

2014

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE
OLJČNE MUHE (*Bactrocera oleae* Gmelin) V
SLOVENSKI ISTRI Z MIKROSATELITI

MAGISTRSKO DELO

KNAP

TEA KNAP

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Analiza populacijske strukture oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin)
v Slovenski Istri z mikrosateliti**

(Microsatellite analysis of olive fly populations (*Bactrocera oleae* Gmelin) in the
Slovenian Istria)

Ime in priimek: Tea Knap

Študijski program: Varstvo narave

Mentor: doc. dr. Dunja Bandelj

Koper, avgust 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Tea KNAP

Naslov magistrskega dela: Analiza populacijske strukture oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) v Slovenski Istri z mikrosateliti

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 53 Število slik: 13 Število preglednic: 6

Število prilog: 1 Število strani prilog: 1

Število referenc: 88

Mentor: doc. dr. Dunja Bandelj

UDK:

Ključne besede: oljčna muha/*Bactrocera oleae* Gmelin/populacijska struktura/mikrosateliti

Izvleček:

V obdobju od 1. 9. 2013 do 1. 10. 2013 smo na štirih lokacijah Slovenske Istre tedensko vzorčili okužene plodove iz katerih so izletele odrasle muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin). Genomsko DNA smo iz odraslih muh izolirali s CTAB metodo z manjšimi modifikacijami. Sto osemdeset vzorcev oljčnih muh (*Bactrocera oleae* Gmelin) smo genotipizirali z 8 mikrosatelitskimi lokusi. Namnožili smo 66 polimorfni alelov s povprečjem 8,25 alela na lokus in informacijsko vrednostjo polimorfizma 0,613 na lokus. Populacijsko strukturo smo določili z metodami na osnovi Bayesovega principa s programoma BAPS 6.0 in STRUCTURE 2.3, ki sta razkrila eno populacijo oljčne muhe v Slovenski Istri.

Key words documentation

Name and SURNAME: Tea KNAP

Title of master thesis: Microsatellite analysis of olive fly populations (*Bactrocera oleae* Gmelin) in the Slovenian Istria

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 53

Number of figures: 13

Number of tables: 6

Number of appendix: 1

Number of appendix pages: 1

Number of references: 88

Mentor: Assist. Prof. Dunja Bandelj, PhD

UDC:

Keywords: olive fruit fly/*Bactrocera oleae* Gmelin/population structure/microsatellites

Abstract:

Infected olive fruits in Slovenian Istria orchards were sampled weekly in the period from 1. 9. 2013 to 1. 10. 2013 on 4 different locations. Genomic DNA was extracted from adult flies which flew out of infected fruits by CTAB method with minor modifications. One hundred and eighty samples of olive fruit fly (*Bactrocera oleae* Gmelin) were genotyped on 8 microsatellite loci. Sixtysix polymorphic alleles were amplified over all microsatellite loci with an average of 8.25 alleles per locus and polymorphism of 0.613 per locus. Population structure was determined with methods based on Bayesian principles with BAPS 6.0 and STRUCTURE 2.3 programs, which revealed one population of olive fruit fly in Slovenian Istria.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Dunji Bandelj, za vso spodbudo, podporo in pomoč pri izdelavi magistrske naloge in na celotni študijski poti.

Hvala Alenki Baruca Arbeiter za pomoč in strokovne nasvete pri praktičnem delu.

Hvala tudi vsem oljkarjem, ki so omogočili vzorčenje v svojih nasadih.

In seveda hvala družini, partnerju in prijateljem za vso podporo, motivacijo in potrpljenje.

Raziskavo je finančno podprl projekt Sigma2 - Čezmejna mreža za sonaravno upravljanje okolja in biotske raznovrstnosti.

Projekt je sofinanciran v okviru Programa čezmejnega sodelovanja Slovenija–Italija 2007–2013 iz sredstev Evropskega sklada za regionalni razvoj in nacionalnih sredstev.

Kazalo vsebine

1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	Oljčna muha	3
2.1.1	Splošni podatki o vrsti	3
2.1.2	Opis vrste in razvojni krog	3
2.1.2.1	Morfološke značilnosti	3
2.1.2.2	Razvojni krog	4
2.1.2.3	Gostiteljske rastline	6
2.1.3	Škoda pri pridelavi oljk	6
2.1.4	Zatiranje oljčne muhe	6
2.1.4.1	Klasična ali kurativna metoda	6
2.1.4.2	Integrirana ali preventivna metoda	7
2.1.4.3	Ekološka metoda	7
2.2	Mikrosateliti	8
2.2.1	Opisi in definicije	8
2.2.1.1	Klasifikacija mikrosatelitov	9
2.2.2	Lastnosti mikrosatelitov in aplikacije	10
2.2.3	Omejitve pri uporabi mikrosatelitskih markerjev	10
2.2.3.1	Ničti aleli	10
2.2.3.2	Homoplazija	10
2.2.3.3	Vezavno neravnovesje	11
2.3	Verižna reakcija s polimerazo	11
2.3.1	Univerzalni fluorescentno označen M13(-21) začetni oligonukleotid	12
3	MATERIAL IN METODE	14
3.1	Lokacije	14
3.2	Vzorčenje	14
3.3	Izolacija genomske DNA	14
3.4	Merjenje koncentracije DNA in redčenje vzorcev	15
3.5	Izbor mikrosatelitskih lokusov	15
3.6	Namnoževanje mikrosatelitov v PCR	16
3.7	Genotipizacija	17
3.8	Statistična obdelava podatkov	18
4	REZULTATI	22
4.1	Vzorčenje okuženih plodov	22
4.2	Izolacija DNA	22
4.3	Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov	23
4.4	Analiza populacijske strukture	27

5	DISKUSIJA	29
5.1	Pojav oljčne muhe v letu 2013	29
5.2	Analiza mikrosatelitskih lokusov	30
5.3	Analiza populacijske strukture	33
6	LITERATURA	35

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Lokacije vzorčenja napadenih plodov s koordinatami, sorte in načini varstva oljk.	14
Preglednica 2: Lastnosti analiziranih mikrosatelitskih lokusov.....	16
Preglednica 3: Parametri genetske variabilnosti po posameznih lokusih.	23
Preglednica 4: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost, vrednost - P ter statistična značilnost izračunane v eksaktnem testu Hardy – Weinbergovega ravnovesja. 25	
Preglednica 5: Vrednosti genetske razdalje med populacijami na osnovi Nei-jevega koeficienta (pod diagonalo) in F_{ST} vrednosti med pari populacij (nad diagonalo)	27
Preglednica 6: Podatki različnih raziskav o dolžini alelov za posamezne lokuse.	32

Kazalo slik

Slika 1: Prozorna krila z značilno rjavo liso (Walker 2008).....	3
Slika 2: Samica oljčne muhe (<i>Bactrocera oleae</i> Gmelin) (Walker 2008).....	4
Slika 3: Razvojni krog oljčne muhe (KGZS 2011).....	5
Slika 4: Shematski prikaz fluorescentnega označevanja PCR produktov z uporabo univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida (Schuelke 2000).....	12
Slika 5: Emisijski spektri štirih barvil in standarda LIZ, ki jih uporabljamo pri genotipizaciji mikrosatelitskih lokusov oljčne muhe (<i>Bactrocera oleae</i> Gmelin) (Applied Biosystem 2010).....	17
Slika 6: Število vzorčenih okuženih plodov in izleženih oljčnih muh na štirih lokacijah v Slovenski Istri.....	22
Slika 7: Število alelov in število učinkovitih alelov po posameznem lokusu.....	23
Slika 8: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost po lokusih.....	24
Slika 9: Frekvenca alelov posameznih lokusov.....	26
Slika 10: Dendrogram podobnosti po metodi UPGMA.....	27
Slika 11: Izbira najbolj verjetnega števila skupin ($K=3$) z metodo ΔK (Evanno in sod. 2005).....	28
Slika 12: Ocenjena populacijska struktura oljčnih muh s programoma STRUCTURE ($K=3$, zgoraj) in BAPS (spodaj), kjer nam različne barve predstavljajo različne genetske skupine, stolpec pa vsakega posameznika, katerega genetska sestava je pojasnjena z deležem posamezne skupine.....	28
Slika 13: Spremljanje leta oljčne muhe (<i>Bactrocera oleae</i> Gmelin) v obdobju od 8. 7. do 14. 10. 2013 na 4 lokacijah v Slovenski Istri (Priloga A). Črne črte označujejo obdobje vzorčenja okuženih plodov.....	29

Kazalo prilog

Priloga A: Ulov oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) v obdobju od 8. 7. do 14. 10. 2014 na 4 lokacijah v Slovenski Istri.

Seznam kratic

AFLP	metoda polimorfizma dolžin namnoženih fragmentov (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)
ang.	angleško
bp	bazni par
°C	stopinja Celzija, enota za merjenje temperature
CTAB	N-cetil-N, N, N-trimetilamonijev bromid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
F_{ST}	fiksacijski indeks
H_e	pričakovana heterozigotnost
H_o	opažena heterozigotnost
K	skupina (ang. cluster)
kbp	kilo baznih parov
M	molarnost, mol/l
MCMC	Markova veriga Monte Carlo (ang. Markov chain Monte Carlo)
MgCl₂	magnezijev klorid
n	dejansko število alelov lokusa
n_e	število efektivnih alelov na lokus
n_{gs}	število genotipsko specifičnih alelov
NaCl	natrijev klorid
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
p_i	frekvenca <i>i</i> -tega alela
PI	verjetnost enakosti genotipov
PIC	informacijska vrednost polimorfizma
RAPD	metoda naključno namnožene polimorfne DNA (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
SSLP	polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij (ang. Simple Sequence Length Polymorphism)
SSR	ponovitve enostavnih zaporedij (ang. Simple Sequence Repeats)
STR	kratke tandemske ponovitve (ang. Short Tandem Repeats)
Tris-HCl	tris(hidroksimetil)aminometan-klorovodikova kislina
UPGMA	metoda neponderirane aritmetične sredine (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (ang. Variable Number of Tandem Repeats)

1 UVOD

Oljčna muha (*Bactrocera oleae* Gmelin) spada med najpomembnejše škodljivce oljk v Sredozemlju, saj povzroča veliko gospodarsko škodo. Ob ugodnih vremenskih pogojih in v kolikor je v oljčnih nasadih ne zatiramo, lahko okuži več kot 90 % plodov (Sharaf 1980; Kapatos in Fletcher 1984). Pojav oljčne muhe tako negativno vpliva na kakovost in količino pridelka, saj lahko v najhujšem primeru povzroči tudi celoten izpad pridelave oljk (Dimou in sod. 2003; Augustinos in sod. 2005). Ocenjena letna izguba pridelka oljk se giblje med 5 % in 30 % in je odvisna od okoljskih pogojev (Mazomenos 1989; Katsoyannos 1992; cit. po Augustinos in sod. 2005)

Oljčna muha (*Bactrocera oleae* Gmelin) pripada družini sadnih muh (Tephritidae), kamor spadajo še češnjeva (*Rhagoletis cerasi* Linnaeus), breskova (*Ceratitis capitata* Wiedemann), orehova (*Rhagoletis completa* Cresson) in višnjeva muha (*Rhagoletis cingulata* Loew). Najdemo jo v Sredozemlju, kjer se pojavlja že več kot 2000 let, v severni Afriki, na Bližnjem vzhodu, in na vzhodni obali Afrike (Rice 2000). Oktobra 1998 se je prvič samička oljčne muhe ujela na McPhailovo vabo tudi v Los Angelesu v Kaliforniji, ZDA od koder se je razširila po vsej državi (Rice 2000; Yokoyama in Miller 2007).

Dandanes se oljčne muhe pojavljajo praktično povsod, kjer podnebne razmere dovoljujejo gojenje in pridelovanje oljk, ter tako ogrožajo skoraj vse nasade oljk. Zaradi omenjenega je dobro poznavanje populacijske strukture vrst bistvenega pomena za učinkovito presojo, nadzor in upravljanje s škodljivci (Asch in sod. 2012).

Razvoj molekularnih markerjev je olajšal preučevanje strukture genoma in prispeval k rešitvi zgoraj omenjenih problemov (Asch in sod. 2012). Na razpolago imamo različne molekularne metode za raziskovanje genetske raznolikosti, ki se med seboj razlikujejo po svojih lastnostih, informativnosti, ceni razvoja molekularne metode in sami zahtevnosti tehnike. Glede na namen proučevanja organizma so bile pri oljčni muhi opravljene študije genetske raznolikosti in filogenetskih odnosov z uporabo različnih metod, kot so metoda naključno namnožene polimorfne DNA (RAPD¹) (Segura in sod. 2008), metoda polimorfizma dolžin namnoženih fragmentov (AFLP²) (Nardi in sod. 2005) in metoda genotipiziranja z mikrosatelitskimi lokusi (Augustinos in sod. 2002, 2005, 2008; Zygouridis in sod. 2009; Dogac in sod. 2013).

Odločili smo se, da se zaradi njihove številčnosti v genomu, visoke stopnje polimorfizma in kodominance osredotočimo le na mikrosatelitske markerje. Mikrosateliti so genetski

¹ ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA

² ang. Amplified Fragment Length Polymorphism

označevalci, ki omogočajo proučevanje genetske strukture populacij, pretoka genov in učinka ozkega grla (Augustinos in sod. 2008). V zadnjih letih so bili uspešno uporabljeni pri analizi strukture populacije različnih vrst družine sadnih muh (Tephritidae), kot so *Ceratitis capitata* Wiedemann (Bonizzoni in sod. 2000), *Bactrocera dorsalis* (Aketarawonget in sod. 2007), *Bactrocera tryoni* (Yu in sod. 2001) *Bactrocera oleae* (Augustinos in sod. 2005, 2008; Nardi in sod. 2005; Zygouridis in sod. 2009, Dogac in sod. 2013) in *Bactrocera invadens* Drew, Tsuruta in White (Khamis in sod. 2009; cit. po Wu in sod. 2011).

2 PREGLED OBJAV

2.1 Oljčna muha

2.1.1 Splošni podatki o vrsti

Slovensko ime: Oljčna muha

Znanstveno ime: *Bactrocera oleae* Gmelin

Sinonim za vrsto: *Dacus oleae* Gmelin

Znanstvena klasifikacija:

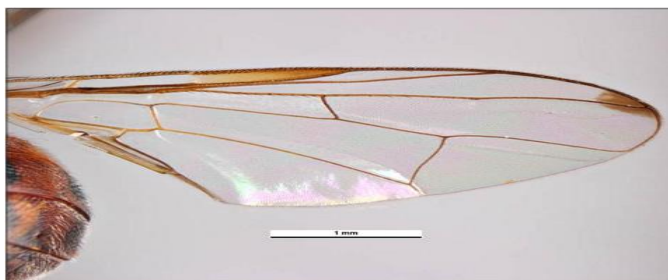
Kraljestvo:	Animalia
Deblo:	Arthropoda
Poddeblo:	Hexapoda
Razred:	Insecta
Podrazred:	Pterygota
Red:	Diptera
Podred:	Brachycera
Družina:	Tephritidae
Poddružina:	Dacinae
Rod:	<i>Bactrocera</i>
Vrsta:	<i>Bactrocera oleae</i>

(*Bactrocera oleae* (Gmelin), 1788)

2.1.2 Opis vrste in razvojni krog

2.1.2.1 Morfološke značilnosti

Odrasla oljčna muha je ena izmed manjših vrst iz rodu *Bactrocera*. Je kostanjevo-sive barve in meri v dolžino približno 4 do 5 mm, v širino pa z razpetimi krili tudi do 12 mm (Alford 2007). Glava odrasle muhe je rumenkasto rdeče barve z velikimi zelenimi očmi in kratkimi antenami. Zgornji del oprsja je rjavo siv s tremi vzdolžnimi temnejšimi črtami, katere se na zadnjem delu oprsja končujejo z značilno trikotno belo liso, kar je tudi eden od pomembnejših razpoznavnih znakov oljčne muhe. Obstaja pa tudi več rumeno belih lis na vsaki strani oprsja. Krila so prozorna z značilno rjavo liso na koncih (Slika 1). Zadek pa je rumenkasto rdeče barve s črnimi lisami na obeh straneh (Alford 2007).



Slika 1: Prozorna krila z značilno rjavo liso (Walker 2008).

Samci in samice odrasle oljčne muhe se medseboj razlikujejo po velikosti in zadku. Samice so nekoliko večje in imajo zaobljen zadek, na katerem je lepo vidna črna leglica (*ovipositor*) (Vossen in sod. 2006; Slika 2).

Jajčece oljčne muhe je mlečno bele barve in meri v dolžino približno 0,7-0,8 mm (Alford 2007). Ličinka (žerka) se razvija preko treh larvalnih stadijev, ki se medseboj ločijo po velikosti in po zgradbi ustnega aparata. Komaj izležena ličinka (ličinka 1. stadija) je praktično prosojna, medtem ko z razvojem pridobi rumenkasto belo barvo (ličinka 3. stadija). V tem zadnjem stadiju lahko žerka meri v dolžino tudi do 7 mm (Alford 2007). Buba je eliptične oblike, dolga približno 4 mm in široka 1,5 mm. So različnih barv vse od kremasto bele pa do rumeno rjave barve (INRA 2005).



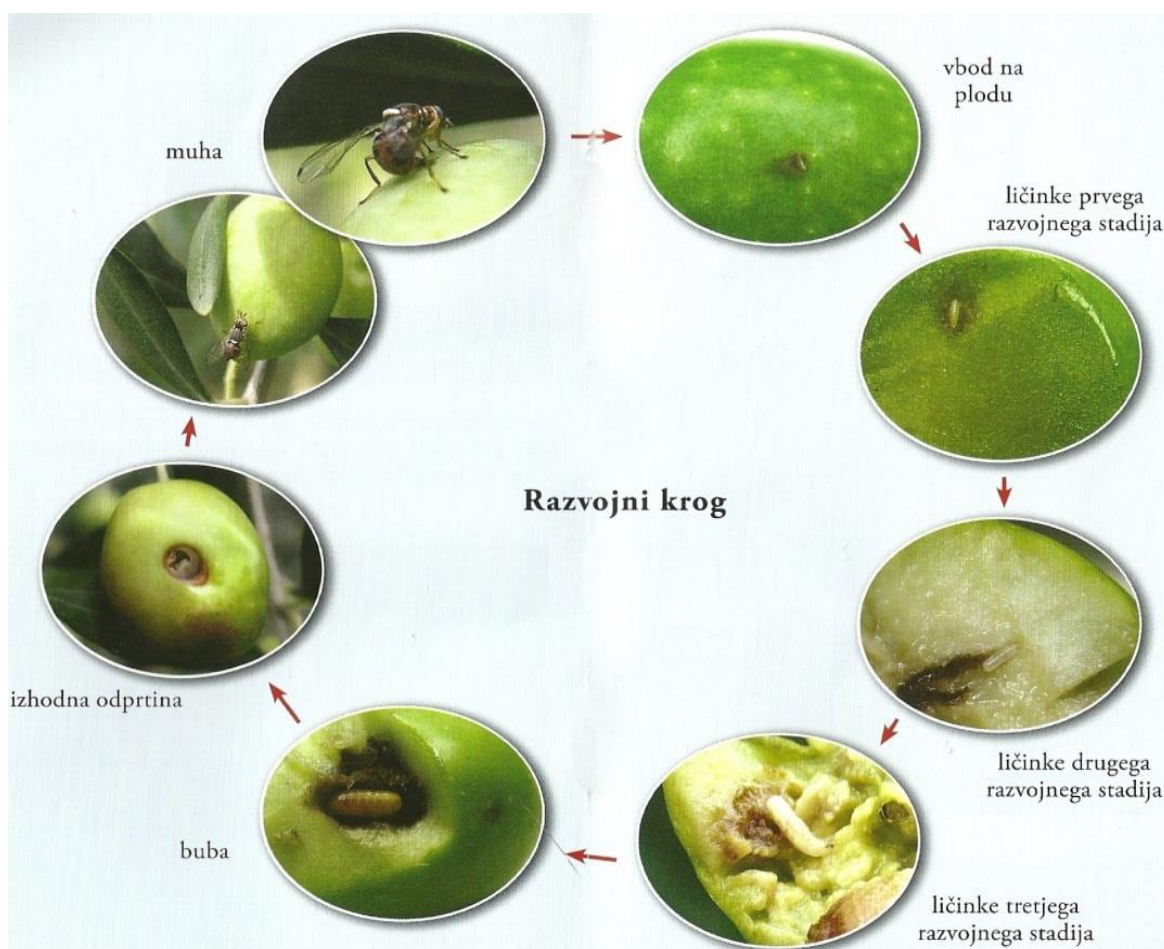
Slika 2: Samica oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) (Walker 2008).

2.1.2.2 Razvojni krog

Razvojni krog oljčne muhe je odvisen od lokalnih podnebnih razmer in sezonskega razvoja glavne gostiteljske rastline, oljke (*Olea europaea* L.) (Zalom in sod. 2009).

Glede na naše podnebne razmere se v povprečju pojavljajo dve do tri generacije oljčne muhe letno. Prva generacija se pojavi že konec junija, nato se konec julija in začetek avgusta zaradi višjih temperatur let oljčne muhe malo umiri in se zato druga generacija pojavi šele nekje po prvih deževjih v avgustu, ko se ozračje spet ohladi in se prisotnost oljčne muhe poveča. Tretja generacija se pojavi septembra. V izjemno ugodnih podnebnih razmerah se lahko razvijejo tudi štiri generacije letno (Sedmak in Jančar 1995). Pri temperaturi 25 °C razvojni krog oljčne muhe traja od 28 do 35 dni, pri temperaturi 20 °C pa 40 dni. Škodijo ji temperature nad 36 °C in nizka relativna vlažnost ter tudi temperature pod -5 °C, saj uničijo tako ličinke kot tudi bube (Sedmak in Jančar 1995). Oljčna muha lahko prezimi na več načinov, in sicer kot buba v tleh; kot ličinka v plodovih, ki so ostali

preko zime na drevesu; in v manjši meri lahko tudi kot odrasle muhe (Steenwyk in sod. 2002). Sam razvojni krog se začne takoj, ko spolno zrela samica z leglico preluknja povrhnjico ploda oljke in vanj odloži jajčece. Samice ležejo jajčeca v poletnih mesecih, ko je premer ploda vsaj 7 mm in je koščica že otrdela, cel postopek pa traja nekje od treh do petnajstih minut. Sveže mesto vboda ima značilno trikotno obliko in je temno zeleno barve, starejši vbodi pa so kot posledica celjenja ran rumeno rjave barve. Samica v svojem življenjskem ciklu odloži od 50 do 400 jajčec, pri tem pa ponavadi vedno izbere še nezaseden plod (po odlaganju namreč sprostijo feromon, ki služi kot opozorilo za druge samice, da je plod zaseden) (Vossen in sod. 2006). Iz jajčec se ob ugodnih podnebnih razmerah v približno dveh do treh dneh razvijejo ličinke, ki se hranijo z vrтанjem mesnatega dela plodov (najprej vrtajo tik pod povrhnjico kasneje kot ličinke 2. in 3. stadija pa vse do koščice). Ličinka za razvoj potrebuje približno dvajset dni. Preden se zabubi se spet približa povrhnjici, jo predre in si s tem pripravi pot po kateri bo plod zapustila kot odrasla muha. Tako po vseh številnih metamorfozah ličinke iz ploda odleti odrasla muha (Vossen in sod. 2006).



Slika 3: Razvojni krog oljčne muhe (KGZS 2011).

2.1.2.3 Gostiteljske rastline

V naravi se ličinka oljčne muhe razvija le v plodovih rastlin iz rodu *Olea*, kamor spadajo *Olea verrucosa* (Link), *O. chrysophylla* (Lam.) in kot glavna gostiteljska rastlina *O. europaea* L. - tako gojena kot tudi divja. Medtem ko so v laboratorijskih pogojih oljčno muho vzgojili v plodovih paradižnika (*Solanum lycopersicum*) in kalina (*Ligustrum acutissimum*) (Athar 2005).

2.1.3 Škoda pri pridelavi oljk

Škodo v plodovih oljke povzročajo ličinke, ki se hranijo z vrtnjem mesnatega dela, dokler ne predrejo epiderme in kot odrasle muhe zapustijo plod. Vanj se sekundarno naselijo glivice in bakterije, ki povzročajo dodatno gnitje (Vossen in sod. 2006). S tem se v napadenih plodovih začnejo oksidacijski procesi, ki povzročijo razpad estrskih lipidov triacilglicerolov, kar vpliva na povečanje prostih maščobnih kislin v plodovih in posledično v oljčnem olju. Glede na to, da je vsebnost prostih maščobnih kislin ali kislinsko število eden pomembnejših parametrov pri določanju kakovosti oljčnega olja, je posledično tako olje slabše kakovosti (Bučar-Miklavčič 1998; cit. po Podgornik in sod. 2007). Slabša kakovost plodov in olja pa se odraža tudi v gospodarski škodi, ki jo utрпи pridelovalec. Ob močnejšem napadu oljčne muhe lahko poškodovani plodovi zaradi prisilnega dozorevanja oziroma zaradi izgube na teži plodov, odpadejo. Zato je v takih nasadih priporočeno zgodnejše obiranje in takojšna predelava, da preprečimo odpadanje in gnitje plodov ter s tem zmanjšamo škodo, ki nastane zaradi napada (Vossen in sod. 2006).

Pri namiznih oljkah predstavljajo škodo že vbodi, ki jih povzroči samica, ko z leglico preluknja povrhnjico ploda. Škoda nastane tako ob sterilnem vbodu, kot tudi če samica v plod odloži jajčece (INRA 2005). Posledice poškodb, ki jih povzročajo ličinke oljčne muhe na plodovih namiznih sort se kažejo v tem, da le ti niso ustrezni za predelavo.

2.1.4 Zatiranje oljčne muhe

Oljčno muho lahko zatiramo z različnimi agrotehničnimi ukrepi, in sicer s klasično ali kurativno metodo, z integrirano ali preventivno metodo ter z ekološko metodo (Podgornik in sod. 2006).

2.1.4.1 Klasična ali kurativna metoda

To metodo varstva uporabimo, ko so plodovi že napadeni, in sicer v primerih, ko je pri več kot 10 % plodov prisoten fertilni vbod oziroma, ko aktivna okuženost³ presega 10 %. V takem primeru škropimo po celi krošnji s dotikalnim insekticidom DECIS 2,5 EC ali GAT

³ prisotna jajčeca ter ličinke 1. stadija in ličinke 2. stadija

DECLINE 2,5 EC (aktivna snov obeh je deltametrin) v odmerku 0,5 l/ha (5 ml na 10 l vode na 100 m² ob porabi 1.500 l vode na ha). Na takšen način lahko opravimo največ dve tretiranji letno. Karenca pripravkov je 7 dni (Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja 2013).

2.1.4.2 Integrirana ali preventivna metoda

Integrirana metoda temelji na preprečevanju odlaganja jajčec v plodove (Podgornik in sod. 2006). Sam prag škodljivosti je dosežen, ko je pri 5 % plodov prisoten fertilni vbod oziroma pri ulovu treh oljčnih muh na vabo na teden. V takem primeru uporabimo Nu Lure (hidrolizirana proteinska vaba za privabljanje škodljivcev) v 1 % koncentraciji ali Nutrel v 1,5 % koncentraciji z dodatkom Perfekthiona (aktivna snov je dimetoat). Tretiramo samo majhen del krošnje (do 0,3 l/drevo) obrnjene proti jugu, prav tako je priporočljivo in hkrati pomembno, da je ta del krošnje neroden. Na takšen način lahko opravimo največ pet tretiranj letno (Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja 2013).

Nu Lure nima karence, tako pri tretiranju v kombinaciji z insekticidi upoštevamo karenco primešanega insekticida, kar znaša glede na dodatek Perfekthiona 28 dni (BASF 2012).

Glede na omejeno število tretiranj, je za lažje in natančnejše določanje datumov tretiranj priporočena uporaba feromonskih vab ali rumenih lepljivih plošč ter ravnati v skladu s priporočili kmetijske svetovalne službe.

2.1.4.3 Ekološka metoda

Najbolj okolju prijazna metoda zatiranja oljčne muhe je ekološka metoda. Pri tej metodi se za zatiranje uporablja ekološki pripravek GF-120 (vaba z naturalitetnim insekticidom).

GF-120 je insekticidna vaba z dodatkom atraktanta. Aktivna snov pripravka je spinosad, ki nastaja biološko pri fermentaciji bakterije *Saccharopolyspora spinosa*. Ta na škodljivce deluje preko prebavil in kontaktno. GF-120 je narejen tako, da atraktant v pripravku zagotovi hrano škodljivcem, vse dokler ti ne vzamejo letalne doze insekticida in poginejo (Zalom in sod. 2009). Sredstvo se uporablja v odmerku 1-1,2 l/ha ob porabi 10 do 30 l vode na hektar oz. 45 do 135 ml škropilne brozge na drevo ob tem, da se enakomerno tretira največ 10 % krošnje na južni strani drevesa ali pa deblo v obliki traku. Uporablja se ga preventivno, za preprečitev odlaganja jajčec na plodove. Njegova karenca je 7 dni in v eni rastni sezoni lahko na istem zemljišču z njim opravimo največ štiri tretiranja (Dow AgroSciences 1998-2012).

2.2 Mikrosateliti

Mikrosateliti so preprosta, tandemska ponavljajoča nukleotidna zaporedja, ki so prisotna v veliki večini vseh organizmov in organelov. Z njimi so se začeli ukvarjati predvsem v zadnjih dveh desetletjih, po tem ko so odkrili, da so izredno vsestransko orodje in zaradi tega uporabni v najrazličnejših aplikacijah molekularne biologije (Chambers in MacAvoy 2000).

2.2.1 Opisi in definicije

Mikrosateliti so del satelitne DNA, ki so jo odkrili pri gradientnem ultracentrifugiranju DNA. Ko se je le ta porazdelila v več plasti, so plast, ki je vsebovala tandemska ponovljivost zaporedja poimenovali satelitna plast. Glede na dolžino osnovnega motiva lahko razdelimo satelitno DNA v tri različne skupine, in sicer na (Armour in sod. 1999; cit. po Bandelj 2006):

1. Satelite (so najdaljše zaporedje, sestavljeni iz osnovnega nukleotidnega zaporedja (motiva) dolžine do 200 baznih parov (bp). Več takšnih ponovitev skupaj tvori satelit, ki ima lahko skupno dolžino tudi 5 Mbp in predstavlja nekaj odstotkov genoma),
2. Minisatelite (osnovni motiv je sestavljen iz več kot desetih nukleotidov in lahko dosežejo skupno dolžino od 0,5 do 30 kbp),
3. Mikrosatelite (osnovni motiv je kratek in na posameznem lokusu tvori ponovitve skupne dolžine od 20 do 100 bp) (Armour in sod. 1999; cit. po Bandelj 2006).

Čeprav na prvi pogled mikrosateliti veljajo za preprosta zaporedja, se je po prebiranju literature in vrsti različnih definicij glede dolžine motive izkazalo, da jih je težko opisati. Nekateri avtorji namreč menijo, da znaša dolžina osnovne ponovitve mikrosatelita od 2 do 8 bp (Armour in sod. 1999), za druge avtorje pa osnovna ponovitev ni daljša od 5 bp (Schlötterer 1998), se pa večina strinja, da so mikrosateliti sestavljeni iz 1 do 6 bp osnovnega motiva (Goldstein in Pollock 1997; cit. po Chambers in MacAvoy 2000; Miah in sod. 2013). Poleg različnih opisov se v literaturi pojavljajo tudi različna poimenovanja mikrosatelitov, kot so: VNTR⁴ (spremenljivo število tandemskih ponovitev), STR⁵ (kratke tandemske ponovitve), SSR⁶ (ponovitve enostavnih zaporedij) in SSLP⁷ (polimorfizem dolžin enostavnih zaporedij) (Chambers in MacAvoy 2000; Bandelj 2006).

⁴ ang. Variable Number of Tandem Repeats

⁵ ang. Short Tandem Repeats

⁶ ang. Simple Sequence Repeats

⁷ ang. Simple Sequence Length Polymorphism

Nukleotidna zaporedja mikrosatelitov najdemo tako v nekodirajočih regijah, kot tudi kodirajočih regijah genoma (Toth in sod. 2000). Pri evkariontih prevladujejo v nekodirajočih regijah (Metzgar in sod. 2000), medtem ko se v kodirajočih regijah pojavljajo redkeje. Tako je stopnja pojavljanja v kodirajočih regijah pri višjih rastlinah med 7 % in 10 % (Varshney 2002), pri vretenčarjih pa je le ta med 9 % in 15 % (Moran 1993; cit. po Chistiskov in sod 2006). Te relativno nizke frekvence mikrosatelitov v kodirajočih regijah lahko pojasnimo z negativno selekcijo in posledično premikom bralnega okvirja v kodirajočih delih DNA (Metzgar in sod. 2000; cit. po Chistiakov in sod. 2006).

2.2.1.1 Klasifikacija mikrosatelitov

Mikrosatelite lahko razvrstimo glede na tip ponovitve osnovnega motiva, število nukleotidov na ponovitev ali glede na položaja v genomu (Miah in sod. 2013). Glede na število nukleotidov na ponovitev lahko mikrosatelite razdelimo na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ali hekso-nukleotide. Glede na položaj mikrosatelitov v genomu ločimo mikrosatelite na jedrne, kloroplastne in mitohondrijske (Miah in sod. 2013). Glede na tip ponovitve osnovnega motiva, sta Chambers in MacAvoy (2000) predlagala razdelitev mikrosatelitov na naslednjih šest razredov, in sicer:

- popoln mikrosatelit⁸ je sestavljen samo iz enega motiva baz, ki se tandemsko ponavlja in o tem ni prekinjen z nobeno drugo bazo, npr. $-(AC)_{14}-$;
- popoln in prekinjen mikrosatelit⁹ ima osnoven motiv prekinjen z insercijo enega nukleotida ali več baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom, npr. $-TA-(CA)_4-TA-(CA)_7-$;
- sestavljen mikrosatelit¹⁰ je sestavljen iz najmanj dveh različnih osnovnih motivov baz, npr. $-(CT)_{22}-(CA)_6-$;
- sestavljen in prekinjen mikrosatelit¹¹ ima poleg vsaj dveh različnih osnovnih motivov še krajšo insercijo baznih parov, ki se razlikujejo od osnovnih motivov, npr. $-(AC)_{14}-AG-AA-(AG)_{12}-$;
- kompleksen mikrosatelit¹² je širši izraz za popolne in sestavljene mikrosatelite, ki nastanejo zaradi insercij baz, ki predstavljajo kratko ponovitev, npr. $-(TTTC)_{3-4}-(T)_6-CT_{0-1}-(CYKY)_n-CTCC-(TTCC)_{2-4}-$,
- prekinjen kompleksen mikrosatelit¹³ predstavlja alele na nekem lokusu, pri katerih znotraj osnovnih motivov prihaja do prekinitve (Bandelj 2006).

⁸ ang. pure microsatellite

⁹ ang. interrupted pure microsatellite

¹⁰ ang. compound microsatellite

¹¹ ang. interrupted compound microsatellite

¹² ang. complex microsatellite

¹³ ang. interrupted complex microsatellite

2.2.2 Lastnosti mikrosatelitov in aplikacije

Mikrosatelite zaradi svojih lastnosti uporabljajo na številnih področjih, tako za identifikacijo osebkov, v sorodstvenih študijah, za gensko kartiranje, v populacijski genetiki in molekularni epidemiologiji, kot tudi v varstveni biologiji in še mnogih drugih. (Chistiakov in sod. 2006; Hoshino in sod. 2010).

Mikrosateliti so se izkazali za dobre genetske markerje, zaradi lastnosti kot so visoka stopnja polimorfnosti, dokaj enakomerna porazdelitev po celotnem genomu, in kodominantno dedovanje, kar omogoča ločevanje med homozigotnimi in heterozigotnimi organizmi. Poleg tega so variabilni, lokusno specifični ter zaradi visoke stopnje polimorfnosti tudi visoko informativni (Pokhriyal in sod. 2012; Abdul-Muneer 2014).

Mikrosateliti so v vsakem evkariotskem organizmu prisotni v velikem številu, pri čemer se večji delež mikrosatelitov nahaja v nekodogeni DNA, zaradi česar niso podvrženi selekciji. Metodologija uporabe je enostavna (Selkoe in Toonen 2006). Kljub avtomatizaciji, je zaradi ostrih pogojev ter lokusno specifičnega pomnoževanja, ponovljivost rezultatov visoka. Za samo analizo so potrebne majhne količine tkiva, saj so zaradi pomnoževanja lokusov v PCR reakciji dovolj le nanogramске količine DNA (Abdul-Muneer 2014).

2.2.3 Omejitve pri uporabi mikrosatelitskih markerjev

Kljub številnim prednostim, imajo mikrosatelitski markerji tudi nekatere omejitve (Selkoe in Toonen 2006). Tako se pri uporabi mikrosatelitov v glavnem pojavljajo težave zaradi pojava ničtih alelov, homoplazije in vezavnega neravnovesja, kateri lahko privedejo do napačne interpretacije rezultatov analize (Abdul-Muneer 2014). Poleg tega je slabost uporabe mikrosatelitov še visok strošek, ki nastane pri razvoju mikrosatelitskih markerjev (Miah in sod. 2013).

2.2.3.1 Nični aleli

Nični aleli so aleli, ki se pri verižni reakciji s polimerazo ne namnožijo. Reakcija ne poteče, ker začetni oligonukleotidi zaradi substitucij, insercij in delecij v obrobni regiji mikrosatelita ne prepoznajo mest prileganja (Chapuis in Estoup 2006).

2.2.3.2 Homoplazija

Pri homoplaziji sta si dva alela identična po pojavnih oblikah (dolžini na istem lokusu), razlikujeta pa se po izvoru, saj sta si evolucijsko popolnoma različna (Anmarkrud in sod. 2008; cit po Hoshino in sod. 2012). V populacijskih študijah zanemarjanje homoplazije lahko vodi do podcenjevanja dejanske raznolikosti med populacijami (Hoshino in sod. 2012).

2.2.3.3 Vezavno neravnovesje

Vezavno neravnovesje je nenaključno združevanje alelov z različnih lokusov, kljub temu da za mikrosatelitske lokuse velja, da se dedujejo neodvisno od drugih lokusov. Do vezavnega neravnovesja lahko pride v majhnih populacijah, v populacijah, ki so šle skozi ozko grlo, po nedavni združitvi različnih populacij, zaradi selekcije in parjenja v sorodstvu (Hoshino in sod. 2012).

2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija polimeraze, znana tudi pod kratico PCR¹⁴, je metoda, ki omogoča pomnoževanje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraze. Sam razvoj PCR predstavlja prelomnico v molekularni genetiki, saj je šele ta tehnika omogočila prvo namnožitev neke regije v genomu v *in vitro* pogojih in nato še analizo le te.

Metodo je leta 1983 razvil ameriški biokemik Kary Mullis, za kar je leta 1993 prejel Nobelovo nagrado za kemijo (Mcpherson in Møller 2006). Leta 1985 so metodo avtomatizirali, in sicer tako, da so namesto DNA-polimeraze iz bakterije *Escherichia coli*, ki ima optimalno temperaturo za delovanje pri 37 °C in pri visokih temperaturah denaturacije DNA razpade, uporabili termostabilno polimerazo iz bakterije *Thermus aquaticus* izolirano iz vročih vrelecev ameriškega narodnega parka Yellowstone (ZDA), ki ima optimalno temperaturo za delovanje med 75 in 80 °C in je stabilna tudi pri temperaturah blizu vrelišča (Mcpherson in Møller 2006; Bartlett in Stirling 2003).

Verižno reakcijo s polimerazo izvajamo v natančnih termostatih, ki jih je mogoče programirati. Da sama reakcija lahko poteče, je potrebno matrični DNA dodati mešanico sestavljeno iz encima Taq polimeraza, para začetnih oligonukleotidov, deoksinukleotide (dNTP) – osnovnih gradnikov nove verige, pufer PCR (za vzdrževanje ustreznega pH v reakciji) in MgCl₂, katerega koncentracija lahko vpliva na prileganje začetnih oligonukleotidov, temperaturo disociacije verig matične DNA, specifičnost produktov, oblikovanje dimerov ter na samo zanesljivost in aktivnost delovanja encima (Innis in sod. 1990).

Princip tehnike PCR temelji na cikličnem ponavljanju: denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov in sinteza molekule DNA:

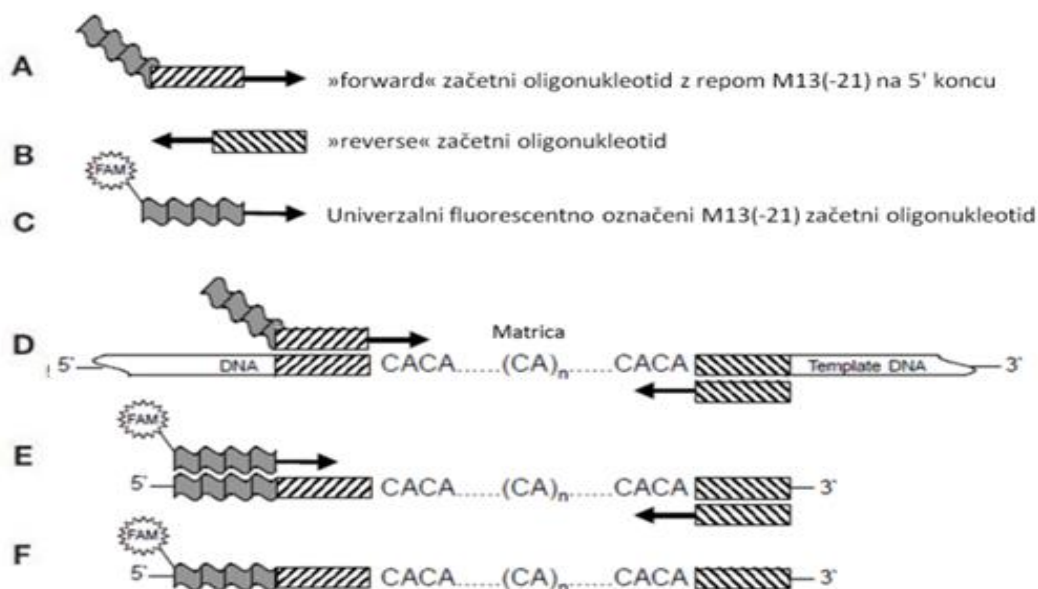
- Denaturacija: segrevanje na visoko temperaturo (ponavadi 94 – 95 °C), posledica le tega je denaturacija oziroma pretrganje H vezi dvojne vijačnice DNA in razklop na dve ločeni komplementarni verigi.

¹⁴ ang. Polymerase Chain Reaction

- Prileganje: reakcijska mešanica se ohladi na temperaturo od 50 do 60 °C, začetni oligonukleotidi najdejo komplementarna mesta prileganja na matrici DNA. Temperatura v tem koraku je odvisna od začetnih oligonukleotidov.
- Sinteza ali podaljševanje DNA: izgradnja komplementarne verige s pomočjo Taq polimeraze, sinteza običajno poteka pri temperaturi 72 °C, torej temperaturi idealni za delovanje termostabilne Taq polimeraze (Mcpherson in Møller 2006; Innis in sod. 1990).

2.3.1 Univerzalni fluorescentno označen M13(-21) začetni oligonukleotid

Pomnoževanje tarčne DNA se izvaja z verižno reakcijo s polimerazo, z uporabo para lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov. Za detekcijo in vizualizacijo namnoženih fragmentov je potrebno, da je v paru eden izmed začetnih oligonukleotidov fluorescentno označen. Fluorescentno označevanje začetnih oligonukleotidov je razmeroma drago, saj lahko določen fluorescentno označen oligonukleotid uporabimo le pri namnoževanju zanj specifičnega lokusa. Pri genotipizaciji se običajno analizira veliko število vzorcev ter preizkusi večje število lokusov, zato je Schuelke (2000) z namenom, da bi rešil to finančno breme predlagal novo tehniko ekonomičnega fluorescentnega označevanja molekul PCR z uporabo univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida, ki se ga lahko uporablja za vse lokuse v različnih študijah kar stroške fluorescentnega označevanja občutno zmanjša.



Slika 4: Shematski prikaz fluorescentnega označevanja PCR produktov z uporabo univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida. (A,B) predstavljata lokusno specifičen začetni oligonukleotid, pri čemer ima A pripeto M13(-21) zaporedje. (C) je univerzalni fluorescentno označen M13(-21) začetni oligonukleotid, z nalepko FAM. (D) v prvi PCR reakciji se A vgradi v PCR produkt. (E) produkti iz D so matrica za fluorescentni začetni oligonukleotid. (F) končni produkt s fluorescentno oznako (Schuelke 2000).

V taki reakciji PCR imamo tako tri začetne oligonukleotide (Slika 4) (poleg običajnih vodilnega¹⁵ in povratnega¹⁶ še univerzalni fluorescentno označeni M13(-21) začetni oligonukleotid), pri čemer je eden od začetnih oligonukleotidov na 5' koncu podaljšan z 18 baznih parov dolgim univerzalnim zaporedjem M13(-21), ki predstavlja komplementarno mesto za univerzalni fluorescentno označen M13(-21) začetni oligonukleotid (Schuelke 2000).

¹⁵ ang. forward

¹⁶ ang. reverse

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Lokacije

Plodove okužene z oljčno muho (*Bactrocera oleae* Gmelin) smo vzorčili v Slovenski Istri na štirih lokacijah, ki jih glede na geografsko lego Slovenske Istre ločimo med seboj na lokacije obalnega pasu ter lokacije zaledja (Preglednica 1). Lokacije se med seboj razlikujejo tudi po načinu varstva oljk tako na teh lokacijah pridelujejo oljke na ekološki, konvencionalen in na dveh lokacijah na integriran način.

Preglednica 1: Lokacije vzorčenja napadenih plodov s koordinatami, sorte in načini varstva oljk.

Območje Slovenske Istre	Lokacije	Koordinate	Način varstva	Sorta
Obalni pas	Beneša	45°35'13.4"N 13°43'42.5"E	integrirano	Ascolana tenera
	Strunjan	45°32'07.3"N 13°36'11.7"E	ekološko	Istrska belica
Zaledje	Krkavče	45°28'02.5"N 13°41'53.6"E	integrirano	Istrska belica
	Sveti Peter	45°28'09.0"N 13°41'01.7"E	konvencionalno	Istrska belica

3.2 Vzorčenje

Na štirih različnih lokacijah v Slovenski Istri smo tedensko nabrali sveže plodove napadene z oljčno muho. Napadene plodove smo shranili v laboratoriju pri temperaturi 22 °C. Iz napadenih plodov so nato izletele odrasle muhe, katere smo zbrali in shranili na -80 °C.

Samo vzorčenje plodov je potekalo od 1. 9. 2013 do 1. 10. 2013, torej v času pred obiranjem oljk in času ko je koščica že otrdela in samice oljčne muhe že odlagajo jajčeca v plod oljke (Dominici in sod. 1986; Yokoyama in sod. 2006). Vzorčilo se je plodove sorte "Ascolana tenera" in pri nas najbolj razširjene sorte "Istrska belica" (Preglednica 1), za obe sorti je znano, da sta občutljivi na napad oljčne muhe (Sancin 1980).

3.3 Izolacija genomske DNA

Genomsko DNA smo iz odraslih oljčnih muh izolirali s CTAB metodo po Kump in sod. (1992) z manjšimi modifikacijami. Vzorce sveže zamrznjenih oljčnih muh smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke jih dobro zdrobili in jim dodali 1 ml na 68 °C predhodno segretega ekstrakcijskega pufra CTAB [2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2 % (w/v) β-merkaptotanol]. Nato smo vzorce inkubirali 90

minut v vodni kopeli pri 68 °C in jih ob tem občasno premešali. Po inkubaciji smo dodali 500 µl mešanice fenol-kloroform-izoamil alkohola, pripravljene v razmerju 25:24:1, in vzorce dobro premešali na mešalcu (Vortex), da nastane suspenzija. Suspenzijo smo centrifugirali 15 minut pri temperaturi 4 °C in pri relativni centrifugalni sili 11000 g (centrifuga Eppendorf 5430R). Supernatant smo previdno odpipetirali v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in DNA oborili z dodatkom 50 µl 3 M natrijevega acetata (1/10 volumna, pH 5,2 uravnan z očetno kislino) in 500 ml ledeno hladnega izopropanola (1 volumen). Vzorce smo dobro premešali in jih za 90 minut postavili v zmrzovalnik na – 20 °C. Temu je sledilo 15-minutno centrifugiranje pri 11000 g in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali, DNA sprali s 500 µl 70 % etanola in rahlo pretresali, da se DNA odlepi od mikrocentrifugirke. Nato smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 14000 g in temperaturi 4 °C, po končani centrifugi smo previdno odpipetirali etanol in DNA posušili na dnu mikrocentrifugirk. DNA smo raztopili v 12 µl pufru TE [10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)] in jo shranili na 4 °C do nadaljnjih analiz.

3.4 Merjenje koncentracije DNA in redčenje vzorcev

Koncentracijo DNA smo določili s pomočjo QubitTM Fluorometra (Invitrogen, ZDA) in s pripadajočim kitom Quant-itTM dsDNA Broad-Range Assay Kit po protokolu navedenem v navodilih za uporabo. Sama metoda temelji na uporabi fluorescenčnih barvil za določanje koncentracije DNA v vzorcu.

Glede na rezultate meritev smo vzorce s koncentracijo DNA nižjo od 45 ng/µl odstranili iz nadaljne analize, medtem ko smo vse ostale vzorce DNA redčili z destilirano vodo do koncentracije 5 ng/µl ter jih v novih mikrocentrifugirkah shranili na 4 °C do nadaljnjih analiz.

3.5 Izbor mikrosatelitskih lokusov

Mikrosatelitske lokuse smo izbrali na podlagi predhodno objavljenih znanstvenih člankov (Augustinos in sod. 2002, 2005 in 2008; Dogac in sod. 2013), pri čemer je bil zaradi drugačne metode označevanja (Schuelke, 2000) eden od začetnih oligonukleotidov na 5' koncu podaljšan z 18 baznih parov dolgim univerzalnim zaporedjem M13(-21) (5' - TGTAACGACGGCCAGT- 3') (Preglednica 2).

Preglednica 2: Lastnosti analiziranih mikrosatelitskih lokusov.

Lokus	Motiv	Nukleotidno zaporedje parov začetnih oligonukleotidov v smeri 5`-3`
Boms5	(CA) ₁₀ TA(CA) ₂	F: TGTA AACGACGGCCAGTTCTCGCCCCAATTACCAC R: GAATTTTGGCAACATCCAAGC
Boms8	(CA) ₇ CG(CA) ₅	F: TGTA AACGACGGCCAGTTGACATACATGCCTTCATTACAC R: CAGAAAAGCTTAAACTAGCGG
Boms17	(TG) ₁₃	F: TGTA AACGACGGCCAGTATTAGACCATAGTGTCTCAC R: AAGATGTTGAGTGCCGTTG
Boms18	(CA) ₁₃	F: TGTA AACGACGGCCAGTGCCATGAATGCAGACCAC R: CCTATTCAAATGCACGAAAAC
Boms25	(GT) ₁₂	F: TGTA AACGACGGCCAGTTGGAATGCGCTATTTTGTG R: ACTCGTATATACGTACATGG
Boms30	(GT) ₁₇	F: TGTA AACGACGGCCAGTCTGACTTCTTGCTTTACACG R: CAGCTTATCTGCTTAAAGTGC
Boms32	(CA) ₁₄	F: TGTA AACGACGGCCAGTTGTATGTATTTGTGCGTCG R: GCTTAGACCATTGCTCC
Boms59	TGTA(TG) ₁₀	F: TGTA AACGACGGCCAGTAGCGCTTACATAAATATAGCTAC R: TCCCGTAAAGCCATAAAGTC

3.6 Namnoževanje mikrosatelitov v PCR

Za namnoževane odsekov DNA, na katerih se nahajajo mikrosatelitski lokusi, smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Reakcijska mešanica je vsebovala 1x PCR pufer Fermentas, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM koncentracije vsakega dNTP-ja (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,2 μM koncentracije vsakega začetnega oligonukleotida za lokusno specifičen par, 0,25 μM koncentracije univerzalnega fluorescentno označenega M13(-21) začetnega oligonukleotida, 0,375 enote encima *Taq* DNA polimeraze (Fermentas) in 25 ng DNA oljčne muhe. Končni reakcijski volumen je znašal 15 μl.

Namnoževanje mikrosatelitskih lokusov je potekalo v cikličnem termostatu DNA-ENGINE Thermal Cycler 200 (Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, ZDA) po naslednjem temperaturnem profilu:

- začetna 5 minutna denaturacija DNA pri 94 °C,
- sledilo je 5 ciklov s ponavljanjem:
 - i. 45 sekund pri 94 °C,
 - ii. 30 sekund pri 57 °C (- 1 °C)¹⁷
 - iii. 30 sekund pri 72 °C,
- nato 30 ciklov s ponavljanjem:
 - i. 30 sekund pri 94 °C,

¹⁷ pri vsakem ciklu se temperatura zniža za 1 °C

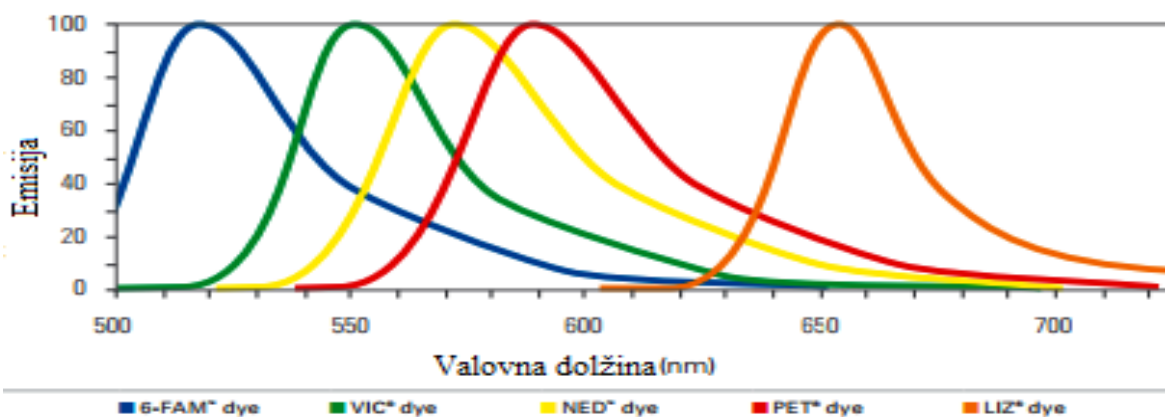
- ii. 30 sekund pri 52 °C,
- iii. 1 minuta in 30 sekund pri 72 °C,
- in končna inkubacija vzorcev 8 minut pri 72 °C.

Vzorci smo do nadaljnjih analiz shranili v hladilniku na 4 °C.

3.7 Genotipizacija

Za ločevanje namnoženih mikrosatelitov smo uporabili avtomatski sekvenator ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Vzorci smo pripravili z namnoževanjem s PCR, kjer smo enega od začetnih oligonukleotidov v paru podaljšali z univerzalnim zaporedjem M13(-21). Tretji začetni oligonukleotid je predstavljal univerzalni začetni oligonukleotid M13(-21), ki je bil označen z eno od štirih fluorescentnih oznak: 6-FAM, VIC, NED in PET. Barvila se med seboj razlikujejo po spektralnih značilnostih, zato je za vsako izmed njih značilno, da oddaja fluorescenco pri drugi valovni dolžini (Slika 5). Najkrajšo valovno dolžino oddaja 6-FAM (modra barva), sledijo VIC (zelena barva), NED (rumena barva), PET (rdeča barva) in standard LIZ (oranžna barva). Z uporabo štirih različnih barvil smo lahko analizirali kombinacije štirih lokusov v eni sami analizi.



Slika 5: Emisijski spektri štirih barvil in standarda LIZ, ki jih uporabljamo pri genotipizaciji mikrosatelitskih lokusov oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) (Applied Biosystem 2010).

Dobljene podatke analize smo uvozili v programski paket Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems) in jih računalniško obdelali.

Z omenjenim programom smo pridobili podatke o prisotnosti, dolžinah alelov in intenziteti fluorescentnega signala. Podatke o dolžinah alelov smo shranili v Excelovo datoteko, pri čemer smo zaradi drugačne metode označevanja (poglavje 2.3.1) vsem dolžinam alelov odšteli 18 baznih parov dolgo univerzalno zaporedje M13(-21).

3.8 Statistična obdelava podatkov

Statistično analizo mikrosatelitskih podatkov smo izvedli z računalniškimi programi POPGENE 1.31 (Yeh in sod. 1999), Cervus 3.0.3 (Marshall in sod. 1998), GenAIEx 6.5 (Peakall in Smouse 2012), BAPS 6.0 (Corander in sod. 2008) in STRUCTURE 2.3 (Pritchard in sod. 2000). Za analizo rezultatov pridobljenih s STRUCTURE smo uporabili še STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl in von Holdt 2012), CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson in Rosenberg 2007) in DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004).

Za izračun opažene heterozigotnosti (H_o), pričakovane heterozigotnosti (H_e), frekvenc alelov, števila efektivnih alelov na lokus (n_e), Nei-jeve genetske distance in za testiranje Hardy-Weinbergovega ravnovesja smo uporabili program POPGENE 1.31. Za identifikacijo števila genotipsko specifičnih alelov (n_{gs}), fiksacijski indeks F_{ST} in grafični prikaz vrednosti frekvenc alelov po posameznih lokusih smo uporabili program GeneAIEx 6.5.

Opažena heterozigotnost (H_o) predstavlja delež heterozigotnih posameznikov v populaciji oziroma v vzorcu. Izračunana je po naslednji formuli (Peakall in Smouse 2009):

$$H_o = \frac{\text{število heterozigotnih posameznikov}}{\text{število vseh posameznikov v populaciji}} \quad (1)$$

Pričakovana heterozigotnost (H_e) predstavlja delež populacije oziroma vzorca, ki bi bil heterozigoten, če bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja. Izračuna se jo kot vsoto kvadratov vrednosti frekvenc alelov (p_i), ki jo odštejemo od vrednosti 1 (Peakall in Smouse 2009):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^h p_i^2, \text{ kjer } h \text{ označuje število alelov na lokus.} \quad (2)$$

Frekvenca alelov (p_i) predstavlja delež posameznega alela v populaciji. Izračuna je po formuli (Peakall in Smouse 2009):

$$p_i = \frac{\text{pogostost } i\text{-tega alela v populaciji}}{\text{pogostost vseh alelov v populaciji}} \quad (3)$$

Število efektivnih alelov na lokus (n_e) lahko izračunamo kot obratno vrednost vsote kvadratov frekvenc alelov (p_i):

$$n_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^h p_i^2}, \text{ kjer } h \text{ označuje število alelov na lokus.} \quad (4)$$

Število efektivnih alelov je različno od dejanskega števila alelov. Običajno je vrednost n_e nižja od dejanskega števila alelov, razen če imajo vsi aleli enako frekvenco (Frankham in sod. 2002).

Genetska razdalja je mera genetske diferenciacije v frekvencah alelov med dvema populacijama. Nei-jeva genetska razdalja je statistični model, ki omogoča merjenje genetske razdalje med dvema populacijama in jo lahko izračunamo po naslednji formuli (Nei 1972, 1978):

$$D = -\ln \frac{\sum_{i=1}^m p_{ix} p_{iy}}{\left[\left(\sum_{i=1}^m p_{ix}^2 \right) \left(\sum_{i=1}^m p_{iy}^2 \right) \right]^{0.5}}, \quad (5)$$

kjer je $p_{ix(y)}$ frekvenca i -tega alela v populaciji $x(y)$ in m število alelov na lokusu.

Fiksacijski indeks F_{ST} je merilo za stopnjo genetske diferenciacije populacije, pridobljene s primerjavo genetske variabilnosti znotraj populacij in med njimi. Vrednost F_{ST} se giblje med 0 in 1. V primeru da je F_{ST} enak 0, diferenciacije ni in vsi vsi posamezniki pripadajo isti populaciji. V primeru, če je vrednost enaka 1, pa so populacije diferencirane. Izračunamo jo po naslednji formuli (Hudson in sod. 1992):

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_W}{H_B}, \quad (6)$$

kjer je H_W razlika med povprečnim številom zaporedij znotraj iste populacije, H_B pa med dvema različnima populacijama.

Vrednosti F_{ST} smo izračunali med pari populacij in določili statistično značilne razlike med njimi. Statistično značilnost smo testirali z 999 permutacijami.

Hardy-Weinbergovo ravnovesje pojasnjuje ugotovitev, da v neskončno velikih populacijah z naključnim parjenjem brez prisotnosti mutacije, migracije in selekcije, ostajajo frekvence genov in genotipov nespremenjene iz generacij v generacijo. V kolikor na populacijo ne vplivajo migracije, mutacije in selekcije se lahko Hardy-Weinbergovo ravnovesje vzpostavi že po eni generaciji. V nasprotnem primeru lahko pride do odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (Frankham in sod. 2002).

V programu POPGENE smo na podlagi testa verjetnostnih razmerij (G^2) testirali, ali so aleli v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, kar pomeni, da sta opažena in pričakovana heterozigotnost na posameznem lokusu enaki.

Informacijsko vrednost polimorfizma (PIC) in verjetnost enakosti genotipov (PI) smo izračunali s programom Cervus 3.0.3.

Informacijska vrednost polimorfizma (PIC) predstavlja informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa oz. stopnjo pri kateri z mikrosatelitskim lokusom nedvoumno določimo genetsko identiteto posameznika in vključuje tako število alelov na posameznem lokusu, kot tudi frekvence posameznih alelov (Štajner 2010). Informacijska vrednost polimorfizma uporabljamo kot merilo primernosti lokusa za gensko kartiranje. Izračunamo jo po naslednji formuli (Botstein in sod. 1980; cit. po Shete in sod. 2000):

$$PIC = 1 - \sum_i^n p_i^2 - \sum_{i,j}^n p_i^2 p_j^2, \quad (7)$$

kjer sta p_i in p_j frekvenci i -tega in j -tega alela, n pa število alelov na lokus.

Verjetnost enakosti genotipov (PI) nam pove kakšna je verjetnost, da imata dva naključna posameznika dva enaka alela na proučevanem lokusu. Manjša kot je vrednost PI, bolj informativen je posamezen lokus. Visoke vrednosti PI kažejo na nizko informativnost, ki je navadno posledica majhnega števila alelov ali visoke frekvence enega od alelov na proučevanem lokusu (Štajner 2010). Verjetnost enakosti genotipov (PI) lahko izračunamo po naslednji formuli:

$$PI = \sum_{i=1}^n (p_i^2)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1+1}^n (2p_i p_j)^2, \quad (8)$$

kjer sta p_i in p_j frekvenci i -tega in j -tega alela, n pa število alelov na lokus.

Populacijsko strukturo smo določili z metodami na osnovi Bayesovega principa s programoma BAPS 6.0 (Corander in sod. 2008) in STRUCTURE 2.3 (Pritchard in sod. 2000).

V programu BAPS smo pri razvrščanju posameznikov v skupine določili maksimalno število skupin (10) in pri tem upoštevali posamezne vzorce iz ene lokacije kot vzorec ene populacije (ene skupine).

V programu STRUCTURE smo ovrednotili število populacijski struktur znotraj vseh analiziranih vzorcev. Za analizo smo uporabili model mešanja¹⁸ in korelirane frekvence alelov med populacijami¹⁹. Število skupin (K) smo določili s pomočjo izračuna verjetnosti, da vzorci tvorijo eno od desetih skupin. Za vsako vrednost K smo naredili 15 ponovitev.

¹⁸ ang. admixture model

¹⁹ ang. correlated allele frequencies

Vsako simulacijo je sestavljalo 100.000 MCMC²⁰ ponovitev in dodatnih 50.000 začetnih ponovitev, ki smo jih izločili iz analize (burn in). Rezultate smo nato analizirali še s programom STRUCTURE HARVESTER, z metodo Evanno (Evanno in sod. 2005), ki določa najverjetnejšo vrednost K po naslednji formuli:

$$\Delta K = \frac{m([L`K])}{sd[L(K)]}, \quad (9)$$

pri čemer je $L(K)$ logaritem verjetnosti, m je povprečje sprememb verjetnosti drugega reda in sd je standarni odklon.

STRUCTURE HARVESTER nam je določil najverjetnejšo vrednost K in pripravil vhodno datoteko za program CLUMPP (Earl in von Holdt 2012). Program CLUMPP je dodatno poravnal razporeditev skupin preko ponovljenih analiz in hkrati pripravil vhodno datoteko za grafični prikaz populacijske strukture s programom DISTRUCT (Jakobsson in Rosenberg 2007). DISTRUCT rezultate smo vizualizirali s programom GSview (GSview 2012).

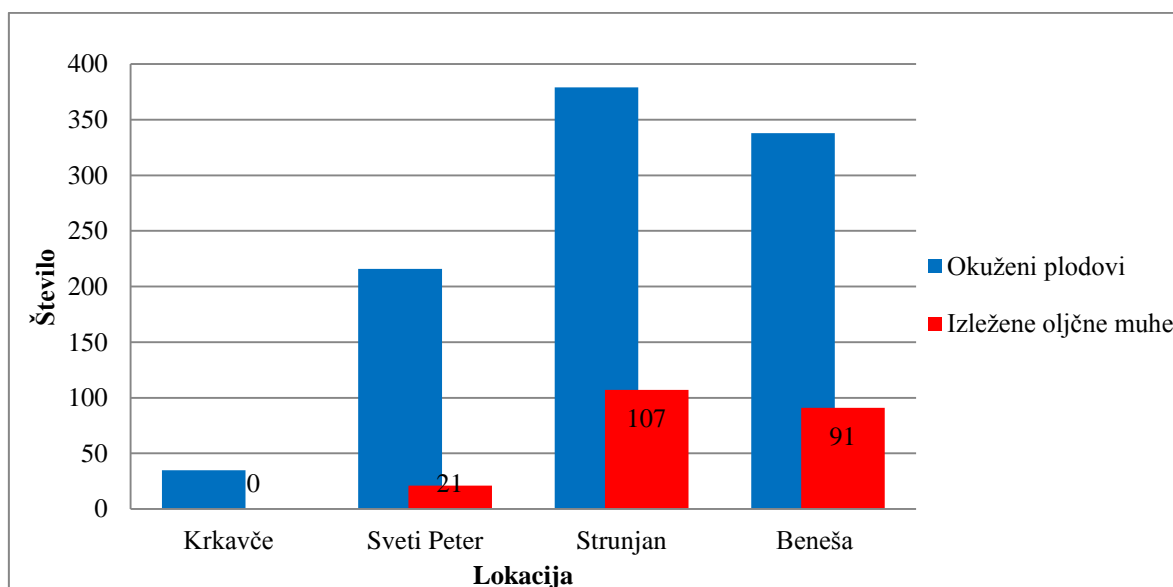
²⁰ Markova veriga Monte Carlo (ang. Markov chain Monte Carlo)

4 REZULTATI

4.1 Vzorčenje okuženih plodov

Plodove napadene z oljčno muho (*Bactrocera oleae* Gmelin) smo od 1. 9. 2013 do 1. 10. 2013 tedensko vzorčili v Slovenski Istri na štirih lokacijah, ki smo jih razdelili med seboj na lokacije obalnega pasu (Strunjan in Beneša) in lokacije zaledja (Krkavče in Sveti Peter). V tem času smo nabrali skupno 968 okuženih plodov, iz katerih se je izleglo 219 odraslih oljčnih muh.

V primerjavi obalnega pasu in zaledja Slovenske Istre je bilo več okuženih plodov na obeh lokacijah obalnega pasu, manj pa v zaledju Slovenske Istre. Na lokacijah Strunjan in Beneša se je iz 379 oziroma 338 okuženih plodov izleglo 107 oljčnih muh na lokaciji Strunjan in 91 na lokaciji Beneša. Na lokaciji Sveti Peter se je iz 216 plodov izleglo 21 oljčnih muh (Slika 6). Stopnja okuženosti je bila zelo nizka na lokaciji Krkavče, saj smo v celotnem obdobju vzorčenja nabrali le 35 okuženih plodov iz katerih se kasneje ni izlegla nobena oljčna muha.



Slika 6: Število vzorčenih okuženih plodov in izleženih oljčnih muh na štirih lokacijah v Slovenski Istri.

4.2 Izolacija DNA

Po izolaciji DNA iz dvesto devetnajstih osebkov oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) smo vzorce s koncentracijo DNA nižjo od 45 ng/ μ l odstranili iz nadaljnje analize. Takih vzorcev je bilo 39.

4.3 Karakterizacija mikrosatelitskih lokusov

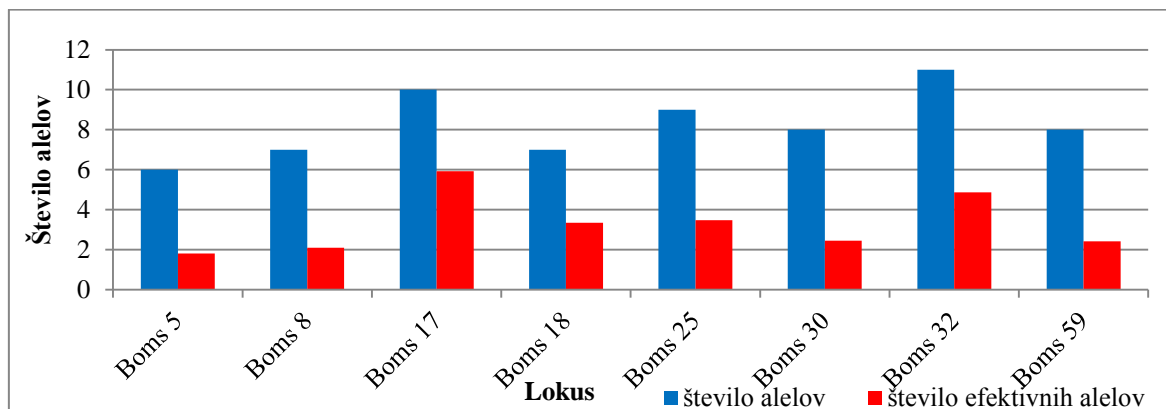
Sto osemdeset vzorcev oljčnih muh (*Bactrocera oleae* Gmelin) iz treh različnih lokacij smo genotipizirali z osmimi mikrosatelitskimi lokusi. Iz nadaljnje analize smo izključili vse vzorce, pri katerih je bila genotipizacija pri vsaj enem mikrosatelitskem lokusu neuspešna. Vse nadaljnje analize smo izvedli s podatkovnim setom iz 117 genotipiziranih vzorcev. Lokuse smo okarakterizirali in te vrednosti predstavili v Preglednici 3.

Preglednica 3: Parametri genetske variabilnosti po posameznih lokusih.

Lokus	H _o	H _e	n	n _e	N _{gs}	PIC	PI
Boms 5	0,419	0,450	6	1,811	0	0,428	0,325
Boms 8	0,521	0,525	7	2,095	1	0,493	0,257
Boms 17	0,402	0,835	10	5,929	1	0,811	0,049
Boms 18	0,735	0,704	7	3,343	1	0,652	0,138
Boms 25	0,795	0,716	9	3,480	2	0,666	0,129
Boms 30	0,547	0,595	8	2,455	3	0,527	0,232
Boms 32	0,752	0,798	11	4,872	4	0,765	0,072
Boms 59	0,496	0,587	8	2,408	1	0,560	0,197
Povprečje	0,583	0,651	8,25	3,299	1,625	0,613	/
Skupno	/	/	66	/	/	/	24x10 ^{-8*}

*H_o in H_e – opažena in pričakovana heterozigotnost; n – število alelov; n_e – število učinkovitih alelov; n_{gs} – število genotipsko specifičnih alelov; PIC – informacijska vrednost polimorfizma; PI – verjetnost enakosti genotipov.

Z osmimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo namnožili 66 polimorfni alelov. Število alelov na lokusih se giblje od 6 do 11. Povprečno število alelov na lokus je 8,25, medtem ko je povprečno število učinkovitih alelov na lokus 3,30. Največ alelov smo odkrili na lokusu Boms 32, najmanj pa na lokusu Boms 5, ki je hkrati tudi najmanj informativen lokus. Z najvišjim številom učinkovitih alelov je najbolj informativen lokus Boms 17 (Slika 7).

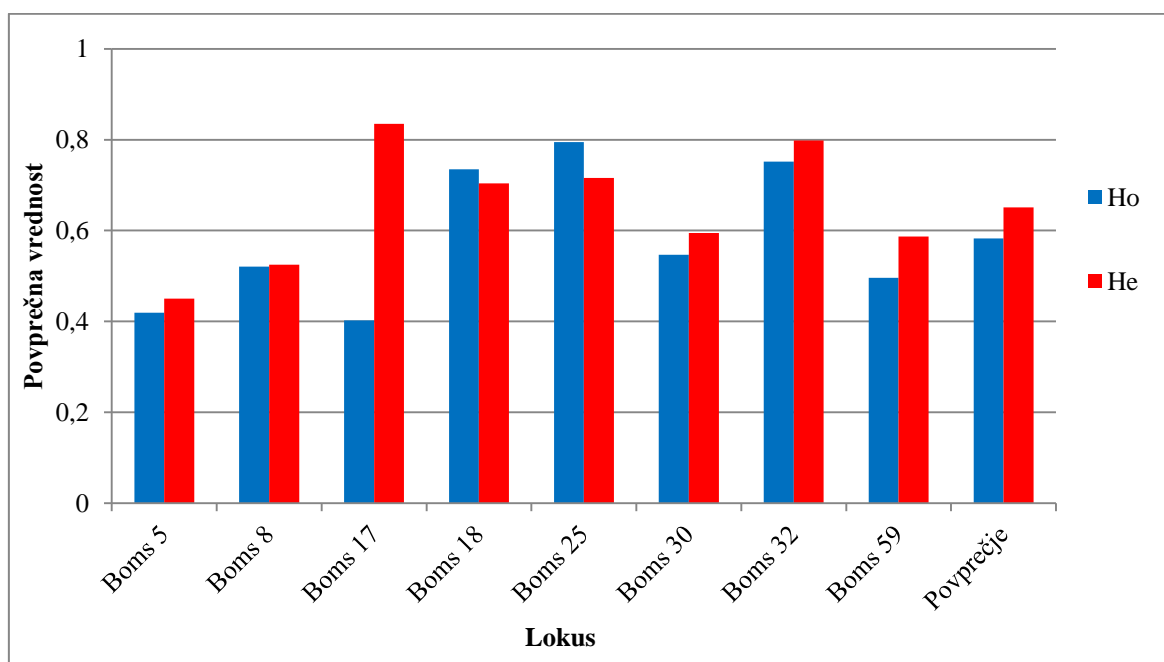


Slika 7: Število alelov in število učinkovitih alelov po posameznem lokusu.

Informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa smo preverili še s informacijsko vrednostjo polimorfizma (PIC) in oceno verjetnosti enakosti genotipov (PI). Višja kot je vrednost PIC bolj informativen je lokus, medtem ko na drugi strani višja kot je vrednost PI nižja je informativnost lokusa.

Vrednosti PIC so odvisne od števila alelov in frekvenc posameznih alelov. Najbolj informativen je lokus Boms 17 s PIC vrednostjo 0,811, najmanj pa lokus Boms 5 z vrednostjo PIC 0,428. Z oceno verjetnosti enakosti genotipov (PI) smo dobili enake rezultate, saj smo najnižjo vrednost PI odkrili na lokusu Boms 17 ($PI=0,049$), najvišjo pa na lokusu Boms 5 ($PI=0,325$). S PI vrednostjo nižjo od 0,10 ($PI=0,072$) in PIC vrednostjo 0,765 lahko trdimo, da je Boms 32 prav tako visoko informativen lokus.

Vrednosti opažene heterozigotnosti (H_o) po lokusih so se nahajale med 0,402 za Boms 17 in vrednostjo 0,795 za Boms 25, medtem ko so se vrednosti pričakovane heterozigotnosti (H_e) gibale od 0,450 za lokus Boms 5 do 0,835 za lokus Boms 17. Opažena in pričakovana heterozigotnost so se za vsak lokus razlikovale. Na Sliki 8 lahko opazimo, da je na lokusih Boms 18 in Boms 25 opažena heterozigotnost nekoliko višja od pričakovane heterozigotnosti, medtem ko je na ostalih lokusih višja pričakovana heterozigotnost. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti na vseh lokusih je 0,583, pričakovane pa 0,651. Največjo razliko med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo opazimo na lokusu Boms 17 (0,433).



Slika 8: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost po lokusih.

Za populacijo je značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja le na enem lokusu (Preglednica 4), in sicer na lokusu Boms 17.

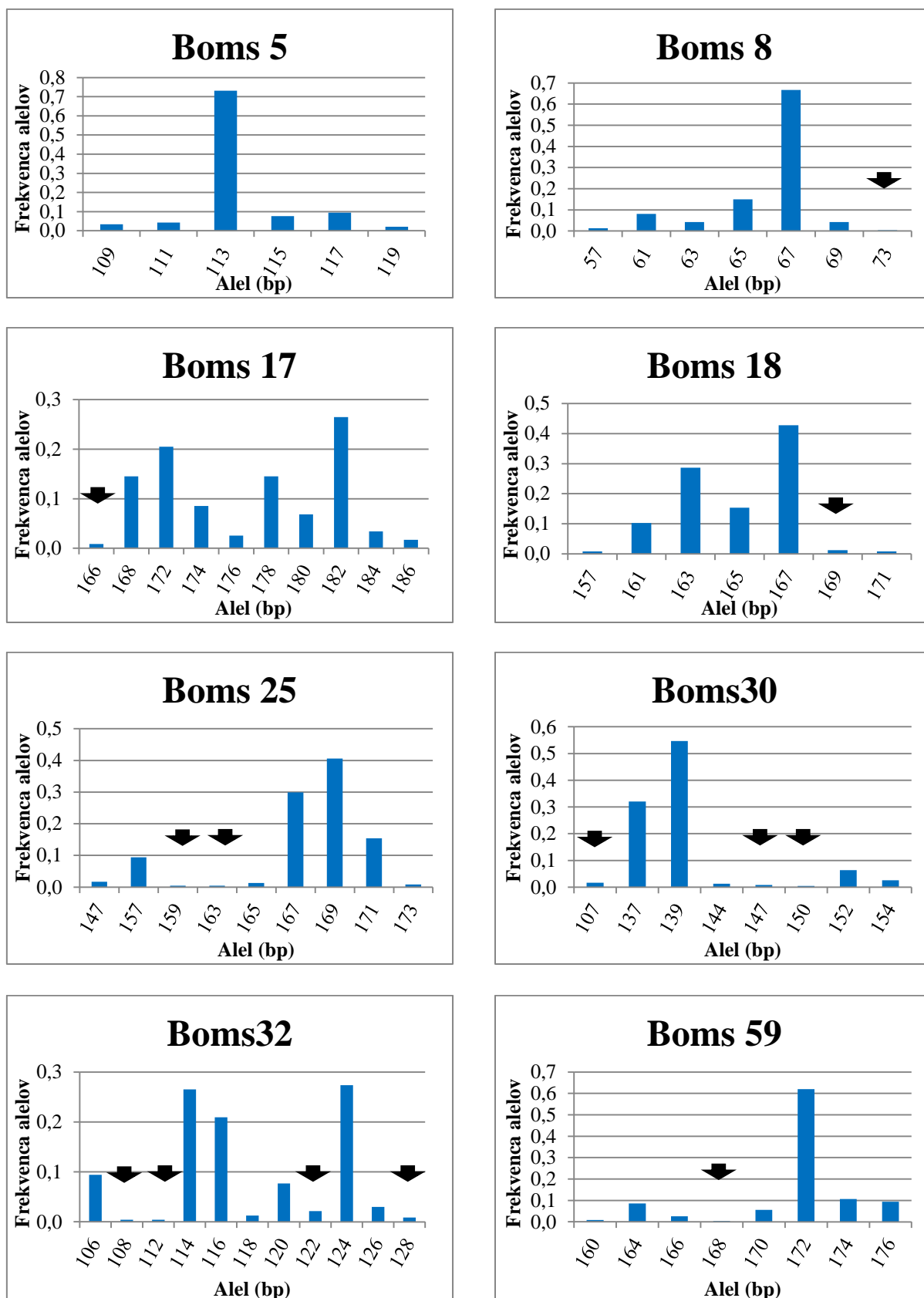
Preglednica 4: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost, vrednost - P ter statistična značilnost izračunane v eksaktnem testu Hardy – Weinbergovega ravnovesja.

Lokus	H_o	H_e	Vrednost - P	Statistična značilnost
Boms 5	0,419	0,450	0,106	statistično neznačilno
Boms 8	0,521	0,525	0,785	statistično neznačilno
Boms 17	0,402	0,835	0,000	P < 0,05
Boms 18	0,735	0,704	0,826	statistično neznačilno
Boms 25	0,795	0,716	0,790	statistično neznačilno
Boms 30	0,547	0,595	0,785	statistično neznačilno
Boms 32	0,752	0,798	0,559	statistično neznačilno
Boms 59	0,496	0,587	0,120	statistično neznačilno

*P < 0,05 - statistično značilno odstopanje H_o od H_e

Na vseh 8 mikrosatelitskih lokusih smo opravili tudi analizo frekvenc alelov (Slika 9). Najmanj alelov (6) je bilo odkritih na lokusu Boms 5, sledila sta mu s 7 aleli lokusa Boms 8 in Boms 18. Na lokusih Boms 30 in Boms 59 smo zaznali po 8 alelov. Pri večini omenjenih lokusov je bil najbolj pogost en alel z nekoliko višjo frekvenco. Na lokusu Boms 8 je pri vseh vzorcih najpogosteje zastopan alel dolžine 67 bp (66 %). Na lokusu Boms 18 je najpogostejši alel dolžine 167 bp, ki je zastopan v 42 %, na lokusu Boms 30 alel dolžine 139 bp (55 %), na lokusu Boms 59 pa je z 62 % najpogosteje zastopan alel dolžine 172 bp. Najvišjo frekvenco smo opazili na lokusu Boms 5, kjer je alel dolžine 113 bp zastopan v 73%. Na tem lokusu smo odkrili tudi najnižje število učinkovitih alelov. Največ učinkovitih alelov je bilo na lokusu Boms 17 in lokusu Boms 32, torej na lokusih kjer so bile frekvence alelov tudi najbolj enakomerno razporejene.

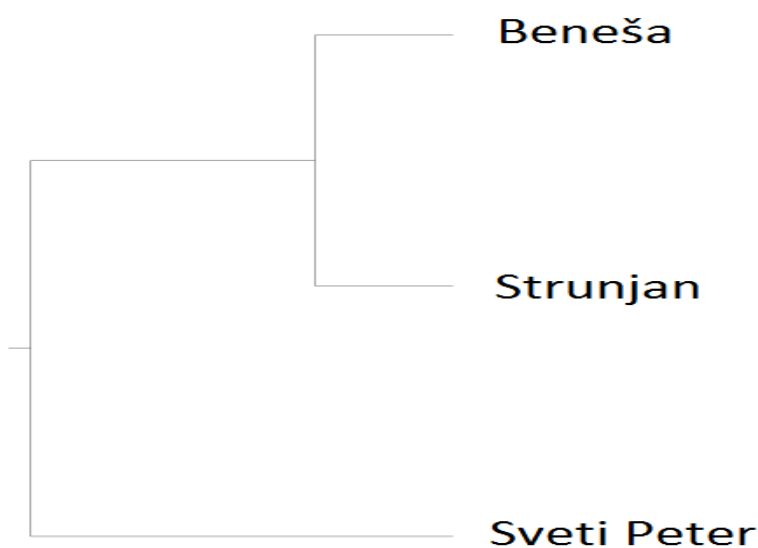
Poleg analize frekvenc alelov smo identificirali še genotipsko specifične alele, ki so na Sliki 9 označeni z puščico. Pri vseh 8 lokusov smo v zelo nizkih frekvencah (1 - 7 %) ugotovili trinajst genotipsko specifičnih alelov. Največ (4) smo jih zabeležili na lokusu Boms 32. Po vzorčnih skupinah smo dva genotipsko specifična alela zabeležili pri vzorcih iz lokacije Beneša, enega pri vzorcih iz lokacije Sveti Peter, deset genotipsko specifičnih alelov je bilo značilnih za vzorce iz lokacije Strunjan.



Slika 9: Frekvenca alelov posameznih lokusov.

4.4 Analiza populacijske strukture

Genetsko razdaljo med vzorčenimi skupinami ali domnevnimi populacijami smo izračunali v programu POPGENE na osnovi Nei-jevega koeficienta. Za grafičen prikaz genetske podobnosti smo po metodi UPGMA²¹ v programu POPGENE na podlagi programa NEIGHBOR v paketu PHYLIP 3.5 izrisali dendrogram, iz katerega (Slika 10) lahko razločimo dve skupine. V prvo skupino se uvrščajo vzorci oljčnih muh obalnega pasu Slovenske Istre: Beneša in Strunjan, v drugo pa osebki muh iz zaledja Slovenske Istre: Sveti Peter.



Slika 10: Dendrogram podobnosti po metodi UPGMA.

V programu GeneA1Ex smo preko parametra F_{ST} proučili odnose med obravnavanimi skupinami vzorčenih oljčnih muh. Vrednosti F_{ST} med skupinami se gibljejo med 0,000 in 0,013 (Preglednica 5). Najnižjo vrednost F_{ST} smo zasledili med skupinama iz obalnega pasu Slovenske Istre: Benešo in Strunjanom, nekoliko višjo pa med skupinama Sveti Peter - Beneša (0,01) in Sveti Peter - Strunjan (0,013). Med vsemi tremi skupinami vzorčenih osebkov so vrednosti F_{ST} zelo nizke, zato se paroma populacije statistično značilno ne razlikujejo ($P < 0,01$).

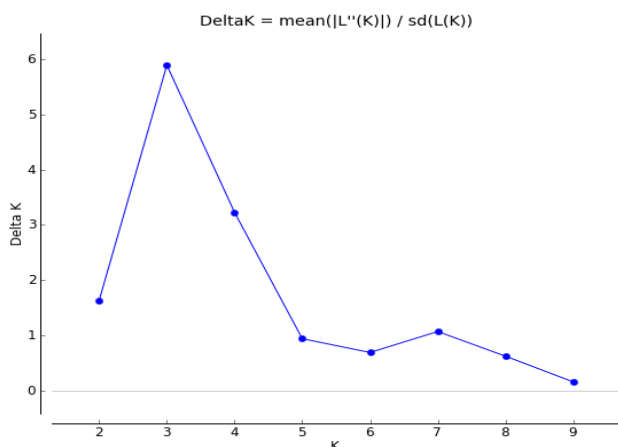
Preglednica 5: Vrednosti genetske razdalje med populacijami na osnovi Nei-jevega koeficienta (pod diagonalo) in F_{ST} vrednosti med pari populacij (nad diagonalo)

	Beneša	Sveti Peter	Strunjan
Beneša		0,010	0,000
Sveti Peter	0,0572		0,013
Strunjan	0,0206	0,0688	

Izračunane vrednosti F_{ST} so statistično značilne, ko je $P > 0,01$.

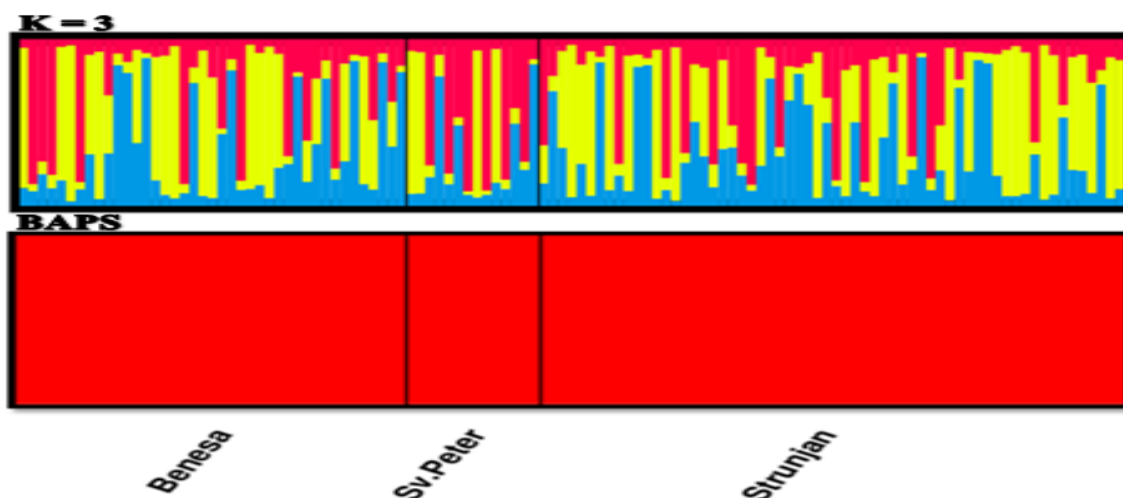
²¹ Metoda neponderirane aritmetične sredine (ang. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

S programoma STRUCTURE in BAPS smo določili število populacijskih struktur znotraj vseh analiziranih vzorcev. Program BAPS je podatkovni set uvrstil v eno skupino, medtem ko je program STRUCTURE z metodo ΔK , kot so jo opisali Evanno in sod. (2005) preko izračuna verjetnosti, da vzorci tvorijo eno od desetih skupin, določil tri skupine ($K=3$). Pri tem je potrebno upoštevati, da je v programu STRUCTURE najmanjše število skupin, ki jih lahko dobimo dve (Slika 11).



Slika 11: Izbira najbolj verjetnega števila skupin ($K=3$) z metodo ΔK (Evanno in sod. 2005).

Program STRUCTURE omogoča dodeljevanje posameznikov v posamezne populacije in določa število različnih populacij, zato smo za lažjo predstavo grafično izrisali skupine s pomočjo programa DISTRUCT (Slika 12). Iz slike lahko razberemo, da rezultat treh skupin ($K = 3$) ni smislen, saj so le te med seboj razpršene, zaradi česar sklepamo, da imamo opravka le z eno prepoznavno skupino oziroma populacijo oljčne muhe, kot je tudi potrdil izris grafa s programom BAPS.

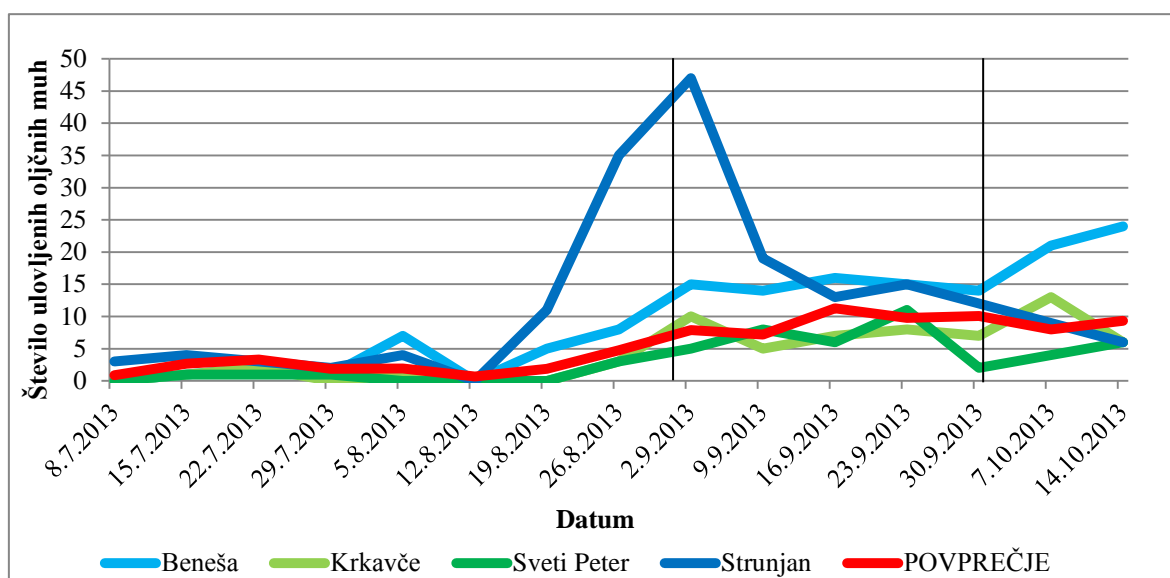


Slika 12: Ocenjena populacijska struktura oljčnih muh s programoma STRUCTURE ($K=3$, zgoraj) in BAPS (spodaj), kjer nam različne barve predstavljajo različne genetske skupine, stolpec pa vsakega posameznika, katerega genetska sestava je pojasnjena z deležem posamezne skupine.

5 DISKUSIJA

5.1 Pojav oljčne muhe v letu 2013

Plodove napadene z oljčno muho (*Bactrocera oleae* Gmelin) smo od 1. 9. 2013 do 1. 10. 2013 tedensko vzorčili v Slovenski Istri na štirih lokacijah, ki smo jih razdelili med seboj na lokacije obalnega pasu (Strunjan in Beneša) in lokacije zaledja (Krkavče in Sveti Peter). Vzorčili smo v času pred obiranjem oljk in času ko je koščica že otrdela in samice oljčne muhe že odlagajo jajčeca v plod oljke (Dominici in sod. 1986; Yokoyama in sod. 2006). Na podlagi podatkov spremljanja ulova oljčne muhe, pridobljenih na strani KGZS – Zavod Nova Gorica (Priloga A) lahko opazimo, da smo izbrali najprimernejši termin vzorčenja plodov, saj je bilo v takratnem obdobju zabeleženih največ oljčnih muh in posledično je bila okuženost največja (Slika 13).



Slika 13: Spremljanje leta oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) v obdobju od 8. 7. do 14. 10. 2013 na 4 lokacijah v Slovenski Istri (Priloga A). Črne črte označujejo obdobje vzorčenja okuženih plodov.

V primerjavi obalnega pasu in zaledja Slovenske Istre je bilo zaradi številčnejšega leta oljčne muhe več okuženih plodov na obeh lokacijah obalnega pasu, manj pa v zaledju Slovenske Istre. Prav tako je bila v primerjavi z lokacijami zaledja na lokacijah obalnega pasu več izleženih muh. Na število izleženih muh je vplival tudi način varstva oljk, tako je bila največja, kar 28 % uspešnost na lokaciji Strunjan, kjer pridelujejo oljke na ekološki način in 26 % uspešnost na lokaciji Beneša, kjer pridelujejo na integriran način. Na lokaciji Sveti Peter, kjer pridelujejo oljke na konvencionalen način in pri varstvu rastlin uporabljajo fitofarmacevtska sredstva se iz okuženih plodov ni izleglo niti 10 % muh. Prav zaradi tega bi bilo v prihodnje smiselno vzorčiti le na lokacijah, kjer pridelujejo oljke na naravi prijazen način, torej na ekološki ali integriran način.

5.2 Analiza mikrosatelitskih lokusov

V nalogi smo mikrosatelitske markerje vrednotili na osnovi različnih parametrov variabilnosti, z namenom, da bi med njimi identificirali najboljše lokuse. Ti parametri so: opažena heterozigotnost (H_o) ta predstavlja delež heterozigotnih posameznikov v populaciji oziroma v vzorcu; pričakovana heterozigotnost (H_e) predstavlja delež populacije oziroma vzorca, ki bi bil heterozigoten, če bi med posamezniki prišlo do naključnega križanja, prav tako predstavlja tudi zmožnost markerja za ločevanje med genotipi; informacijska vrednost polimorfizma (PIC) predstavlja informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa oziroma stopnjo pri kateri z njim nedvoumno določimo genetsko identiteto posameznika in vključuje tako število alelov na posameznem lokusu, kot tudi frekvence posameznih alelov; verjetnost enakosti genotipov (PI), ta nam pove kakšna je verjetnost, da imata dva naključna posameznika dva enaka alela na proučevanem lokusu (Štajner 2010). Manjša kot je vrednost PI, bolj informativen je posamezen lokus. Visoke vrednosti PI kažejo na nizko informativnost, ki je navadno posledica majhnega števila alelov ali visoke frekvence enega od alelov na proučevanem lokusu (Štajner 2010).

Pri 117-ih vzorcih oljčnih muh (*Bactrocera oleae* Gmelin) smo z osmimi pari lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov namnožili 66 polimorfni alelov, kar predstavlja povprečno 8,25 alelov na lokus. Augustinos in sod. so leta 2005 pri analizi 650 - 700 vzorcev oljčne muhe na 12 lokusih v povprečju zaznali 10,41 alela na lokus, medtem ko so leta 2008 pri analizi 20 - 37 oljčnih muh na 58 lokusih v povprečju zaznali 4,63 alela na lokus. V primerjavi z našo raziskavo so Augustinos in sod. (2008) na enakih 8 lokusih v povprečju zaznali nekoliko manjše število alelov, in sicer 6,13 alelov na lokus, vendar je potrebno poudariti, da so v študiji analizirali manjše število vzorcev. O nekoliko večji variabilnosti mikrosatelitov poročajo Dogac in sod. (2013), ki so pri analizi 380 oljčnih muh na 12 lokusih v povprečju odkrili 13,9 alelov. V naši raziskavi je povprečno število alelov na lokus večje od števila, ki ga najdemo v raziskavah na drugih dvokrilcih (Diptera), kot so *Drosophila melanogaster* (4,75), *Drosophila simulans* (7,11) in *Anopheles gambiae* (7,8) (Augustinos in sod. 2005, Wu in sod. 2011). Ugotovljeno potrjuje uporabnost našega seta markerjev v populacijsko-genetskih analizah oljčne muhe.

Vrednosti opažene heterozigotnosti (H_o) po lokusih so se nahajale med 0,402 za Boms 17 in vrednostjo 0,795 za Boms 25, medtem ko so se vrednosti pričakovane heterozigotnosti (H_e) gibale od 0,450 za lokus Boms 5 do 0,835 za lokus Boms 17. V povprečju vseh lokusov je opažena heterozigotnost (H_o) znašala 0,583, pričakovana heterozigotnost (H_e) pa je bila nekoliko višja in je znašala 0,651. Podobno povprečno vrednost so na enakih osmih lokusih odkrili tudi Augustinos in sod. (2008) ($H_o=0,603$, $H_e=0,630$). V obeh raziskavah, tako naši, kot v raziskavi Augustinosa in sod. (2008) smo največjo razliko med

opaženo in pričakovano heterozigotnostjo opazili na lokusu Boms 17. Na tem lokusu je za populacijo značilno izrazito odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, ki kaže na možnost vpliva nekaterih za populacijo neugodnih dejavnikov, vendar ker ne razpolagamo s podatki nukleotidnega zaporedja iz naše analize in evolucije lokusa, ne moremo določiti dejanskega vzroka za odstopanje. V obrobni regiji mikrosatelita pogosto nastajajo mutacije (Orti in sod., 1997), ki povzročijo lažno smrt mikrosatelita. Ker začetni oligonukleotidi v PCR ne prepoznajo mutiranih mest prileganja pride do odsotnosti amplifikacije alelov. Rezultat takšnega procesa so ničti aleli, ki se lahko v populaciji ustalijo in njihova navzočnost povzroča veliko odstopanje med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo (Callan in sod., 1993).

Za vseh 8 mikrosatelitskih lokusov smo opravili tudi analizo frekvenc alelov (Slika 9). Na lokusih kjer so bile frekvence alelov bolj enakomerno razporejene (lokusa Boms 17 in Boms 32) je bilo ugotovljenih več učinkovitih alelov, kot na lokusih kjer je bil najbolj pogost en alel z nekoliko višjo frekvenco (Boms 5). Visoka frekvenca enega alela na lokus vpliva na izračunane nižje vrednosti učinkovitih alelov ter posledično na samo informativnost lokusa.

Dolžine alelov so primerljive z dolžinami alelov oziroma pričakovanimi dolžinami alelov, ki so jih našli tudi v drugih raziskavah (Preglednica 6). V primerjavi z raziskavo Augustinos in sod. (2008) prihaja do odstopanj le na dveh lokusih, in sicer na lokusu Boms 8 (2 bp) in lokusu Boms 5 (4 bp). Ti rezultati so primerljivi z rezultati pridobljenimi na študiji grozdja, kjer so v medlaboratorijski primerjavi dolžin alelov dobili odstopanja od 1 do 5 baznih parov (This in sod. 2004). Do nekoliko večjih odstopanj je prišlo v primerjavi z raziskavo Augustinosa in sod. (2005) in Dogaca in sod. (2013), kar je verjetno posledica različnih dejavnikov, kot so koncentracija pufra, temperatura laboratorijske okolice in fluorescentna oznaka, ki lahko vplivajo na mobilnost DNA v kapilarni elektroforezi (Demmer in Nelson 2010). V praksi so številne študije potrdile, da se dolžine alelov med laboratoriji lahko razlikujejo, in da je te razlike mogoče pripisati opremi ali tehničnim sposobnostim raziskovalcev (Doveri in sod. 2008). Prav tako številni avtorji razpravljajo o problemu doslednosti podatkov genotipizacije mikrosatelitov v različnih laboratorijih in predlagajo standardizacijo dolžin alelov (Demmer in Nelson 2010; Vemireddy in sod. 2007). Pompanon in sod. (2005) so razvrstili napake genotipizacije na: napake povezane s spremembo zaporedja DNA, napake povezane z nizko kakovostjo ali količino DNA in na napake, katerih glavni krivec je človek. Problem je, da se genotipizacijske napake pogosto zanemarija, čeprav lahko bistveno vplivajo na biološke sklepe, prav zaradi tega je izredno pomembna delitev in izmenjava podatkov genotipizacije med raziskovalnimi skupinami, ki lahko prispeva k boljšemu upravljanju genskih virov oljčne muhe.

Preglednica 6: Podatki različnih raziskav o dolžini alelov za posamezne lokuse.

Lokus	Dolžina alelov (naša raziskava)	Pričakovana dolžina alelov (Augustinos in sod. 2008)	Dolžina alelov (Augustinos in sod. 2005, Dogac in sod. 2013)
Boms 5	109-119	105	ni podatka
Boms 8	57-73	75	ni podatka
Boms 17	166-186	170	ni podatka
Boms 18	157-171	171	153-165
Boms 25	147-173	167	140-170
Boms 30	107-154	150	123-163
Boms 32	106-128	125	111-130
Boms 59	160-176	171	158-174

Informativnost posameznega mikrosatelitskega lokusa smo preverili še s informacijsko vrednostjo polimorfizma (PIC) in oceno verjetnosti enakosti genotipov (PI) (Preglednica 3). Višja kot je vrednost PIC bolj informativen je lokus, medtem ko na drugi strani višja kot je vrednost PI nižja je informativnost lokusa.

Vrednosti PIC določajo vrednost polimorfizma, ki je odvisen od števila alelov in frekvence vsakega alelov na lokusu. Najbolj informativen je lokus Boms 17 s PIC vrednostjo 0,811, najmanj pa lokusa Boms 5 z vrednostjo PIC 0,428 in Boms 8 (PIC=0,493), ki sta tudi edina lokusa z vrednostjo PIC nižjo od 0,5, zaradi česar spadata med srednje informativne lokuse (Botstein in sod. 2005). Na osnovi povprečne vrednosti PIC (PIC=0,613) lahko zaključimo, da so analizirani mikrosatelitski lokusi visoko informativni (PIC>0,5) in primerni tudi za gensko kartiranje. To dokazuje, da so izbrani mikrosatelitski lokusi dovolj polimorfni zaradi česar so uporabni v genetski študijah.

Vrednosti enakosti genotipov (PI) se uporablja kot merilo za ločevanje genotipov in je pokazala najnižjo informacijsko vrednost PI na lokusu Boms 17 (PI=0,049). Najvišjo pa na lokusu Boms 5 (PI=0,325) in Boms 8 (PI=0,257), torej na lokusih z najmanjšim številom odkritih alelov. Zaradi višje vrednosti PI omenjena lokusa uvrščamo med mikrosatelitske lokuse s slabšo sposobnostjo ločevanja in v primerjavi z ostalimi mikrosatelitskimi lokusi nista toliko primerna za uporabo.

Če povzamemo, smo na osnovi analize mikrosatelitski lokusov, ugotovili, da so vsi mikrosatelitski lokusi polimorfni. Kljub temu, da sta zaradi nizkih vrednosti PIC, visokih vrednosti PI in manjšega števila učinkovitih alelov, lokusa Boms 5 in Boms 8 kazala nekoliko slabše parametre variabilnosti je bil nabor uporabljenih mikrosatelitskih

markerjev visoko informativen. Na osnovi obravnavanih parametrov variabilnosti lahko zaključimo, da so obravnavani mikrosatelitski lokusi primerni genetski označevalci za populacijske študije oljčne muhe.

5.3 Analiza populacijske strukture

S programoma STRUCTURE in BAPS smo določili število populacijskih struktur znotraj vseh analiziranih vzorcev. Program BAPS je podatkovni set uvrstil v eno skupino, program STRUCTURE pa tri. Kljub temu, da se rezultati pridobljeni s programoma razlikujejo, se je kot najbolj verjetno izkazalo, da gre v celotni zbirki vzorcev le za eno prepoznavno skupino oziroma za eno populacijo oljčne muhe. To je razvidno tako iz razpršene grafične ocene populacijske strukture (Slika 12), kot tudi iz nizkih F_{ST} vrednosti ($< 0,01$), ki v programu STRUCTURE vplivajo na odkrivanje skupin na osnovi ocene frekvenc alelov v populaciji. Program STRUCTURE namreč pri $F_{ST} < 0,03$ ne more več pravilno oceniti števila skupin (Pritchard in sod. 2000; Hubisz in sod. 2009).

Nizke vrednosti fiksacijskega indeksa F_{ST} med pari populacij lahko razložimo s predpostavko, da prihaja do migracije in naključnega parjenja med posameznimi osebkami različnih mikro lokacij Slovenske Istre ter je med njimi prisoten pretok genov. Močnejše okužbe oljčnih plodov in številčnejše populacije oljčne muhe v priobalnem pasu pa lahko prepisemo ugodnejšim ekološkim dejavnikom kot je denimo povišana vlaga. Na ozkem geografskem območju med pari populacij torej ne prihaja do razlik, zaradi česar jih lahko vrednotimo kot eno samo homogeno populacijo. O nizki diferenciaciji poročajo tudi v raziskavi Dogaca in sod. (2013) na območju Turčije, kjer so jo pojasnili z intenzivnim oljkarstvom, odsotnostjo fizičnih ovir za pretok genov in ustreznimi klimatskimi pogoji. Vrednosti F_{ST} se gibljejo med $-0,002$ in $0,051$, kar je razdelilo vzorce v 2 populacije, ki so med seboj oddaljene za več kot 700 km. Upoštevajoč to razdaljo je pretok genov en pomembnejših dejavnikov, ki vpliva na obliko genetske strukture oljčne muhe v Turčiji (Dogac in sod. 2013). O nizkih vrednostih F_{ST} poročajo tudi Nardi in sod. 2005, kjer se je le ena populacija s vrednostjo $F_{ST} 0,56$ dobro ločila od ostalih. Vse raziskave kažejo na to, da na regionalni ravni obstaja zelo nizka genetska diferenciacija med populacijami oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin), medtem ko na kontinentalni, prihaja do večjega razhajanja (Nardi in sod. 2005).

Za nadaljnje analize populacijske strukture oljčne muhe bi bilo smiselno populacijo oljčne muhe Slovenske Istre primerjati s populacijami celotnega Jadrana, saj bi tako dobili primerjavo s populacijami v geografsko ločenih območjih Jadranske obale in otokov ter tako ugotovili ali prihaja z razdaljo do diferenciacije populacije. Raziskavo bi bilo smiselno razširiti na celoten Balkanski polotok.

Razumevanje populacijske strukture, priseljevanja, selitvenih poti in poznejših vzorcev razširjenosti po vseh naravnih pokrajinah spada med pomembne vidike upravljanja oljčnih muh. Mikrosateliti so genetski označevalci, ki omogočajo proučevanje genetske strukture populacij, pretoka genov in učinka ozkega grla in so bili v zadnjih letih uspešno uporabljeni pri analizi strukture populacije različnih vrst družine sadnih muh. So zelo dobra orodja za populacijsko-genetske analize in še posebej koristni pri vrstah, kot je oljčna muha, kjer je zaradi pomanjkanja morfoloških markerjev klasična genetska analiza praktično nemogoča (Augustinos in sod. 2008). Hkrati bi boljše poznavanje genetike oljčne muhe omogočilo uporabo tehnike sterilnih insektov in s tem izkoreninjene teh škodljivih organizmov brez uporabe fitofarmaceutskih sredstev.

6 LITERATURA

- Abdul-Muneer P.M. 2014. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International* 2014: 691759.
- Aketarawong N., Bonizzoni M., Thanaphum S., Gomulski L. M., Gasperi G., Malacrida A. R., Gugliemino C. R. 2007. Inferences on the population structure and colonization process of the invasive oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Molecular Ecology* 16: 3522-3532.
- Alford D. V. 2007. Pests of fruit crops: a colour handbook. London, Manson Publishing: 187 str.
- Anmarkrud J.A., Kleven O., Bachmann L., Lifjeld J.T. 2008. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evolutionary Biology* 8: 1471-2148.
- Applied Biosystems, 2010.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039944.pdf (datum dostopa: 4. 4. 2014)
- Armour J. A. L., Alegre S. A., Miles S., Williams L. J., Badge R. M. 1999. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. V: *Microsatellites - evolution and applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 24-33.
- Asch B., Pereora Castro I., Rei F., Costa L.T. Mitochondrial haplotypes reveal olive fly (*Bactrocera oleae*) population substructure in the Mediterranean. *Genetica* 140(4-6): 181-187.
- Athar M. 2005. Infestation of olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, in California and taxonomy of its host trees. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 70(4): 135-138.
- Augustinos A. A., Stratikopoulos E. E., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K. D. 2002. Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes* 2: 278-280.
- Augustinos A. A., Mamuris Z., Stratikopoulos E. E., D'Amelio S., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K. D. 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125: 231-241.
- Augustinos A. A., Stratikopoulos E. E., Drosopoulou E., Kakani E. G., Mavragani-Tsipidou P., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K. D. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9: 618.
- Bandelj Mavsar D. 2006. Mikrosatelitski markerji in njihova uporabnost v oljkarstvu. *Series Historia Naturalis* 16(2): 209-222.

- Bartlett M. S. J., Stirling D. 2003. PCR Protocols, druga izdaja. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.
- BASF. 2012. Perfekthion. Etiketa z navodilom za uporabo. Ljubljana, BASF SLO d.o.o. <http://spletni2.furs.gov.si/FFS/FFSCD/CD/FFS/S/E/BASF/PERFEKTHION.pdf> (datum dostopa: 4. 4. 2014)
- Bonizzoni M., Katsoyannos B. I., Marguerie R., Guglielmino C. R., Gasperi G., Malacrida A., Chapman T. 2002. Microsatellite analysis reveals remating by wild Mediterranean fruit fly females, *Ceratitidis capitata*. Molecular Ecology 11: 1915-1921.
- Botstein D., White R. L., Skalnick M. H., Davies R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, American Journal of Human Genetics 32: 314-331.
- Bučar Miklavčič M. 1998. Pridelava in kakovost oljčnega olja - The processing and quality of olive oil. Glasnik UP ZRS 5(3): 61-76.
- Callan D. F., Thompson A. D., Shen Y., Philips H. A., Richards R. I., Mulley J. C., Sutherland G. R. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. American Journal of Human Genetics 52: 922-927.
- Chambers G. K., MacAvoy E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126: 455-576.
- Chapuis M. P., Estoup A. 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. Mol Biol Evol 24(3): 621-631.
- Chistiakov D. A., Hellemans B., Volckaert F. A. M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. Aquaculture 255: 1-29.
- Corander J., Marttinen P., Sirén J., Tang J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. BMC Bioinformatics 9: 539.
- Deemer D. L., Nelson C. D. 2010. Standardized SSR allele naming and binning among projects. Biotechniques 49(5): 835-836.
- Dimou I., Koutsikopoulos C., Economopoulos A. P., Lykakis J. 2003. The distribution of olive fruit fly captures with Mc Phail traps within an olive orchard. Phytoparasitica 31: 124-131.
- Dogac E., Kandemir I., Taskin V. 2013. The Genetic Polymorphisms and Colonization Process of Olive Fly Populations in Turkey. PLOS ONE 8(2): 1-11.
- Dominici M., Pucci C., Montanari G. E. 1986. *Dacus oleae* (Gmel.) ovipositing in olive drupes (Diptera, Tephritidae). J. Appl. Entomol. 101: 111-120.
- Doveri S., Sabino Gil F., Díaz A., Reale S., Busconi M., da Câmara Machado A., ... in Lee D. 2008. Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar

- identification studies in olive (< i> Olea europaea</i> L.). Scientia horticulturae 116(4): 367-373.
- Dow AgroSciences. 2012. GF-120 vaba z naturalitetnim insekticidom. Ljubljana, Karsia Dutovlje d.o.o. http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/Dokumenti%5CDoc_1_GF-120.pdf (datum dostopa: 4. 4. 2014)
- Earl D. A., von Holdt B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4(2): 359-361.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611-2620.
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York, 617 str.
- Goldstein D. B., Pollock D. D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. Journal of Heredity 88: 335-342.
- GSview. 2012. <http://pages.cs.wisc.edu/~ghost/gsview/> (datum dostopa: 4. 7. 2014)
- Hoshino A. A., Bravo J. P., Nobile P. M., Morelli K. A. 2012. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. Genetic Diversity in Microorganisms 149-170.
- Hubisz M. J., Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular ecology resources 9(5): 1322-1332.
- Hudson R. R., Slatkin M., Maddison W. P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. Genetics 132(2): 583-589.
- Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. 1990. PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press Inc., San Diego, Kalifornija: 482 str.
- INRA. 2005. Paris, Institut national de la recherche agronomique. <http://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/6dacole.htm> (datum dostopa: 4. 4. 2014)
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics 23(14): 1801-1806.
- Kapatos E. T., Fletcher B. S. 1984. The phenology of olive fly, *Dacus oleae* Gmel. (Diptera, Tephritidae), in Corfu. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie 97: 360-370.
- Katsoyannos P. 1992. Olive Pests and Their Control in the Near East. FAO Plant production and protection paper No115. FAO, Rim.
- KGZS – Kmetijsko Gozdarski zavod Nova Gorica. 2011. Letak Ekološko varstvo pred oljčno muho. http://www.zoob-oljke.si/images/stories/MUHA_SLO_2.pdf (datum dostopa: 4. 4. 2014)

- Khamis F. M., Karam N., Ekesi S., De Meyer M., Bonomi A., Gomulski L. M., Scolari F., Gabrieli P., Siciliano P., Masiga D. 2009. Uncovering the tracks of a recent and rapid invasion: the case of the fruit fly pest *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in Africa. *Molecular Ecology* 18: 4798-4810.
- Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo* 59: 63-66.
- Marshall T. C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- McPherson M., Møller S. 2006. PCR, druga izdaja. Taylor & Francis Group, Abingdon: 292 str.
- Metzgar D., Bytof J., Wills C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72-80.
- Miah G., Rafii M. Y., Ismail M. R., Puteh A. B., Rahim H. A., Islam N., Latif M. A. 2013. A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 22499-22528.
- Minch E. 1997. Microsat, Version 1.5b: Stanford University Medical center, Stanford.
- Moran C. 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Heredity* 84: 274-280.
- Mazomenos, B. E. 1989. *Dacus oleae*. World crop pests. V Robinson A. S. in Hooper G. (ur.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Nizozemska: 169-177.
- Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Roderick G. K., Frati F. 2005. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* 14(9): 2729-2738.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat* 106: 283-292.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3): 583-590.
- Orti G., Pearse D.E., Avise J. C. 1997. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 10745-10749.
- Peakall R., Smouse P. E. 2009. GenAlEx Tutorials - Part 1: Introduction to Population Genetic Analysis. Australian National University, Canberra.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Podgornik M., Bandelj D., Jančar M., Bučar Miklavčič M. 2006. Spremljanje pojava oljčne muhe (*Bactrocera oleae*) v Slovenski Istri v letu 2005 z novo metodo za fitosanitarno varstvo olj. *Annales, Series Historia Naturalis* 16(2): 223-230.
- Podgornik M., Bandelj D., Jančar M., Bučar Miklavčič M., Tomassone D. 2007. Nova metoda spremljanja pojava oljčne muhe (*Bactrocera oleae* L.) v Slovenski Istri v

- okviru projekta SIGMA, Interreg IIIA; Zbornik predavanj in referatov 8. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Radenci: 163-167.
- Pokhriyal B., Thorat K., Limaye D. A., Joshi Y. M., Kadam V. J., Dubey R. 2012. Microsatellite markers – a novel tool in molecular genetics. *International journal of research in pharmacy and chemistry* 2(2): 397-412.
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E. in Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics* 6(11): 847-846.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(4): 945-959.
- Rice R.E. 2000. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *Univ. California Coop. Ext., UC Plant Protection Quarterly* 10: 1-5.
- Rosenberg N. A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology* 4:137-138.
- Sancin V. 1990. Velika knjiga o oljki. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 319 str.
- Schlötterer C. 1998. Microsatellites. V: Hoelzel, A.R. (Ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford: 237-261.
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Shete S., Tiwari H., Elston R. C. 2000. On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value. *Theoretical Population Biology* 57: 265-271.
- Sedmak D., Jančar M. 1995. Izkušnje pri integriranem varstvu oljk pred oljčno muho v Slovenski Istri. Zbornik predav. in refer. z 2. Slov. posvet o varstvu rastlin: 211-220.
- Sharaf N. S. 1980. Life history of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera: Tephritidae), and its damage to olive fruit in Tripolitania. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 89: 390-400.
- Segura M. D., Callejas C., Ochando M. D. 2008. *Bactrocera oleae*: a single large population in Northern Mediterranean basin. *Journal of Applied Entomology* 132: 706–713
- Selkoe K. A., Toonen R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera* L.) *Acta agriculturae Slovenica* 95(2): 183-192.
- Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja. 2013. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Ljubljana.
http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Kmetijstvo/Integrirana_pridelava/IPL-TN-2013_final_popravek_3.pdf (datum dostopa: 4. 4. 2014)

- This P., Jung A., Boccacci P., Borrego J., Botta R., Costantini L., ... in Maul E. 2004. Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 109(7): 1448-1458.
- Toth G., Gaspari Z., Jurka J., 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10: 967-981.
- Van Steenwyk R. A., Ferguson L., Zalom F. G. 2002. UC IPM pest anagementguidelines: olive insects and mites. University of California, Agriculture and Natural Resources Publication 3452.
- Varshney R.K., Thiel T., Stein N., Langridge P., Graner A. 2002. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell Mol Biol Lett* 7: 537-546.
- Vemireddy L., Archak S. in Nagarju J. 2007. Capillary electrophoresis is essential for microsatellite marker based detection and quantification of adulteration of basmati rice (*Oryza sativa* L.) *J. Agric. Res.* 23: 4407-4414.
- Vossen P., Varela L., Devarenne A. 2006. Olive fruit fly. University of California Cooperative Extension Sonoma County, California: 5.
- Walker K. 2008. Olive fruit fly (*Bactrocera oleae* Gmelin) <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136256> (datum dostopa: 4. 4. 2014)
- Wu Y., Li Y., Ruiz-Arce R., McPherson B. A., Wu J., Li Z. 2011. Microsatellite Markers Reveal Population Structure and Low Gene Flow Among Collections of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera:Tephritidae) in Asia. *Journal of Economic Entomology* 104(3): 1065-1074.
- Yeh F. C., Boyle T., Ye Z., Xiyang J. M. 1999. POPGENE Version 1.31: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf> (datum dostopa: 3. 6. 2014)
- Yokoyama V. Y., Miller G. T., Stewart-Leslie J., Rice R. E., Phillips P. A. 2006. Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Populations in Relation to Region, Trap Type, Season, and Availability of Fruit, *Journal of Economic Entomology* 99: 2072-2079.
- Yokoyama V. Y., Miller G. T. 2007. Olive fruit fly biology and cultural control practices in California. *IOBC/WPRS Bull.* 30(9): 263-269.
- Yu H., Frommer M., Robson M. K., Meats A. W., Shearman D. C., Sved J. A. 2001. Microsatellite analysis of the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae) indicates spatial structuring: implications for population control. *Bull Entomol Res* 91: 139-147.
- Zalom F. G., Van Steenwyk R. A., Burrack H. J., Johnson M. W. 2009. Olive fruit fly. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publ. 74112.

Zygouridis N. E., Augustinos A. A., Zalom F. G., Mathiopoulos K. D. 2009. Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity* (Edinb) 102(4): 402–412.

PRILOGE

Priloga A: Ulov oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) v obdobju od 8. 7. do 14. 10. 2014 na 4 lokacijah v Slovenski Istri.

Lokacija	8. 7. 2013	15. 7. 2013	22. 7. 2013	29. 7. 2013	5. 8. 2013	12. 8. 2013	19. 8. 2013	26. 8. 2013	2. 9. 2013	9. 9. 2013	16. 9. 2013	23. 9. 2013	30. 9. 2013	7. 10. 2013	14. 10. 2013
Beneša	0	1	2	1	7	0	5	8	15	14	16	15	14	21	24
Krkavče	0	1	2	0	1	0	0	3	10	5	7	8	7	13	6
Sv.Peter	0	1	1	1	0	0	0	3	5	8	6	11	2	4	6
Strunjan	3	4	3	2	4	0	11	35	47	19	13	15	12	9	6