecticide, trichlorfon. *Aquatic Toxicology*. 131 (3): 18-26.

Coates, B.S., Dopman, E.B., Wanner, K.W. and Sappington, T.W. (2018). Genomic mechanisms of sympatric ecological and sexual divergence in a model agricultural pest, the European corn borer. *Current opinion in insect science*, 26, pp.50-56.

D

Denlinger, D. L. (2008). Why study diapause?. *Entomological Research*, 38(1): 1–9.

Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future

Dionne Ariane, Mohamed Khelifi, Silvia Todorova, Guy Boivin. (2018). Design and Testing of a Boom Sprayer Prototype to Release *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Sweet Corn for Biocontrol of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. 61(6): 1867-1879.

F

- Fadamiro HY, Baker TC. (1999). Reproductive performance and longevity of female European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: effects of multiple mating, delay in mating, and adult feeding. *Journal of Insect Physiology*. 45(4):385-392.
- Farooqui, A.A. and Horrocks, L.A. (1998). Lipid peroxides in the free radical pathophysiology of brain diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 18: 599–608.
- Felton G.W. & Summers C.B. (1995): Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 29(6): 187-197.
- Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Lowe, D.J., Mautner, G.N., Rotilio, G. and Calabrese, K. (1974). Mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis *Biochem. J*. 139(4): 49-60.
- Forman, H. J. and Fridovich, I. (1973) On the stability of bovine superoxide dismutase. The effect of metals. *The Journal of Biological Chemistry* 248(8): 2645–2649.
- Franco, R., Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death & Differentiation*. 16(4): 1303–1314.
- Franeta F., Mirčić D., Todorović D., Milovac Ž., Nihat Obradović G., Peric-Mataruga Saša. 2018. Effects of different insecticides on the antioxidative defense system of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis* Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Archives of Biological Sciences*. 70(4): 765-773.
- Franeta, F. (2018). Uticaj insekticida na mortalitet i fiziološki stres gusenica kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) i pojavu sekundarnih gljivičnih infekcija na kukuruzu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 4: 118.

G

- Gaspers C. (2009). The European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.), its susceptibility to the Bt-toxin Cry1F, its pheromone races and its gene flow in Europe in view of an Insect Resistance Management. Unpublished PhD thesis: Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Germany.
- Getzoff, E.D., Cabelli, D.E., Fisher, C.L., Parge, H.E., Viezzoli, M.S., Banci, L., and Hallewell, R.A. (1992). Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature*. 358: 347-351.
- Gibb Timothy. 2015. *Contemporary Insect Diagnostics*. Boston. Academic Press.

Glover TJ, Tang XH, Roelofs WL. (1987). Sex pheromone blend discrimination by male moths from E and Z strains of European corn borer. *Journal of Chemical Ecology*. 13(1):143-151.

H

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford 56(4):365-543.

Hassan, H.M. (1988). Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radic.Biol. Med.* 5(2): 377-385.

I

Ibrahim, M.A., Ghazy, A-H.M., Masoud, H.M.M (2015) Catalase from larvae of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 4: 411–416.

Ighodaro, O.M. and Akinloye, O.A. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 4(2):56-87.

J

Jeffrey A. Gwirtz, Maria Nieves Garcia-Casal. (2014). Technical Considerations for Maize Flour and Corn Meal Fortification in Public Health. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1312(1):66-75.

John L. Capinera. (2005). Relationships between Insect Pests and Weeds: An Evolutionary Perspective. *Weed Science*. 53(6): 892-901.

K

Kim YO, Park JI, Kumar SU, Kwon HY, Na JA, Chun YO, Kim WO. Insecticidal activity of chlorine dioxide gas by inducing an oxidative stress to the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. 2015. *Journal of Stored Products Research*. 64(4):88-96.

Kim, F.J., Kim, H.P., Hah, Y.C., and Roe, J.H. (1996). Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *Eur. J. Biochem.* 241(4): 178-185.

Klotz, M.G., Klassen, G.R. and Loewen, P.C. (1997) Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* 14(6): 951–958.

Kobayashi, Y., Nojima, Y., Sakamoto, T. (2019) Comparative analysis of seven types of superoxide dismutases for their ability to respond to oxidative stress in *Bombyx mori*. *Sci Rep*. 9 (2): 2150-2170.

- Kojić, D., Spasojević, I., Mojović, M., Blagojević, D., Worland, M. R., Grubor-Lajšić, G., Spasić, M. B. (2009). Potential role of hydrogen peroxide and melanin in the cold hardiness of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology*, 106(3): 451.
- Koštal, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of insect physiology*, 52(2): 113–127.
- Kumar SU, Park JI, Kim EU, Jahyun NA, Chun SY, Kwon HY, Kim WO, Kim YO. 2015. Oxidative stress induced by chlorine dioxide as an insecticidal factor to the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 124(4): 48-59.
- Kereši, T., Vajgand, D., Milovac, Ž. (2014) Važnije štetočine kukuruza iz reda Lepidoptera. *Biljni lekar*, 42 (2-3), 184-199.

L

- Liu TA, Li LI, Zhang FA, Wang YU. 2015. Transcriptional inhibition of the Catalase gene in phosphine-induced oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 124(3): 1-7.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 4: 118.
- Loew, O. (1900) Physiological studies of Connecticut leaf tobacco. U.S. Dept. of Agri.Repts. 56(3): 5–57.
- Loewen, P.C. (1997) Bacterial catalases. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, pp. 273–308. Scandalios J. G. (ed), Cold Spring Harbor.
- Lu YA, Bai QI, Zheng XU, Lu ZH. 2017. Expression and Enzyme Activity of Catalase in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) Is Responsive to Environmental Stresses. *Journal of Economic Entomology*. 110(4):Issue 4, 1803–1812.

M

- MacRae, T. H. (2010). Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and Molecular life sciences*, 67(14), 2405-2424.
- Mates, J.M., Sanches-Jimenez, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 32: 157–70.
- Matteson J. W., Decker G. C. 1965. Development of the European Corn Borer at Controlled Constant and Variable Temperatures. *Section of Economic Entomology, Illinois Natural History Survey, Urbana*. 32(3):333-349.

- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(7): 6049-6055.
- Meissle, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X., Vasileiadis, V. P., Otto, S., Antichi, D., Kiss, J., Palinkas, Z., Dorner, Z., Van der Weide, R., Groten, J., Czembor, E., Adamczyk, J., Thibord, J. B., Melander, B., Nielsen, G.C., Poulsen, R. T., Zimmermann, O., Verschwele, A., Oldenburg, E. (2010). Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. *Journal of Applied Entomology* 134(5):357–375.
- Meng J. Y., Zhang C. Y., Zhu F., Wang X. P., Lei C. L. (2009). Ultraviolet light-induced oxidative stress: effects on antioxidant response of *Helicoverpa armigera* adults. *J. Insect Physiol.* 55(4): 588–592.
- Monaghan Pat, Metcalfe Neil B., Torres Roxana. (2008). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *12(1):75-92.*
- Muruuna Arna, Munnop Eucene. 2016. Taxonomy and distribution of the European Cornborer and Allied Species: Genus *Ostrinia* (Lepidoptera:Pyralidae). *Memories of the Entomological society of Canada.* 76(4):453-874.

N

- Nation, J. (2008). *Insect physiology and biochemistry*. 2nd Edition. CRC Press.
- Nicholls, P., Fita, I. and Loewen P.C. (2001) Enzymology and structure of catalases. *Adv.Inorg. Chem.* 51(4): 51–106.
- Niki, E. (1993). Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, eds. *Free radicals: from basic science to medicine*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag. 365–373.
- Nordin, J. H., Cui, Z., & Yin, C. M. (1984). Cold-induced glycerol accumulation by *Ostrinia nubilalis* larvae is developmentally regulated. *Journal of Insect Physiology*, 30(7), 563-566.

O

- Ogut S, Gultekin F, Nesimi Kisioglu A, Kucukoner E. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicology and Industrial Health.* 2011;27(9):820-825.
- Olson, K.R., Gao, Y., DeLeon, E.R., Arif, M., Arif, F., Arora, N., Straub, K.D. (2017). Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: an ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species (rss), *Redox Biol.* 12(2): 325–339.

Orr, W. C. (1992) in *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems* (Scandalios, J.G., Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 231-261.

P

Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E.E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E. A., and Waterbury, J. (2003). The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*. 424(3): 1037-1042.

Petrović, M., Sekulić, J. (2017). *Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji* (2017).

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci: IJBS*.34(2): 4-89.

Picardo, M., Passi, S. (1997). Free radicals, in: J.D. Bos (Ed.), *Skin immune system (SIS)*, CRC Press, Boca Raton, New York. 34(3):207-226.

Popović, Ž. D. (2014). *Molekularna i biohemijska osnova dijapauze kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lepidoptera: Pyralidae)*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.

Popović, Ž. D., Subotić, A., Nikolić, T. V., Radojičić, R., Blagojević, D. P., Grubor-Lajšić, G., Košťál, V. (2015). Expression of stress-related genes in diapause of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 186(3): 1–7. *prospecta. Japi*. 52: 794–804.

R

Revilla, P., Soengas, P., Malvar, R. A., Carrea, M. E., Ordás, A. (1998). Isozyme variation and historical relationships among the maize races of Spain. *Maydica*. 43(2): 175–182.

Riar, N. K. (2014). Bifenthrin. *Encyclopedia of Toxicology*, 449-451.

Rikans, L.E., Hornbrook, K.R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochem. Biophys. Acta* 1362: 116–127.

Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H., (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17(4): 547–559.

S

Saladini, M. A., Blandino, M., Reyneri, A., Alma, A. (2008). Impact of insecticide treatments on *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) and their

influence on the mycotoxin contamination of maize kernels. *Pest Management Science*. 64(7): 1170– 1178.

Sarajlić, A. (2015). Utjecaj abiotskih čimbenika na pojavu kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis* Hübner), doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.

Sooch, B.S., Kauldhar, B.S., Puri, M. (2014). Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification. *Biotechnol Adv.* 32(4): 1429–47.

Stallings, W.C., Patridge, K.A., Strong, R.K., and Ludwig, M.L. (1984). Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J. Biol. Chem.* 259(3): 10895-10699.

Storey, K. B. (1997). Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(4), 1115-1124.

Storey, K. B., Baust, J. G., & Storey, J. M. (1981). Intermediary metabolism during low temperature acclimation in the overwintering gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Comparative Physiology*, 144(2), 183-190.

Storey, K.B. Storey, J.M. (2001). Hibernation Poikilotherms. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group.

Storey, K.B., Storey, J.M. (2012). Insect cold hardiness: metabolic, gene, and protein adaptation. *Canadian Journal of Zoology*, 90(4): 456–475.

Suverkropp, B. P., Dutton, A., Bigler, F., van Lenteren, J. C. (2008). Oviposition behaviour and egg distribution of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, on maize, and its effect on host finding by *Trichogramma* egg parasitoids. *Bulletin of insectology*. 61(2): 303–312.

Switala, J. and Loewen, P.C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* 401(2): 145–154.

T

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Beem, K.M., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (1982). Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 760(3): 181-217.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (1983). Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. 306(7): 284-287.

Thompson, D.A., Lehmler, H.J., Kolpin, D.W., Hladik, M.L., Vargo, J.D., Schilling, K.E., LeFevre, G.H., Peeples, T.L., Poch, M.C., LaDuca, L.E. and Cwiertny, D.M. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current

knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22(6): 1315–1346.

Trenam, C.W., Blake, D.R., Morris, C. (1992). Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron, *J. Invest. Dermatol.* 99: 675-682.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39(6): 44-84.

Vukašinović, E. (2014). Analiza lipida i masnih kiselina nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) (Insecta: Lepidoptera). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

W

Wills, E.D. (1971). Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 123(3): 983–991.

Y

Yao J.; Buschman L.; Lu N.; Khajuria C.; Zhu K. (2014) Changes in Gene Expression in the Larval Gut of *Ostrinia nubilalis* in Response to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Protoxin Ingestion. *Toxins*. 6 (4): 1274-1294.

Yocum, G. D., Rinehart, J. P., Horvath, D. P., Kemp, W. P., Bosch, J., Alroobi, R., & Salem, S. (2015). Key molecular processes of the diapause to post-diapause quiescence transition in the alfalfa leafcutting bee *Megachile rotundata* identified by comparative transcriptome analysis. *Physiological Entomology*, 40(2), 103-112.

Yoshikawa, T. and Naito, Y. (2002). What Is Oxidative Stress? *JMAJ*. 45(3): 271-276.

Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C., and Kang, S.O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318 (3): 889-896.

Интернет извори

Интернет 1: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> Коришћени филтери:

production/crops: Countries or regions: world; Elements: area harvested; items aggregated: maize; Years: 2016

[Приступљено: 20.06.2022.]

Интернет 2: <http://www.hidmet.gov.rs> Republički hidrometeorološki zavod Srbije, (2013-2017): Meteorološki godišnjak – klimatološki podaci.

[Приступљено: 20.06.2022.]

Интернет 3: https://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/e_corn_borer.htm

[Приступљено: 20.06.2022.]

Интернет 4:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.vectorstock.com%2Froyaltyfree-vector%2Fmoth-life-cycle-diagram-vector-23247575&psig=AOvVaw28d45mB4_q90jtQcwXOvxd&ust=1646743966867000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwjY_9u6hbT2AhVIYxoKHUgMCC8QjRx6BAgAEAk

[Приступљено: 20.06.2022.]

Интернет 5: <https://www.ciencia-e-vinho.com/2018/08/19/neuroprotective-effect-of-wine-against-hydrogen-peroxide-induced-oxidative-stress-in-human-neuron-like-cells/>

[Приступљено: 21.06.2022.]

Интернет 6: <https://healthclub.rs/zdrav-zivot/sta-su-slobodni-radikali-i-zasto-su-oni-stetni-za-nas/>

[Приступљено: 21.06.2022.]

Интернет 7: <https://pdb101.rcsb.org/motm/94>

[Приступљено: 21.06.2022.]

Интернет 8: <https://pdb101.rcsb.org/motm/57>

[Приступљено: 21.06.2022.]

Интернет 9: <https://www.agromarketsrbija.rs/srb/zastita-bilja/7/insekticidi>

[Приступљено: 21.06.2022.]

Интернет 10: <https://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6ostnub.htm>

[Приступљено: 22.06.2022.]

Интернет 11: <https://www.agromarketsrbija.rs/srb/proizvod/185/Biozastita/LEPINOX-PLUS>

[Приступљено: 22.06.2022.]

Интернет 12: <http://www.hemoslavija.co.rs/zastita-bilja/tretiranje-semena/702-semafor-fs.html>

[Приступљено: 22.06.2022.]

Интернет 13: <https://www.cropscience.bayer.rs/proizvodi-zastita-bilja/tretmansemena/sonido.aspx>

[Приступљено: 22.06.2022.]

Интернет 14: [https://www.worldometers.info/world-population/#:~:text=World%20Population%20Clock%3A%207.96%20Billion%20People%20\(2022\)%20%2D%20Worldometer](https://www.worldometers.info/world-population/#:~:text=World%20Population%20Clock%3A%207.96%20Billion%20People%20(2022)%20%2D%20Worldometer)

[Приступљено: 27.06.2022.]

БИОГРАФИЈА



Оливера Попов је рођена 05. јуна 1998. године у Новом Саду. Основну школу „Ђорђе Натошевић“ завршила је 2013. године као добитница Вукове дипломе. Гимназију „Јован Јовановић Змај“, друштвено-језички смер, завршила је 2017. године. Исте године уписује основне студије биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Новом Саду, које завршава 2021. године са просеком 9,69. Током основних студија, учествовала је у реализацији манифестације „Ноћ биологије“ на Природно-математичком факултету. Учествовала је у раду три универзитетске лабораторије. У периоду од јануара до јула 2020. године, учествовала је у размени студената преко Erasmus + програма мобилности на Универзитету у Турку у Финској. Студентски рад који је написала на четворој години студија, добио је награду у оквиру конкурса за научне и стручне радове Универзитета у Новом Саду. За успех остварен на основним студијама добила је статус штићеника Фондације „Привредник“, а такође награђена је и са Универзитетском и Доситејевом стипендијом. На Природно-математичком факултету 2021 уписује мастер академске студије, модул молекуларна биологија, током којих је положила све испите прописане планом и програмом са просечном оценом 9.80. Добитница је Доситејеве стипендије за школску 2021/22 годину. Осим српског, говори течно енглески језик и француски језик.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број:

РБР

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације: Монографска документација

ТД

Тип записа: Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада: Мастер рад

ВР

Аутор: Оливера Попов

АУ

Ментор: ванр. проф. др Жељко Д. Поповић, УНСПМФ

МН

Наслов рада: Дејство одабраних пестицида на релативну експресију гена за каталазу и супероксид дисмутазу кукурузног пламенца *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)

НР

Језик публикације: српски (ћирилица)

ЈП

Језик извода: српски/енглески

ЈИ

Земља публикавања: Република Србија

ЗП

Уже географско подручје: Војводина

УГП

Година: 2022.

ГО

Издавач: Ауторски репринт

ИЗ

Место и адреса: Природно-математички факултет, Трг Доситеја

МА Обрадовића 3, Нови Сад

Физички опис рада: поглавља (.7.); стр. (.81.); табела (.5.); графикона (.2.);

ФО слика (.6.); лит. навода (.97.);

Научна област: Биологија

НО

Научна дисциплина: Биохемија и молекуларна биологија

НД

Предметна одредница/ Кукурузни пламенац, *Ostrinia nubilalis*, дијапауза,

кључне речи: инсектициди, генска експресија, антиоксидативни

ПО ензими, супероксид дисмутаза, каталаза, оксидативни

УДК стрес

Чува се: Библиотека Департмана за биологију и екологију,

ЧУ Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 2, Нови Сад

Важна напомена:

нема

ВН

Извод:

ИЗ

Од великог значаја су проучавања врста које наносе велике економске губитке на најзначајнијим пољопривредним културама као што је кукуруз, врста која проузрокује највеће економске губитке на пољима кукуруза је дијапаузирајући мољац *Ostrinia nubilalis*. Дијапауза је хипометаболичка врста мировања коју карактеришу смањена стопа оксидативног метаболизма, синтеза заштитних молекула, акумулација енергетских резерви и експресија специфичних гена. Доказано је да дијапаузирајуће врсте имају знатно већу отпорност на инсектицидне третмане, те је од великог значаја спровођење истраживања која за циљ имају тестирање биолошког одговора на пестициде који се налазе комерцијално у употреби. Инсектицидни третман може довести до оксидативног стреса, у оквиру чега се продукују ензими антиоксидативне заштите као што су супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT). Испитиван је утицај два фолијарна и два семена инсектицида, од којих је један биолошки, док су остали синтетички. У оквиру експеримента урађена је провера да ли инсектицидни третман доводи до појаве оксидативног стреса код преживелих ларви *O. nubilalis*, који ће резултовати повећаном експресијом гена за SOD и CAT. Укупна РНК је изолована из хомогената целих дијапаузирајућих гусеница петог инстара које су преживеле инсектицидни третман. Након синтезе комплементарне ДНК, спроведена је квантитативна PCR анализа, те је помоћу добијених Cq вредности израчуната релативна експресија гена користећи актин као референтни ген. Показано је да

постоји статистички значајно повећање релативне експресије гена за SOD и CAT у односу на контролну групу приликом примене синтетичког инсектицида Фобос. Биолошки инсектицид Лепинокс и синтетички инсектицид Сонидо довели су до статистички значајно повећане експресије гена за CAT, док је код релативне експресије гена за SOD дошло до блажег смањења. Приликом примене инсектицида Семафор на семе није дошло до статистички значајних промена у релативној експресији ни једног од испитиваних гена у односу на контролну групу. Резултати овог истраживања су пионирске природе, јер према нашим сазнањима не постоје подаци о ефекту пестицида на експресију овде испитиваних гена.

Датум прихватања теме од

НН већа: 07.07.2022.

ДП

Датум одбране:

29.7.2022.

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник:

проф. др Данијела Којић, УНСПМФ

ментор:

ванр. проф. др Жељко Д. Поповић, УНСПМФ

члан:

др Снежана Гошић-Дондо, Институт „Земун Поље“

резервни члан:

проф. др Јелена Пураћ, УНСПМФ

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

Monograph publication

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Content code:

Master Thesis

CC

Author:

Olivera Popov

AU

Mentor/comentor:

Željko D. Popović, Ph.D., Associate professor, UNSPMF

MN

Title:

The impact of selected pesticides on relative expression of superoxide dismutase and catalase, two antioxidant enzyme genes, in the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)

TI

Language of text:

Serbian (Latin)

LT

Language of abstract: English

LA

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2022.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publication place: Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

PP

Physical description: chapters (.7.), pages (.81.), references (.97.), figures (.6.),
PD tables (.5.), graphs (.2.)

Scientific field: Biology

SF

Scientific discipline: Biochemistry and Molecular Biology

SD

Subject/ Key words: European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, diapause,

SKW

insecticides, gene expression, antioxidative enzymes,

UC

superoxide dismutase, catalase, oxidative stress

Holding data:

Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of

HD

Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad

Note: none

N

Abstract:

AB

Research on economically significant pests of agricultural crops, such as corn, is of great importance, the most damaging insect species, when it comes to corn crops, is the diapausing moth *Ostrinia nubilalis*. Diapause is a hypometabolic type of rest characterized by a reduced rate of oxidative metabolism, synthesis of protective molecules, accumulation of energy reserves and expression of specific genes. It has been proven that diapausing species have a significantly higher resistance to insecticide treatments, so conducting research aimed at testing the biological response is of great importance. Insecticide treatment can cause oxidative stress, in response to which antioxidant protection enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), are produced. The effect of two foliar and two seed insecticides was tested. One of the four insecticides is a bioinsecticide, while the other three are synthetic. As part of the experiment, it was examined whether the insecticide treatment leads to the occurrence of oxidative stress in the larvae of *O. nubilalis*, which will result in increased expression of *sod* and *cat* genes. Total RNA was isolated from homogenates of whole-body diapausing 5th instar larvae that survived the insecticide treatment. After the

synthesis of complementary DNA, quantitative PCR analysis was carried out, and relative gene expression was calculated using the Cq values obtained using actin as the reference gene. It was shown that there is a statistically significant increase in the relative expression of both *sod* and *cat* genes in comparison to the control group when applying the synthetic insecticide Phobos. The biological insecticide Lepinox and the synthetic insecticide Sonido led to a statistically significant increase in the expression of *cat* gene, while the relative expression of the gene for SOD was mildly decreased. When applying the insecticide Semaphore to seeds, there were no statistically significant changes in the relative expression of any of the tested genes compared to the control group. The results of this research are of a pioneer nature, as to our knowledge there is no data on pesticide treatment affects the expression of genes analysed in this study.

Accepted by the Scientific

Board: 07.07.2022.

ASB

Defended on: 29.07.2022.

DE

Thesis defend board:

DB

President: Danijela Kojić, Ph.D., Full Professor, UNSPMF

Supervisor: Željko D. Popović, Ph.D., Associate Professor, UNSPMF

Member: Snežana Gošić-Dondp, Ph.D., Institute 'Zemun Polje'

Substitute member: Jelena Purać, Ph.D., Full Professor, UNSPMF