

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

PROUČEVANJE RAZVOJA ODPORNOSTI NA
INSEKTICIDE IZ SKUPINE ORGANSKIH
FOSFORJEVIH ESTROV Z MOLEKULARNIMI
METODAMI PRI OLJČNI MUHI *Bactrocera oleae*
Gmelin (Diptera: Tephritidae)

ANDREJA FRANCA

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Proučevanje razvoja odpornosti na insekticide iz skupine
organskih fosforjevih estrov z molekularnimi metodami pri
oljčni muhi *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae)**

(Study of resistance development to the organophosphate insecticides by
molecular methods in the olive fly *Bactrocera oleae*
Gmelin (Diptera: Tephritidae))

Ime in priimek: Andreja Franca

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Koper, november 2021

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Andreja FRANCA

Naslov magistrskega dela: Proučevanje razvoja odpornosti na insekticide iz skupine organskih fosforjevih estrov z molekularnimi metodami pri oljčni muhi *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae)

Kraj: Koper

Leto: 2021

Število listov: 58

Število slik: 16

Število preglednic: 6

Število prilog: 3

Št. strani prilog: 3

Število referenc: 53

Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

UDK: 632.7:615.285.7(043.2)

Ključne besede: *Bactrocera oleae* Gmelin; organski fosforjevi estri; odpornost; mutacije; acetilholinesteraza (AChE); Slovenska Istra

Izvleček:

Oljčna muha, *Bactrocera oleae* Gmelin, je pomemben škodljivec za oljko. Povzroči lahko celoten izpad pridelka in prispeva k zmanjšanju kakovosti olja. Varstvo proti oljčni muhi temelji predvsem na uporabi insekticidov iz skupine organskih fosforjevih estrov, piretroidov in spinosada. Zaradi dolgotrajne uporabe ožjega izbora pripravkov v tujini poročajo o razvoju odpornosti. Odpornost oljčne muhe proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov povezujejo s tremi mutacijami (G488S, I214V in Δ 3Q) v genu *ace*, ki kodira zapis za encim acetilholinesterazo (AChE). Ugotavljanje prisotnosti omenjenih treh mutacij je pomembno zaradi načrtovanja varstvenih ukrepov proti oljčni muhi, ki bi razvoj odpornosti upočasnili. V ta namen smo z genetsko analizo preverili prisotnost vseh treh mutacij v vzorcih oljčne muhe iz dveh lokacij v Slovenski Istri. Frekvence odpornostnih alelov pri omenjenih mutacijah so bile višje leta 2016 v primerjavi z letom 2013, zato predpostavljamo, da se je stopnja odpornosti oljčnih muh proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov povečala.

Key document information

Name and SURNAME: Andreja FRANCA

Title of the thesis: Study of resistance development to the organophosphate insecticides by molecular methods in the olive fly *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae))

Place: Koper

Year: 2021

Number of pages: 58

Number of figures: 16

Number of tables: 6

Number of appendix: 3

Number of appendix pages: 3

Number of references: 53

Mentor: Assist. Prof. Matjaž Hladnik, PhD

UDC: 632.7:615.285.7(043.2)

Keywords: *Bactrocera oleae* Gmelin; organophosphates; resistance; mutations; acetylcholinesterase (AChE); Slovenian Istria

Abstract:

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Gmelin, is an important pest of the olive. It can cause complete destruction of olive crop and contributes to reduction of the olive oil quality. Protection against the olive fruit fly is based on the use of insecticides from the groups of organophosphates, pyrethroids and spinosad. Due to the long-term use of a small number of plant protection products, the development of a resistance has been already reported in other countries. The resistance of olive flies to insecticides from the group of organophosphates was observed to be related to the three mutations (G488S, I214V and Δ 3Q) in the *ace* gene, which encodes the acetylcholinesterase enzyme (AChE). Monitoring of the presence of these three mutations is important to plan protective measures against the olive fly, which would slow down the development of resistance. Therefore, we performed genetic analyzes to examine which above mentioned mutations are present in the olive fruit fly samples from two locations in Slovenian Istria. The frequencies of the resistance alleles of these three mutations were higher in 2016 compared to 2013. Based on the results it could be suggested that the resistance of olive fly to the insecticides from organophosphate group has increased.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	Razširjenost oljke (<i>Olea europaea</i> L.) v Sloveniji	3
2.2	Oljčna muha	3
2.2.1	Morfološke značilnosti	4
2.2.2	Biološki cikel in fenologija.....	5
2.2.3	Prehrana in migracije oljčnih muh.....	5
2.2.4	Škoda	7
2.3	Varstvo pred oljčno muho.....	7
2.3.1	Kurativna metoda	10
2.3.2	Preventivne metode	11
2.3.3	Alternativne metode oz. novi načini nadzora oljčnih muh.....	12
2.3.4	Primer dobre prakse za podporo pri varstvu oljk	15
2.4	Insekticidi na osnovi organskih fosforjevih estrov	15
2.5	Razvoj odpornosti proti insekticidom iz organskih fosforjevih estrov	16
2.5.1	Razvoj odpornosti pri drugih škodljivcih	16
2.5.2	Oljčna muha (<i>Bactrocera oleae</i> Gmelin)	18
2.5.3	Kako preprečujemo razvoj odpornosti proti insekticidom	24
3	MATERIAL IN METODE.....	26
3.1	Material za izolacijo DNK	26
3.2	Izolacija DNK	26
3.3	Merjenje koncentracije DNK.....	27
3.4	Ugotavljanje prisotnosti mutacij I214V in G488S s sekvenciranjem.....	27
3.4.1	Pomnoževanje lokusov z odpornostnima mutacijama.....	27
3.4.2	Kontrola uspešnosti pomnoževanja v reakciji PCR	28
3.4.3	Čiščenje produkta PCR pred sekvenčno reakcijo.....	28
3.4.4	Sekvenčna reakcija	28
3.4.5	Čiščenje sekvenčne reakcije in nanos na kapilarno elektroforezo	29
3.5	Ugotavljanje prisotnosti mutacije $\Delta 3Q$	30
3.5.1	Pomnoževanje z lokusno in alelno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v reakciji PCR.....	30
3.5.2	Priprava vzorcev za analizo na kapilarnem genetskem analizatorju	31
4	REZULTATI	32
4.1	Prisotnost mutacij I214V in G488S	32
4.2	Prisotnost mutacije $\Delta 3Q$	33
5	DISKUSIJA	37
6	LITERATURA	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Integrirano varstvo oljk (MKGP 2020).....	9
Preglednica 2: Frekvence alelov I214V, G488S in $\Delta 3Q$ v Grčiji in Cipru (Kakani in sod. 2008).....	21
Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov in njihovo zaporedje.....	28
Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov in nukleotidno zaporedje.....	30
Preglednica 5: Frekvenca odpornostnih alelov pri oljčni muhi za mutacije G488S, I214V in $\Delta 3Q$ (F_R = frekvenca odpornostnih alelov, R = število odpornostnih alelov v vzorcu, N = število vseh muh v vzorcu).....	35
Preglednica 6: Identificirani haplotipi in njihova pogostnost.	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Samica (levo) in samec oljčne muhe (desno) (KGZS 2012).....	4
Slika 2: Razvojni krog oljčne muhe (KGZS 2012).	4
Slika 3: Lokacije treh vzorčnih mest v Slovenski Istri in razdalje med njimi; 1 – Beneša, 2 – Strunjan in 3 – Sveti Peter (Knap in Bandelj 2016).	6
Slika 4: Feromonska vaba (Vesel in sod. 2020).	8
Slika 5: Koristna navadna tenčičarica (<i>Chrysoperla carnea</i>) (levo) in oljčna muha (desno) na rumeni lepljivi plošči (KGZS 2011a).	8
Slika 6: Navadni kaprovec (<i>Capparis spinosa</i> L.) (KGZS 2011b).	10
Slika 7: Lepljivi oman (<i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton) (KGZS 2011b).	10
Slika 8: Shematski prikaz PCR-produkta oljčne muhe na 10. eksonu gena <i>ace</i> . Začetna oligonukleotida Boace 10F in Boace 10R (označena na 5' in 3' koncu) se uporabljata za amplifikacijo fragmenta z delecijo (Kakani in sod. 2008).	22
Slika 9: Razširjenost mutacije $\Delta 3Q$ po Sredozemlju. V tortnih grafikonih rumena barva predstavlja frekvenco divjega tipa alela (brez mutacije $\Delta 3Q$), medtem ko oranžna barva frekvenco alela $\Delta 3Q$ (Kakani in sod. 2013).	23
Slika 10: Vzorčni mesti Strunjan in Krkavče (https://www.google.si/maps/).	26
Slika 11: Naprava Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer za kapilarno elektroforezo (foto: Franca, A. 2016).	29
Slika 12: Agarozni gel s produkti reakcije PCR: 1.–5. fragment 3. eksona, 6.–10. fragment 6. eksona (1,4 % agaroz, 0,5X TBE, 3 V/cm, 1 h, velikostni standard Thermo Scientific GeneRuler 10 bp DNA Ladder).....	32
Slika 13: Elektroferograma sekvence 3. eksona gena <i>ace</i> . Pri zgornjem elektroferogramu je na označenem mestu prisoten G, pri spodnjem elektroferogramu pa je na mestu mutacije prisoten polimorfizem, in sicer G/A.	33
Slika 14: Elektroferograma sekvence 6. eksona gena <i>ace</i> . Pri zgornjem elektroferogramu je na označenem mestu prisoten polimorfizem A/G, pri spodnjem pa je na mestu mutacije prisoten adenzin. S puščico je označeno mesto mutacije, ki se skoraj vedno pojavi ob prisotni mutaciji G488S.....	33
Slika 15: Elektroferogrami vzorca 21-Strunjan-2016 z divjim tipom alela. Zgornji elektroferogram prikazuje signal pomnoženega divjega tipa alela z lokusno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, srednji elektroferogram prikazuje rezultate pomnoževanja alela z mutacijo $\Delta 3Q$ (prisotnost odpornostnega alela pri tem vzorcu ni bila potrjena), spodnji elektroferogram pa prikazuje rezultate reakcije PCR z alelno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje divjega alela.....	34
Slika 16: Elektroferogrami heterozigotnega vzorca 16-Krkavče-2016. Zgornji elektroferogram prikazuje signal pomnoženega divjega tipa alela in alela z mutacijo $\Delta 3Q$ z lokusno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, srednji elektroferogram prikazuje rezultat	

pomnoževanje alela z mutacijo $\Delta 3Q$ (prisotnost odpornostnega alela pri tem vzorcu je bila potrjena), spodnji elektroferogram pa prikazuje rezultate reakcije PCR z alelno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje divjega alela..... 34

KAZALO PRILOG

PRILOGA A *Seznam vzorcev oljčnih muh, vzorčenih v letu 2016, z navedbo datuma vzorčenja plodov in spola oljčne muhe.*

PRILOGA B *Rezultati genetske analize oljčnih muh iz leta 2016.*

PRILOGA C *Rezultati genetske analize oljčnih muh iz leta 2013.*

SEZNAM KRATIC

AChE	acetilholinesteraza
angl.	angleško
Bp	bazni par
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
DNK	deoksiribonukleinska kislina (DNA)
Dntp	deoksiribonukleotid trifosfat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina – dinatrijeva sol
EPPO	Evropska organizacija za varstvo rastlin (angl. European Plant Protection Organization)
MgCl ₂	magnezijev klorid
NaCl	natrijev klorid
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RFLP	dolžinski polimorfizem restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-boratni-EDTA elektroforetski pufer
Tris-HCl	tris(hidroksimetil)aminometan-klorovodikova kislina

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem vsem, ki so mi pomagali, me spodbujali in mi vlivali pogum pri pisanju magistrskega dela. Še posebno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Matjažu Hladniku, ki mi je pomagal s predlogi, popravki, potrpežljivostjo in spodbudami, da je nastalo moje magistrsko delo, s katerim bom zaključila magistrski študij Varstvo narave. Upam, da bom naredila še veliko dobrega za ta svet in naravo v svojem življenju, saj imamo samo en planet, s katerim bi morali vsi ravnati odgovorneje in poskrbeti za skupno prihodnost.

1 UVOD

Oljčna muha (*Bactrocera oleae* Gmelin) je eden najpomembnejših škodljivcev oljke (Daane in Johnson 2010). V ugodnih vremenskih razmerah in ob neustreznem varstvu lahko povzroči celoten izpad pridelka. Poškodovani plodovi vplivajo tudi na slabšo kakovost oljčnega olja (Podgornik in sod. 2007).

Odrasla samica oljčne muhe lahko izleže 50–400 jajčec, po navadi eno na posamezen plod. Te se razvijejo v larve oz. ličinke. Medtem ko se hranijo, vrtajo rove po celotnem plodu in uničujejo mezokarp. Poškodovano tkivo naselijo bakterije in glive, ki povzročajo gnitje in povečanje prostih maščobnih kislin (kislost) v olju. Ti plodovi lahko tudi prej odpadejo. Oljčni plodovi, poškodovani zaradi oljčne muhe, so občutljivejši za oksidacijske procese in mikrobiološko razgradnjo, zato morajo biti plodovi pobrani prej, čas od obiranja do predelave pa mora biti čim krajši (Vossen in sod. 2004).

Varstveni ukrepi proti oljčni muhi temeljijo na kemičnih pripravkih, med katerimi so določeni namenjeni preventivni uporabi, preostali pa kurativnim ukrepom. Poznamo tudi biotično varstvo rastlin, kjer škodljivce zatiramo z naravnimi sovražniki, vendar pri oljčni muhi poskusi z biotičnim varstvom še niso dali zadovoljivih rezultatov (Bučar Miklavčič in sod. 1997, Daane in Johnson 2010). V ekološki pridelavi, kjer so dovoljene preventivne metode, je dovoljeno sredstvo na osnovi spinosada, spojine, ki jo sintetizirajo bakterije iz vrste *Saccharopolyspora spinosa* Mertz, Yao, vendar je v literaturi zaslediti, da se je pri oljčni muhi razvila odpornost proti tej aktivni spojini (Kakani in sod. 2010).

Za zagotavljanje učinkovitosti varstvenih ukrepov je zato treba stremeti k preudarni rabi insekticidov in k razvoju novih metod. Slabosti insekticidov so, da so obremenjujoči za okolje, ogrožajo zdravje ljudi, predstavljajo precejšni del stroška pridelave, njihova nepravilna in dolgotrajna raba pa privede do razvoja odpornosti. Pri uporabi fitofarmaceutskih sredstev je pomembno pravilno svetovanje o njihovi uporabi, izobraževanje in osveščanje kmetov in ostalih uporabnikov.

Že nekaj desetletij se za varstvo proti oljčni muhi uporabljajo insekticidi iz skupine organskih fosforjevih estrov, piretroidov in spinosada (Daane in Johnson 2010). Zaradi dolgotrajne uporabe se je pri oljčni muhi razvil določen nivo odpornosti (Kakani in sod. 2010, Vontas in sod. 2001).

Odpornost proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov povezujejo s tremi mutacijami v genu *ace*, ki kodira zapis za encim acetilholinesterazo (AChE). Te mutacije so delecija 9 baznih parov (bp) (delecija $\Delta 3Q$) in dve nesinonimni mutaciji, ki na 214. in 488.

aminokislinskem mestu povzročita spremembo izolevcina v valin (I214V) in glicina v serin (G488S) (Kakani in sod. 2013, Vontas in sod. 2002). Ti dve mutaciji se skoraj vedno pojavljata skupaj, nahajata se na 3. in 6. eksonu in sta prisotni že pri manjšem selekcijskem pritisku (Vontas in sod. 2002). Tretja mutacija, delecija $\Delta 3Q$, pa se nahaja na 10. eksonu gena *ace*, njena frekvenca se povečuje pri večjem selekcijskem pritisku in pripomore k večji odpornosti oljčne muhe (Kakani in sod. 2008).

Namen magistrskega dela je: a) s pregledom literature poglobiti znanje o razvoju odpornosti proti insekticidom pri oljčni muhi (*Bactrocera oleae* Gmelin), b) z genetsko analizo preveriti, ali so pri oljčni muhi v Slovenski Istri prisotni aleli, povezani z razvojem odpornosti proti insekticidom na osnovi organskih fosforjevih estrov. Prisotnost mutacij G488S in I214V pomeni, da je muha že razvila odpornost proti insekticidom, vendar je leta manjša, kot če je prisotna tudi delecija $\Delta 3Q$, ki se, kot omenjeno, pojavi ob večjem selekcijskem pritisku zaradi uporabe insekticidov. Ob povečanju frekvence mutacije $\Delta 3Q$ bi bilo treba prilagoditi ukrepe varstva rastlin. Za zagotavljanje učinkovitega varstva je zato zelo pomembno spremljanje razvoja odpornosti.

V genetsko analizo smo vključili od 20 do 25 vzorcev oljčne muhe na lokacijo, in sicer iz leta 2016 za lokaciji Krkavče in Strunjan in iz leta 2013 za lokacijo Strunjan. Preverili smo prisotnost vseh treh mutacij in rezultate primerjali s tujo literaturo.

V okviru magistrskega dela smo preverili naslednjo zastavljeno hipotezo: Glede na večletno uporabo fitofarmaceutskih sredstev iz skupine organskih fosforjevih estrov za zaščito oljke pred oljčno muho se je odpornost proti omenjenih sredstvih pri oljčni muhi razvila tudi v Slovenski Istri.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Razširjenost oljke (*Olea europaea* L.) v Sloveniji

Oljka je tipična sredozemska kultura, ki je tradicionalno prisotna v Slovenski Istri. Pridelovanje oljk v Istri sega v začetek gojenja oljk na severni obali Sredozemlja, kamor so oljko prinesli Feničani 600 let pr. n. št., k nam pa naj bi prišla v 4. stoletju pr. n. št. z grškimi kolonizatorji. V Sloveniji gojimo oljko predvsem na obalnem območju do Kraškega roba (Slovenska Istra), uspeva tudi v Goriških Brdih, na Goriškem in ponekod v Vipavski dolini (Vesel in sod. 2009).

Skupna površina oljčnikov v Sloveniji predstavlja 0,3 % vseh kmetijskih zemljišč. Površina oljčnikov je leta 2019 znašala 2389 ha, od tega je 96 % površine bilo oljčnikov v Slovenski Istri in 4 % na Goriškem (GOV.SI 2019).

2.2 Oljčna muha

Oljko ogrožajo različni škodljivci organizmi, med katere spadajo škodljive žuželke, kot so oljčna muha, kaparji in oljčni molj. Med nevarne bolezni pa uvrščamo pavje oko in oljkovo sivo pegavost. Ti škodljivci in bolezni se v primorskih oljčnikih pojavljajo redno. Podobno kot v drugih sredozemskih državah sta tudi na območjih gojenja oljk v Sloveniji najpomembnejša oljčna muha in glivična bolezen pavje oko (Vesel in sod. 2020).

Oljčna muha (*Bactrocera oleae* Gmelin) spada v družino sadnih muh (Tephritidae), v red dvokrilcev (Diptera) in v razred žuželk (Insecta). Je ključni škodljivec na vseh območjih na svetu, kjer se goji oljka. V ugodnih vremenskih razmerah in ob neustreznem varstvu lahko povzroči zelo veliko škodo, v najslabšem primeru tudi celoten izpad pridelka. V Slovenski Istri se pojavlja intenzivneje v oljčnikih bliže morja, medtem ko sta pojav muhe in tudi škoda v zaledju manjša (Vesel in sod. 2009).

Oljčna muha se v naravi lahko razvija v plodovih različnih vrst rastlin iz rodu *Olea*. Glavna gostiteljska rastlina je oljka. Sorte oljke so različno občutljive za napad škodljivca. Pri nas je najbolj dovzetna naša najpomembnejša sorta 'Istrska belica' (Vesel in sod. 2020).

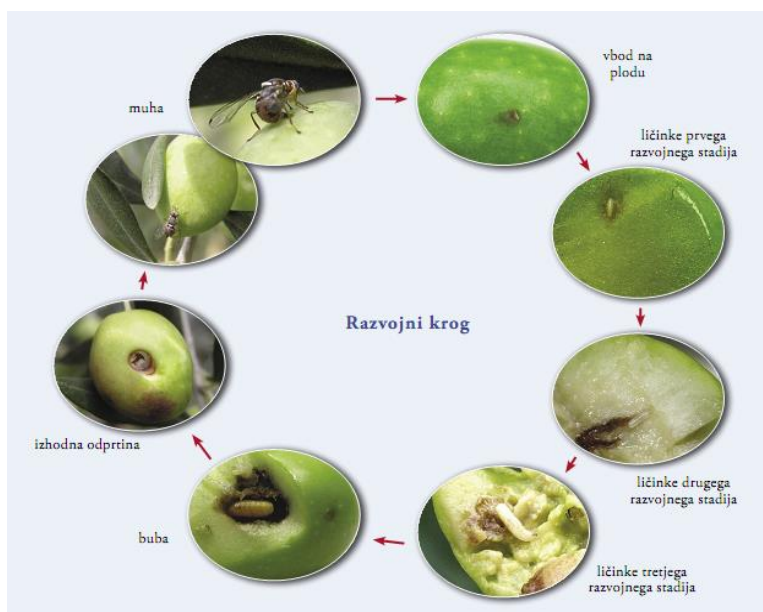
2.2.1 Morfološke značilnosti

Odrasla oljčna muha meri v dolžino od 4 do 5 mm, v širino z razpetimi krili pa od 11 do 12 mm. Ima rumenordečo glavo in velike kovinsko zelene oči. Oprsje na zgornji strani je sivo s tremi vzdolžnimi temnejšimi črtami. Na koncu oprsja ima rumen ščitek. Krila so prozorna z značilnim rjavim madežem na koncih (eden pomembnejših razpoznavnih znakov). Zadek je rumenkasto rdeč s črnimi lisami na obeh straneh. Samice so nekoliko večje od samcev, ki jih ločimo od samic po zaobljenem zadku, medtem ko ima samica na zadku črno osnovo legla (Vesel in sod. 2020) (slika 1).



Slika 1: Samica (levo) in samec oljčne muhe (desno) (KGZS 2012).

Jajčece je mlečno bele barve, v dolžino meri 0,7 mm, v širino pa 0,2 mm. Breznoga ličinka, imenovana tudi žerka, se razvija v treh razvojnih stopnjah ličinke ali stadijih, ki se med seboj ločijo po velikosti in zgradbi ustnega ustroja. Komaj izležena žerka je prosojna, kasneje postane rumenkasto bela. Žerka lahko v zadnjem stadiju meri v dolžino do 8 mm. Bube so dolge približno 4 mm, široke 1,5 mm in so različnih barv, od umazano bele do oker rumene (Vesel in sod. 2020). Razvojni krog oljčne muhe od vboda na plodu do odrasle živali je prikazan na sliki 2.



Slika 2: Razvojni krog oljčne muhe (KGZS 2012).

2.2.2 Biološki cikel in fenologija

Oljčna muha ima tri do pet generacij na leto, odvisno od okoljskih razmer. Prezimi kot odrasla muha ali kot buba v tleh ali v odpadlih plodovih. Prva generacija odraslih muh se pojavi spomladi. Občutljivost oljk se poveča, ko koščica v plodu otrdi. V enem letu se lahko zvrsti več generacij in v nekaterih primerih pride do neprekinjenega pojavljanja odraslih muh skozi celo leto. Populacije se lahko v optimalnih razmerah številčno hitro razvijejo. V večini primerov največja škoda nastane, ko se plodovi začnejo mehčati in barvati (od septembra do novembra) (Vossen in sod. 2004).

Biološki cikel je pogojen predvsem z geografsko širino in je odvisen od makro- in mikroklimatskih razmer v posameznih oljčnikih. Odrasla oljčna muha je lahko ob ugodnih klimatskih razmerah prisotna v oljčnikih Slovenske Istre vse leto. V povprečnih letih se na zgodnejših priobalnih legah pojavijo konec junija. V najtoplejšem delu leta, konec julija in začetek avgusta, se let muhe umiri ali celo prekine (Vesel in sod. 2009). V juliju in avgustu ovirajo večji pojav teh škodljivk visoke temperature, nizka relativna vlažnost in naravni sovražniki. S prvimi padavinami konec avgusta in v septembru in z začetkom optimalnih temperatur postanejo muhe številčnejše. Rodovi muh si sledijo vse do obiranja oljk. Zimo preživijo v obliki ličinke, bube ali odrasle muhe. Razvojni cikel muhe pri 25 °C traja okoli 28 dni, pri 20 °C pa približno 40 dni. V naših podnebnih razmerah ima oljčna muha od dva do tri, izjemoma štiri rodove na leto (Bučar Miklavčič in sod. 1997). Največ škode naredi muha od konca avgusta do začetka oktobra. Najugodnejša temperatura za razvoj oljčne muhe je 16–30 °C (Vesel in sod. 2020).

Spolna aktivnost oljčne muhe se vrši pozno popoldne. Komunikacija med spoloma poteka vizualno, akustično in s spolnimi feromoni, to so kemijske spojine, ki jih izločajo spolno zrele samice, da privabljajo samčke. Oplojena samica lahko odloži do nekaj sto jajčec, praviloma po eno v plod. Oljčno muho bolj pritegnejo srednje zreli plodovi zelenorumeni ali rdečkaste barve. Samica z leglom preluknja povrhnjico in v sadež odloži jajčece. Postopek odlaganja traja od tri do petnajst minut (Vesel in sod. 2020).

2.2.3 Prehrana in migracije oljčnih muh

Odrasle muhe se prehranjujejo z medeno roso, rastlinskimi sokovi in pelodom. Letijo izključno podnevi, pri tem pa jih močno omejuje veter. Odrasle muhe se lahko selijo pri iskanju oljk oz. hrane tudi do deset kilometrov, medtem ko se v oljčniku gibljejo le na premeru nekaj sto metrov. Minimalna pogoja, da lahko poleti, sta temperatura nad 7 °C in relativna zračna vlaga nad 40 % (Vesel in sod. 2020).

Letna populacijska dinamika oljčne muhe v Slovenski Istri ima tri vrhove. Dinamiko leta muhe kontrolirajo z rumenimi lepljivimi vabami s feromonom. Na podlagi ulova oljčne muhe se izvedejo ukrepi z insekticidi. Glavni problem v Sloveniji je ta, da ukrepi niso časovno koordinirani med oljčniki. V zadnjih dveh desetletjih so v Sloveniji za zmanjševanje populacij oljčne muhe uporabljali zastrupljene vabe z dodanim pripravkom Perfekthion z aktivno snovjo dimetoat. V ekološkem kmetijstvu je na voljo pripravek GF-120 NF Naturalyte, ki temelji na spinosadu. Ta metoda je postala priljubljena tudi pri integrirani pridelavi oljk (Knap in Bandelj 2016).

Tea Knap in Dunja Bandelj (2016) sta raziskali genetsko strukturo populacije oljčne muhe v Slovenski Istri z mikrosatelitskimi markerji, da bi ugotovili migracije oljčnih muh med lokacijami in določili primerno in učinkovito strategijo za kontrolo populacije oljčne muhe. Analizo sta opravili na vzorcu 117 oljčnih muh s treh različnih lokacij. Genetske analize so potrdile neomejeno migracijo in naključno parjenje med osebkami z različnih mikrolokacij.

Migracija in naključno parjenje oljčnih muh z obalnih lokacij Strunjan in Beneša je bila pogostejša (razdalja med njima je krajša od 15 km), medtem ko je bilo naključno parjenje nekoliko manjše med oljčnimi muhami z obalnega območja in zaledja, in sicer zaradi heterogenosti terena in manjših ovir, kot so doline in hribi s fragmentiranimi gozdovi. Kot najboljšo rešitev za varstvo proti oljčni muhi predlagata časovno usklajeno prvo tretiranje oz. ukrepanje na območju Slovenske Istre (Knap in Bandelj 2016).

Raziskava Tee Knap in Dunje Bandelj (2016) predstavlja prvo poročilo o genetski diverziteti in populacijski strukturi oljčne muhe s te regije in o migraciji med heterogenimi oljčniki v Sloveniji (slika 3).



Slika 3: Lokacije treh vzorčnih mest v Slovenski Istri in razdalje med njimi; 1 – Beneša, 2 – Strunjan in 3 – Sveti Peter (Knap in Bandelj 2016).

2.2.4 Škoda

Pri namiznih sortah oljk predstavljajo škodo že ranice, ki jih na oljki z leglom povzročijo muhe pri odlaganju jajčec, medtem ko pri oljkah, namenjenih za predelavo v oljčno olje, ločimo tri poglavitne vrste škode. To so: neposredna škoda, ki jo povzročijo žerke v plodovih oljk (izguba mase ploda se giblje navadno med 3 in 5 %, pri sortah z manjšimi plodovi lahko izguba doseže tudi do 20 % mase ploda), odpadanje poškodovanih plodov in zmanjšanje kakovosti poškodovanih plodov in posledično tudi oljčnega olja (Jančar in Devetak 2018).

Škodo na plodovih oljke povzročajo belkaste ličinke žerke, ki se hranijo z mesom in v plod izločajo iztrebke. Ko žerke zapustijo plod, se skozi izhodno odprtino v poškodovane plodove naselijo mikroorganizmi, ki še dodatno povzročijo gnitje in propadanje plodov. Zaradi encimatske hidrolize maščobnih kislin se močno poveča kislost (vsebnost prostih maščobnih kislin) olja, s tem pa se zmanjšata kakovost olja in njegova obstojnost. Ob močnejšem napadu muh lahko poškodovani plodovi odpadejo zaradi hitrejšega dozorevanja (Vesel in sod. 2020).

V močno okuženih oljčnikih z oljčno muho je tako edina rešitev zgodnejše obiranje oljk. S tem preprečimo odpadanje in gnitje plodov. Predčasnemu obiranju pa mora slediti takojšnja predelava, saj le tako dobimo olje ustrezne kakovosti (Vesel in sod. 2009).

Največja škoda nastane zaradi izgube pridelka, ko močno poškodovani plodovi odpadejo (Vesel in sod. 2020). Ocenjujejo, da se letna izguba svetovne oljčne proizvodnje giblje med 5 % in 30 %, odvisno od okoljskih razmer (Augustinos in sod. 2005, Katsoyannos 1992). Okužene oljke z oljčno muho negativno vplivajo na količino oljk in kakovost oljčnega olja, za katerega so pogosto značilne višje proste maščobne kisline, nižja vsebnost fenolov in spremembe organoleptičnih lastnosti (Mraicha in sod. 2010).

2.3 Varstvo pred oljčno muho

Poznamo različne načine varstva proti oljčni muhi. Pri kemijskem varstvu ločimo preventivno in kurativno metodo. Preventivne metode z zastrupljeno vabo so dovoljene v integrirani in ekološki pridelavi. K uravnavanju številčnosti oljčne muhe prispevajo tudi domorodni naravni sovražniki, zato smo jih v nadaljevanju nekaj tudi omenili.

Varstvo oljk pred oljčno muho se lahko med posameznimi leti zelo razlikuje. Odvisno je od časa, intenzivnosti pojava oljčne muhe in škode, ki jo naredi v posameznih letih. Čas in intenzivnost pojavljanja spremljamo s pomočjo vab, in sicer poznamo tri tipe: barvne v obliki rumenih lepljivih plošč, feromonske in kombinirane prehransko-barvno-feromonske.

Vabe obesimo na južno oz. zavetrno stran krošnje oljke. Na en hektar namestimo od eno do tri vabe. Feromonske vabe so selektivnejše, saj se nanje v glavnem lovijo le samci oljčne muhe (slika 4), na rumenih lepljivih ploščah pa se lovijo tudi druge žuželke, med katerimi je veliko koristnih (slika 5). Če imamo v nasadu namizne sorte oljk, npr. sorto 'Ascolana tenera', namestimo vabe nanje, saj se na njih muha pojavlja prej in običajno v večjem številu. Vabo sicer namestimo na sorto 'Istrska belica', ki je od sort za pridelavo pri nas najobčutljivejša za muho (Vesel in sod. 2020).

Vabe za opazovanje nastavimo sredi junija in jih pregledujemo enkrat na teden, ob številnejšem ulovu muh tudi pogosteje (Vesel in sod. 2020). Prisotnost oljčne muhe spremljajo tudi na KGZ Nova Gorica, kjer objavljajo podatke o ulovu oljčnih muh v oljčnikih na feromonskih vabah. Poleg spremljanja vab vzorčijo tudi plodove oljk, da bi ugotovili morebitno poškodovanost zaradi napada oljčne muhe. Ob povečani prisotnosti oljčnih muh (tri oz. več muh na vabo na teden) objavijo priporočila kako ukrepati za zmanjšanje številčnosti populacije (na naslovu www.kmetijskizavod-ng.si). Oljkarjem priporočajo, da tudi sami v svojih oljčnikih redno spremljajo prisotnost oljčne muhe na feromonskih vabah ali rumenih lepljivih ploščah in po potrebi proti škodljivcu ukrepajo skladno s priporočili.



Slika 4: Feromonska vaba (Vesel in sod. 2020).



Slika 5: Koristna navadna tenčičarica (*Chrysoperla carnea*) (levo) in oljčna muha (desno) na rumeni lepljivi plošči (KGZS 2011a).

Ko pa omejitveni dejavniki, predvsem klimatske razmere in naravni sovražniki, ne uspejo zadržati oljčne muhe pod pragom škodljivosti, je priporočljiva uporaba fitofarmacevtskih

sredstev (Jančar in Devetak 2018). V preglednici 1 so navedeni pripravki z aktivnimi snovmi, povzeti po Tehnoloških navodilih za integrirano pridelavo sadja v letu 2020 (MKGP 2020).

Preglednica 1: Integrirano varstvo oljk (MKGP 2020).

UKREPI	AKTIVNA SNOV	FITOFARM. SREDSTVO	ODMEREK	KARENCA DNI
Kemijsko varstvo: Preventivna metoda z zastrupljenimi vabami, prag škodljivosti: ulov treh muh /vaba/teden ali 3 % plodov s fertilnimi vbodi oljčne muhe. Pojav muhe spremljamo z rumenimi lepljivimi ploščami ali feromonskimi vabami. Kurativna metoda proti žerkam oljčne muhe, prag škodljivosti: 10 % plodov s fertilnimi vbodi muhe (prisotna jajčeca ali žerke). Kurativno ukrepanje s sredstvom na osnovi dimetoata po 30. 6. 2020 ni več dovoljeno!	- dimetoat	*Perfekthion	0,125 l/ha	35
	- hidrolizirana b.	Nutrel	1,5 %	
	- deltametrin	Decis 2,5 EC	0,5 l/ha	7
	- spinosad	GF 120	1–1,2 l/ha	7
	- fosmet	Imidan 50 WG	1,5 kg/ha	28
	- dimetoat	* Perfekthion	1,2 l/ha	35
	- <i>Beauveria bassiana</i>	Naturalis	2 l/ha	Ni potrebna.
* Poraba zalog do 30. 6. 2020				

V ekološki pridelavi oljk so bila v letu 2020 dovoljena sredstva GF 120, Naturalis, Flypack dacus trap (z aktivno snovjo deltametrin [0,015 g/vabo]) in Invelop white protect (z aktivno snovjo talc E553b). Pri integrirani pridelavi pa poleg navedenih sredstev za integrirano pridelavo (preglednica 1) še Mospilan 20SG (z aktivno snovjo acetamiprid) (KGZS 2020).

Omejitveni dejavniki, zlasti za ličinke prvega razvojnega stadija, so visoke poletne temperature, saj je v takšnih razmerah smrtnost največja. Tudi zelo nizke temperature v zimskem obdobju vplivajo na zmanjšanje populacije škodljivca. Poleg vremenskih razmer številčnost populacije oljčne muhe omejujejo naravni sovražniki. Pomembnejše so parazitoidne osice, kot so *Eupelmus urozonus* Dalman, *Pnigalio mediterraneus* Ferrière, Delucchi, *Eurytoma martellii* Domenichini in *Opius concolor* Szépligeti. Posamezne vrste so bile najdene tudi v naših oljčnikih (Vesel in sod. 2020).

Opius concolor parazitira ličinke oljčne muhe. V oljčnik ga lahko privabimo z navadnim čičimakom ali žižolo (*Ziziphus jujuba* Mill.) in z navadnim kaprovcem (*Capparis spinosa* L.) (KGZS 2011b), ki je prikazan na sliki 6. *Eupelmus urozonus* aktivno parazitira ličinke oljčne muhe, medtem ko bube parazitira v omejenem obsegu. Zanj sta pomembni trnata gledičevka (*Gleditschia triacanthos* L.) in lepljivi oman (*Inula viscosa* (L.) Aiton) (slika 7) (KGZS 2011b).



Slika 6: Navadni kaprovec (*Capparis spinosa* L.) (KGZS 2011b).



Slika 7: Lepljivi oman (*Inula viscosa* (L.) Aiton) (KGZS 2011b).

Pnigalio agruales s parazitiranjem ličink oljčne muhe začne v avgustu, nato pa je ponovno aktiven v oktobru in novembru. Najdemo ga na različnih vrstah iz rodu hrasta (*Quercus* spp.), jablan (*Malus* spp.), citrusov (*Citrus* spp.) in *Olea* spp. (KGZS 2011b).

Kot naravni sovražniki se pojavljajo tudi nekateri plenilci, ki so dejavni predvsem v fazi migracije ličink v tla, preden se te zabubijo. V tej fazi se kot zelo koristne omenjajo plenilske stenice in ptice (Vesel in sod. 2020). Ptice so naravni sovražniki številnih škodljivih žuželk. Njihovo številčnost povečamo s krmilnicami in gnezdilnicami. Sinice in druge ptičje vrste bodo zmanjšale populacijo škodljivcev oljke, saj se hranijo z žuželkami in njihovimi ličinkami (KGZS 2011a). Pomembni žužkojedi so tudi netopirji, ki so ena najbolj ogroženih živalskih skupin, zato je zelo pomembno ohranjanje starih dreves z dupli, ekstenzivnih travnikov, visokodebelnih sadovnjakov in mejic ali živic (KGZS 2011b).

2.3.1 Kurativna metoda

Bistvo kurativne metode je, da z insekticidi ukrepamo, potem ko je muha že odložila jajčeca v plod in so se iz njih že izlegle žerke ter se zavrtale v plod (Bučar Miklavčič in sod. 1997). Ta metoda varstva je predvidena, ko aktivna okuženost (v plodu prisotna jajčeca in ličinke prvega in drugega razvojnega stadija) presega 10 % (Vesel in sod. 2009) oz. ko je več kot 10 % plodov s fertilnimi vbodi (MKGP 2019).

V Tehnoloških navodilih za integrirano pridelavo sadja kurativna metoda ni več dovoljena oz. po 30. 6. 2020 ni več dovoljeno ukrepanje s sredstvom na osnovi dimetoata (preglednica 1) (MKGP 2020). Dovoljenje za nujne primere za Perfekthion je veljalo do 30. 9. 2020 (KGZS 2020).

2.3.2 Preventivne metode

2.3.2.1 Integrirana pridelava

Preventivne metode temeljijo na uporabi proteinskih vab, ki privabljajo odrasle muhe, le-te pa so zastrupljene z dodatkom insekticida. V integrirani pridelavi se za proteinsko vabo uporablja hidroliziran protein NuLure v 1-odstotni koncentraciji in insekticid Perfekthion v 0,15-odstotni koncentraciji. Z omenjeno škropilno brozgo poškropimo le nerodni del krošnje na južni strani drevesa. V povprečju uporabimo le od 0,1 do 0,2 l škropiva na drevo. Takšen način aplikacije ima manjši vpliv na koristne organizme in okolje in izključuje možnost ostanka insekticida v oljčnem olju. Bistveno je, da škropimo prej, kot muha odloži jajčeca v plod (Vesel in sod. 2009). Prag škodljivosti je dosežen ob ulovu treh muh na vabo na teden ali ko je 5 % plodov s fertilnimi vbodi oljčne muhe. Pojav muhe spremljamo z rumenimi lepljivimi ploščami ali feromonskimi vabami (MKGP 2019).

V sklopu integrirane pridelave se lahko uporabi tudi hidroliziran protein Nutrel v 1,5-odstotni koncentraciji, ki se mu lahko doda insekticid Perfekthion v odmerku 0,125 l/ha pri porabi do 20 l škropilne brozge/ha. Perfekthion kot insekticidno vabo se je lahko uporabilo le enkrat na leto. Pri integrirani pridelavi se lahko kot kontaktni insekticid proti odrasli muhi za škropljenje po celotni krošnji uporabi tudi sredstvo na osnovi deltametrina, in sicer: Decis 2,5 EC v odmerku 0,5 l/ha. Z omenjenim sredstvom je dovoljeno ukrepati največ dvakrat na leto. Uporabi se lahko tudi sredstvo na osnovi fosmeta Imidan 50 WG v odmerku 1,5 kg/ha. Sredstvo se lahko uporabi enkrat na leto. Navedena odmerka fitofarmacevtskih sredstev sta za škropljenje po celotni krošnji (KGZS 2020).

2.3.2.2 Ekološka pridelava

V ekološki pridelavi oljk je dovoljena uporaba zastrupljene vabe, pri kateri uporabimo pripravek GF 120 v odmerku od 1 do 1,2 l/ha. Aktivna snov pripravka je spinosad. Porabi se do 30 l škropilne brozge/ha. Pripravek GF 120 se lahko v sezoni uporabi štirikrat. Za zmanjšanje populacije oljčne muhe se lahko v sklopu ekološke pridelave uporabi tudi sredstvo Naturalis na osnovi entomopatogene glive *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. v odmerku 2 l/ha. Dovoljenih je največ pet tretiranj na leto (KGZS 2019).

Ob pravočasno in kakovostno izvedenih škropljenjih lahko tudi ob zelo močnem napadu muh s preventivno metodo uspešno obvarujemo pridelek. Kljub večjemu številu škropljenj sta uporaba insekticida in s tem vpliv na okolje, človeka in koristne živali v oljčnikih manjša kot pri kurativni oz. klasični metodi škropljenja po celi krošnji (Vesel in sod. 2009).

2.3.3 Alternativne metode oz. novi načini nadzora oljčnih muh

Daljša uporaba insekticidov privede do razvoja odpornosti, zato je treba delovati tudi v smeri izboljšanja alternativnih metod varstva pred oljčno muho. Med alternativne metode za nadzor oljčnih muh uvrščamo npr. biotično varstvo, tehniko sterilnih insektov SIT (angl. Sterile Insect Technique), metodo RIDL (angl. Release of Insects carrying a Dominant Lethal) itd.

Alternativa kemičnim fitofarmaceutskim sredstvom (FFS) so okolju prijaznejše tehnologije, ki jih lahko preprosto opredelimo kot nekemične metode varstva rastlin. Namesto izraza nekemične metode so v publikaciji Zdravju in okolju prijazne metode varstva rastlin uporabili izraz metode (varstva rastlin) z nizkim tveganjem (okrajšano MNT), ki so nekakšna nadpomenka za celo množico agroekosistemsko vzdržnejših in zdravstveno manj oporečnih metod in ukrepov zatiranja škodljivih organizmov (ŠO). MNT so definirane v petem členu pravilnika o integriranem varstvu rastlin in vključujejo mehansko ali fizikalno zatiranje plevela, mehansko ali fizikalno odstranjevanje napadenih oz. okuženih rastlin ali njihovih delov oz. škodljivih organizmov, uporabo FFS, izdelanih na osnovi mikroorganizmov, rastlinskih izvlečkov, feromonov in snovi z nizkim tveganjem, uporabo koristnih organizmov za biotično varstvo rastlin, uporabo t. i. osnovnih snovi, za katere ni treba pridobiti odločbe o registraciji ali dovoljenja, in uporabo pripravkov, ki so dovoljeni v ekološkem kmetovanju (Razinger 2019).

2.3.3.1 Primer registriranega biopesticida na osnovi gliv v Sloveniji

Pripravek Naturalis na osnovi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. deluje na dva načina, in sicer kot kontaktni insekticid, ki uniči ciljni organizem, in kot sredstvo za preprečevanje ovipozicije samic sadnih muh. *Beauveria bassiana* je entomopatogena talna gliva, splošno razširjena v različnih talnih tipih in različnih klimatskih razmerah. Parazitira številne vrste žuželk in pršic v razvojnih fazah od ličinke do odraslih osebkov. Znanih je več sevov glive *Beauveria bassiana*, ki se razlikujejo po virulentnosti in spektru gostiteljev. Pripravek Naturalis vsebuje soj ATCC 74040 glive *Beauveria bassiana* in se uporablja za zatiranje oz. delno zatiranje sadne muhe (*Ceratitis capitata*), češnjeve muhe (*Rhagoletis cerasi*), oljčne muhe (*Bactrocera oleae*), resarjev (*Frankliniella occidentalis*, *Trips major*, *Taeniothrips meridionalis*), ščitkarjev (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Aleyrodes proletella*) itd. (Razinger 2019).

2.3.3.2 Biotično varstvo rastlin

Biotično varstvo rastlin lahko definiramo kot varstvo rastlin, ki vključuje uporabo živih koristnih organizmov oz. naravnih sovražnikov ali njihovih produktov za zatiranje škodljivih organizmov (angl. Biological control). Po Zakonu o zdravstvenem varstvu rastlin (ZZVR) je biotično varstvo rastlin definirano kot »način obvladovanja škodljivih organizmov v kmetijstvu in gozdarstvu, ki uporablja žive naravne sovražnike, antagoniste ali kompetitorje ali njihove produkte in druge organizme, ki se morejo sami razmnoževati«. ZZVR dodatno uvaja pojma domorodne vrste koristnih organizmov in tujerodne vrste koristnih organizmov, ki jih je mogoče uporabljati v okviru biotičnega varstva. Terminološki problem nastane, ker Pravilnik o biotičnem varstvu rastlin (Ur. l. RS, št. 45/06) predvideva le uporabo makrobiotičnih oz. živalskih koristnih organizmov v okviru biotičnega varstva, saj biotične agense na osnovi mikroorganizmov ureja zakonodaja za področje fitofarmaceutskih sredstev in so podvrženi drugačnim postopkom ocenjevanja tveganja in registracijskim postopkom. Mikroorganizme ureja Uredba EU (ES) št. 1107/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 21. oktobra 2009 o dajanju fitofarmaceutskih sredstev v promet in razveljavitvi direktiv Sveta 79/117/EGS in 91/414/EGS, zato uporaba mikrobiotičnih koristnih organizmov (bakterije, glive, praživali in virusi), ki so podlaga mikrobnih biopesticidov, sodi tudi na področje biotičnega varstva rastlin (Razinger 2019).

Biotični pripravki za varstvo rastlin so zelo raznoliki. Tu gre za pripravke na osnovi (večceličnih) koristnih živali (pršice, žuželke, ogorčice) ali na osnovi koristnih mikroorganizmov (bakterije, glive, kromisti, virusi, praživali), ki so osnova biopesticidov. Vsi koristni organizmi, ki jih uporabljamo za biotično zatiranje škodljivih organizmov, imajo v okviru integriranega varstva rastlin velik pomen, saj zaradi varovanja naravnih sovražnikov ohranjajo splošno ravnovesje med organizmi in vzdržujejo biotsko raznovrstnost, ki je ključna za dolgoročno zagotavljanje produktivnosti kmetijstva in gozdarstva. Uporaba metod biotičnega zatiranja škodljivih organizmov v Sloveniji narašča, vendar je v primerjavi z uporabo klasičnih kemičnih FFS majhna (Razinger 2019).

Če je uporaba MNT dovolj učinkovita in lahko z njimi uspešno obvladujemo škodljive organizme, jih v okviru integriranega varstva rastlin uporabljamo prednostno. Uporaba MNT in predvsem biotičnega varstva rastlin zahteva posebna znanja in postopke, ustrezno strokovno podporo in izobraževanje uporabnikov oz. pridelovalcev ob upoštevanju okolja in kmetijstva na širšem lokalnem območju, da se zagotovi njihova optimalna učinkovitost (Razinger 2019).

Pri biotičnem varstvu rastlin v oljčniku je pomembno, da ustvarimo tako okolje, v katerem bodo koristni in škodljivi organizmi v stalnem ravnovesju. Biološki sistemi z raznolikimi

rastlinskimi in živalskimi vrstami so stabilnejši, manj občutljivi in tudi prilagodljivejši na morebitne spremembe v okolju (KGZS 2011b).

Koristni organizem je domorodni ali tujerodni organizem, ki zatira škodljive organizme, se na njih ali v njih oz. v njihovi bližini razvija in jih uniči ali pa le zavre njihovo rast in razvoj. To so živi naravni sovražniki, antagonisti ali kompetitorji oz. njihovi produkti. Koristni organizmi imajo teoretično zmožnost razmnoževanja. Sem spadajo tudi tisti, ki so pakirani ali formulirani kot komercialni proizvodi za biotično varstvo rastlin. S svojim delovanjem koristijo človeku, saj ohranjajo kmetijske pridelke v smislu količine in kakovosti (Razinger 2019).

2.3.3.3 FFS, izdelana na osnovi mikroorganizmov

Nekatere mikrobe ali njihove sekundarne metabolite lahko samostojno oz. zaradi procesa fermentacije uporabimo pri proizvodnji sredstev za varstvo rastlin. V Sloveniji so nam najbolj poznani pripravki, ki vsebujejo aktivno snov spinosad – gre za fermentirane metabolite bakterije iz debela aktinobakterij *Saccharopolyspora spinosa* Mertz, Yao. Aktivna snov spinosad ima dva mehanizma delovanja, kontaktni in želodčni. Pri žuželkah povzroči vzbujanje živčnega sistema, kar vodi v nenadzorovano krčenje mišic, oslabeledost, tresenje in končno paralizo. Delovanje sredstva je takojšnje. Spinosad predstavlja enega izmed nepogrešljivih biopesticidov v integriranem varstvu rastlin (Razinger 2019).

Yousef in sod. (2016) so preučili učinkovitost talnih aplikacij pod krošnjami oljčnih dreves z entomopatogeno glivo *Metarhizium brunneum* Petch, prilagojeno na mediteranske okoljske razmere. Poizkus so opravljali od leta 2010 do 2015, po dve aplikaciji na leto, in sicer jeseni in spomladi. Kot rezultat so potrdili, da je ta metoda učinkovita, saj je bil v spomladanskem času let oljčne muhe za 50 % do 70 % manj številčen v primerjavi s kontrolnimi območji.

2.3.3.4 Tehnika sterilnih insektov

Ant in sod. (2012) so objavili članek o nadzoru oljčne muhe s pomočjo genetsko izboljšane tehnike sterilnih insektov. Ta tehnika je vrstno specifična, kar pomeni, da v primerjavi z insekticidi deluje bolj tarčno. Za uspeh tehnike je bistveni predpogoj razvoj sterilnih samcev, ki bi uspešno konkurirali z naravno prisotnimi.

Razvili so tudi samce z vstavljenim transgenom, ki v fazi ličinke prepreči razvoj do odrasle samice (angl. Release of Insects carrying a Dominant Lethal; RIDL). Ugotovili so, da so samci glavnega seva OX3097D-Bol spolno konkurenčni z divjim tipom oljčnih muh, kažejo

sinhrono parjenje z divjimi samicami in povzročijo neodzivnost pri divji samici pri ponovnem parjenju. Pokazali so, da lahko tedenski izpusti OX3097D-Bol samcev v stabilne populacije divjih oljčnih muh (v kletkah) povzročijo hiter propad oz. kolaps populacije in da je RIDL pristop, ki je specifičen za samice, uspešna metoda nadzora oljčne muhe, čeprav je potrebna še dodatna proučitev in potrditev (Ant in sod. 2012).

2.3.4 Primer dobre prakse za podporo pri varstvu oljk

Ena izmed raziskav za nadzor škodljivcev je bila monitoring oljčne muhe, kjer so spremljali pojav oljčne muhe in stopnjo okuženosti na območju Slovenske Istre z namenom varovanja okolja in ohranjanja biotske raznovrstnosti na obmejnem območju Italije in Slovenije. To so spremljali z ulovom oljčnih muh na rumene lepljive feromonske plošče. Ugotovili so, da se zaradi geografske heterogenosti območja Slovenske Istre in mikroklimatskih značilnosti oljčna muha na različnih lokacijah pojavlja različno intenzivno. Večja številčnost populacij se lahko pojavi zaradi vremenskih pogojev v zimskem času, saj oljčna muha prezimi v odmrlem listju ali v zgornjih plasteh tal v stadiju bube. Občutljiva je na visoko relativno zračno vlago in na nizke temperature, ki povzročijo veliko stopnjo umrljivosti. Tedensko so po SMS-sporočilih in obvestilih na spletni strani obveščali pridelovalce o ukrepanju proti oljčni muhi na podlagi ulova oljčne muhe, stopnji okuženosti plodov in ob upoštevanju vremenskih razmer, kar se je pokazalo kot dober način osveščanja pridelovalcev o zmanjšani uporabi fitofarmaceutskih sredstev in skrbi za ohranjanje okolja (Klančar in sod. 2012).

2.4 Insekticidi na osnovi organskih fosforjevih estrov

Za zatiranje škodljivih žuželk oljčne muhe se v večini primerov uporabljajo insekticidi, predvsem iz skupine organskih fosforjevih estrov, piretroidov in spinosada (Daane in Johnson 2010).

Insekticid je vsaka strupena snov za ubijanje žuželk oz. insektov. Takšne snovi se uporabljajo predvsem za zatiranje škodljivcev, ki okužijo gojene rastline, ali za odpravo žuželk, ki prenašajo bolezni na določenih območjih. Lahko jih razdelimo na naravne in sintetične insekticide (Encyclopedia Britannica 2019).

Sintetični kontaktni insekticidi so glavne snovi za zatiranje insektov. Na splošno zlahka vstopijo v žuželko in so strupeni za številne vrste. Glavne sintetične skupine so klorirani ogljikovodiki, organofosfati oz. insekticidi na osnovi organskih fosforjevih estrov in karbamati (Encyclopedia Britannica 2019).

Organofosfati (OP) oz. insekticidi na osnovi organskih fosforjevih estrov so bili zadnjih pet desetletij najbolj razširjeni insekticidi. Uporabljajo se v kmetijstvu, domovih, vrtovih, v veterinarstvu itd. Vsi organofosfati imajo skupen mehanizem delovanja, tj. inhibicija encima acetilholinesteraze. Aktivne spojine, ki sodijo med organofosfate, so: dimetoat, malation, fention, paration itd. (Roberts in Reigart 2013). Encim acetilholinesteraza je pomemben pri delovanju živčnega sistema žuželk, zato organofosfati z zaviranjem tega encima povzročijo smrt žuželk (Mutero in sod. 1994). Zaradi inhibicije AChE pride do povečanja koncentracije acetilholina (ACh) v holinergičnih sinapsah, kar povzroči stalno vzdraženje mišic ali živčnega vlakna in lahko privede do paralize in smrti zaradi zastrupitve (Bocquené in Galgani 1998).

Encim acetilholinesteraza v normalnih razmerah oz. brez prisotnosti organofosfatov razgradi živčni prenašalec acetilholin (ACh) na etanojsko kislino in holin na postsinaptični membrani živčevja. Vzdraženost živčne celice se tako zmanjša. V primeru prisotnosti aktivne spojine insekticida se le-ta v sinaptični špranji veže na encim (na serinski ostanek) in povzroči spremembo v zvitju proteina na vezavnem mestu za acetilholin. Posledica tega je stalno vzdraženje postsinaptične membrane živčne celice (Eučbenik 2020).

2.5 Razvoj odpornosti proti insekticidom iz organskih fosforjevih estrov

Odpornost oz. rezistenca proti kemičnim sredstvom za varstvo rastlin je pojav, ko se v neki populaciji škodljivih organizmov pojavijo osebk, ki prenesejo določeno koncentracijo aktivnih snovi v pripravkih, ki na druge osebk iste vrste delujejo smrtno. Razvoj odpornosti je selekcijski proces. Ta se začne, če je v populaciji najprej le malo osebk, ki imajo dedno določeno manjšo občutljivost za neko aktivno snov in zaradi te lastnosti preživijo tretiranje s to snovjo. Pri večkratni uporabi pripravkov na osnovi te aktivne spojine se v naslednjih generacijah frekvenca odpornostnih alelov povečuje, kar privede do razvoja populacije odporne proti tej aktivni spojini (Novak in Maček 1990).

2.5.1 Razvoj odpornosti pri drugih škodljivcih

Odpornost acetilholinesteraze (AChE) zaradi točkovnih mutacij je bila opisana pri različnih vrstah žuželk (Fournier 2005), kot so *Drosophila melanogaster* (Mutero in sod. 1994), pri več vrstah komarjev (Weill in sod. 2004), pri *Musca domestica* (Walsh in sod. 2001), *Bactrocera dorsalis* (Hsu in sod. 2006), *Ceratitis capitata* (Magana in sod. 2007) itd. Vrste, kjer odporen fenotip na omenjene insekticide ni povezan s spremembami v *ace* genu, so npr. *Nephrotettix cincticeps* (Tomita in sod. 2000), *Boophilus microplus* (Baxter in sod. 1998) in *Lucilia cuprina* (Newcomb in sod. 1997).

2.5.1.1 Vinska mušica *Drosophila melanogaster* Meigen

Pri več odpornih osebkih vrste *Drosophila melanogaster* so identificirali pet točkovnih mutacij v genu za AChE, povezanih z zmanjšano občutljivostjo za insekticide. Poleg mutacij gena za AChE so žuželke razvile tudi druge mehanizme, npr. hiperprodukcijo oz. povečano sintezo AChE (Mutero in sod. 1994).

2.5.1.2 Komarji (Culicidae)

Višja raven odpornosti proti insekticidu zaradi neobčutljive acetilholinesteraze (AChE) se je razvila tudi pri komarjih. Mutacija gena G119S *ace-1* omogoča razvoj povečane odpornosti pri *Culex pipiens* in pri *Anopheles gambiae*, dveh vrstah komarjev, ki pripadata različnim poddružinama (Culicinae in Anophelinae) (Weill in sod. 2003). Mutacijo G119S so zaznali tudi pri vrsti komarja *A. albimanus* (Weill in sod. 2004).

2.5.1.3 Domača muha *Musca domestica* Linnaeus

Do razvoja odpornosti proti organofosfatom in karbamatom je zaradi spremembe pri acetilholinesterazi (AChE) prišlo tudi pri muhi (*Musca domestica*). Muha je bila ena prvih žuželk, ki so razvile ta mehanizem. V genu za AChE muhe poročajo o pojavu petih mutacij, ki posamično ali v kombinaciji dajejo drugačen spekter odpornosti proti insekticidu. Zaradi razvoja odpornosti pri populacijah muh se pojavljajo težave pri njihovem nadzoru (Walsh in sod. 2001).

2.5.1.4 Breskova muha *Ceratitis capitata* Wiedemann

Breskova muha *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) velja za enega najpomembnejših škodljivcev citrusov v Španiji. Varstvo proti temu škodljivcu temelji na zračnih in zemeljskih tretiranjih s FFS na osnovi malationa. Zaradi težav z njegovim zatiranjem pa so uporabo insekticidov na nekaterih območjih province Valencia v zadnjih letih povečali (Magana in sod. 2007).

Populacije *C. capitata* pri citrusih in drugih sadnih rastlinah z različnih geografskih območij v Španiji so pokazale manjšo občutljivost za malation (od 6 do 201-krat) v primerjavi z laboratorijskimi populacijami. Razlike v občutljivosti so povezali s frekvenco škropljenj. Pri petih populacijah iz Valencije, ki so bile izpostavljene visokim selekcijskim pritiskom (5–10 zračnih škropljenj/leto), je bila ugotovljena najvišja stopnja odpornosti (LC_{50} med 1.000 in 3.000 ppm in $LC_{90} > 10.000$ ppm). Ta ugotovitev je zelo pomembna za kontrolo tega škodljivca v Valencii, kjer v Španiji pridelajo največ citrusov. Koncentracija malationa v

beljakovinskih vabah, ki se uporablja pri zračnih škropljenjih, je namreč 7.500 ppm (Magana in sod. 2007).

2.5.2 Oljčna muha (*Bactrocera oleae* Gmelin)

Rezistenca proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov je bila pri oljčni muhi ugotovljena zaradi mutacij gena *ace* (Kakani in sod. 2013). Pri tej odpornosti je glavni vzrok modifikacija oz. sprememba AChE (Vontas in sod. 2001).

Pri oljčni muhi sta bili identificirani dve nesinonimni točkovni mutaciji (G488S in I214V) in ena delecija ($\Delta 3Q$) v genu *ace*, ki vplivajo na občutljivost za insekticide iz skupine organskih fosforjevih estrov (Kakani in sod. 2008, Vontas in sod. 2002), medtem ko na funkcijo encima ne vplivajo (Vontas in sod. 2001).

2.5.2.1 Mutaciji G488S in I214V

Točkovni mutaciji, ki sta povezani z razvojem odpornosti proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov, sta I214V na tretjem eksonu in G488S na šestem eksonu. Ti dve nesinonimni mutaciji povzročata spremembo izolevcina v valin (I214V) in glicina v serin (G488S) na 214. in 488. aminokislinskem mestu (Kakani in sod. 2013, Vontas in sod. 2002). Skoraj vedno se pojavljata skupaj in sta prisotni pri manjšem selekcijskem pritisku (Vontas in sod. 2002).

Vontas in sod. (2001) so ugotovili, da mutacija G488S povzroči osemkratno odpornost, medtem ko skupaj z mutacijo I214V prispeva k 16-kratni odpornosti proti insekticidu. V raziskavi Hawksa in sod. (2005) so pri oljčnih muhah iz Grčije ugotovili, da so bile vse razen ene homozigotne za obe mutaciji. Poleg vzorcev iz Grčije so analizirali vzorce oljčnih muh iz Albanije, Italije, Španije, Francije in Južne Afrike. Pri vzorcih iz Albanije so mutacijo 488S ugotovili v skoraj vseh vzorcih. Visoko frekvenco 488S (88,9 % in 67,9 %) so odkrili pri oljčnih muhah z obeh italijanskih lokacij, nižje frekvence odpornostnega alela pa v Franciji (27,8 %) in Španiji (33,3 %).

Večina vzorcev oljčnih muh z mutacijo G488S je imelo tudi mutacijo I214V. Haplotip z obema mutacijama je po poročanju Hawksa in sod. (2005) razširjen v različnih evropskih državah, z višjimi frekvencami (nad 91,7 %) pa v vzhodnih sredozemskih državah, kot je Grčija. Pri zahodnih sredozemskih državah so frekvence teh dveh mutacij nižje (pod 88,9 %), kar pripisujejo manjši rabi insekticidov (Hawkes in sod. 2005). V Sredozemlju, kjer pridelajo večino oljk, so insekticid dimetoat uporabljali več desetletij za zatiranje oljčne

muhe (Vontas in sod. 2001). Vzorci oljčnih muh iz Južne Afrike (iz province Cape) pa so bili homozigotni za divji tip oz. niso imeli prisotne mutacije (Hawkes in sod. 2005).

Nardi in sod. (2006) so analizirali oljčne muhe iz Pakistana, Afrike, Srednjega vzhoda, sredozemskih držav in Amerike. Ugotovili so 25 različnih alelov za 3. ekson (označili so jih: A–Y). Identificirali so dva alela z mutacijo I214V, ki sta A in W. Alela A in W se razlikujeta za šest sinonimnih substitucij. Za 6. ekson so identificirali sedem različnih alelov (a–g). Mutacijo G488S je imel alel b.

Odpornostnih alelov niso ugotovili pri vzorcih oljčnih muh iz Pakistana in Afrike, nižjo frekvenco (50 %) so odkrili na Srednjem vzhodu in v Ameriki. Največjo prisotnost odpornostnih alelov so potrdili na območju Sredozemlja, kjer so bile frekvence okoli 100 % v Grčiji in srednji/južni Italiji. V Franciji pa so bile frekvence odpornostnih alelov pod 30 % in na Portugalskem 0 % (Nardi in sod. 2006).

Leta 2015 so Pereira-Castro in sod. želeli ugotoviti, kako so se razširili odpornostni aleli pri oljčni muhi zaradi insekticidov iz skupine organskih fosforjevih estrov na zahodnem in južnem Iberskem polotoku (na Portugalskem in v Španiji) v primerjavi s prvima raziskavama, ki pripadata Hawksu in sod. (2005) in Nardiju in sod. (2006). Mutaciji I214V in G488S so našli s srednjimi do visokimi frekvencami pri vseh lokacijah in so dokazali, da sta razširjeni tudi na Portugalskem. Niso pa potrdili prisotnosti alela z mutacijo $\Delta 3Q$.

Povprečne frekvence za mutaciji I214V in G488S so bile višje od 50 % na Portugalskem in višje od 80 % v Andaluziji, v nasprotju s predhodnimi vrednostmi, ki sta bili 0 na Portugalskem in 33 % v Andaluziji pri raziskavah, ki so jih opravili Hawkes in sod. (2005) in Nardi in sod. (2006). Prisotnost obeh mutacij na Iberskem polotoku je potrdila introdukcijo oljčnih muh s kromosomom z obema mutacijama (Pereira-Castro in sod. 2015).

Hanife (2016) je analiziral oljčne muhe z območja Çanakkale leta 2006, 2007 in 2013. V oljčnih nasadih, kjer so vzeli vzorce oljčnih muh, se proti škodljivcu ukrepa z insekticidi iz skupine organskih fosforjevih estrov, kot sta fention in dimetoat. Vzorce oljčnih muh s 46 lokacij iz Çanakkale v Turčiji so prvič analizirali za prisotnost mutacije G488S. Leta 2006 so identificirali 31,7 % homozigotnih vzorcev z odpornostnim alelom in 65,21 % vzorcev, ki so bili heterozigotni. Samo pri petih vzorcih oljčnih muh od 161 oz. 3,1 % so potrdili prisotnost normalnega oz. alela brez odpornostnih mutacij. Leta 2007 so zabeležili 54,14 % vzorcev homozigotnih z odpornostnim alelom G488S in 44,75 % heterozigotnih vzorcev. Samo dva od 181 vzorcev (1,1 %) sta bila homozigotna z nemutiranim alelom. Leta 2013 so analizirali 95 vzorcev oljčne muhe. Alel z mutacijo G488S so ugotovili v vseh testiranih

oljčnih muhah, in sicer 82 % vzorcev je bilo homozigotnih, 18 % pa heterozigotnih za odpornostni alel G488S. V letu 2013 niso identificirali nobenega nemutiranega alela.

Insekticidi iz skupine organskih fosforjevih estrov za varstvo pred oljčno muho se v Turčiji uporabljajo več kot štiri desetletja. Kmetje običajno uporabljajo insekticide od štiri- do šestkrat na leto in jih nanesejo po celotni krošnji. Hanife (2016) ugotavlja, da frekvence odpornostnih alelov na območju Çanakkale v Turčiji z leti naraščajo. To potrjuje tudi dejstvo, da se veliko lokalnih kmetov pritožuje nad neučinkovitostjo njihovih aplikacij, kar lahko pri varstvu pred oljčno muho v prihodnosti predstavlja problem.

2.5.2.2 Mutacija $\Delta 3Q$

Tretja mutacija se razlikuje od dveh točkovnih mutacij. Delecija treh glutaminov (delecija $\Delta 3Q$) se ne nahaja v katalitičnem centru AChE, ampak na karboksilnem koncu encima na 642. mestu (Kakani in sod. 2008) in predstavlja poseben mehanizem odpornosti proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov.

Mutacija $\Delta 3Q$ je povezana z odpornostjo proti višjim odmerkom insekticida iz skupine organskih fosforjevih estrov (natančneje za dimetoat), vendar vedno v kombinaciji s prej omenjenima dvema točkovnima mutacijama. Prisotnost zgolj delecije $\Delta 3Q$ ne omogoča razvoja odpornosti, kar kaže na pomožno vlogo te mutacije. Poleg tega so Kakani in sod. (2008) ugotovili $\Delta 3Q$ vedno v heterozigotnem stanju, kar dokazuje, da homozigotno stanje te mutacije vpliva na sposobnost preživetja in razmnoževanja. V znanstveni literaturi sicer poročajo tudi, da so mutacijo $\Delta 3Q$ ugotovili v homozigotnem stanju (Dogac in sod. 2015). Dva homozigotna vzorca mutacije $\Delta 3Q$ so identificirali v populaciji s province Hatay in enega v populaciji s province Aydin.

2.5.2.3 Odkritje mutacije $\Delta 3Q$

Kakani in sod. (2008) so analizirali vzorce Skourasa in sod. (2007), ki so objavili raziskavo o stanju odpornosti oljčne muhe proti dimetoatu v Grčiji in na Cipru. Opazili so precejšnje razlike v stopnjah odpornosti, kar je bilo v glavnem posledica različnih selekcijskih pritiskov zaradi apliciranja insekticidov v različnih regijah, vendar molekularna osnova za te razlike ni bila znana. Kakani in sod. (2008) so poskušali oceniti, ali je te razlike mogoče pripisati razlikam v frekvencah dveh znanih *ace* mutacij (Vontas in sod. 2002) ali dodatnim modifikacijam. Odkrili so novo mutacijo $\Delta 3Q$, ki jo povezujejo z visoko stopnjo odpornosti.

Vzorci oljčnih muh Skourasa in sod. (2007) in tiste v njihovem laboratoriju so razdelili v tri skupine glede na povečano odpornost (4–9 ng insekticida na žuželko, 19–37 ng in 75–150

ng), ki so jih pridobili s testom preživetja po apliciranju določene količine insekticida (Kakani in sod. 2008).

Pri proučevanih skupinah oljčnih muh so preverili frekvence normalnih (oz. občutljivih) (S) in odpornostnih (R) alelov z obema točkovnima mutacijama, vendar razlik v odpornosti niso uspeli obrazložiti (preglednica 2). Večina genotipiziranih muh je bilo homozigotnih za obe mutaciji (90 %), medtem ko so nekateri osebki bili heterozigotni, vendar nobena od muh in celo osebki z najnižjimi stopnjami odpornosti niso imeli homozigotnega genotipa za občutljiv tip (SS) za mutaciji I214V in G488S. Vsi vzorci oljčnih muh so imeli vsaj en odpornostni alel (Kakani in sod. 2008).

Preglednica 2: Frekvence alelov I214V, G488S in $\Delta 3Q$ v Grčiji in Cipru (Kakani in sod. 2008).

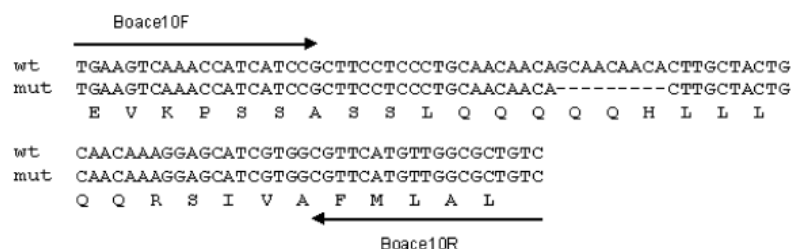
Količina dimetoata na oljčno muho (ng)	I214V			G488S			$\Delta 3Q$		
	F _R ^b	R/N ^a	N ^c	F _R ^b	R/N ^a	N ^c	F _R ^b	R/N ^a	N ^c
4–9	0,8950	213/119	SS: 0 SR: 25 RR: 94	0,9076	216/119	SS: 0 SR: 22 RR: 97	0,0061	1/82	SS: 81 SR: 1 RR: 0
19–37	0,9227	334/181	SS: 0 SR: 28 RR: 153	0,9144	331/181	SS: 0 SR: 31 RR: 150	0,0355	13/183	SS: 170 SR: 13 RR: 0
75–150	0,8529	58/34	SS: 0 SR: 10 RR: 24	0,8529	58/34	SS: 0 SR: 10 RR: 24	0,0847	10/59	SS: 49 SR: 10 RR: 0

^a N je skupno število oljčnih muh. R je število odpornostnih alelov v vzorcu. Za diploidni organizem je za R največja vrednost 2N.

^b F_R je frekvenca odpornostnega alela, izračunana kot razmerje R/2N.

^c Število oljčnih muh pri različnih genotipih.

Produkte PCR od 8. do 10. eksona pri 10 oljčnih muhah z območja Kentri (Kreta), ki so preživele najvišji odmerek insekticida (150 ng na žuželko) pri bioloških testih v izvedbi Skourasa in sod. (2007), so Kakani in sod. (2008) klonirali in analizirali nukleotidno zaporedje gena za acetilholinesterazo. Odkrili so več polimorfizmov. Vsi polimorfizmi na 8. in 9. eksonu so bile sinonimne spremembe nukleotidov. V nukleotidnem zaporedju 10. eksona pa so identificirali delecijo 9 bp (imenovano $\Delta 3Q$) pri dveh od 10 vzorcih. Ta mutacija ustreza devetim (GCAACAACA) nukleotidom, od 1926. do 1934. mesta cDNK *ace* gena (Vontas in sod. 2002) in povzroči delecijo treh glutaminskih ostankov na mestih 642–644 (slika 8).



Slika 8: Shematski prikaz PCR-produkta oljčne muhe na 10. eksonu gena *ace*. Začetna oligonukleotida Boace 10F in Boace 10R (označena na 5' in 3' koncu) se uporabljata za amplifikacijo fragmenta z delecijo (Kakani in sod. 2008).

Da bi ocenili pomen mutacije $\Delta 3Q$ pri odpornosti, so proučili frekvenco mutiranega alela pri oljčnih muhah. Kot je razvidno iz preglednice 2, je pogostost oz. frekvenca alela $\Delta 3Q$ v povezavi s stopnjami odpornosti proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov. Zanimivo je, da so alel z mutacijo $\Delta 3Q$ identificirali vedno v heterozigotnem stanju (Kakani in sod. 2008).

Rezultati so pokazali, da prisotnost alela $\Delta 3Q$ v kombinaciji z $I214V^{+/-}$, $G488S^{+/-}$ (heterozigoti) pripomore k povečanju aktivnosti AChE za 44 %, medtem ko je v primeru prisotnosti $\Delta 3Q$ pri genotipu $I214V^{-/-}$, $G488S^{-/-}$ (homozigoti odpornega tipa) aktivnost AChE povečana za 14 %. Razlika v aktivnosti AChE pri organizmih, ki so heterozigotni za točkovni mutaciji in brez $\Delta 3Q$, v primerjavi z organizmi, ki so homozigotni z odpornostnimi točkovnimi mutacijami in heterozigotni za mutacijo $\Delta 3Q$, je 39,17 % oz. je aktivnost AChE pri slednjem genotipu večja za 152 %. Pri najvišjem nivoju odpornosti (75–150 ng insekticida na žuželko) so ugotovili razmeroma nizko frekvenco $\Delta 3Q$ (8,5 %) (Kakani in sod. 2008).

2.5.2.4 Metode za detekcijo alelov za razvoj odpornosti

Začetna oligonukleotida za pomnoževanje 10. eksona, Boace10F in Boace10R, omogočata pomnoževanje skoraj celotnega eksona, ki vsebuje delecijo 9 bp. Tako je produkt PCR divjega tipa alela velik 96 bp, medtem ko je produkt PCR mutiranega alela zaradi delecije 87 bp (Kakani in sod. 2008).

Za testiranje prisotnosti ali odsotnosti mutacije $\Delta 3Q$ so Kakani in sod. (2013) uporabili začetna oligonukleotida: Ex10wt3'F-IMP (CTTCCTCCCTGCAACAATAG), ki je specifičen za divji tip alela, in Ex10mut3'F-IMP (CTTCCTCCCTGCAACAATAC), specifičen za alel z delecijo $\Delta 3Q$. Začetna oligonukleotida sta enaka, razen pri zadnjem nukleotidu na 3' koncu, ki zagotavlja specifičnost za en ali drugi alel. Uporabili so ju v kombinaciji z začetnim oligonukleotidom Boace10R. Dolžina pomnoženega fragmenta z delecijo $\Delta 3Q$ je 67 bp, produkt PCR divjega tipa alela pa 76 bp (Kakani in sod. 2013).

Pri PCR-RFLP so produkt PCR tretirali z restrikcijskim encimom *MwoI* z restrikcijskim mestom (GCNNNNNNNGC), ki je prisotno v nukleotidnem zaporedju divjega tipa. Delecija 9 bp mutacije $\Delta 3Q$ izbriše zadnja dva GC na prepoznavnem mestu *MwoI*, zato so uporabili *MwoI*-mesto 10. eksona za določitev genotipa različnih oljčnih muh pri diagnostičnem testu PCR-RFLP. Produkt PCR divjega tipa z začetnima oligonukleotidoma Boace10F in Boace10R je kot rečeno dolg 96 bp, mutirani alel pa 87 bp. Po restrikciji fragmenta z divjim tipom alela z encimom *MwoI* nastaneta fragmenta v dolžini 59 bp in 37 bp. Pri heterozigotih za mutacijo $\Delta 3Q$ (mutirani in normalni alel) so po restrikciji tako prisotni trije fragmenti (87 bp, 59 bp in 37 bp) (Kakani in sod. 2013).

Kakani in sod. (2013) so za potrjevanje prisotnosti divjega in odpornostnega alela razvili tudi TaqMan test.

2.5.2.5 Razširjenost mutacije $\Delta 3Q$

Porazdelitev mutacije $\Delta 3Q$ v sredozemskih populacijah so preverili s PCR-RFLP diagnostičnim testom. Skupno so analizirali deset populacij (približno 30 vzorcev iz vsake populacije) iz različnih regij iz osmih držav (dve iz Izraela in Francije in eno iz Cipra, Grčije, Italije, Španije, Portugalske in Maroka). Alel $\Delta 3Q$ so našli v devetih od desetih testiranih divjih populacijah s frekvencami od 2 do 12,5 %. Alela $\Delta 3Q$ niso detektirali na Portugalskem. Najvišje frekvence (več kot 10 %) so ugotovili v Grčiji in Italiji, medtem ko so opazili postopno zmanjšanje frekvence $\Delta 3Q$ proti zahodnemu Sredozemlju (slika 9). Homozigota za mutacijo $\Delta 3Q$ niso identificirali v nobeni od obravnavanih populacij (Kakani in sod. 2013).



Slika 9: Razširjenost mutacije $\Delta 3Q$ po Sredozemlju. V tortnih grafikonih rumena barva predstavlja frekvenco divjega tipa alela (brez mutacije $\Delta 3Q$), medtem ko oranžna barva frekvenco alela $\Delta 3Q$ (Kakani in sod. 2013).

V Grčiji so približno štiri desetletja proti oljčni muhi uporabljali dimetoat in fention (Skouras in sod. 2007). Kakani in sod. (2013) so najnižje frekvence $\Delta 3Q$ ugotovili v državah zahodnega Sredozemlja, kjer je uporaba insekticidov iz skupine organskih fosforjevih estrov omejena. V Španiji so odkrili samo en alel $\Delta 3Q$, medtem ko na Portugalskem $\Delta 3Q$ niso našli.

Tudi Pereira-Castro in sod. (2015) na Portugalskem niso odkrili mutacije $\Delta 3Q$. Ta porazdelitev mutacije $\Delta 3Q$ je v skladu s porazdelitvijo drugih dveh točkovnih mutacij, I214V in G488S, v Sredozemlju (Hawkes in sod. 2005, Skouras in sod. 2007). Najvišjo frekvenco I214V in G488S so zabeležili v Grčiji in Italiji, kar potrjuje, da širjenje *ace* mutiranih alelov v veliki meri sledi uporabi insekticidov iz skupine organskih fosforjevih estrov.

Kot omenjeno, je bil odpornostni alel odkrit v devetih od desetih populacij, kar potrjuje, da so odpornostni aleli, povezani z odpornostjo proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov, razširjeni v Sredozemlju. Distribucija $\Delta 3Q$ je v povezavi s pogostostjo uporabe OP-insekticidov po Sredozemlju, kar kaže, da je močan selekcijski pritisk z uporabo insekticidov povezan s širjenjem odpornostnih alelov (Kakani in sod. 2013).

Raziskava Doğaça in sod. (2015) je pokazala, da je bila frekvenca $\Delta 3Q$, v nasprotju s pričakovanji, nižja v Egejski regiji v Turčiji v primerjavi s sredozemskim delom (južni del Turčije), kjer pa je zaradi večje rabe insekticidov prisoten večji selekcijski pritisk. Ugotovili so namreč, da je mutacija $\Delta 3Q$ v sredozemskih populacijah s frekvenca od 6 % do 20 %. V nekaterih populacijah iz Egejske regije mutacije $\Delta 3Q$ še niso ugotovili, pri ostalih populacijah pa je ta mutacija prisotna s frekvenca od 2 % do 8 %. Opazili so, da je $\Delta 3Q$ skoraj vedno v heterozigotnem stanju, saj so ugotovili samo en homozigoten vzorec z mutacijo $\Delta 3Q$ v populaciji province Hatay in enega v populaciji province Aydin.

V raziskavi iz leta 2020 so mutacijo $\Delta 3Q$ ugotovili samo pri dveh vzorcih oljčne muhe od 115 analiziranih v Španiji, ki sta bila v heterozigotnem stanju. Mutacijo $\Delta 3Q$ so ugotovili tudi pri vzorcih iz Izraela, Grčije in Portugalske. V Grčiji so mutacijo $\Delta 3Q$ ugotovili pri dveh vzorcih od 29 analiziranih, na Portugalskem pa pri enem vzorcu od 13. Prvič je bila mutacija $\Delta 3Q$ ugotovljena tudi pri treh od 29 analiziranih vzorcev oljčne muhe iz Izraela (Lantero in sod. 2020).

2.5.3 Kako preprečujemo razvoj odpornosti proti insekticidom

Eden izmed pomembnih programov varstva je še vedno spremljanje oz. monitoring razvoja odpornosti proti insekticidom. Poznavanje stanja odpornosti in trend razvoja odpornosti so osnovne zahteve za prilagajanje programov za varstvo rastlin. Ko se frekvenca odpornih fenotipov poveča do določene ravni, učinkovitost nadzora z insekticidi, proti kateremu so škodljivci razvili odpornost, postane neuspešno, zato je pomembno, da se odkrijejo odpornostni aleli, še posebno tisti, ki k razvoju odpornosti pripomorejo največ, npr. pri oljčni muhi alel $\Delta 3Q$, ko so prisotni še v nizkih frekvencah, tako da se lahko ustrezni ukrepi

izvedejo pravočasno, da bi ustavili njihovo kopičenje. Detekcija odpornostnih alelov, npr. I214V in G488S, pa lahko služi kot zgodnje opozorilo na prihajajoči problem odpornosti proti insekticidom. Po mnenju Kakanija in sod. (2013) bi bilo treba ob detekciji mutacije $\Delta 3Q$ zamenjati insekticid.

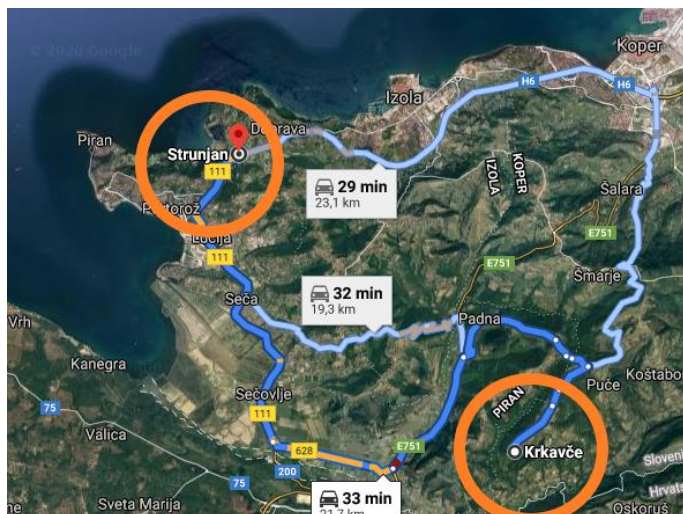
Pogosta uporaba insekticidov neizogibno vodi k razvoju in širjenju odpornosti. Uporaba spinosada proti oljčni muhi sledi podobnemu vzorcu razvoja rezistence (Kakani in sod. 2010). Potrebni so novi pristopi za obvladovanje škodljivcev.

Zanimiv je tudi predlog raziskave Tee Knap in Dunje Bandelj (2016), ki trdita, da bi bilo zaradi migracije oljčne muhe v Slovenski Istri varstvo z zastrupljenimi vabami pred oljčno muho učinkovitejše ob sočasni izvedbi prvega škropljenja proti škodljivcu v 48 urah po povečanemu ulovu oljčne muhe na feromonskih vabah. S tem bi omejili prvo generacijo oljčne muhe, ustavili njeno migracijo in zmanjšali širjenje odpornosti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Material za izolacijo DNK

Oljčne muhe smo pridobili iz napadenih plodov, iz katerih smo odstranili bube in jih inkubirali v petrijevkah na sobni temperaturi do razvoja muh. Uporabili smo napadene plodove oljk iz Krkavč in Strunjana (slika 10), ki so bili vzorčeni v avgustu in septembru 2016. Ker smo želeli primerjati rezultate genetske analize s starejšimi vzorci, smo uporabili DNK oljčnih muh iz leta 2013 iz Strunjana, ki je bila izolirana v okviru izdelave magistrske naloge Tee Knap (2014). Analizirali smo od 20 do 24 muh s posamezne lokacije. Pred izolacijo DNK smo oljčnim muham določili tudi spol. Seznam vzorcev je v prilogi A.



Slika 10: Vzorčni mesti Strunjan in Krkavče (<https://www.google.si/maps/>).

3.2 Izolacija DNK

DNK smo iz oljčnih muh izolirali z metodo CTAB (Kump in sod. 1992). Za izolacijo DNK smo uporabili celo muho. Homogenizacijo smo izvedli s homogenizatorjem (TissueLyser II, Qiagen), pri čemer smo v centrifugirko poleg oljčne muhe dodali še stekleno kroglico in 200 μ l na 68 °C segretega pufra CTAB (2 % [w/v] CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,2 % [v/v] β -merkaptotetanol). Po 30 s stresanja s hitrostjo 30 Hz smo dodali še 300 μ l pufra CTAB, nato smo vzorce inkubirali v vodni kopeli 1 h in 30 min. na 68 °C in občasno premešali. Dodali smo 500 μ l topila fenol : kloroform : izoamilalkohola v razmerju 25 : 24 : 1 in ga dobro premešali, da je nastala suspenzija. Vzorce smo nato centrifugirali 15 min. pri 11000 $\times$ g (centrifuga Eppendorf 5430R) in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odpipetirali v novo ependorffko (1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko) in dodali 50 μ l 3 M Na-acetata (1/10 volumna, pH 5,2) in 500 μ l ledeno hladnega izopropanola (enakovredno 1 volumnu izolacijske raztopine). Vzorce smo dobro pretresli in jih dali v

zamrzovalnik za 30 min. na -20°C . Nato smo vzorce ponovno dobro pretresli in centrifugirali 15 min. pri $11000 \times g$ in temperaturi 4°C . Supernatant smo zavrgli, oborjeni DNK dodali $500\ \mu\text{l}$ 70-odstotnega etanola in rahlo pretresli. Ponovno smo centrifugirali 5 min. pri $11000 \times g$, etanol smo previdno odpipetirali in DNK inkubirali na sobni temperaturi, da je preostali etanol izhlapel. DNK smo raztopili v $30\ \mu\text{l}$ TE pufra ($10\ \text{mM}$ Tris-HCl [pH 8,0], $1\ \text{mM}$ EDTA [pH 8,0]) in jo shranili na -20°C .

3.3 Merjenje koncentracije DNK

Koncentracijo DNK smo izmerili s fluorometrom (Qubit Fluorometer 3.0, ThermoFisher Scientific) in pripadajočim kitom dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit.

Delovno raztopino smo pripravili z redčenjem $200\times$ koncentriranega reagenta (Qubit® dsDNA BR Reagent) s pufrom Qubit® dsDNA BR Buffer do $1\times$ koncentracije.

Za umeritev fluorometra smo pripravili kalibracijski raztopini, ki sta vsebovali $190\ \mu\text{l}$ delovne raztopine in $10\ \mu\text{l}$ standarda 1 (Qubit® dsDNA BR Standard #1) oz. standarda 2 (Qubit® dsDNA BR Standard #2).

Za določanje koncentracije DNK v vzorcih smo pripravili meritveno raztopino, ki je vsebovala $198\ \mu\text{l}$ delovne raztopine in $2\ \mu\text{l}$ DNK oljčne muhe.

Za nadaljnjo uporabo vzorcev DNK v reakciji PCR smo pripravili raztopine DNK s koncentracijo $4\ \text{ng}/\mu\text{l}$.

3.4 Ugotavljanje prisotnosti mutacij I214V in G488S s sekvenciranjem

3.4.1 Pomnoževanje lokusov z odpornostnima mutacijama

Za pomnoževanje alelov z mutacijama I214V in G488S smo uporabili metodo, ki so jo razvili Nardi in sod. (2006) (preglednica 3).

Reakcijska mešanica v končnem volumnu $15\ \mu\text{l}$ je bila sestavljena iz $3,9\ \mu\text{l}$ vode (dH_2O), $3\ \mu\text{l}$ $5\times$ PCR pufra, $1,2\ \mu\text{l}$ $25\ \text{mM}$ MgCl_2 , $1,2\ \mu\text{l}$ dNTP ($10\ \text{mM}$ vsak), $0,3\ \mu\text{l}$ primerja BoAce_518F, $0,3\ \mu\text{l}$ primerja BoAce_1040R ($10\ \mu\text{M}$), $0,075\ \mu\text{l}$ encima Taq polimeraze ($5\ \text{u}/\mu\text{l}$, Promega) in $20\ \mu\text{l}$ DNK ($4\ \text{ng}/\mu\text{l}$).

Pomnoževanje je potekalo po protokolu, ki so ga ravno tako objavili Nardi in sod. (2006), in sicer 94°C 1 min. in 35 ciklov: 56°C 1 min. 10 s, 72°C 1 min. 30 s.

Preglednica 3: Seznam začetnih oligonukleotidov in njihovo zaporedje.

Mutacija	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5'–3'
I214V	BoAce_518F	TACTCAATTTCACTTTCAGCACTC
	BoAce_1040R	CAACTCACCGACAATAGCG
G488S	BoAce_1424F	CAGCTGGGTTGGTAATCC
	BoAce_1519R	TAGTGCACGGAAGCTCC

3.4.2 Kontrola uspešnosti pomnoževanja v reakciji PCR

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z agarozno elektroforezo. Pripravili smo 1,4-odstotni agarozni gel s fluorescentnim barvilom Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics Europe).

Vzorci smo za nanos na agarozni gel pripravili tako, da smo v vsak vzorec dodali 3 μ l nanašalnega barvila (6 X DNA LoadingDye, Thermo Fisher Scientific). Za velikostni standard smo uporabili 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Na gel smo nanесли 7 μ l DNK z barvilom. Elektroforeza je potekala 30 min. pri napetosti 3 V/cm.

3.4.3 Čiščenje produkta PCR pred sekvenčno reakcijo

S tem postopkom se v reakciji PCR razgradijo začetni oligonukleotidi in nukleotidi, ki so po končanem pomnoževanju v reakciji PCR ostali prosti v raztopini.

Reakcija čiščenja produktov PCR v končnem volumnu 7 μ l je vsebovala 5 μ l reakcije PCR, 0,1 μ l ExoI (encim eksonukleaza I [20 U/ μ l], Thermo Fisher Scientific), 0,5 μ l AP (encim alkalna fosfataza [1 U/ μ l], Thermo Fisher Scientific) in 1,4 μ l 1X PCR pufra. Reakcijo smo nato inkubirali 45 min. pri 37 °C in 15 min. pri 80 °C.

3.4.4 Sekvenčna reakcija

Sekvenčna reakcija v končnem volumnu 10 μ l je vsebovala 3,5 μ l očiščene DNK, 0,2 μ l začetnega oligonukleotida BoAce_518F, 2 μ l 5X BD pufra, 0,5 μ l BD reakcijske mešanice (BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) in 3,8 μ l vode.

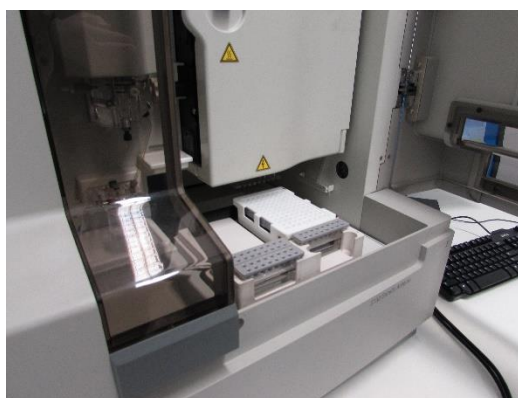
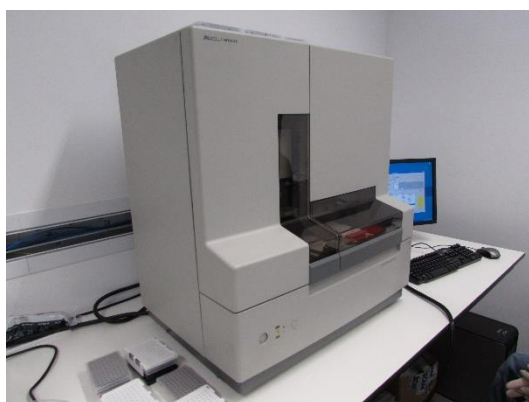
Sekvenčna reakcija je na PCR-napravi potekala po naslednjem temperaturnem profilu:

- začetna denaturacija pri 96 °C za 3 min.,
- 50 ciklov s ponavljanjem:
 - 96 °C za 10 s,
 - 50 °C za 10 s,
 - 60 °C za 4 min.,
- končna inkubacija pri 72 °C za 7 min.

3.4.5 Čiščenje sekvenčne reakcije in nanos na kapilarno elektroforezo

Sledilo je čiščenje sekvenčnih reakcij. S tem postopkom se odstranijo prosti nukleotidi, označeni s fluorescentnimi barvili. S tem pridobimo boljši signal pri kapilarni elektroforezi.

Čiščenje je potekalo po naslednjem postopku: 10 µl vzorca iz sekvenčnih reakcij smo prenesli na 96-mestno ploščo in jo za kratek čas centrifugirali. Dodali smo 2,5 µl 125 mM EDTA in centrifugirali le toliko, da pride EDTA v stik s sekvenčno reakcijo. Dodali smo 30 µl absolutnega etanola. Ploščo smo prekrili s septo in premešali s 5- do 10-kratnim obračanjem. Ploščo smo inkubirali 15 min. na sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo, in jo po končani inkubaciji centrifugirali pri maksimalni hitrosti 55 min. pri 4 °C. Po centrifugiranju smo iz plošče odlili etanol in EDTA s hitrim gibom navzdol. Ploščo smo nato obrnjeno navzdol centrifugirali pri 190 ×g na papirnati brisači za 2 min. Ploščo smo inkubirali na sobni temperaturi za 5 min., zaščiteno pred svetlobo, in raztopili DNK v 12 µl formamida (Hi-Di Formamide, Thermo Fisher Scientific). Tako pripravljeno ABI-ploščo smo položili na genetski analizator 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) (slika 11).



Slika 11: Naprava Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer za kapilarno elektroforezo (foto: Franca, A. 2016).

Elektroferograme, ki smo jih dobili po zaključeni analizi na genetskem analizatorju, smo obdelali s programoma Sequencing Analysis v5.4 in CodonCode Aligner.

3.5 Ugotavljanje prisotnosti mutacije $\Delta 3Q$

3.5.1 Pomnoževanje z lokusno in alelno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v reakciji PCR

Prisotnost mutacije $\Delta 3Q$ smo preverili z dvema metodama, ki so ju razvili Kakani in sod. (2008). Prva metoda temelji na lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidih (Boace 10F in Boace 10R). Ta par začetnega nukleotida istočasno pomnoži mutirani in divji tip alela, medtem ko druga metoda temelji na alelno specifičnih začetnih oligonukleotidih, kjer se alel z mutacijo $\Delta 3Q$ (Ex10mut3_F-IMP in Boace10R) in alel brez mutacije (Ex10wt3_F-IMP in Boace10R) pomnožujeta v ločenih reakcijah PCR. Pri prvi metodi je dolžina pomnoženega alela z delecijo $\Delta 3Q$ 87 baznih parov (bp) in dolžina produkta brez delecije 96 bp. Pri drugi metodi pa je dolžina pomnoženega fragmenta z delecijo 67 bp, alel brez delecije pa 76 bp.

Pomnoževanje smo izvedli po ekonomični metodi (Schuelke 2000), zaradi česar smo v vseh reakcijah PCR uporabili začetni oligonukleotid Boace10R, ki je bil na 5' koncu podaljšan za 18 baz, in v reakcijo PCR dodali fluorescentno označen tretji začetni oligonukleotid M13(-21). V preglednici 4 so prikazani uporabljeni začetni oligonukleotidi in njihovo nukleotidno zaporedje.

Preglednica 4: Seznam začetnih oligonukleotidov in nukleotidno zaporedje.

Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje 5'–3'
Boace10F	TGAAGTCAAACCATCATCCG
Boace10R	GACAGCGCCAACATGAACG
Ex10wt3_F-IMP	CTTCCTCCCTGCAACAATAG
Ex10mut3_F-IMP	CTTCCTCCCTGCAACAATAC
TAIL-Boace10R	TGTAAAACGACGGCCAGTGACAGCGCCAACATGAACG
M13(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT

Reakcijska mešanica je potekala v skupnem volumnu 15 μ l in je vsebovala 5,35 μ l dH₂O, 1,5 μ l 10X PCR pufru z (NH₄)₂SO₄, 1,2 μ l 2mM MgCl₂, 1,2 μ l 0,2 mM koncentracije dNTP, 0,3 μ l 10 μ M specifičnega začetnega oligonukleotida Boace 10F in M13(-21) začetnega oligonukleotida, 0,075 μ l 10 μ M koncentracije podaljšanega začetnega oligonukleotida Boace 10R – TAIL, 0,075 μ l Taq polimeraze (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) in 5 μ l DNK v koncentraciji 4 ng/ μ l.

Za alelno specifično reakcijo PCR smo v reakcijsko mešanico namesto začetnega oligonukleotida Boace 10F dodali specifičen začetni oligonukleotid Ex10mut3_F-IMP ali Ex10wt3_F-IMP.

3.5.2 Priprava vzorcev za analizo na kapilarnem genetskem analizatorju

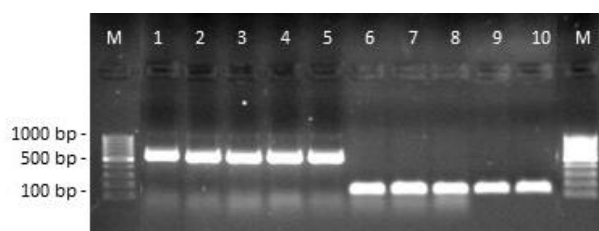
Iz vsake reakcije z različnimi fluorescentnimi barvili (FAM, VIC, NED in PET) smo vzeli 5 μ l in zmešali skupaj. Iz tako pripravljene mešanice smo odvzeli po 1 μ l produkta PCR, ga nanesli na 96-mestno ploščo in dodali 0,3 μ l velikostnega standarda (LIZ 500, Thermo Fisher Scientific) in 10,7 μ l formamida (Hi-Di Formamide, Thermo Fisher Scientific).

Vzorci smo pred analizo denaturirali na 95 °C za 5 min., da se je dvovijačna DNK razcepila, in jih po končani denaturaciji takoj postavili na –20 °C, da smo preprečili ponovno združevanje komplementarnih molekul DNK. Vzorce so nato nanesli na kapilarni genetski analizator 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Za določitev produktov PCR in dolžine pomnoženih fragmentov smo dobljene elektroferograme analizirali s programom GeneMapper v4.1.

4 REZULTATI

4.1 Prisotnost mutacij I214V in G488S

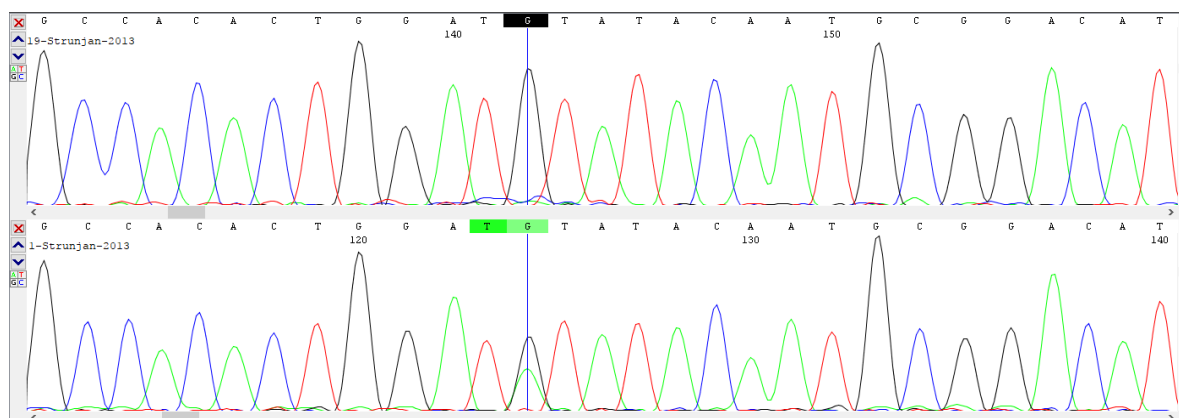
Z agarozno elektroforezo smo potrdili uspešnost pomnoževanja fragmentov v reakciji PCR (slika 12). Dolžina pomnoženega fragmenta iz 3. eksona gena *ace* brez začetnih oligonukleotidov je 521 bp od 543 bp celotnega 3. eksona in 94 bp od 150 bp celotnega 6. eksona gena *ace*. Predvidena dolžina pomnoženih fragmentov je razvidna tudi na sliki 12.



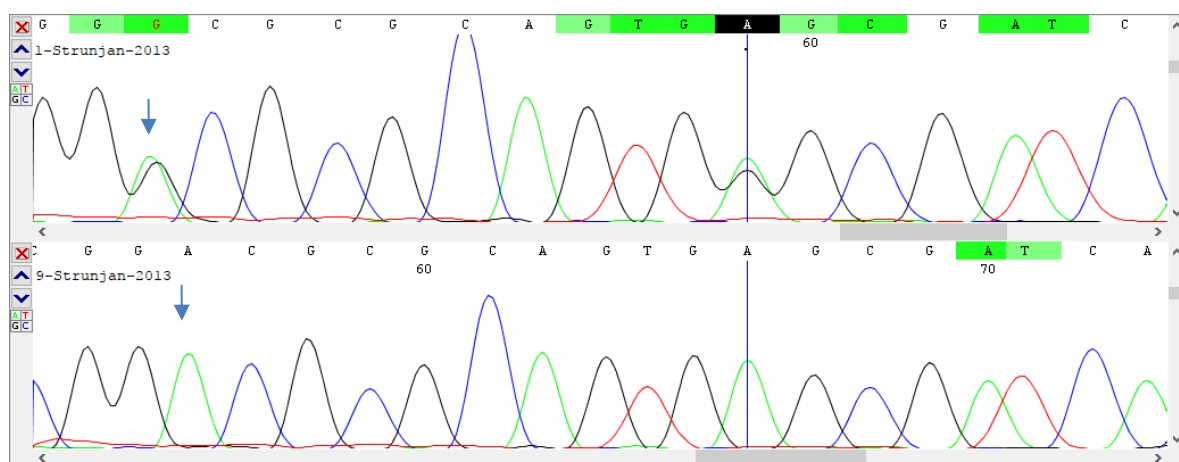
Slika 12: Agarozni gel s produkti reakcije PCR: 1.–5. fragment 3. eksona, 6.–10. fragment 6. eksona (1,4 % agaroz, 0,5X TBE, 3 V/cm, 1 h, velikostni standard Thermo Scientific GeneRuler 10 bp DNA Ladder).

Po reakciji PCR je sledila sekvenčna reakcija in detekcija sekvence na genetskem analizatorju. Za poravnavo zaporedij smo kot referenčni sekvenci uporabili DQ499479.1 (za 3. ekson) in DQ499505.1 (za 6. ekson). Elektroferograme smo pregledali ročno. Če je bil na mestu mutacije I214V prisoten samo signal za G (mutacija, ki je povezana z razvojem odpornosti) ali A, smo to označili kot homozigotno stanje, če pa sta bila prisotna dva signala, smo zabeležili prisotnost odpornostnega alela in divjega tipa alela (slika 13). Enako smo vrednotili elektroferograme regije 6. eksona, le da sta na mestu mutacije prisotna A (mutacija, ki je povezana z razvojem odpornosti) ali G (divji alel) oz. v primeru dveh signalov heterozigot (slika 14). Rezultati analize sekvenc so podani v prilogah B in C in v preglednici 5, kjer so navedene frekvence odpornostnih alelov, ki smo jih izračunali kot razmerje med številom odpornostnih alelov v vzorcu in številom vseh alelov.

Iz preglednice 5 vidimo, da je frekvenca mutacije G488S leta 2016 za Krkavče znašala 97,5 % in za Strunjan 97,7 %, medtem ko je leta 2013 za Strunjan znašala 85,4 %. Frekvenca mutacije I214V je bila leta 2016 100-odstotna za obe lokaciji, leta 2013 za Strunjan pa 85,4-odstotna. Iz rezultatov je razvidno, da je bila frekvenca odpornostnih alelov v Strunjanu leta 2013 nižja v primerjavi z letom 2016, kar bi lahko pomenilo, da se je odpornost proti insekticidom povečala.



Slika 13: Elektroferograma sekvence 3. eksona gena *ace*. Pri zgornjem elektroferogramu je na označenem mestu prisoten G, pri spodnjem elektroferogramu pa je na mestu mutacije prisoten polimorfizem, in sicer G/A.



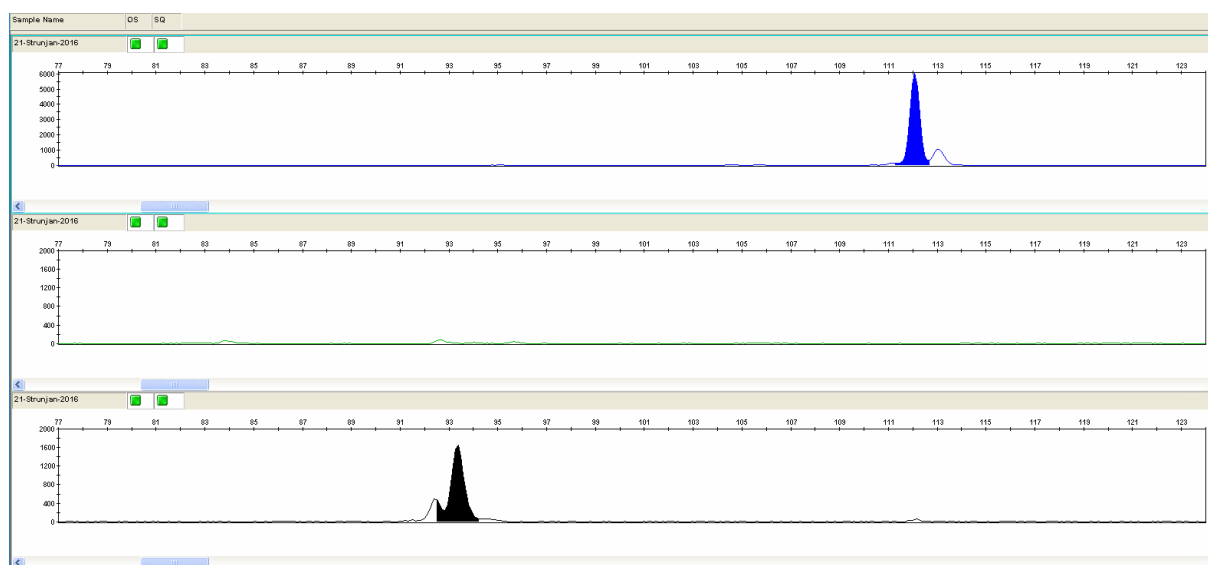
Slika 14: Elektroferograma sekvence 6. eksona gena *ace*. Pri zgornjem elektroferogramu je na označenem mestu prisoten polimorfizem A/G, pri spodnjem pa je na mestu mutacije prisoten adenzin. S puščico je označeno mesto mutacije, ki se skoraj vedno pojavi ob prisotni mutaciji G488S.

4.2 Prisotnost mutacije $\Delta 3Q$

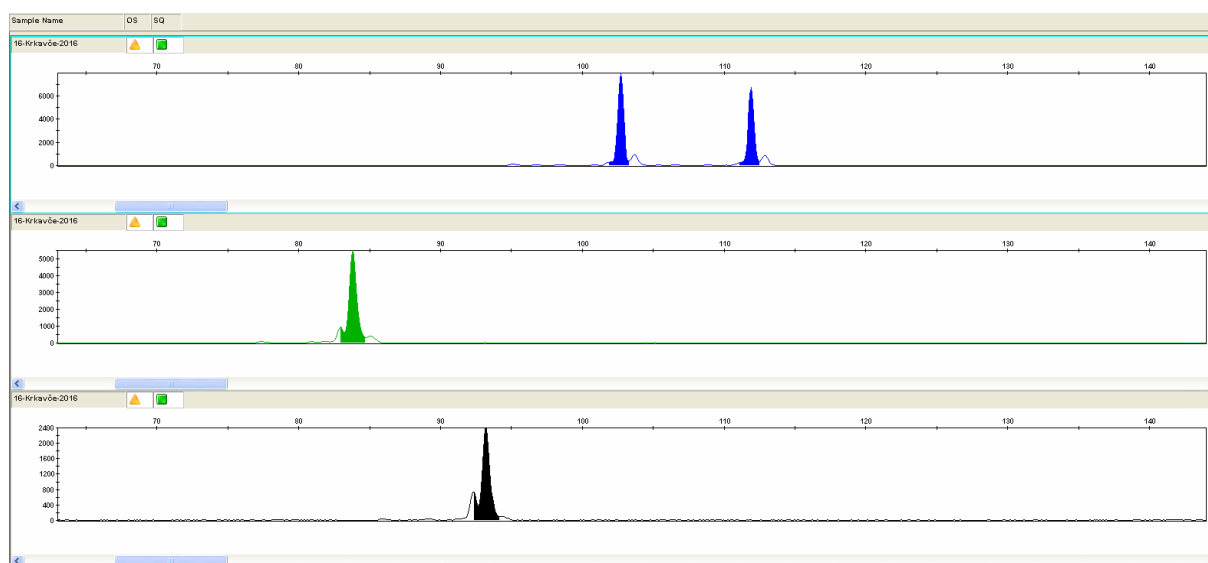
Prisotnost mutacije $\Delta 3Q$ smo ugotavljali z dvema metodama, ki se razlikujeta v začetnih oligonukleotidih. Z lokusno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi se lahko istočasno pomnožita divji tip alela in alel z mutacijo oz. odpornostni alel. Zaradi uporabe ekonomske metode, zaradi katere smo začetni oligonukleotid Boace10R podaljšali za 18 baz (zaporedje M13(-21) začetnega oligonukleotida), so bili produkti PCR daljši od pričakovanih, in sicer pri uporabi lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov smo določili dolžino za alel z delecijo 103 bp, za divji tip alela pa 112 bp. Dolžini se razlikujeta za 9 bp, kar je enako kot dolžina delecije. Pri pomnoževanju z alelno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo ravno tako zaradi modifikacije metode določili daljše produkte, in sicer 94 bp za divji tip alela in 87 bp za alel z mutacijo. Rezultati genetske analize o prisotnosti alelov z delecijo in brez nje za leti 2013 in 2016 za obe lokaciji so podani v preglednici 5 in v prilogah B in C. Prisotnost mutacije $\Delta 3Q$ smo potrdili z obema metodama. Sliki 15 in 16 prikazujeta primera

elektroferogramov dveh vzorcev oljčnih muh, homozigotnega za divji alel in heterozigotnega z mutacijo $\Delta 3Q$.

Na sliki 15 zgornji elektroferogram prikazuje rezultat pomnoževanja z lokusno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, kjer je prisoten samo produkt v dolžini 112 bp. Prav tako se alel z delecijo z uporabo alelna specifičnih začetnih oligonukleotidov ni pomnožil (srednji elektroferogram), medtem ko je produkt pomnoževanja alela brez delecije prisoten (spodnji elektroferogram).



Slika 15: Elektroferogrami vzorca 21-Strunjan-2016 z divjim tipom alela. Zgornji elektroferogram prikazuje signal pomnoženega divjega tipa alela z lokusno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, srednji elektroferogram prikazuje rezultate pomnoževanje alela z mutacijo $\Delta 3Q$ (prisotnost odpornostnega alela pri tem vzorcu ni bila potrjena), spodnji elektroferogram pa prikazuje rezultate reakcije PCR z alelna specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje divjega alela.



Slika 16: Elektroferogrami heterozigotnega vzorca 16-Krkavče-2016. Zgornji elektroferogram prikazuje signal pomnoženega divjega tipa alela in alela z mutacijo $\Delta 3Q$ z lokusno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, srednji elektroferogram prikazuje rezultat pomnoževanje alela z mutacijo $\Delta 3Q$ (prisotnost

odpornostnega alela pri tem vzorcu je bila potrjena), spodnji elektroferogram pa prikazuje rezultate reakcije PCR z alelno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje divjega alela.

Na sliki 16 sta se z uporabo lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov pomnožila alel brez delecije in alel z njo (zgornji elektroferogram). Prisotnost alelov z delecijo (srednji elektroferogram) in brez delecije (spodnji elektroferogram) smo potrdili tudi z uporabo alelno specifičnih začetnih oligonukleotidov.

Frekvenca mutacije $\Delta 3Q$ oz. odpornostnega alela je bila leta 2016 za Krkavče 2,5-odstotna (identificiran en odpornostni alel) in za Strunjan 9,1-odstotna oz. 4 odpornostni aleli, medtem ko je bila leta 2013 v Strunjanu frekvenca delecije $\Delta 3Q$ 2,1-odstotna oz. en odpornostni alel. Iz rezultatov je razvidno, da se je frekvenca delecije $\Delta 3Q$ v Strunjanu od leta 2013 do 2016 povečala.

Preglednica 5: Frekvenca odpornostnih alelov pri oljni muhi za mutacije G488S, I214V in $\Delta 3Q$ (F_R = frekvenca odpornostnih alelov, R = število odpornostnih alelov v vzorcu, N = število vseh muh v vzorcu).

	Mutacija	$F_R = R/2N$	R/N	Frekvenca v %
Krkavče 2016	448	39/40 = 0,975	39/20	97,5
	214	40/40 = 1	40/20	100
	$\Delta 3Q$	1/40 = 0,025	1/20	2,5
Strunjan 2016	448	43/44 = 0,977	43/22	97,7
	214	44/44 = 1	44/22	100
	$\Delta 3Q$	4/44 = 0,0909	4/22	9,1
Strunjan 2013	448	41/48 = 0,854	41/24	85,4
	214	41/48 = 0,854	41/24	85,4
	$\Delta 3Q$	1/48 = 0,0208	1/24	2,1

Preglednica 6: Identificirani haplotipi in njihova pogostnost.

	448 A (odpornostni alel) G (občutljivi alel)	214 G (odpornostni alel) A (občutljivi alel)	$\Delta 3Q$ 103 (odpornostni alel) 112 (občutljivi alel)	VSOTA 2013 Strunjan	VSOTA 2016 Krkavče	VSOTA 2016 Strunjan	SKUPAJ	
								%
1.	A/A	G/G	112/112	17	18	18	53	80,3
2.	A/G	G/G	112/112	0	1	0	1	1,5
3.	A/A	G/G	103/112	1	1	3	5	7,6
4.	A/G	G/G	103/112	0	0	1	1	1,5
5.	A/G	A/G	112/112	5	0	0	5	7,6
6.	G/G	A/A	112/112	1	0	0	1	1,5

V preglednici 6 so navedeni identificirani haplotipi pri analiziranih vzorcih za vse tri odpornostne mutacije. Vidimo, da je najpogostejša kombinacija mutacij prva oz. A/A (448),

G/G (214) in 112/112 (homozigoti za odpornostni alel pri mutaciji G448S, homozigoti za odpornostni alel za mutacijo I214V in homozigoti za divji tip alela [dolžina produkta PCR 112 bp] na 10. eksonu, torej brez delecije $\Delta 3Q$). Leta 2013 je bilo največ heterozigotnih vzorcev za mutaciji G448S in I214V (A/G [448], A/G [214] in homozigoti za divji tip alela na 10. eksonu). Identificiran je bil tudi en vzorec brez odpornostnih mutacij (G/G [448], A/A [214] in 112/112), medtem ko so leta 2016 imeli vsi vzorci oljčnih muh prisoten vsaj en odpornostni alel. Mutacija $\Delta 3Q$ se je vedno pojavila v heterozigotnem stanju.

5 DISKUSIJA

Namen naloge je bil ugotoviti, ali so aleli za razvoj odpornosti proti dimetoatu pri oljčni muhi prisotni tudi v Slovenski Istri, s čimer bi pripomogli k oblikovanju novih strategij varstva oljke. V tuji literaturi namreč poročajo, da ob pojavu odpornostnih alelov insekticidi, proti katerim se je odpornost pojavila, niso več omogočali učinkovitega nadzora škodljivcev. V tem primeru je treba zamenjati insekticid ali poiskati nove oz. izboljšati obstoječe metode varstva pred oljčno muho.

Z genetsko analizo smo preverili prisotnost mutacij, ki jih povezujejo z razvojem odpornosti proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov, G488S, I214V in $\Delta 3Q$, za lokaciji Krkavče in Strunjan pri vzorcih iz leta 2016 in za lokacijo Strunjan pri vzorcih iz leta 2013.

V uvodu smo si zastavili hipotezo, da glede na večletno uporabo fitofarmaceutskih sredstev iz skupine organskih fosforjevih estrov za zaščito oljke pred oljčno muho predvidevamo, da se je odpornost proti omenjenim sredstvom pri oljčni muhi razvila tudi v Slovenski Istri. To hipotezo smo z genetsko analizo tudi potrdili.

Frekvence mutacij G488S in I214V (preglednica 5) so bile visoke za obe lokaciji in so se od leta 2013 do 2016 povečale (za Strunjan za mutacijo G488S s 85,4 % na 97,7 % in za mutacijo I214V s 85,4 % na 100 %). Ti dve mutaciji se pojavljata skoraj vedno skupaj, kar je razvidno iz preglednice 6, saj je bila kombinacija A/A (448), G/G (214) in 112/112 prisotna pri 53 od 66 vzorcev oljčne muhe, kar pomeni, da je bilo največ oljčnih muh homozigotnih za ti dve mutaciji (80,3 %).

Frekvenca mutacije $\Delta 3Q$ (preglednica 5) se je od leta 2013 do 2016 povečala z 2,1 % (1 alel oz. 1 vzorec oljčne muhe) na 9,1 % (4 aleli oz. 4 vzorci oljčne muhe). Če primerjamo obe lokaciji za leto 2016, ugotovimo, da je bila frekvenca mutacije $\Delta 3Q$ pri vzorcih iz Strunjana višja (9,1 % oz. 4 aleli) v primerjavi z vzorci iz Krkavč (2,5 % oz. 1 alel).

Iz rezultatov pri ugotavljanju prisotnosti vseh treh mutacij je razvidno, da so bile frekvence odpornostnih alelov višje leta 2016 v primerjavi z letom 2013. Iz pridobljenih rezultatov bi lahko sklepali, da se je odpornost proti insekticidom povečala, s tem pa se je zmanjšala njihova učinkovitost. Tudi druge raziskave potrjujejo, da višje frekvence odpornostnih alelov vodijo v razvoj odpornosti oljčnih muh proti insekticidom (Doğaç in sod. 2015, Hanife 2016, Kakani in sod. 2008, Kakani in sod. 2013, Pereira-Castro in sod. 2015).

Identificirali smo 100-odstotno frekvenco odpornostnega alela I214V. Enako so v Grčiji in Italiji ugotovili tudi Nardi in sod. (2006). Med vsemi analiziranimi vzorci smo identificirali

samo en vzorec oljne muhe brez odpornostnih mutacij iz leta 2013, medtem ko so leta 2016 vsi vzorci oljnih muh imeli vsaj en odpornostni alel z mutacijo. Mutacija $\Delta 3Q$ se je vedno pojavila v heterozigotnem stanju. Enako so ugotovili tudi v drugih raziskavah iz tuje literature (Kakani in sod. 2008, Kakani in sod. 2013). Odpornostni alel z mutacijo $\Delta 3Q$ smo odkrili na obeh vzorčnih lokacijah. Tudi Kakani in sod. (2013) so odpornostni alel $\Delta 3Q$ potrdili pri devetih od desetih populacijah iz Sredozemlja, kar potrjuje, da so odpornostni genotipi, povezani z odpornostjo proti insekticidom iz skupine organskih fosforjevih estrov, razširjeni po Sredozemlju.

Ob povečanju odpornosti proti insekticidom, stroškov za njihov nakup in onesnaževanju okolja je treba razmisliti o novih načinih nadzora populacij oljne muhe. Biotično varstvo rastlin je zanimiva metoda, kjer škodljivce zatiramo z njihovimi naravnimi sovražniki. Vsekakor bi bilo na tem področju treba opraviti več raziskav. Pri fitofarmacevtskih sredstvih pa je pomembno, da se pravilno svetuje o njihovi uporabi. Povečanje rezistence bi lahko privedlo do neučinkovitosti obstoječih načinov varstva in bi bilo treba oblikovati nove strategije varstva pred oljno muho. Povečevanje frekvence odpornostnih mutacij je treba odkriti pravočasno in jih s primernimi varstvenimi ukrepi zaustaviti.

Za zmanjšanje porabe FFS bo treba več raziskav usmeriti tudi v razvoj alternativnih metod, kot so naravni sovražniki škodljivcev, tehnika sterilnih insektov, škropljenje z naravnimi snovmi itd. Novi načini nadzora so zanimivi, vendar jih je treba še izpopolniti in bolje preučiti.

Knap in Bandelj (2016) na primer predlagata zanimivo rešitev za zmanjšanje populacije oljne muhe s časovno usklajenim prvim škropljenjem z zastrupljenimi vabami proti oljni muhi vseh pridelovalcev oljk iz obalnih lokacij in zaledja Slovenske Istre, in sicer v 48 urah po povečanemu ulovu muhe. Tako bi ustavili migracijo muh, zmanjšali številčnost prve generacije oljne muhe in vplivali tudi na drugo in tretjo generacijo. Najverjetneje bi s to metodo ustavili tudi širjenje odpornostnih mutacij. Vsekakor bi bilo treba to metodo še dodatno proučiti in jo preveriti v praksi, saj bi bilo treba vse pridelovalce oljk prepričati, da bi izvedli prvo škropljenje oljk proti oljni muhi istočasno, in jih o tem tudi opozoriti, ko se pojavi povečani ulov na feromonskih vabah. To bi bilo predvsem koristno, če bi na ta način uspeli zmanjšati število škropljenj in s tem omejili negativni vpliv na naravo. Obveščanje o ulovu muh in o varstvu že poteka na KGZ Nova Gorica. Predvsem tisti pridelovalci, ki jih to zanima, lahko informacije o tem najdejo na njihovi spletni strani.

Pomembno je še naprej spremljati razvoj odpornosti proti insekticidom, saj smo pokazali, da lahko z molekularnimi metodami spremljamo prisotnost odpornostnih alelov. Ključno pa je predvsem, da se mutacija $\Delta 3Q$ ugotovi, ko je še na nizki ravni, in se spremlja njena rast

in geografska razširjenost, saj se takrat lahko izvedejo ustrezni ukrepi varstva, da se zaustavi njena rast. Detekcija mutacij I214V in G488S pomeni, da je odpornost proti insekticidom na nižji ravni, medtem ko odkritje mutacije $\Delta 3Q$ nakazuje na višjo raven rezistence proti insekticidom, nadaljnje povečevanje frekvence odpornostnega alela pa bi lahko privedlo do potrebe po novem insekticidu za varstvo pred oljčno muho. Poleg preučevanja rezistence je treba tudi izboljšati različne tehnike oz. načine varstva in jih podrobneje preučiti, da bomo pri varstvu proti oljčni muhi učinkoviti in bomo lahko pridelali kakovostno oljčno olje.

6 LITERATURA

Ant T., Koukidou M., Rempoulakis P., Gong H. F., Economopoulos A., Vontas J., Alphey L. 2012. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biology* 10: 51.

Augustinos A., Mamuris Z., Stratikopoulos 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.

Baxter G. D., Baker S. C. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 581–589.

Bocquené G., Galgani F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* 22: 12.

Bučar Miklavčič M., Butinar B., Jančar M., Sotlar M., Vesel V. 1997. Oljka in oljčno olje. Ljubljana, Kmečki glas.

Daane K. M., Johnson M. W. 2010. Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annual review of entomology* 55(1): 151–169.

Doğaç E., Kandemir İ., Taşkın V. 2015. Geographical distribution and frequencies of organophosphate-resistant Ace alleles and morphometric variations in olive fruit fly populations. *Pest Management Science* 71(11): 1529–1539.

Encyclopedia Britannica. 2019. <https://www.britannica.com/technology/insecticide> (datum dostopa: 7. 6. 2020).

E-učbenik Kemija 1. <https://eucbeniki.sio.si/kemija1/480/index4.html> (datum dostopa: 19. 6. 2020).

Fournier D. 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-Biological Interactions* 157-158: 257–261.

GOV.SI. 2019. <https://www.gov.si/teme/oljkarstvo/> (datum dostopa: 4. 5. 2020).

Hanife G. 2016. Screening of Organophosphate Resistance in the Acetylcholinesterase Gene of Field Collected Olive Fruit Fly, *Bactrocera Oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae). *Romanian Biotechnological Letters* 21(1): 11209–11216.

Hawkes N. J., Janes R. W., Hemingway J., Vontas J. 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry Physiology* 81: 154–163.

Hsu J. C., Haymer D. S., Wu W. J., Feng H. T. 2006. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 396–402.

Jančar M., Devetak M., KGZ Nova Gorica. 2018. <https://www.ivr.si/wp-content/uploads/2018/01/Oljčna-muha.pdf> (datum dostopa: 2. 6. 2020).

Kakani E. G., Ioannides I. M., Margaritopoulos J. T., Seraphides N. A., Skouras P. J., Tsitsipis J. A., Mathiopoulos K. D. 2008. A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 781–787.

Kakani E. G., Zygouridis N. E., Tsoumani K. T., Seraphides N., Zalom F. G., Mathiopoulos K. D. 2010. Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Management Science* 66(4): 447–453.

Kakani E. G., Sagri E., Omirou M., Ioannides I. M., Mathiopoulos K. D. 2013. Detection and geographical distribution of the organophosphate resistance-associated $\Delta 3Q$ *ace* mutation in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi). *Pest Management Science* 70: 743–750.

Katsoyannos P. 1992. Olive pests and their control in the Near East. FAO plant production and protection paper.

KGZS – Kmetijsko-gozdarski zavod Nova Gorica. 2011a. Ekološko varstvo pred oljčno muho. http://www.zoob-oljke.si/images/stories/MUHA_SLO_2.pdf (datum dostopa: 6. 1. 2015).

KGZS – Kmetijsko-gozdarski zavod Nova Gorica. 2011b. Koristne rastline in živali v oljčnikih. http://www.zoob-oljke.si/images/stories/koristne_rast._SLO_2.kor.pdf (datum dostopa: 10. 1. 2015).

KGZS – Kmetijsko-gozdarski zavod Nova Gorica. 2012. Trajnostni razvoj oljkarstva z zmanjšano porabo fitofarmacevtskih sredstev in hranil. Projekt ZOOB – Zmanjšanje onesnaževanja in ohranjanje biotske pestrosti v kmetijstvu s poudarkom na oljkarstvu.

KGZS – Kmetijsko-gozdarski zavod Nova Gorica. 2019. Varstvo oljk. https://www.kmetijskizavod-ng.si/novice/2019100314215161/varstvo_oljk (datum dostopa: 18. 10. 2019).

KGZS – Kmetijsko-gozdarski zavod Nova Gorica. Varstvo oljk za 8. 9. 2020. https://kmetijskizavod-ng.si/novice/2020090814570652/varstvo_oljk (datum dostopa: 10. 9. 2020).

Klančar U., Podgornik M., Vuk I., Arbeiter A., Hladnik M., Jančar M., Bandelj D. 2012. Populacija oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) v Slovenski Istri v obdobju 2010–2011. V: Bandelj D. (ur.), Podgornik M. (ur.), Arbeiter A. (ur.). Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu: zbornik znanstvenih prispevkov z mednarodnega posveta. Koper: Univerza na Primorskem, Znanstveno raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales: 47–54.

Knap T. 2014. Analiza populacijske strukture oljčne muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin) v Slovenski Istri z mikrosateliti. Magistrsko delo, Univerza na Primorskem.

Knap T., Bandelj D. 2016. Microsatellite analysis revealed a different approach of control of olive fly population (*Bactrocera oleae*) in Slovenia. *Journal of Applied Entomology* 1–10.

Kump B., Svetek S., Javornik B. 1992. Izolacija visokomolekularne DNK iz rastlinskih tkiv. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo* 59: 63–66.

Lantero E., Matallanas B., Pascual S., Ochando M. D., Callejas C. 2020. Phylogeography of Organophosphate Resistant *ace* Alleles in Spanish Olive Fruit Fly Populations: A Mediterranean Perspective in the Global Change Context. *Insects* 11(396): 1–12.

Magana C., Hernandez-Crespo P., Ortego F., Castanera P. 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. *J. Econ. Entomol.* 100(6): 1836–1843.

MKGP. 2019. Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja. Leto 2019. http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/integrirana_pridelava/tehnoloska_navodila/ (datum dostopa: 25. 7. 2019).

MKGP 2020. Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja. Leto 2020. <https://www.gov.si teme/integrirana-pridelava/> (datum dostopa: 3. 6. 2020).

Mraicha F., Ksantini M., Zouch O., Ayadi M., Sayadi S., Bouaziz M. 2010. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food and Chemical Toxicology* 48: 3235–3241.

Mutero A., Pralavorio M., Bride J. M., Fournier D. 1994. Resistance-associated point mutation in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5922–5926.

Nardi F., Carapelli A., Vontas J. G., Dallai R., Roderick G. K., Frati F. 2006. Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (*Bactrocera oleae*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36(7): 593–602.

Newcomb R. D., Campbell P. M., Russell R. J., Oakeshott J. G. 1997. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 15–25.

Novak M., Maček J. 1990. Tehnike nanašanja pesticidov: škropljenje, pršenje in drugi postopki. Ljubljana, Kmečki glas.

Pereira-Castro I., Van Asch B., Trindade Rei F., Teixeira da Costa L. 2015. *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) organophosphate resistance alleles in Iberia: Recent expansion and variable frequencies. *European Journal of Entomology* 112(1): 20–26.

Podgornik M., Bandelj Mavsar 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, 6.–7. marec 2007: 163–167.

Razinger J. 2019. Zdravju in okolju prijazne metode varstva rastlin. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin. https://www.ivr.si/wp-content/uploads/2018/12/Zdravju-in-okolju-prijazne-metode-varstva-rastlin_KONCNA.pdf (datum dostopa: 22. 8. 2020).

Roberts J. R., Reigart J. R. 2013. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. Sixth Edition. Organophosphates. EPA 5: 43–55.

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18(2): 233–234.

Skouras P. J., Margaritopoulos J. T., Seraphides N. A., Ioannis M. I., Kakani E. G., Mathiopoulos K. D., Tsitsipis J. A. 2007. Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Management Science* 63: 42–48.

Tomita T., Hidoh O., Yoshiaki K. 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 325–333.

Vesel V., Valenčič V., Jančar M., Čalija D., Butinar B., Bučar Miklavčič M. 2009. Oljka – živilo, zdravilo, lepotilo. Ljubljana, Kmečki glas.

Vesel V., Vrhovnik I., Jančar M., Bandelj D., Devetak M., Baruca Arbeiter A. 2020. Oljka. Ljubljana, Kmečki glas.

Vontas J. G., Cosmidis N., Loukas M., Tsakas S., Hejazi M. J., Ayoutanti A., Hemingway J. 2001. Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Pesticide Biochemistry Physiology 71: 124–132.

Vontas J. G., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis N., Loukas M., Hemingway J. 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Molecular Biology 11(4): 329–336.

Vossen P., Varela L., Devarenne A. 2004. Olive Fruit Fly. University of California Cooperative Extension.

Yousef M., Garrido-Jurado I., Ruíz-Torres M., Quesada-Moraga E. 2016. Reduction of adult olive fruit fly populations by targeting preimaginals in the soil with the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. Journal of Pest Science 90: 345–354.

Walsh S. B., Dolden T. A., Moores G. D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire A. L., Williamson M. S. 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. Biochem. J. 359: 175–181.

Weill M., Lutfalla G., Mogensen K., Chandre F., Berthomieu A., Berticat C., Pasteur N., Philips A., Fort P., Raymond M. 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. Nature 423: 136–137.

Weill M., Malcolm C., Chandre F., Mogensen K., Berthomieu A., Marquine M., Raymond M. 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Molecular Biology 13(1): 1–7.

PRILOGE

PRILOGA A *Seznam vzorcev oljčnih muh, vzorčenih v letu 2016, z navedbo datuma vzorčenja plodov in spola oljčne muhe.*

Oznaka vzorca	Datum vzorčenja		Spol (M – moški, Ž – ženski)
	plodov	Lokacija	
1-Krkavče-2016	5. 9. 2016	Krkavče	M
2-Krkavče-2016	28. 8. 2016	Krkavče	Ž
3-Krkavče-2016	12. 9. 2016	Krkavče	M
4-Krkavče-2016	10. 10. 2016	Krkavče	M
5-Krkavče-2016	12. 9. 2016	Krkavče	Ž
6-Krkavče-2016	12. 9. 2016	Krkavče	Ž
7-Krkavče-2016	12. 9. 2016	Krkavče	Ž
8-Krkavče-2016	12. 9. 2016	Krkavče	Ž
9-Krkavče-2016	12. 9. 2016	Krkavče	Ž
10-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
11-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
12-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
13-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
14-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
15-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
16-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
17-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
18-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
19-Krkavče-2016	19. 9. 2016	Krkavče	Ž
20-Krkavče-2016	26. 9. 2016	Krkavče	Ž
1-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	Ž
2-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	Ž
3-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	Ž
4-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	Ž
5-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	Ž
6-Strunjan-2016	29. 8. 2016	Strunjan	Ž
7-Strunjan-2016	29. 8. 2016	Strunjan	Ž
8-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	Ž
9-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	Ž
10-Strunjan-2016	12. 9. 2016	Strunjan	Ž
11-Strunjan-2016	19. 9. 2016	Strunjan	Ž
12-Strunjan-2016	19. 9. 2016	Strunjan	Ž
13-Strunjan-2016	19. 9. 2016	Strunjan	Ž
14-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	M
15-Strunjan-2016	22. 8. 2016	Strunjan	M
16-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	M
17-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	M
18-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	M
19-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	M
20-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	M
21-Strunjan-2016	5. 9. 2016	Strunjan	M
22-Strunjan-2016	19. 9. 2016	Strunjan	M

PRILOGA B *Rezultati genetske analize oljčnih muh iz leta 2016.*

Oznaka vzorca	G448S	I214V	Δ3Q
	A = odpornostni alel, G = občutljivi alel	G = odpornostni alel, A = občutljivi alel	103 = odpornostni alel, 112 = občutljivi alel
1-Krkavče-2016	A	G	112
2-Krkavče-2016	A	G	112
3-Krkavče-2016	A	G	112
4-Krkavče-2016	A	G	112
5-Krkavče-2016	A	G	112
6-Krkavče-2016	A	G	112
7-Krkavče-2016	A	G	112
8-Krkavče-2016	A	G	112
9-Krkavče-2016	A	G	112
10-Krkavče-2016	A	G	112
11-Krkavče-2016	A	G	112
12-Krkavče-2016	A	G	112
13-Krkavče-2016	A	G	112
14-Krkavče-2016	A/G	G	112
15-Krkavče-2016	A	G	112
16-Krkavče-2016	A	G	103/112
17-Krkavče-2016	A	G	112
18-Krkavče-2016	A	G	112
19-Krkavče-2016	A	G	112
20-Krkavče-2016	A	G	112
1-Strunjan-2016	A	G	112
2-Strunjan-2016	A	G	103/112
3-Strunjan-2016	A	G	112
4-Strunjan-2016	A	G	112
5-Strunjan-2016	A	G	112
6-Strunjan-2016	A	G	112
7-Strunjan-2016	A	G	112
8-Strunjan-2016	A	G	112
9-Strunjan-2016	A	G	112
10-Strunjan-2016	A	G	112
11-Strunjan-2016	A/G	G	103/112
12-Strunjan-2016	A	G	112
13-Strunjan-2016	A	G	112
14-Strunjan-2016	A	G	103/112
15-Strunjan-2016	A	G	112
16-Strunjan-2016	A	G	112
17-Strunjan-2016	A	G	103/112
18-Strunjan-2016	A	G	112
19-Strunjan-2016	A	G	112
20-Strunjan-2016	A	G	112
21-Strunjan-2016	A	G	112
22-Strunjan-2016	A	G	112

PRILOGA C Rezultati genetske analize oljčnih muh iz leta 2013.

Oznaka vzorca	G448S	I214V	Δ3Q
	A = odpornostni alel, G = občutljivi alel	G = odpornostni alel, A = občutljivi alel	103 = odpornostni alel, 112 = občutljivi alel
1-Strunjan-2013	A/G	A/G	112
2-Strunjan-2013	A	G	112
3-Strunjan-2013	A/G	A/G	112
4-Strunjan-2013	A	G	112
5-Strunjan-2013	A	G	112
6-Strunjan-2013	A	G	112
7-Strunjan-2013	A	G	112
8-Strunjan-2013	A	G	103/112
9-Strunjan-2013	A	G	112
10-Strunjan-2013	A	G	112
11-Strunjan-2013	A	G	112
12-Strunjan-2013	A	G	112
13-Strunjan-2013	A	G	112
14-Strunjan-2013	A	G	112
15-Strunjan-2013	A	G	112
16-Strunjan-2013	A/G	A/G	112
17-Strunjan-2013	A	G	112
18-Strunjan-2013	A	G	112
19-Strunjan-2013	A	G	112
20-Strunjan-2013	A/G	A/G	112
21-Strunjan-2013	A/G	A/G	112
22-Strunjan-2013	G	A	112
23-Strunjan-2013	A	G	112
24-Strunjan-2013	A	G	112