

Primerjava tradicionalnih in sodobnih metod za določanje gospodarsko pomembnih vrst strun (Coleoptera: Elateridae)

Eva PRAPROTNIK^{1,2}, Jaka RAZINGER¹, Stanislav TRDAN³

Received October 05, 2020; accepted December 26, 2020.
Delo je prispelo 05. oktobra 2020, sprejeto 26. decembra 2020.

Primerjava tradicionalnih in sodobnih metod za določanje gospodarsko pomembnih vrst strun (Coleoptera: Elateridae)

Izvleček: Strune so ličinke hroščev pokalic (Coleoptera: Elateridae) in so znane kot gospodarsko pomembni škodljivci. Poznavanje vrstne diverzitete strun na določenem območju je pomembno, saj se ekološke zahteve posameznih vrst razlikujejo, to pa vpliva na izbor ustreznih načinov zatiranja. Morfološko določanje strun je zahtevno in pogosto je razlikovanje med posameznimi vrstami skoraj nemogoče. Molekularne metode zato ustrezno dopolnjujejo morfološke metode, in sicer se za molekularno določanje strun najpogosteje uporablja mitohondrijski gen za citokrom oksidazo I. V članku navajamo molekularne, morfološke in vedenjske metode za določanje strun, prav tako izpostavljamo tudi prednosti in slabosti naštetih metod. Na koncu članka je priložen poenostavljen morfološki določevalni ključ za določevanje gospodarsko pomembnejših vrst strun rodu *Agriotes* v slovenskem jeziku.

Ključne besede: strune; morfološko določanje; molekularno določanje; vedenjski vzorci

Comparison of traditional and modern methods for identification of economically important wireworm species (Coleoptera: Elateridae)

Abstract: Wireworms are larvae of click beetles (Coleoptera: Elateridae) and are well known pests of economic importance. Knowing the species diversity in a particular area is important, as the ecological requirements and consequent management strategies of individual species vary. Morphological identification of wireworms is challenging; separating between individual species is often almost impossible. Molecular methods therefore complement morphological methods. Mitochondrial gene for cytochrome oxidase I is most commonly used for molecular identification of wireworms. In this study we list molecular, morphological and behavioural methods for wireworm identification and also highlight the advantages and disadvantages of these methods. At the end of the article, a simplified morphological identification key for determining economically important wireworm species of the genus *Agriotes* in Slovenian language is attached.

Key words: wireworms; morphological identification; molecular identification; behavioural patterns

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova, Ljubljana

² Korespondenčni avtor, e-naslov: eva.praprotnik@kis.si

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, Jamnikarjeva, Ljubljana

1 UVOD

Strune so polifagne ličinke hroščev pokalic (Coleoptera: Elateridae) in so na svetovni ravni znane kot eni najpomembnejših talnih herbivorov na kmetijskih zemljiščih. Družina Elateridae je ena izmed vrstno najštevilčnejših družin hroščev, vendar njeni filogenetski odnosi še vedno niso dorečeni (Gur'yeva, 1974; Kandrata in Bocak, 2011; Lawrence in Newton, 1995). Večina najpomembnejših kmetijskih škodljivcev v Evropi pripada rodu *Agriotes* (Furlan, 2014; Tóth in sod., 2003), v Severni Ameriki rodovom *Hypnoidius*, *Agriotes*, *Limonius*, *Ctenicera*, *Aeolus* in *Melanotus* (Morales-Rodriguez in sod., 2014; Saguez in sod., 2017), v Aziji rodovoma *Agriotes* in *Melanotus* (Oba in sod., 2015), v Avstraliji pa rodovom *Conoderus*, *Agrypnus*, *Heteroderes*, *Arachnodima* in *Haptesus* (Calder, 1996).

Strune lahko uvrstimo v kriptične vrste, saj je predstavnike določenih vrst med seboj težko oziroma praktično nemogoče ločiti na podlagi morfoloških znakov. Zaradi zapletene sistematike in življenjskega kroga v tleh so bile strune do nedavnega obravnavane kot en sam škodljivec. Temu primerni so bili tudi varstveni ukrepi, kjer so smernice narekovala enake načine zatiranja, ne glede na vrstno sestavo strun na določeni lokaciji. Vendar je potrebno upoštevati, da so strune talne žuželke z raznolikimi prehranjevalnimi navadami in njihova vloga v ekosistemu ni vedno jasna. Na primer vrsta *Glyphonyx bimarginatus* Schaeffer, 1916 je ena izmed pomembnejših škodljivcev sladkornega trsa na Floridi (Cherry, 2007), vendar ne velja za pomembnega škodljivca krompirja (Langdon in Abney, 2017). Vrsti *Conoderus exsul* (Sharp, 1877) in *Agrypnus variabilis* (Candeze, 1857) sta na Havajih in v Avstraliji pomembna škodljivca sladkornega trsa, na Novi Zelandiji pa sta vrsti pomembna plenilca ličink bojevnike muhe *Inopus rubriceps* (Macquart, 1847), ki je škodljivec trav na pašnikih (Robertson in Pottinger, 1979; Williams in Galbreath, 1987). Danes, ko družba zahteva okolju prijaznejše načine zatiranja škodljivcev in je uporaba biotičnih agensov v porastu (Ansari in sod., 2009; Kabaluk in sod., 2007; Kleespies in sod., 2013), v ospredje prihaja potreba po znanju o posebnih ekoloških zahtevah posameznih vrst (Hermann in sod., 2013) in njim ustreznih metodah za učinkovito integrirano varstvo pridelkov.

Obstoječi morfološki določevalni ključji ter molekularne analize so pogosto omejeni na posamezno geografsko območje oziroma se osredotočajo le na izbrane taksonomske skupine. Vendar je potrebno upoštevati, da se zaradi spremenjenih kmetijskih praks in vnosa tuje-rodnih vrst spreminja sestava (kompleks) vrst na posameznih območjih. Primer je vnos evropskih vrst *Agriotes obscurus* (Linnaeus, 1758) in *Agriotes lineatus* (Linnaeus,

1767) v Britansko Kolumbijo v začetku 20. stoletja (King, 1950). Vrsti sta tako do leta 2000 že veljali za pomembna škodljivca vrtnin ter okrasnih in krmnih rastlin v Severni Ameriki (Vernon in sod., 2001).

Ena od metod za določanje strun je njihovo gojenje do stadija imaga, saj je morfološko določanje odraslih osebkov enostavnejše in zanesljivejše (Leseigneur, 1972; Lohse, 1979; Jiang, 1999; Laibner, 2000; Cate, 2007; Prosvirov, 2013). Ta metoda pri strunah ni najbolj praktična, saj le-te potrebujejo več let, da zaključijo svoj življenjski krog v tleh, hkrati pa se dolžina larvalnega stadija med vrstami močno razlikuje, na primer pri vrstah *Agriotes* spp. štiri do sedem let (Furlan, 1998; Miles, 1942), pri vrsti *Limonius californicus* (Mannerheim) štiri do enajst let (EPPO, 2005) ter eno leto pri vrsti *Aelous mellilus* (Say, 1836) (Jewett, 1940). Prav tako identifikacija le odraslih predstavnikov ne odslkava realne vrstne sestave strun v specifičnem času in prostoru (Benefer in sod., 2012).

Vrste iz rodu *Agriotes* spadajo med najpomembnejše škodljivce v Srednji Evropi, kjer je bilo do sedaj zabeleženo dvajset vrst iz omenjenega rodu (Cate, 2007; Furlan in Tóth, 2007), kar devet od teh pa predstavlja pomembne talne škodljivce na kmetijskih zemljiščih: *A. lineatus*, *Agriotes brevis* Candeze, 1863, *Agriotes ustulatus* (Schaller, 1783), *Agriotes sputator* (Linnaeus, 1758), in *A. obscurus*, ki so hkrati tudi najpogostejše vrste v Sloveniji (Milevoj in sod., 2005), ter *Agriotes litigiousus* (Rossi, 1792), *Agriotes proximus* Schwarz, 1891, *Agriotes rufipalpis* Brullé, 1832 in *Agriotes sordidus* (Illiger, 1807). Morfološki ključji (Schaerffenberg, 1940; Cocquempot in sod., 1999; Klausnitzer, 2013; Heimbach in sod., 2020) omogočajo identifikacijo le devet od vsega dvajsetih vrst iz rodu *Agriotes*.

2 MORFOLOŠKA IDENTIFIKACIJA

Čeprav so ličinke znotraj družine Elateridae precej raznolike, jih od ličink drugih družin razlikujemo po naslednjih znakih: (1) trije pari pravih nog na oprsju, sestavljeni iz 5 členov (peti segment predstavlja terminalni kremplj); (2) hitinizirano telo; (3) zgornja ustna (ang. labrum) odsotna, oziroma zlita z oglavnim ščitom (ang. clypeus) in glavno kapsulo; (4) maksila (ang. maxilla) in spodnja ustna (ang. labium) podaljšani in zliti v samostojno enoto; (5) frontalni šiv v obliki lire; (6) tipalke iz treh členov; (7) dihalnice biforalne oblike (tj. z dvema rhodomama); (8) parni izrastki na konici abdomna – analne vilice (ang. urogomphi); (9) telo ravno, z devetimi abdominalnimi segmenti; (10) deseti abdominalni segment slabše viden, saj leži ventralno glede na deveti segment. Na njem je lociran anus (Hyslop, 1917; Glen in sod., 1943; Klausnitzer, 2013). Vizualno so strunam podobne

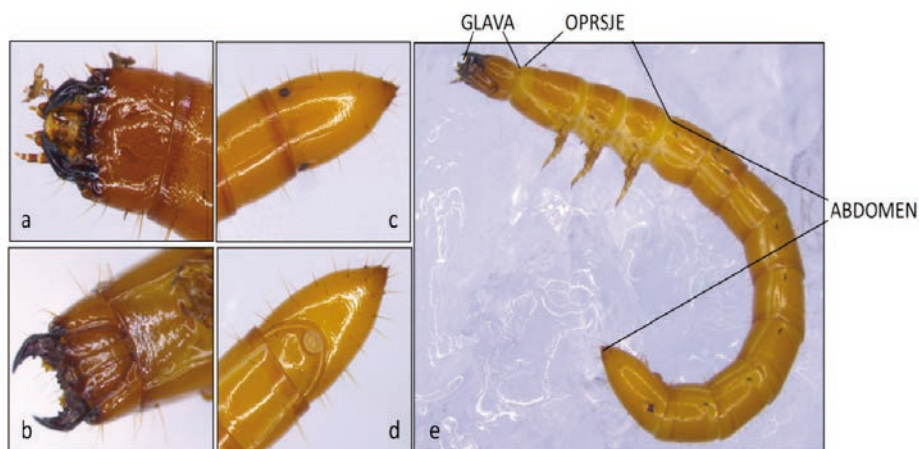
ličinke hroščev iz družine črnivcev (Tenebrionidae), še posebno iz rodu *Eleodes*. Družini zanesljivo med seboj ločimo po tem, da imajo ličinke črnivcev frontalni šiv v obliki črke Y, imajo dobro razvito zgornjo ustno, bolj izrazite tipalke, prvi par nog na oprsju je pogosto daljši od drugih parov ter na devetem abdominalnem segmentu so pogoste ščetine in manjši trni (Rogers in sod., 1978; Glen in sod., 1943).

Določanje strun je težavno zaradi velike morfološke podobnosti med vrstami, hkrati pa grejo ličinke med razvojem skozi večje število larvalnih stopenj (8-16), med katerimi prihaja do morfoloških sprememb znotraj iste vrste (Pic in sod., 2008; Klausnitzer, 2013). Te spremembe so rezultat prehranjevanja in premikanja v tleh ter posledičnih poškodb zunanjega skeleta oz. hitinjače. Strukture, ki so podvržene takšnim spremembam je najbolje opazovati takoj po levitvi, saj se njihova izrazitost proti koncu larvalnega stadija zmanjšuje (Glen in sod., 1943). Glen in sod. (1943) za najpomembnejše strukture za zanesljivo identifikacijo rodov in vrst strun navajajo (Slika 1, Slika 2): (1) deveti abdominalni segment, in sicer prisotnost/odsotnost kavdalne zareze, prisotnost/odsotnost »očesc« (ang. muscular impressions, eye-spots), oblika analnih vilic, prisotnost/odsotnost ščetin, oblika stranskih robov; (2) struktura glavne kapsule, nosnica (ang. nasale) je vidna pod mikroskopom, pomembna pa je prisotnost/odsotnost strukture ter oblika zobcev. Nosnica je podvržena fizičnim poškodbam in je zato pogosto obrabljena; (3) mandibule so pomemben morfološki znak, in sicer prisotnost/odsotnost retinakuluma in pomožnega zobca na notranji strani mandibule ter kót, ki ga pomožni zobec

tvori z osjo mandibule. Tudi mandibule so podvržene fizičnim poškodbam, hkrati pa lahko pri merjenju kotov tako majhnih objektov pride do napak; (4) prisotnost/odsotnost izrazitih telesnih zarez in vdolbin. Te strukture so manj izrazite na mladih ličinkah in ličinkah, ki so se nedavno levile; (5) oblika ventralnega dela predprsja (ang. presternum), in sicer je lahko sestavljen iz več delov oziroma zlit v en sklerit; (6) prisotnost/odsotnost ščetin; (7) prisotnost/odsotnost oči.

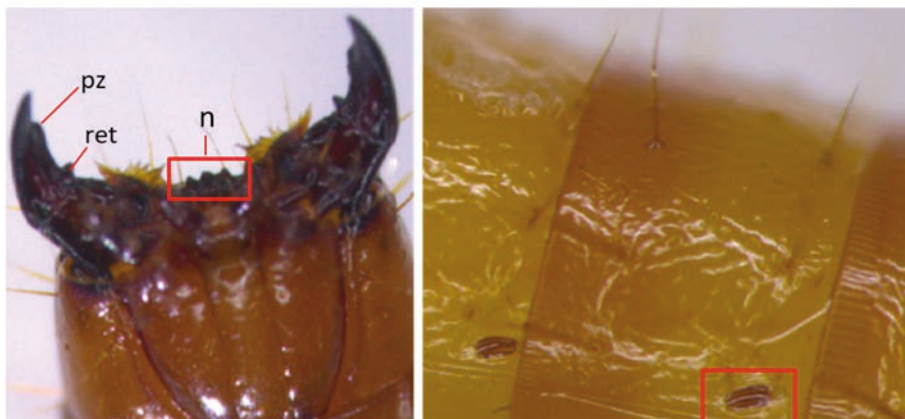
Za zanesljivo določitev je potrebno opazovati dobro razvite ličinke, saj se pri mladih ličinkah obarvanost, število ščetin, značilnosti nosnice, kavdalne zareze in analnih vilic lahko močno razlikujejo; pri vrstah *A. sordidus*, *A. sputator*, *A. lineatus* in *A. obscurus* morajo ličinke za določitev doseči dolžino vsaj 1 cm (Pic in sod., 2008).

Mnogi morfološki določevalni ključi (Tabela 1) datirajo v prvo polovico 20. stoletja in so zaradi tega taksonomsko zastareli. Pogosto so napisani v različnih jezikih, na primer v nemščini (Beling, 1883, 1884; Scherffenberg, 1940; Korschevsky, 1941; Klausnitzer, 2013), danščini (Schjødte, 1870), francoščini (Pic in sod., 2008), angleščini (Glen in sod., 1943; Becker, 1956; Eidt, 1954; Etzler, 2013; Glen, 1950; Lanchester, 1946; Riley in Keaster, 1979; Wilkinson, 1963; Heimbach in sod., 2020). Prav tako so klasični dihonomni ključi nemalokrat zahtevni za uporabo za nestrokovnjake, posebno če ključi temeljijo na besednem opisovanju lastnosti in morfoloških struktur. Uporabnikom prijaznejši so slikovni določevalni ključi, ki prikažejo sliko za vsak iskan morfološki znak. Takšni ključi za določevanje strun so redki; Etzler (2013) je ustvaril kombinacijo slikovnega in dihonomnega dolo-



Slika 1: Struna rodu *Agriotes* sp. a: glava, dorzalno. b: glava, ventralno. Dobro vidne mandibule in nosnica. c: deveti abdominalni segment, dorzalno. Dobro vidna »očesca«. d: deveti abdominalni segment, ventralno. Dobro viden anus. e: struna, lateralno. Slike: Eva Praprotnik.

Figure 1: Wireworm of the genus *Agriotes* sp. a: head, dorsal. b: head, ventral. Mandibles and nasale clearly distinguishable. c: ninth abdominal segment, dorsal. Muscular impressions ("eye-spots") clearly distinguishable. d: ninth abdominal segment, ventral. Anus clearly distinguishable. e: wireworm, lateral. Photo: Eva Praprotnik.



Slika 2: Levo: glava, ventralno. pz – pomožni zobec, ret – retinakulum, n – nosnica (nasale). Desno: dihalnica biforalne oblike. Slike: Eva Praprotnik.

Figure 2: Left: head, ventral. pz – preapical tooth, ret – retinaculum, n – nasale. Right: biforous spiracle. Photo: Eva Praprotnik.

čevalnega ključa za gospodarsko pomembne vrste strun, ki se pojavljajo v ameriški zvezni državi Montana in na pacifiškem severozahodu.

Strokovnjaki v Evropi se z izzivom določevanja strun in iskanjem zanesljivih morfoloških znakov ukvarjajo že dolgo časa. Beling (1883, 1884) in Schiødte (1870) sta opisala ličinke družine Elateridae, dihotomni določevalni ključ Schaerffenberga (1940) je namenjen določanju 15 najpomembnejših vrst strun v Nemčiji, delo Korschevskyja (1941) povzema biologijo družine Elateridae in sistematiko njihovih ličink, določevalni ključ Coccoempota in sod. (1999), Heimbacha in sod. (2020) in Pica in sod. (2008) se osredotočajo na rod *Agriotes*, najbolj celovit določevalni ključ pa je Klausnitzerjev (2013), saj v njem dobimo opise in skice za celotno družino Elateridae Evrope. Literatura o strunah Severne Amerike je prav tako obširna, saj nam Glen in sod. (1943) podajo dihotomni določevalni ključ za več kot 30 vrst strun Kanade, 7 let pozneje pa detajlni določevalni ključ plemena Lepturoidini Severne Amerike (Glen, 1950). Wilkinson (1963) nadgradi in spiše določevalni ključ za 25 vrst strun, ki se pojavljajo na kmetijskih zemljiščih Britanske Kolumbije. Določevalna ključa Eidta (1954) in Beckerja (1956) se osredotočata na rod *Agriotes*, Lanchester (1946) se osredotoča na rod *Limonius*, Riley in Keaster (1979) pa na rod *Melanotus*. Stibick je napisal pregled skupine Hypnoidinae, ki jo filogenetsko uvršča v samostojno poddružino in je eden redkih, ki je naredil pregled na svetovni ravni, in sicer Severne in Južne Amerike (Stibick, 1976; Stibick, 1978), Evrazije (Stibick, 1979), Indije (Stibick, 1980b) in Nove Zelandije (Stibick, 1980a).

Morfološko določanje strun je pogosto nezanesljiva metoda in zahteva veliko znanja in izkušenj, pa vendar so prve filogenetske študije družine Elateridae v veliki meri

temeljile prav na morfoloških značilnostih ličink ter fosilnih ostankih (Becker, 1956). Takšno filogenetsko drevo temelji na izvornih (pleziomorfnih) in izpeljanih (apomorfnih) znakih, ki so se pri vrstah, ki jih med seboj primerjamo, pojavili v različnih kombinacijah v različnem časovnem obdobju (Rieppel, 2020). Hyslop (1917) je na podlagi morfoloških lastnosti odraslih hroščev in ličink izrisal filogenetsko shemo v geološki časovni lestvici, ki je do razvoja molekularnih metod veljala za najpopolnejši prikaz evolucijske zgodovine družine Elateridae. Evolucija družine je v biološkem smislu šla v smeri krajšanja življenjske dobe odraslih hroščev in posledično daljšanja obdobja, ki ga preživijo v stadiju ličink. Larvalni stadiji so tako tekom filogeneze doživeli znatnejše morfološke spremembe kot pa stadiji imaga (Dolin, 1978).

3 MOLEKULARNO DOLOČANJE

V zadnjem desetletju se za določanje morfološko težko ločljivih vrst uveljavlja vse več molekularnih metod (Tabela 1), ki v veliki meri temeljijo na izolaciji DNK in pomnoževanju specifičnih odsekov z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo (ang. polymerase chain reaction - PCR). Veliko le-teh temelji na identifikaciji odraslih hroščev (Han in sod., 2016; Kundrata in sod., 2016; Oba in sod., 2015), čeprav so ličinke tiste, ki povzročajo znatno škodo v kmetijskih in gozdnih ekosistemih.

DNK črtno kodiranje je metoda, pri kateri namnožimo DNK fragmente, ki so specifični za določen takson. Pri živalih se za določanje najpogosteje uporablja zaporedje v genu za mitohondrijski citokrom c oksidazo (COI) (Hebert in sod., 2003). DNK črtno kodiranje je pomembno orodje za določanje kriptičnih vrst, torej

Tabela 1: Metode za določanje strun, vključno z njihovimi prednostmi in slabostmi
Table 1: Methods of wireworm identification, including their advantages and disadvantages

| Metode | Preučevani organizem | Prednosti | Slabosti | Referenca |
|----------------------|---|--|---|---|
| Morfološko določanje | 15 najškodljivejših vrst strun v Nemčiji | prisotne skice in fotografije morfoloških struktur | ključ v nemškem jeziku, uporaba zahtevna za nestrokovnjake, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Schaerffenberg, 1940 |
| | več kot 30 vrst strun Kanade | ključ v angleškem jeziku, natančne skice morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Glen, in sod. 1943 |
| | vrste plemena Lepturoidini Severne Amerike | ključ v angleškem jeziku, natančne skice morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake | Glen, 1950 |
| | 45 vrst, ki se pojavljajo v ameriški zvezni državi Montana in pacifiškem severozahodu | podroben slikovni ključ v kombinaciji z dihotomnim ključem | poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Etzler, 2013 |
| | pregled skupine Hypnoidinae | pregled poddružine na svetovni ravni | zahteven dihotomni ključ | Stibick, 1976, 1978, 1979, 1980a, 1980b |
| | 25 vrst strun, ki se pojavljajo na kmetijskih površinah Britanske Kolumbije | ključ v angleškem jeziku, prisotne skice morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Wilkinson, 1963 |
| | 6 ekonomsko pomembnih vrst strun rodu <i>Limomitus</i> | ključ v angleškem jeziku, prisotne skice morfoloških struktur, podroben opis morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Lanchester, 1946 |
| | nearktične vrste rodu <i>Agriotes</i> | ključ v angleškem jeziku, obravnava ličinke in odrasle primerke, prikaz razširjenosti vrst na zemljevidu | uporaba zahtevna za nestrokovnjake | Becker, 1956 |
| | družina Elateridae v Evropi | celovit ključ za identifikacijo celotne družine, podrobne skice morfoloških struktur | ključ v nemškem jeziku, uporaba zahtevna za nestrokovnjake | Klausnitzer, 2013 |
| | 10 vrst rodu <i>Melanotus</i> Severne Amerike | ključ v angleškem jeziku, prisotne skice morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake | Riley in Keaster, 1979; Riley, 1983 |
| | 4 vrste rodu <i>Agriotes</i> iz Nove Škotske | ključ v angleškem jeziku, podrobne skice in opisi morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Eidt, 1954 |
| | 4 vrste rodu <i>Agriotes</i> | poenostavljen in kratak določevalni ključ | ključ v francoskem jeziku, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Pic, in sod. 2008 |
| | več kot 15 rodov družine Elateridae | podrobna sistematika družine Elateridae, prisotne skice morfoloških struktur | ključ v nemškem jeziku, uporaba zahtevna za nestrokovnjake | Korschetsky, 1941 |
| | 4 vrste rodu <i>Agriotes</i> v Franciji | prisotne skice morfoloških struktur, prikaz razširjenosti vrst na zemljevidu | ključ v francoskem jeziku, poudarek le na ekonomsko pomembnih vrstah | Cocquempot, in sod. 1999 |
| | ključ za identifikacijo 11 rodov strun, s poudarkom na vrstah iz rodu <i>Agriotes</i> | ključ v angleškem jeziku, prisotne fotografije morfoloških struktur | uporaba zahtevna za nestrokovnjake | Heimbach, in sod. 2020 |

nadaljevanje tabele 1

| | | | |
|---|---|---|--|
| Molekularno določanje analiza mitohondrijskega gena <i>COI</i> v kombinaciji z multipleks PCR | 17 vrst rodu <i>Agriotes</i> iz Srednje Evrope | poceni in zanesljiva metoda, pri kateri je verjetnost lažno pozitivnih rezultatov majhna | omejeno število začetnih oligonukleotidov znotraj Staudacher, in sod. 2011 |
| analiza mitohondrijskega gena <i>COI</i> in jedrnega gena EF1- α | rod <i>Melanotus</i> iz bambusovih gozdov Južne Kitajske | analiza večjega števila lokusov poda zanesljivjše rezultate | analiza le mitohondrijskih genov ne poda vedno zanesljivih filogenetskih rezultatov Zhang, in sod. 2019 |
| analiza mitohondrijskega gena <i>COI</i> | 30 ekonomsko pomembnih vrst v Montani, ZDA | poceni in zanesljiva metoda, številni optimizirani protokoli | analiza le mitohondrijskih genov ne poda vedno zanesljivih filogenetskih rezultatov Etzler, in sod. 2014 |
| analiza mitohondrijskega gena <i>COI</i> | 10 vrst rodu <i>Melanotus</i> , 1 vrsta rodu <i>Conoderus</i> | poceni in zanesljiva metoda, številni optimizirani protokoli | analiza le mitohondrijskih genov ne poda vedno zanesljivih filogenetskih rezultatov Lindroth in Clark 2009 |
| analiza mitohondrijskega gena <i>COI</i> | 7 vrst rodu <i>Agriotes</i> iz Francije | poceni in zanesljiva metoda, številni optimizirani protokoli | analiza le mitohondrijskih genov ne poda vedno zanesljivih filogenetskih rezultatov Pic, in sod. 2008 |
| analiza mitohondrijskega gena <i>COI</i> | 3 vrste rodu <i>Agriotes</i> | poceni in zanesljiva metoda, številni optimizirani protokoli | analiza le mitohondrijskih genov ne poda vedno zanesljivih filogenetskih rezultatov Lehmus in Niepold, 2015 |
| T-RFLP | 3 vrste rodu <i>Agriotes</i> | poceni, enostavna in zanesljiva metoda | metoda je občutljiva na variabilnost izolirane DNK med posameznimi vzorci. Uporaba različnih barvil vpliva na mobilnost DNK fragmentov v kapilarni elektroforezi Ellis, in sod. 2009 |
| analiza <i>16S</i> rRNK | 15 ekonomsko pomembnih vrst v Kanadi | poceni in hitra metoda, ustrezna metoda za filoge-metoda se v največji meri uporablja za študije netske študije | prokariotskih organizmov Benefer, in sod. 2013 |
| Vedensjske lastnosti intenziteta tonične negibnosti | <i>A. lineatus</i> in <i>A. obscurus</i> | v kombinaciji z morfološko identifikacijo lahko zmanjšamo možnost napake pri identifikaciji | temperatura ima velik vpliv na vedenje strun, za identifikacijo potrebujemo žive primerke Ritter, in sod. 2016 |

dveh ali več vrst, ki so med seboj težko ločljive le na podlagi morfoloških lastnosti. Hkrati nam metoda omogoči prepoznavo novih povezav med odraslimi hrošči in prej vrstno nedoločljivimi ličinkami (Etzler in sod., 2014).

Pic in sod. (2008) so prvi uporabili molekularno metodo za določanje strun. Pomnoževali so COI regijo mitohondrijske DNK za določitev 7 vrst rodu *Agriotes*, ki velja za najpogostejši rod pokalic v Franciji. Metoda kombinacije molekularnega in morfološkega določanja se je izkazala za uspešno pri štirih najškodljivejših vrstah *A. sordidus*, *A. sputator*, *A. lineatus* in *A. obscurus*, vendar z eno izjemo. Tri ličinke, ki so jih raziskovalci morfološko opredelili kot *A. sputator*, so se na kladogramu razvrstile ob zaporedju odraslega predstavnika vrste *Agriotes gallicus* Lacordaire, 1835. Ker je larvalni stadij *A. gallicus* skorajda neznan, predstavlja molekularno določanje edini način za razlikovanje ličink *A. gallicus* in *A. sputator*.

Lindroth in Clark (2009) sta prav tako pomnoževala COI regijo mitohondrijske DNK za prepoznavo in filogenetski pregled gospodarsko pomembnih vrst strun srednjega zahoda ZDA iz rodu *Melanotus* in *Conoderus*. Dobljeni filogenetski odnosi se v veliki meri skladajo z morfološki podatki določevalnega ključa po Riley in Keaster (1981). Podan je zgled vrste *Melanotus depressus* (Melsheimer, 1844), ki se od ostalih vrst omenjenega rodu znatno razlikuje, saj je edina brez parnih prečnih prog na posteriornih segmentih. S tem se skladajo tudi rezultati filogenetske analize, saj vrsta zavzema izhodiščni položaj za vse ostale preučevane vrste znotraj rodu *Melanotus*.

Zhang in sod. (2019) so za molekularno določanje treh vrst strun iz rodu *Melanotus* iz Južne Kitajske, ki se prehranjujejo s poganjki bambusa, uporabili podatke mitohondrijskega gena *COI* in jedrnega gena *EF1- α* . Namreč analiza filogenetskih odnosov in določitev vrst, ki temelji le na mitohondrijskem genu *COI* včasih ne zadoštuje in poda zavajajoče rezultate zlasti pri ozko sorodnih vrstah (Rubinoff in Holland, 2005; Shaw, 2002).

Tudi Etzler in sod. (2014) so za določanje gospodarsko najpomembnejših vrst strun na območju ameriške zvezne države Montana uporabili analizo *COI* gena. Filogenetska analiza vrste *Hypnoidus bicolor* (Eschscholtz, 1829) je pokazala veliko raznolikost med posameznimi kladi (več kot 3%), kar lahko nakazuje na prisotnost dveh ali celo treh kriptičnih vrst, ki jih na podlagi morfoloških znakov uvrščamo v eno samo vrsto. Benefer in sod. (2013) so z analizo *16S rRNK* gena prav tako pokazali veliko genetsko raznolikost omenjene vrste, v korelaciji z geografsko razdaljo, in sicer do 4,6 %. Za primerjavo, med vrstami *A. lineatus*, *A. sputator* in *A. obscurus* genetska raznolikost znaša 3,7 % (Benefer in sod., 2012), oziroma 4,9 % (Pic in sod., 2008). Status *H. bicolor* je pomemben zaradi vse večjega negativnega vpliva vrste

v agroekosistemih, saj se njena številčnost po prepovedi nekaterih kemičnih insekticidov povečuje (Parker in Howard, 2001). Staudacher in sod. (2011) so razvili preprost protokol za določanje 17 vrst iz rodu *Agriotes* z metodo DNK črtnega kodiranja, v kombinaciji s PCR multipleksom pa so določili 9 najpomembnejših in hkrati najpogostejših vrst. Princip delovanja PCR multipleksa je enak klasični PCR reakciji, s tem da lahko naenkrat pomnožujemo več različnih DNK segmentov v vzorcu, in sicer z uporabo večjega števila začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici. Zaradi prihranjenega časa in denarja uporaba metode PCR multipleksa narašča, še posebej pri raziskavah z velikim številom vzorcev (Gauthier, 2010; Lagisz in sod., 2010). Potrebno pa je upoštevati, da je število začetnih oligonukleotidov, ki jih lahko uporabimo znotraj ene multipleks PCR reakcije omejeno in morajo biti optimizirani na delovanje pri enaki temperaturi podaljševanja novo sintetiziranih nukleotidnih zaporedij, saj lahko v nasprotnem primeru pride do neenakovernega pomnoževanja posameznih fragmentov (Sint in sod., 2012). Filogenetska analiza celotnega *COI* gena je pokazala veliko podobnost med vrstama *A. lineatus* in *A. proximus*. Ti dve vrsti prav tako privablja enak feromon (Subchev in sod., 2005), morfološke razlike odraslih osebkov so minimalne, ličinke vrste *A. proximus* pa tudi še niso morfološko opisane. Ta dejstva sprožijo vprašanje ali je smiselno obravnavati *A. lineatus* in *A. proximus* kot dve ločeni vrsti (Staudacher in sod. 2011).

Lehmhus in Niepold (2015) sta pomnoževala mitohondrijski gen *COI* za identifikacijo vrst *A. lineatus*, *A. sputator* in *A. obscurus*, Ellis in sod. (2009) pa so za identifikacijo teh treh vrst pomnoževali *16S* regijo mitohondrijske DNK in uporabili tehniko polimorfizma dolžine končnih restrikcijskih fragmentov (ang. Terminal restriction fragment length polymorphism - T-RFLP). Osnova metode je pomnoževanje specifičnega odseka DNK, pri čemer sta oba, lahko tudi le en začetni oligonukleotid, označena s fluorescentnim barvilom (Walker in sod., 2017). Pomnoženim odsekom dodamo encim restrikcijska endonukleaza, ki razreže odseke na specifičnih mestih, sama dolžina končnih odsekov pa je vrstno specifična. Metoda je poceni, ponovljiva in zanesljiva za določitev nekaterih najpomembnejših vrst strun, vendar je hkrati občutljiva na variabilnost med vzorci (količina izolirane DNK), uporaba različnih barvil pa vpliva na mobilnost DNK fragmentov v kapilarni elektroforezi (Prakash in sod., 2014).

4 DOLOČANJE NA PODLAGI VEDENJSKIH LASTNOSTI

Za določanje žuželk lahko v kombinaciji z morfo-

loškimi značilnostmi uporabimo tudi vedenjske lastnosti (Beaudoin-Ollivier in sod., 2000). Ritter in sod. (2016) so spremljali protipredatorsko vedenje pri različnih vrstah strun iz rodu *Agriotes*. Strune se v primeru odzema iz substrata lahko odzovejo s tremi vedenjskimi oblikami, in sicer: 1) tonična negibnost (hlinjenje smrti); 2) faza orientacije (gibanje na površju); 3) faza kopanja v substrat. Ugotovili so, da je pri 20 °C tonična negibnost statistično značilno različna med vrstama *A. lineatus* in *A. obscurus*, in sicer ličinke, ki ostanejo negibne več kot 4,35 s pripadajo vrsti *A. lineatus*, tiste, ki so negibne manj kot 4,35 s pa vrsti *A. obscurus*. Pri morfološki določitvi, ki temelji na številu ščetin nad dihalnico (*A. lineatus* 1 ščetina in *A. obscurus* 2 ščetini (Lehmhus in Niepold, 2015)), je možnost napačne določitve 19,1 %. Če hkrati spremljamo še čas tonične negibnosti, se ta napaka zmanjša na 2,2 %. Slabost izbrane metode je, da za določanje potrebujemo žive primerke. Hkrati je prisoten velik vpliv temperaturnih sprememb, saj te različno vplivajo na protipredatorsko vedenje posameznih vrst strun (Staudacher in sod., 2013), zato so za razrešitev teh vprašanj pomembne dodatne etološke študije.

5 ZAKLJUČEK

Prepoznavanje raznolikosti kriptičnih vrst na določenem območju je pomembno za uporabo ustreznih smernic za varstvo kmetijskih pridelkov. Nezmožnost rutinskega in zanesljivega razlikovanja med posameznimi vrstami strun predstavlja veliko omejitev pri raziskovanju in upravljanju kmetijskih ekosistemov. Pri določanju strun je pomembna kombinacija različnih metod, še posebej pri vrstah, ki jih na podlagi morfoloških lastnosti težko ločimo med seboj. Dihotomni ključ so za nestrokovnjake lahko zahtevni za uporabo, zato lahko s kombinacijo morfoloških in molekularnih metod izboljšamo in razširimo obstoječe identifikacijske ključne. Analiza mitohondrijskega gena *COI* je dovolj zanesljiva za vrstno določitev strun, za boljše razumevanje med- in znotrajvrstnih odnosov pa so potrebne dodatne filogenetske študije, tudi na globalni ravni. Hkrati metoda ni vedno vsem dostopna in ni uporabna za rutinske preiskave kmetijskih svetovalcev.

Za lažje razumevanje in določanje smo pripravili morfološki določevalni ključ za ekonomsko pomembnejše vrste strun. Pri uporabi morfoloških določevalnih ključev se je potrebno zavedati, da obstaja velika verjetnost napačne pri določitvah, zlasti pri opazovanju živih primerkov.

6 VIRI

Ansari, M. A., Evans, M., & Butt, T. M. (2009). Identification

of pathogenic strains of entomopathogenic nematodes and fungi for wireworm control. *Crop Protection*, 28(3), 269–272. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.11.003>

Beaudoin-Ollivier, L., Prior, R. N. B., & Laup, S. (2000). Simplified field key to identify larvae of some rhinoceros beetles and associated scarabs (Coleoptera: scarabaeoidea) in Papua New Guinea coconut developments. *Annals of the Entomological Society of America*, 93(1), 90–95.

Becker, E. C. (1956). Revision of the Nearctic Species of *Agriotes* (Coleoptera: Elateridae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 88(S1), 5–101. <https://doi.org/10.4039/entm8801fv>

Beling, T. (1883). Beitrag zur Metamorphose der Kaferfamilie den Elateriden. *Deutsche entomologische Zeitschrift*, 27, 129–144.

Beling, T. (1884). Beitrag zur Metamorphose der Kaferfamilie den Elateriden. *Deutsche entomologische Zeitschrift*, 28, 177–216.

Benefer, C. M., Knight, M. E., Ellis, J. S., Hicks, H., & Blackshaw, R. P. (2012). Understanding the relationship between adult and larval *Agriotes* distributions: The effect of sampling method, species identification and abiotic variables. *Applied Soil Ecology*, 53(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.004>

Benefer, C. M., van Herk, W. G., Ellis, J. S., Blackshaw, R. P., Vernon, R. S., & Knight, M. E. (2013). The molecular identification and genetic diversity of economically important wireworm species (Coleoptera: Elateridae) in Canada. *Journal of Pest Science*, 86(1), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0454-x>

Calder, A. A. (1996). *Click Beetles: Genera of the Australian Elateridae (Coleoptera)*. Victoria: CSIRO Publishing.

Cate, P. C. (2007). Family Elateridae. I. Löbl & A. Smetana (Ur.), *Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 4. Elateroidea - Derodontoidea - Bostrichoidea - Lymexyloidea - Cleroidea - Cucujoidea* (str. 89–209). Stenstrup: Apollo Books.

Cherry, R. (2007). Seasonal population dynamics of wireworms (Coleoptera: Elateridae) in Florida sugarcane fields. *Florida Entomologist*, 90(3), 426–430. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2007\)90\[426:SPDOWC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[426:SPDOWC]2.0.CO;2)

Cocquempot, C., Martinez, M., Courbon, R., Blanchet, A., & Caruhel, P. (1999). Nouvelles données sur l'identification des larves de taupins (Coleoptera: Elateridae): une aide à la connaissance biologique et à la cartographie des espèces nuisibles. *Cinquième Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture* (str. 477–486). Montpellier: AFPP.

Dolin, V. G. (1978). Phylogeny of the click beetles (Coleoptera, Elateridae). *Vestnik Zoologii*, 3, 3–12.

Eidt, D. C. (1954). A description of the larva of *Agriotes mancus* (Say), with a key separating the larvae of *A. lineatus* (L.), *A. mancus* (Say), *A. obscurus* (L.) and *A. sputator* (L.) from Nova Scotia. *Canadian Entomologist*, 86, 481–494.

Ellis, J. S., Blackshaw, R., Parker, W., Hicks, H., & Knight, M. E. (2009). Genetic identification of morphologically cryptic agricultural pests. *Agricultural and Forest Entomology*, 11(1), 115–121. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2008.00420.x>

EPPO Bulletin. (2005). *Limonium californicum*. *EPPO Bulletin*, 35, 377–379

Etzler, F. E. (2013). *Identification of Economic Wireworms Using*

- Traditional and Molecular Methods* (Doctoral dissertation). Montana State University, Montana.
- Etzler, F. E., Wanner, K. W., Morales-Rodriguez, A., & Ivie, M. A. (2014). DNA barcoding to improve the species-level management of wireworms (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomology*, 107(4), 1476–1485. <https://doi.org/10.1603/EC13312>
- Furlan, L. (1998). The biology of *Agriotes ustulatus* Schaller (Col., Elateridae). II. Larval development, pupation, whole cycle description and practical implications. *Journal of Applied Entomology*, 122(2–3), 71–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1998.tb01464.x>
- Furlan, L. (2014). IPM thresholds for *Agriotes* wireworm species in maize in Southern Europe. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0583-5>
- Furlan, L., & Tóth, M. (2007). Occurrence of click beetle pest spp. (Coleoptera, Elateridae) in Europe as detected by pheromone traps: survey results of 1998–2006. *Bulletin OILB/SROP*, 30(7), 19–25.
- Gauthier, N. (2010). Multiple cryptic genetic units in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae): Evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101(1), 113–129. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01483.x>
- Glen, R., King, K. M., & Arnason, A. P. (1943). The Identification of Wireworms of Economic Importance in Canada. *Canadian Journal of Research*, 21d, 358–387.
- Glen, R. (1950). Larvae of the Elaterid beetles of the tribe Lepuroidini (Coleoptera: Elateridae). *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 111(11), 1–246.
- Gur'yeva, Y. L. (1974). Thoracic structure of click-beetles (Coleoptera, Elateridae) and the significance of the structural characters for the system of the family. *Entomologicheskoye Obozreniye*, 53, 96–113.
- Han, T., Lee, W., Lee, S., Park, I. G., & Park, H. (2016). Reassessment of Species Diversity of the Subfamily Denticolinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 11(2), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Heimbach, U., Lehmus, J., & Zamani-Noor, N. (2020). Clarification of efficacy data requirements for the authorization of an insecticide applied as seed treatment for the control of wireworms in crops such as maize, sunflowers, millet and sugar beet in the EU. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*.
- Hermann, A., Brunner, N., Hann, P., Wrbka, T., & Kromp, B. (2013). Correlations between wireworm damages in potato fields and landscape structure at different scales. *Journal of Pest Science*, 86(1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0444-z>
- Hyslop, A. (1917). The Phylogeny of the Elateridae Based on Larval Characters. *Annals of the Entomological Society of America*, 10(3), 241–263.
- Jewett, H. H. (1940). Observations on life history of *Aeolus mellillus*. *Journal of Economic Entomology*, 33(5), 816–816.
- Jiang, S. H. (1999). *Economic click beetle fauna of China (Coleoptera: Elateridae)*. Beijing: China Agriculture Press.
- Kabaluk, J. T., Vernon, R. S., & Goettel, M. S. (2007). Mortality and infection of wireworm, *Agriotes obscurus* [Coleoptera: Elateridae], with inundative field applications of *Metarhizium anisopliae*. *Phytoprotection*, 88(2), 51–56. <https://doi.org/10.7202/018055ar>
- King, K. M. (1950). Vegetable insects of the season 1949 on Vancouver Island. *Canadian Insect Pest Review*, 28, 1–2.
- Klausnitzer, B. (2013). Familie: Elateridae. B. Klausnitzer (Ur.), *Die Larven der Käfer Mitteleuropas. Bd. 2, Myxophaga, Polyphega. Teil 1* (str. 118–190). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kleespies, R. G., Ritter, C., Zimmermann, G., Burghause, F., Feiertag, S., & Leclercq, A. (2013). A survey of microbial antagonists of *Agriotes* wireworms from Germany and Italy. *Journal of Pest Science*, 86(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0447-9>
- Korschefsky, R. (1941). Bestimmungstabelle der bekanntesten deutschen Elateridenlarven. *Arbeiten über Morphologische und Taxonomische Entomologie aus Berlin-Dahlem*, 8(4), 217–230.
- Kundrata, R., & Bocak, L. (2011). The phylogeny and limits of Elateridae (Insecta, Coleoptera): Is there a common tendency of click beetles to soft-bodiedness and neoteny? *Zoologica Scripta*, 40(4), 364–378. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00476.x>
- Kundrata, R., Gunter, N. L., Douglas, H., & Bocak, L. (2016). Next step toward a molecular phylogeny of click-beetles (Coleoptera: Elateridae): redefinition of Pityobiinae, with a description of a new subfamily Parablacinae from the Australasian Region. *Austral Entomology*, 55(3), 291–302. <https://doi.org/10.1111/aen.12185>
- Lagisz, M., Wilde, K. E., & Wolff, K. (2010). The development of PCR-based markers for molecular sex identification in the model insect species *Tribolium castaneum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 134(1), 50–59. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00935.x>
- Laibner, S. (2000). *Elateridae of the Czech and Slovak Republics*. Zlin: Kabourek.
- Lanchester, H. P. (1946). Larval Determination of Six Economic Species of *Limoni* (Coleoptera: Elateridae). *Annals Entomological Society of America*, 39(4), 619–626.
- Langdon, K. W., & Abney, M. R. (2017). Relative susceptibility of selected potato cultivars to feeding by two wireworm species at two soil moisture levels. *Crop Protection*, 101, 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.011>
- Lawrence, J. F., & Newton, A. F. J. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera. Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*, 779–1006.
- Lehmus, J., & Niepold, F. (2015). Identification of *Agriotes* wireworms – Are they always what they appear to be? *Journal für Kulturpflanzen*, 67(4), 129–138. <https://doi.org/10.5073/J>
- Leseigneur, L. (1972). *Coléoptères elateridae de la faune de France continentale et de Corse*. Lyon: Bulletin mensuel de la sté linnéenne de Lyon.

- Lindroth, E., & Clark, T. L. (2009). Phylogenetic analysis of an economically important species complex of wireworms (Coleoptera: Elateridae) in the midwest. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 743–749. <https://doi.org/10.1603/029.102.0235>
- Lohse, G. A. (1979). Familie Elateridae. H. Freude, K. W. Harde, & G. A. Lohse (Ur.), *Die Käfer Mitteleuropas, Band 6, Diversicornia* (str. 103–186). Krefeld: Goecke & Evers.
- Miles, H. W. (1942). Wireworms and Agriculture, With Special Reference To *Agriotes Obscurus* L. *Annals of Applied Biology*, 29(2), 176–180. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1942.tb07585.x>
- Milevoj, L., Gomboc, S., Bobnar, A., Smodiš, T., Valič, N., & Mikuš, T. (2005). Spremljanje aktivnosti pet vrst pokalic rodu *Agriotes* (Coleoptera: Elateridae) s feromonskimi vabami v okolici Ljubljane. *Zbornik predavanj in referatov s 7. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin* (str. 254–262). Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije.
- Morales-Rodriguez, A., O'Neill, R. P., & Wanner, K. W. (2014). A survey of wireworm (Coleoptera: Elateridae) species infesting cereal crops in Montana. *Pan-Pacific Entomologist*. Pacific Coast Entomological Society. <https://doi.org/10.3956/2014-90.3.116>
- Oba, Y., Ōhira, H., Murase, Y., Moriyama, A., & Kumazawa, Y. (2015). DNA barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera, Elateridae). *PLoS ONE*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116612>
- Parker, W. E., & Howard, J. J. (2001). The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to the U.K. *Agricultural and Forest Entomology*. <https://doi.org/10.1046/j.1461-9563.2001.00094.x>
- Pic, M., Pierre, É., Martinez, M., Genson, G., Rasplus, J. Y., & Albert, H. (2008). Les Taupins du Genre *Agriotes* Démasqués par leurs Empreintes Génétiques. 8. *Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture*. Montpellier: AFPP.
- Prakash, O., Pandey, P. K., Kulkarni, G. J., Mahale, K. N., & Shouche, Y. S. (2014). Technicalities and Glitches of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). *Indian Journal of Microbiology*, 54(3), 255–261. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0461-0>
- Prosvirov, A. S. (2013). To the knowledge of the fauna of click-beetles (Coleoptera: Elateridae) of south of European Russia and the Caucasus. *Caucasian Entomological Bulletin*, 9(2), 253–259. <https://doi.org/10.23885/1814-3326-2013-9-2-253-259>
- Rieppel, O. (2020). Morphology and Phylogeny. *Journal of the History of Biology*, 53(2), 217–230. <https://doi.org/10.1007/s10739-020-09600-x>
- Riley, T. J., & Keaster, A. J. (1979). Wireworms Associated with Corn: Identification of Larvae of Nine Species of *Melanotus* from the North Central States. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(3), 408–414. <https://doi.org/10.1093/aesa/72.3.408>
- Riley, T. J., & Keaster, A. J. (1981). A pictorial field key to wireworms attacking corn in the Midwest. *U.S. Dep. Agric./SEA Extension Integrated Pest Management Program*.
- Riley, T. J. (1983). Identification of the Larva of *Melanotus in distinctus* (Coleoptera: Elateridae). *Annals of Entomological Society of America*, 76, 999–1001.
- Ritter, C., de Mol, F., Richter, E., Struck, C., & Katroschan, K. U. (2016). Antipredator Behavioral Traits of some *Agriotes* Wireworms (Coleoptera: Elateridae) and their Potential Implications for Species Identification. *Journal of Insect Behavior*, 29(2), 214–232. <https://doi.org/10.1007/s10905-016-9555-3>
- Robertson, L. N., & Pottinger, R. P. (1979). Predation on Australian soldier fly by pasture wireworm. *Proceedings of the New Zealand Weed and Pest Control Conference*, 32, 76–79. <https://doi.org/10.30843/nzpp.1979.32.10739>
- Rogers, L. E., Woodley, N., Sheldon, J. K., & Ursek, V. A. (1978). *Darkling Beetle (Tenebrionidae) Populations of the Hanford Site in southcentral Washington*. Richland: Pacific Northwest Laboratory. doi: 10.2172/5041122
- Rubinoff, D. & Holland, B. S. (2005). Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. *Systematic Biology*, 54(6), 952–961. <https://doi.org/10.1080/10635150500234674>
- Saguez, J., Latraverse, A., De Almeida, J., Van Herk, W. G., Vernon, R. S., Légaré, J. P., ... Labrie, G. (2017). Wireworm in Quebec field crops: Specific community composition in North America. *Environmental Entomology*, 46(4), 814–825. <https://doi.org/10.1093/ee/nvx116>
- Schaerffenberg, B. (1940). Bestimmungsschlüssel der landwirtschaftlich wichtigsten Drahtwürmer. *Anzeiger Für Schädlingskunde*, 16, 90–96.
- Schiødte, J. C. (1870). De metamorphosi eleutheratorum observations. Part 5 of Bidrag til insekternes udviklingshistorie. *Naturhistorisk Tidsskrift*, 3(6), 467–536.
- Shaw, K. L. (2002). Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16122–16127. <https://doi.org/10.1073/pnas.242585899>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>
- Staudacher, K., Pitterl, P., Furlan, L., Cate, P. C., & Traugott, M. (2011). PCR-based species identification of *Agriotes* larvae. *Bulletin of Entomological Research*, 101(2), 201–210. <https://doi.org/10.1017/S0007485310000337>
- Staudacher, K., Schallhart, N., Pitterl, P., Wallinger, C., Brunner, N., Landl, M., ... Traugott, M. (2013). Occurrence of *Agriotes* wireworms in Austrian agricultural land. *Journal of Pest Science*, 86(1), 33–39. <https://doi.org/10.1007/s10340-011-0393-y>
- Stibick, J. N. L. (1976). A revision of the Hypnoidinae of the World. Part I. Introduction, phylogeny, biogeography. The Hypnoidinae of North and South America. The genera *Berninelsonius* and *Ligmargus*. *Eos*, 51, 143–223.
- Stibick, J. N. L. (1978). A revision of the Hypnoidinae of the World. Part II. The Hypnoidinae of North and South America. The genera *Ascoliocerus*, *Desolakerrus*, *Margaiostus*, *Hypolithus* and *Hypnoidus*. *Eos*, 52, 309–386.

- Stibick, J. N. L. (1979). A revision of the Hypnoidinae of the World. Part III. The Hypnoidinae of Eurasia. *Eos*, 53, 223–307.
- Stibick, J. N. L. (1980a). A revision of the Hypnoidinae of the World. Part V. The Hypnoidinae of New Zealand, fossil Hypnoidinae, postscript and indexes. *Eos*, 55–56, 227–282.
- Stibick, J. N. L. (1980b). A revision of the Hypnoidinae of the World. Part IV. The Hypnoidinae of India. *Eos*, 54, 247–273.
- Subchev, M., Toshova, T., Furlan, L., & Tóth, M. (2005). Click beetles (Coleoptera: Elateridae) and their seasonal swarming as established by pheromone traps in different plant habitats in Bulgaria: 2. Maize. *Acta Zoologica Bulgarica*, 57(3), 321–332.
- Tóth, M., Furlan, L., Yatsynin, V. G., Ujváry, I., Szarukán, I., Imrei, Z., ... Jossi, W. (2003). Identification of pheromones and optimization of bait composition for click beetle pests (Coleoptera: Elateridae) in Central and Western Europe. *Pest Management Science*, 59(4), 417–425. <https://doi.org/10.1002/ps.629>
- Vernon, B., Lagasa, E., & Philip, H. (2001). Geographic and temporal distribution of *Agriotes obscurus* and *A. lineatus* (Coleoptera: Elateridae) in British Columbia and Washington as determined by pheromone trap surveys. *Journal - Entomological Society of British Columbia*, 98, 257–265.
- Walker, L. M., Hoppe, T., & Silliker, M. E. (2017). Molecular Techniques and Current Research Approaches. In *Myxomycetes: Biology, Systematics, Biogeography and Ecology* (pp. 145–173). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805089-7.00005-6>
- Wilkinson, A. T. (1963). Wireworms of cultivated land in British Columbia. *Proceedings of the Entomological Society of British Columbia*, 60, 3–17.
- Williams, E. M., & Galbreath, R. A. (1987). Diet and development in *Conoderus exsul* and *Agrypnus variabilis* (Coleoptera: Elateridae). *New Zealand Journal of Zoology*, 14(1), 85–88. <https://doi.org/10.1080/03014223.1987.10422684>
- Zhang, S., Liu, Y., Shu, J., Zhang, W., Zhang, Y., & Wang, H. (2019). DNA barcoding identification and genetic diversity of bamboo shoot wireworms (Coleoptera: Elateridae) in South China. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(1), 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.12.017>

Priloga 1: Morfološki identifikacijski ključ za najpogostejše vrste iz rodu *Agriotes* v Sloveniji (Povzeto po: Schaerffenberg, 1940; Klausnitzer, 2013, Heimbach, in sod. 2020)

Appendix 1: Morphological identification key for the most common species of the genus *Agriotes* in Slovenia (See: Schaerffenberg, 1940; Klausnitzer, 2013, Heimbach, et al. 2020)

Za ličinke iz rodu *Agriotes* je značilno cilindrično, močno hitinizirano telo, deveti abdominalni segment je nedeljen, stožčasto zašiljen, na bazi tega segmenta pa so prisotna »očesca«.

1 Tergiti so vzdolžno valovito nagubani. Deveti abdominalni segment se konča s topo, bolj ali manj izrazito bradavico. Med vrhom mandibule in retinakulumom ni dodatnih zobcev. Srednji zobec pri nosnici je daljši od zunanjih dveh. Ličinka vitka in intenzivno rumene barve, maksimalna dolžina 9 mm, širina 0,6 mm..... *Agriotes pallidulus*

1* Tergiti nagubani, gladki ali z vdolbinicami. Konica devetega analnega segmenta koničasta in hitinizirana. Mandibule pred vrhom razširjene ali s prisotnim pomožnim zobcem med vrhom mandibule in retinakulumom. Zobci nosnice enako dolgi (Slika 2)..... 2

2 Prisotne granulacije na začetku segmentov in med kolčkom (ang. coxa). Pomožni zobec z osjo mandibule tvori pravi kot 90°. Od 1.-8. segmenta: nad dihalnico je ob večji ščetini prisotna še manjša ščetina. Maksimalna dolžina 18 mm, širina 1,4 mm *Agriotes sputator*

2* Odsotne granulacije na začetku segmentov in med kolčkom..... 3

3 Mandibule pred vrhom razširjene, vendar brez pomožnega zobca. Pore, iz katerih izraščajo ščetine 9. abdominalnega segmenta, so rahlo izbočene. Maksimalna dolžina 25 mm, širina 1,9 mm..... *Agriotes ustulatus*

3* Med vrhom mandibule in retinakulumom prisoten pomožni zobec..... 4

4 Od 1.-8. segmenta: nad dihalnico je manjša ščetina odsotna. Pomožni zobec z osjo mandibule tvori kot 60°. Maksimalna dolžina 27 mm, širina 2 mm..... *Agriotes lineatus*

4* Od 1.-8. segmenta: nad dihalnico je ob večji ščetini prisotna še manjša ščetina. Pomožni zobec z osjo mandibule tvori kot 120°. Maksimalna dolžina 28 mm, širina 2 mm..... *Agriotes obscurus*