

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra genetiky a šlechtění**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Využití metody SSCP pro detekci genů rezistence u  
mandelinky bramborové**

**Bakalářská práce**

**Veronika Vindušková  
Rostlinolékařství**

**Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.**



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití metody SSCP pro detekci genů rezistence u mandelinky bramborové" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 1. 5. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za přátelský přístup, odbornou pomoc a cenné rady, které vedly k úspěšnému zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za poutavé uvedení do problematiky samotné metody SSCP a za podmětné rady, které vedly k získání výsledků.

# Využití metody SSCP pro detekci genů rezistence u mandelinky bramborové

## Souhrn

Předkládaná bakalářská práce se zabývá možností využití metody SSCP pro detekci rezistentních genů mandelinky bramborové, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Rezistence mandelinky bramborové vůči různým druhům účinných látek využívaných v insekticidech je již od poloviny minulého století stále aktuálním tématem. V první části práce byly shromážděny a popsány současně známé poznatky o způsobu života mandelinky bramborové a následně byly zpracovány informace o rezistenci ve spojitosti s geny *AChE* a *LdVssc1*. V souvislosti s tím byla vypracována experimentální část práce, která se zabývá přítomností rezistence k organofosfátům a pyrethroidům u výše zmíněných genů. Pro detekci rezistence byla využita metoda SSCP, jejíž funkčnost byla následně ověřena metodou sekvenování. Ze získaných výsledků nelze metodu SSCP pro detekci genů rezistence doporučit.

**Klíčová slova:** mandelinka bramborová, rezistence, SSCP, *AChE*, *LdVssc1*, sekvenování

# Using of SSCP method for detection of resistance genes of *Leptinotarsa decemlineata*

## Summary

This bachelor thesis deals with the possibility of using SSCP method for detection of resistance genes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). The resistance of the Colorado potato beetle to various types of active substances used in insecticides has been an issue since the middle of the last century. In the first part of this thesis was collected and described current knowledge about the way of life of the Colorado potato beetle and then the information about resistance in connection with the *AChE* and *LdVssc1* genes was processed. In connection with this, an experimental part of this thesis was developed which deals with the resistance to organophosphates and pyrethroids in the above-mentioned genes. The SSCP method was used to detect resistance and its veracity was verified by the sequencing method. From the obtained results, the SSCP method cannot be recommended for the detection of resistance genes.

**Keywords:** *Leptinotarsa decemlineata*, resistance, SSCP, *AChE*, *LdVssc1*, sequencing

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Mandelinka bramborová.....</b>	<b>11</b>
3.1.1 Původ a rozšíření .....	11
3.1.2 Životní cyklus .....	11
3.1.3 Ekologie .....	12
3.1.4 Hospodářský význam.....	13
3.1.5 Ochrana a antirezistentní strategie .....	13
3.1.5.1 Prevence .....	14
3.1.5.2 Monitoring a prognóza .....	14
3.1.5.3 Fyzikální metody ochrany .....	15
3.1.5.4 Biologické metody ochrany.....	15
3.1.5.5 Chemické metody ochrany .....	16
3.1.5.6 Šlechtění .....	17
<b>3.2 Rezistence.....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Příčiny vzniku .....	18
3.2.2 Účinné látky v pesticidech.....	19
3.2.2.1 Organofosfáty .....	21
3.2.2.2 Pyrethroidy .....	21
3.2.3 Geny rezistence.....	21
3.2.3.1 AChE .....	21
3.2.3.2 LdVssc1 .....	22
3.2.3.3 Metody detekce .....	22

<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>23</b>
4.1	Biologický materiál .....	23
4.2	Izolace DNA .....	23
4.3	Amplifikace.....	24
4.4	Gelová elektroforéza .....	24
4.5	SSCP .....	25
4.6	Sekvenace.....	26
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>27</b>
5.1	Vyhodnocení sekvenování .....	27
5.1.1	Rezistence v genu <i>AChE</i> .....	27
5.1.2	Rezistence v genu <i>LdVssc1</i> .....	28
5.1.3	Porovnání sekvenace pomocí kitu a sekvenace fosfatázovou metodou ...	29
5.2	Vyhodnocení SSCP .....	30
5.2.1	Rezistence v genu <i>AChE</i> .....	30
5.2.2	Rezistence v genu <i>LdVssc1</i> .....	31
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>32</b>
6.1	Vyhodnocení výsledků metod SSCP a sekvenování pro gen <i>AChE</i> .....	33
6.2	Vyhodnocení výsledků metod SSCP a sekvenování pro gen <i>LdVssc1</i> .....	34
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>36</b>



# 1 Úvod

Mandelinka bramborová, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), je jedním ze světově nejvýznamnějších škůdců lilku brambor, *Solanum tuberosum* (L.). Původem pochází z Ameriky, ale během 20. století zvládla plně zasáhnout i území Evropy a Asie, odkud se nadále intenzivně šíří (Weber 2003). Škodlivost mandelinky je úzce spojena s rostlinami z čeledi *Solanaceae*, mezi které patří i již zmíněné brambory (Database of Insects and their Food Plants 2021). Poškození je způsobováno larvami a dospělci, kteří požírají listy rostlin, což zabraňuje přirozenému růstu bramborových hlíz a způsobuje tak vysoké ztráty na výnosech (Weber & Ferro 1993).

Kontrola nad mandelinkou je však velmi náročná, a to kvůli její schopnosti přizpůsobit se nepříznivým podmínkám. Drtivá většina historických i současných ochranných strategií spoléhala na insekticidy (Grafius & Douches 2008), a přestože insekticidní opatření nejprve vedly k výraznému snížení členů populace, nepřímo tak docházelo i k rozvoji rezistence vůči účinným látkám (Grafius 1997). Vysoký selekční tlak tak spolu s přirozeným sklonem k adaptaci způsobil, že si mandelinka od poloviny minulého století vytvořila rezistenci vůči 56 různým sloučeninám využívaných v registrovaných insekticidech (Arthropod Pesticide Resistance Database 2021).

Neuvážené zvyšování dávek insekticidů však poskytuje pouze krátkodobou úlevu a vede jen a pouze k rychlejšímu vývoji rezistence (Wustman & Carnegie 2000). Jediným udržitelným způsobem ochrany brambor je integrace více vědecky podložených kontrolních technik do pěstebních postupů. Překonání těchto překážek není snadný úkol, ale jde o jedinou možnou alternativu, jak zabránit opakovaným ztrátám sklizně a vytvořit tak dlouhodobě udržitelnou produkci brambor (Alyokhin 2009).

## 2 Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo shromáždit a prostudovat současné známé poznatky o rezistenci mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*, Say) k různým účinným látkám používaných v insekticidech a zhodnotit možnost využití metody SSCP pro detekci genů rezistence. Dílčím cílem práce bylo detekovat rezistentní a senzitivní genotypy genů *AChE* a *LdVssc1* pomocí metody SSCP, jejíž výsledky byly následně porovnány s osekvenovanými PCR produkty vybraných genotypů s cílem zhodnocení funkčnosti metody SSCP.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mandelinka bramborová

Mandelinka bramborová, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), je obecně považována za nejvýznamnějšího škůdce lilku brambor, *Solanum tuberosum* (L.). Jedná se o vzhledově nezaměnitelného brouka z čeledi mandelinkovitých, *Chrysomelidae* (Database of Insects and their Food Plants 2021), jehož celkový plošný rozsah se odhaduje přibližně na 16 milionů km<sup>2</sup> v oblasti zahrnující Severní Ameriku, Evropu i Asii (Weber 2003).

#### 3.1.1 Původ a rozšíření

Udává se, že mandelinka bramborová původně pochází z jihozápadu USA a Mexika. Poprvé byla popsána v roce 1824 Thomasem Nattalem (Alyokhin et al. 2008), avšak déle jak čtyřicet let po svém objevu neměla téměř žádný význam. Situace se ale začala dramaticky měnit se zvyšujícím se množstvím pěstovaných brambor, které se ukázaly být pro mandelinku perfektní hostitelskou rostlinou (Weber 2003).

Informace o prvním velkém ohnisku byly zaregistrovány v roce 1859 v Omaze (USA), odkud se mandelinka zvládla bleskově rozšířit a způsobit tak rozsáhlé škody i ve 100 mil vzdálených oblastech (Alyokhin et al. 2008). Nic jí tak nebránilo v expanzi po celé Americe (Casagrande 1987).

První evropská populace se objevila ve Francii roku 1922, odkud se do konce 20. století zvládla rozšířit a způsobit značné problémy nejen v Evropě, ale i v Asii (Weber 2003).

Na území současné České republiky se mandelinka, následně přezdívaná jako americký brouk, poprvé objevila roku 1950. I u nás mandelinka neměla žádné přirozené nepřátele, a tak jí opět nic nebránilo v rychlém rozšíření. Toho posléze využila komunistická propaganda, která označila mandelinku za tajnou zbraň kapitalistů, namířenou proti komunismu za účelem rozvrátit zásobování obyvatelstva (Patočka 2015).

#### 3.1.2 Životní cyklus

Samotný cyklus začíná přezimováním dospělců v půdě, které je vyvoláno fotoperiodou krátkého dne (De Kort 1990). Místem přezimování jsou buď okolní pole nebo přímo ta pole, kde mandelinky strávily léto (Weber & Ferro 1993). Diapauza trvá nejčastěji tři měsíce a během ní brouci nereagují na jakoukoli změnu podmínek prostředí (De Kort 1990).

S rostoucí jarní teplotou dospělci začínají vylézat na povrch s cílem získání potravy a rozmnožení se. Dospělci jsou schopni chůze hned poté, co dokončí proměnu dokonalou. To však ale neplatí pro létání, protože k dokončení vývoje letových svalů dochází 5 až 10 dní po vykuklení. Po uplynutí této doby už jsou dospělci schopni pomocí letu a chůze zdolávat i několik kilometrů dlouhé vzdálenosti (Voss & Ferro 1990). Rychlost šíření se však může lišit na základě několika různých faktorů jako je například hustota vegetace, teplota vzduchu, intenzita slunečního záření nebo povětrností podmínky (Caprio & Grafius 1990). Po usídlení dochází k rozmnožení (Alyokhin et al. 2008). Mandelinka je polygammním druhem, takže páření mezi více partnery je pro ni zcela přirozené (Alyokhin et al. 2013) a je zaměřeno především na maximalizaci genetické variability jejích potomků. Ve vyhovujících podmínkách jsou mandelinky během jednoho vegetačního období schopné vytvořit až tři generace (Walgenbach & Wyman 1984).

Po 5 až 10 dnech po oplození samice kladou vajíčka ve snůškách na spodní strany listů. Jedna taková snůška se skládá z 20 až 60 vajíček nepřehlédnutelné oranžovo-žluté barvy (Hare 1990). Za celý svůj život je samice schopná naklásat až 800 vajíček (Walgenbach & Wyman 1984). Obecně se udává, že vývoj mandelinky od vajíčka po dospělého trvá v závislosti na teplotě 14 až 56 dní (De Wilde 1948). K nejrychlejšímu vývoji dochází mezi 25 - 32 °C, ale ukazuje se, že se tyto hodnoty mohou lišit mezi různými populacemi různého geografického původu (May 1981).

Larvy se z vajíček začínají líhnout nejčastěji po 4 až 12 dnech (Tauber et al. 1988). Na rozdíl od vajíček jsou larvy schopné přijímat potravu a již v tomto stádiu mohou vytvářet značná poškození (Ferro et al. 1985). Plně vyvinuté larvy následně přestanou přijímat potravu a zakuklí se v půdě (Hare 1990).

Dospělci nejčastěji vylézají na povrch po 5 až 7 dnech (Tauber et al. 1988) v závislosti na teplotě, fotoperiodě a stavu hostitelské rostliny (Voss & Ferro 1990). Ihned po vykuklení jsou schopné páření a migrace, která je ovlivněna především čichovými a vizuálními podněty jako je velikost a celkový vzhled rostliny (Fernandez & Hilker 2007). K identifikaci hostitelské rostliny pomocí čichu dochází díky chemickým sloučeninám produkovaných druhů *Solanum* (Dickens 2000). Právě to je důvodem proč rostliny s poškozenými listy, které tak uvolňují více těchto látek do okolí, mohou zvýšit přitažlivost mandelinek (Bolter et al. 1997).

### 3.1.3 Ekologie

Mandelinka bramborová má relativně úzký hostitelský rozsah, protože parazituje pouze na rostlinách čeledi *Solanaceae*, kam patří různé druhy lilků a rajčat (Database of Insects and

their Food Plants 2021). V rámci Evropské unie existuje přibližně 20 druhů rostlin, které je mandelinka schopna napadnout, avšak nejvhodnější a nejčastěji napadaným hostitelem je lilek brambor (Kennedy 2009). Jeden dospělý brouk je schopen zkonzumovat přibližně 10 cm<sup>2</sup> plochy listů denně, ale v porovnání s jeho larvami, které dokážou spořádat až 40 cm<sup>2</sup> listové plochy, jde o výrazně nižší množství (Logan et al. 1985). Poškození způsobené konzumací lilku brambor se jeví jako různě velké otvory na listových plochách, které může vyústit až ve vznik holožíru (Weber & Ferro 1993).

Stravovací návyky mandelinek nezávisí pouze na mandelinkách, ale mohou být také ovlivňovány stimulanty, které jsou uvolňovány z bramborových listů. Mezi takové látky patří například steroly, konkrétně tedy cholesterol,  $\beta$ -sitosterol a stigmasterol, které mají stimulační účinky na larvy mandelinek (Szafranek et al. 2008).

#### **3.1.4 Hospodářský význam**

Přítomnost škůdců v agrosystémech má vliv jak na kvantitu, tak na kvalitu výnosů zemědělských plodin. V případě mandelinky bramborové je poškození způsobováno jak dospělci, tak larvami (Ferro et al. 1985). Jejich destruktivní stravovací návyky způsobují odlistění neboli defoliaci lilku brambor (Radcliffe & Lagnaoui 2007), což výrazně snižuje celkovou produkci hlíz (Kennedy 2009). Uvádí se, že bez použití insekticidů může mandelinka snížit výnos až o 40-80 % (Skryabin 2010). Ztráta více jak 75 % listů vede ve většině případů k celkovému zániku rostliny (Hare 1980). To je důvodem proč se mandelinka v kombinaci se schopností vytvářet rezistenci vůči insekticidům stala jedním z nejnáročnějších škůdců.

Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů pokládá brambory za čtvrtou nejvyužívanější potravinářskou plodinu, hned po pšenici, rýži a kukuřici. Udává se, že v celosvětovém měřítku jsou brambory ročně vysazovány přibližně na 20 milionech hektarů s průměrným výnosem 17 tun bramborových hlíz na hektar (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2021). Konkrétně v České republice byly v roce 2019 brambory vysázeny na 22,9 tisících hektarech, z nichž bylo sklizeno 604 tisíc tun brambor (Žižka 2020).

#### **3.1.5 Ochrana a antirezistentní strategie**

Rychlý a vůči stresům snadno přizpůsobivý životní cyklus učinil kontrolu nad mandelinkou nelehkým úkolem. Současné strategické postupy s cílem dosáhnout snížení insekticidního tlaku na populace škůdců spočívají především v prevenci a v důsledné biologické a chemické ochraně (Maharijaya & Vosman 2015). Rezistence hostitelské

rostliny by mohla být potenciálně dalším vhodným nástrojem, který by mohl snížit množství aplikovaných insekticidů. Bohužel i přes dlouhou dobu šlechtitelského snažení, v současné době neexistuje žádný běžně využívaný kultivar lilku brambor, který by byl vůči mandelince odolný (James 2011).

#### *3.1.5.1 Prevence*

Jedním z hlavních pilířů preventivních opatření proti mandelince bramborové je volba vyhovujícího osevního postupu (Alyokhin 2009). Populaci mandelinky lze relativně snadno snížit již využitím správné rotace pěstovaných plodin. Těto znalosti bylo využíváno již v 19. století (Bethune 1872) a zůstává tak nejjednodušší a zároveň jednou z nejdůležitějších kontrolních strategií. Pouhou změnou plodiny v jednom vegetačním období za jinou v období dalším, klesá následné množství vajíček mandelinky až o 10 % v porovnání s poli s plodinou nezměněnou (Lashomb & Ng 1984). Problémem však zůstává vysoká pohyblivost brouků. Proto je zároveň nutné brát ohled na vzdálenost mezi takto rotujícími poli, aby došlo k maximální efektivitě této metody (Weisz et al. 1994).

Dalším ze zásadních principů osevních postupů je vhodná volba předplodiny. Uvádí se, že díky správnému osevnímu plánu, kde jsou brambory řazeny po obilovinách, které jsou pro mandelinky nehostinné, se sníží hustota jejich dospělců až o 95,8 % (Wright 1984).

Mezi důležité aspekty patří také včasná výsadba, protože pouhé zvolení vhodné doby výsadby brambor může pomoci potlačit populaci larev druhé generace. A to proto, že letní generace dospělců se objeví až později v sezóně v době, kdy už jsou nadzemní části rostlin značně narostlé. Kromě toho fotoperioda krátkého dne stimuluje diapauzu, což do značné míry eliminuje dopad mandelinek na plodinu (Weber & Ferro 1994).

#### *3.1.5.2 Monitoring a prognóza*

Intenzita napadení je detekována za pomoci přesného monitoringu. Výskyt se zkoumá z počtu dospělců a ohnisek larev na 1 ha (Hausvater & Doležal 2014). Hustota napadení závisí na několika podmínkách jako je průměrná koncentrace ploch a frekvence zařazení brambor do osevního postupu, průměrná teplota v dané oblasti, či podmínky při přezimování (Alyokhin 2009). Ideálním stanovištěm s vysokou pravděpodobností úspěšnosti přezimování jsou pro mandelinku lehké písčité půdy. Naopak půdy těžké obsahující velké množství humusu se ukázaly být pro mandelinku zcela nevhodné. Pokud jde o teplotu, jsou pro přezimování vhodnější chladnější zimy se stálým a málo proměnlivým počasím, které je tak chrání před napadením různých bakterií a plísní (Hausvater & Doležal 2014).

Prognóza se následně provádí podle výsledného počtu mandelínek vyskytujících se v porostu během jarního období. Za práh škodlivosti se považuje výskyt buď 100 dospělých brouků, 14 ohnisek larev nebo 5000 larev na 1 ha (ÚKZÚS Rostlinolékařský portál 2021).

#### 3.1.5.3 Fyzikální metody ochrany

Na pěstebních plochách menší velikosti je možné využít metodu sběru brouků a jejich likvidaci. Důležité je se zaměřit nejprve na brouky jarní obzvláště během měsíců května a června, jejichž sběrem zamezíme naklazení dalších vajíček. Později je pak vhodné likvidovat i vajíčka a larvy. Tato metoda často nachází využití v porostech brambor v systému ekologického zemědělství (Dvořák & Bicanová 2007). Speciálně pro tyto potřeby byly dokonce vyvinuty stroje, které jsou schopné odsát dospělé a larvy mandelínek z napadených rostlin. Tento pokus o mechanizaci je však velmi energeticky náročný a ve většině případů nenašel své uplatnění (Hausvater & Doležal 2014).

#### 3.1.5.4 Biologické metody ochrany

Mandelinka bramborová má relativně málo přirozených nepřátel, které lze potencionálně využít v biologické kontrole (Alvarez et al. 2013). Existuje však několik druhů členovců, kteří potenciál v boji proti mandelinkám mají. Takovým druhem jsou například dravé ploštice *Perillus bioculatus*, které se živí larvami mandelínek, čímž dokážou snížit hustotu jejich populace až o 62 % (Biever & Chauvin 1992). Dalším takovým příkladem jsou samice brouka *Coleomegilla maculata*, které se živí vajíčky a mladými larvami (Grodén et al. 1990). Celková úmrtnost vajíček může dosáhnout u první generace na 37,8 % a u generace druhé až na 58,1 % (Hazzard et al. 1991). Podobně jako *Coleomegilla* se vajíčky a larvami živí i někteří střevlíci, konkrétně například *Lebia grandis* (Weber et al. 2006). Mezi o něco efektivnější a častěji využívaný hmyz patří parazitické vosy *Edovum puttleri*, které jsou schopné usmrtit 67 až 79 % vajíček jedné populace (Lashomb et al. 1987).

Členovci však nejsou jedinými parazity mandelínek. Řadí se mezi ně například i některé entomopatogenní houby. Konkrétním příkladem je *Beauveria bassiana*, která se dá aplikovat na porost běžnými postřikovači. Jde o způsob ochrany, který je využíván především v ekologickém zemědělství. Udává se, že snižuje populaci brouků až o 75 %, ale ve srovnání s běžnými insekticidy jde opět o relativně nízký účinek (Cantwell et al. 1986).

Ačkoli se využití biologické ochrany jeví jako správná volba a je často považována za nejvíce ekologický způsob ochrany (Alvarez et al. 2013), obvykle tyto organismy nejsou schopné snížit hustotu mandelínek pod ekonomicky škodlivou úroveň, a proto je nutné těchto

metod využívat v kombinaci s jinými ochrannými opatřeními. A ani rozšíření takového množství nepřátelských populací, aby došlo k potlačení mandelinky, není praktické z důvodu vysokých nákladů na chov a manipulaci (Ferro 1994).

#### 3.1.5.5 Chemické metody ochrany

Chemikálie se využívají v boji proti mandelince bramborové již od roku 1864 (Gauthier et al. 1981) a jejich využití pokračuje i nadále. Do jisté míry je tak mandelinka zodpovědná za vývoj moderního průmyslu s insekticidy. Prvním zásadním průlomem byl insekticid s účinnou látkou známou pod názvem Pařížská zeleň. Tato sloučenina na bázi arsenu a mědi byla proti mandelince vysoce účinná, a tak byla velmi kladně přijata komerčními pěstiteli a v průběhu let byla doplněna dalšími chemikáliemi spoléhající na stejnou účinnou látku (Brown 1951). Nevalně známé DDT bylo proti mandelince testováno poprvé roku 1939 a díky své vysoké účinnosti se stalo nejvyužívanějším insekticidem 40. let minulého století (Hitchner 1952). DDT bylo rychle následováno organofosfáty, karbamáty a dalšími organickými insekticidy (Casagrande 1987).

U mandelinek byla však velmi brzy pozorována pozoruhodná adaptibilita na širokou škálu využívaných insekticidů. Prvním případem odolnosti škůdce vůči syntetickým insekticidům, konkrétně DDT, byl nahlášen roku 1952 (Quinton 1955) a v průběhu let si mandelinka vytvářela rezistenci vůči většině insekticidů. Je ale nutné zmínit, že ne každá populace je rezistentní vůči všem druhům sloučenin, u nichž byla rezistence zaznamenána. Mechanismy rezistence mohou být zcela odlišné i na poměrně malém území (Ioannidis et al. 1991).

V současné době zůstává chemický způsob ochrany brambor standardem ve velkých komerčních podnicích a i přes všechny své nevýhody je využití těchto insekticidů stále velmi účinnou a spolehlivou metodou. V České republice je v současné době registrováno přes 40 přípravků proti mandelince bramborové (Registr přípravků na ochranu rostlin 2021). K samotné aplikaci insekticidů je nutné přistoupit ve vhodnou dobu, a to tehdy, kdy výskyt mandelinky dosáhne prahu škodlivosti. Pro nejjistější výsledek je nutné provádět ošetření už na larvách, protože už pouhá aplikace v nevhodném životní stádiu zvyšuje procento vzniku rezistence (Hausvater & Doležal 2014).

Mimo pravidel správné aplikace insekticidů a dodržování ochranných lhůt přípravků, je nutné brát ohled na antirezistentní strategie, protože mandelinka je schopná velmi rychle adaptace na změny v prostředí, v tomto případě na prostředí ošetřené pesticidem. Na území České republiky byla doposud prokázána rezistence mandelinky bramborové k pyrethroidům,



organofosfátům a proti acetaprimidu ze skupiny neonikotinoidů (Zichová et al. 2010). Hlavní myšlenkou, jak předejít vzniku rezistence je střídání různých účinných látek z různých skupin insekticidů, tj. s různým mechanismem účinku (Hausvater & Doležal 2014). V současné době jde o nejvíce doporučovanou techniku, jak snížit pravděpodobnost vzniku rezistence (Alyokhin et al. 2008).

### 3.1.5.6 Šlechtění

Vzhledem ke stále častějšímu vzniku rezistence je nutný nepřetržitý vývoj nových způsobů ochrany rostlin. Jedním takovým možným řešením je využití geneticky modifikovaných organismů. V současné době mají takové rostliny ve světě hojné zastoupení a jejich celková plocha byla v roce 2016 odhadnuta na 185 milionů hektarů (Abbas 2018). Konkrétním příkladem takto geneticky upravených rostlin je například kukuřice, která ve svém genomu nese část genetické výbavy bakterie *Bacillus thuringiensis*. Takto modifikovaná kukuřice je schopná produkovat Bt toxin, který umí hubit housenky nejčastějšího škůdce kukuřice, zavíječe kukuřičného (Hellmich et al. 2008). Obdobně geneticky modifikované kultivary různých plodin jsou zemědělci široce využívány jako další alternativa k chemické ochraně proti ekonomicky důležitým hmyzím škůdcům (James 2011).

A ani geneticky modifikovaný lilek brambor není výjimkou z důvodu vysoké poptávky po omezení pesticidů (Dik et al. 2000). Avšak vyšlechtit takové kultivary je značně časově náročné a uvedení nových odrůd na trh může trvat 8 až 15 let (Balaško et al. 2020). Stejně jako u kukuřice, tak i u brambor dochází k experimentům s již zmíněnou bakterií *Bacillus thuringiensis*. Ukázalo se, že tato bakterie mimo jiné produkuje protein Cry3A, který vykazuje insekticidní vlastnosti vůči mandelince (Perlak et al. 1993). Velkou výhodou Bt insekticidů je fakt, že obecně nejsou škodlivé pro člověka či divokou zvěř. Dalo by se říct, že postřiky obohacené o Cry3A protein jsou jedinečnou alternativou v boji proti hmyzím škůdcům. Ale po dalším zkoumání se ukázalo, že toxiny obsažené v takto upravených postřících jsou velmi citlivé na světlo a k jejich rozkladu dochází mnohem rychleji než u běžných chemických insekticidů (Whalon & Wingerd 2003). Kromě toho už jen samotné použití těchto postřiků opět vyvolává obavy z potencionálního vývoje rezistence vůči samotné *Bacillus thuringiensis* (Sexson & Wyman 2005). Kromě postřiků se experimentovalo s využitím Cry3A proteinů i přímo v souvislosti s transgenními bramborami. První takto geneticky modifikované odrůdy brambor, které by odolávaly napadení a poškození hmyzu, byly představeny v roce 1995 (Thomas et al. 1997) a výsledky ukázaly, že poškození hmyzem byla významně snížena jak v laboratorních podmínkách, tak na polích. Další testování prokázalo, že tyto geneticky

modifikované odrůdy jsou schopné dosahovat úplně stejné jakosti jako nemodifikované brambory. Po tak úspěšných experimentech byla tato odrůda v USA komerčně využívána až do roku 2001 a během této doby byla mandelinka zcela pod kontrolou (Grafius & Douches 2008). Na trhu ale moc dlouho nevydržela zejména kvůli odmítání geneticky modifikovaných plodin společnostmi a komplikacím spojených s výsadbou těchto plodin. V současné době existuje pouze jediná komerčně pěstovaná geneticky modifikovaná odrůda brambor, a to odrůda Amflora. Schválená je však pouze pro průmyslové použití a jako krmivo pro zvířata (James 2011).

Vývoj takových plodin není vůbec jednoduchým procesem a v zemích Evropské unie obzvláště ne. Na rozdíl od zbytku světa zůstávají geneticky modifikované plodiny v EU stále velmi kontroverzním tématem. Politika v oblasti geneticky modifikovaných organismů je velice přísná a z velké části znemožňuje schválení takto modifikovaných plodin. Je však umožněno jejich pěstování či prodej ke spotřebitelským účelům, ale až poté, co bylo jejich užívání prověřeno komplexními schvalovacími postupy (Faculty of Humanities University of Copenhagen 2021).

## **3.2 Rezistence**

Od poloviny minulého století si mandelinka bramborová vytvořila rezistenci na sloučeniny patřící do všech hlavních tříd insekticidů. Úroveň rezistence se výrazně liší mezi různými vývojovými stadii a obecně také v závislosti na konkrétní populaci, často však bývá rezistence různorodá i v relativně úzké zeměpisné lokaci. Charakteristickou vlastností rezistentních brouků je schopnost přežít aplikaci jinak smrtelné dávky vybraného insekticidu (Alyokhin et al. 2008).

### **3.2.1 Příčiny vzniku**

Predispozice pro tvorbu rezistence je pravděpodobně zapříčiněná několika různými faktory. Nejvýznamnějším z nich je především vysoká plodnost mandelinek, která zvyšuje pravděpodobnost vzniku náhodných mutací a předurčuje tak rychlý vznik rezistentních jedinců (Bishop & Grafius 1991).

Dalším z faktorů je samotný výběr hostitelské rostliny. Rostliny z čeledi *Solanaceae* mají ve svých listech vysokou koncentraci toxických glykoalkaloidů, což by mohlo mít souvislost s tím, proč je mandelinky preferují pro svůj fyziologický vývoj a jsou pak schopné tolerovat většinu jedů (Ferro 1993).

Třetí faktor opět souvisí s úzkým hostitelským spektrem. V důsledku toho, že mají dospělci i larvy stejný zdroj potravy snižuje se tak pravděpodobnost, že se všichni jedinci vyhnou aplikaci pesticidů. Tudíž dochází k rovnoměrnému zasažení chemikáliemi všech členů dané populace (Bishop & Grafius 1991).

Začtvrté, s výjimkou střídání plodin, se pěstitelé v boji proti mandelince téměř výhradně spoléhají pouze chemickou ochranu. Neúmyslně tak způsobují zvýšení selekčního tlaku a nepřímo také vznik rezistence (Casagrande 1987).

### **3.2.2 Účinné látky v pesticidech**

Použití široké škály chemických látek v boji proti škůdcům je běžnou součástí zemědělské praxe. Regulace a kontrola nad nežádoucími organismy díky různým obsaženým účinným látkám, nepochybně vedla ke zvýšení výnosů plodin. Nicméně jejich nadměrné užívání se stalo terčem kritiky (Al-Saleh 1994).

Nadměrně užívání stále se opakujících účinných látek v jedné oblasti vede v dlouhodobém měřítku k přizpůsobení se organismů na daný pesticid (Alyokhin et al. 2008). V případě mandelinky bramborové v současné době pozorujeme odolnost vůči všem hlavním skupinám insekticidů, jako jsou organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy, nikotinoidy nebo například organochloridy (Arthropod Pesticide Resistance Database 2021), jejichž účinky se mandelince daří potlačit všemi možnými druhy rezistentních mechanismů (Kim et al. 2007). Časová osa let, kdy byla rezistence mandelinky bramborové evidována u konkrétních chemikálií je znázorněna v Tabulce 1.

Tabulka 1: Časová osa vývoje rezistence u mandelinky bramborové (Arthropod Pesticide Resistance Database 2021)

1955	DDT
1960	lindan
1965	aldrin, karbanyl, chlordan, dieldrin, endosulfan, endrin, parathion, toxafen
1974	azinphos-methyl, cartap, dioxacarb, kyanovodík, methidathion, quinalphos
1975	chlorfenvinphos, methamidophos, methoxychlor, phoxim, propoxur
1980	aldikarb, karbofuran, malathion, monocrotophos, oxamyl, permethrin, phosmet
1981	chloethocarb, fenvalerát, phorate, tetrachlorvinphos Z-izomer
1984	cypermethrin, deltamethrin
1989	parathion-methyl, trichlorfon
1992	esfenvalerát, rotenon
1993	<i>Bacillus thuringiensis var. tenebrionensis</i>
2003	karbosulfan, chlorpyrifos
2006	acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, N-desmethyl thiamethoxam, nitenpyram, spinosad, thiacloprid
2010	cyhalothrin, alfa-cypermethrin, phosalone
2012	bensultap
2015	pyrethrin

### 3.2.2.1 Organofosfáty

Účinné látky ze skupiny organofosfátů jsou neurotoxiny, které fungují na základě inhibice acetylcholinesterázy. Acetylcholinesteráza je klíčovým enzymem v nervovém systému (Hama 1983) a způsobuje degradaci neurotransmiteru acetylcholinu za vzniku cholinu a acetátu. Při inhibici účinků acetylcholinesterázy dochází k nadměrným vzruchům v nervech, k zastavení činnosti neurotransmiterů a následně ke smrti. Nicméně dlouhodobé kvalitativní a kvantitativní změny acetylcholinesterázy vedou ke vzniku účinného mechanismu rezistence vůči organofosfátům (Zabel et al. 2017). Mezi organofosfáty využívané k ochraně proti mandelince patří například účinná látka azinfos-methyl (Arthropod Pesticide Resistance Database 2021), který je od roku 2006 na území Evropské unie zakázán (Scott 2008).

### 3.2.2.2 Pyrethroidy

Pesticidy s účinnou látkou na bázi pyrethroidů byly a stále jsou hojně využívány ke kontrole široké škály škůdců. Mechanismus rezistence vůči pyrethroidům se nazývá knockdown (kdr) a je založen na snížené citlivosti nervového systému daného škůdce. Kdr způsobuje modifikaci sodíkových kanálů axonů nervových buněk, díky čemuž je organismus následně méně citlivý vůči toxickým účinkům pyrethroidů (Zichová et al. 2010). Mezi pyrethroidy, které se využívají proti mandelince patří například účinná látka známá pod názvem permethrin, která se k regulaci mandelinky používá už od 60. let minulého století (Migranov 1994).

## 3.2.3 Geny rezistence

Tato práce se detailně věnuje rezistenci vůči organofosfátům a pyrethroidům. V souvislosti s těmito látkami byly identifikovány geny rezistence, konkrétně geny *AChE* a *LdVssc1*.

### 3.2.3.1 *AChE*

Rezistence k organofosfátům je spojena s acetylcholinesterázou (*AChE*) (Argentine et al. 1994). Častá aplikace organofosfátů vede k mutaci, při které dochází ke změně adenosinu na guanin. Výsledkem je změna aminokyseliny serin na aminokyselinu glycin (S291G) na autozomálním *AChE* genu (Zhu et al. 1995). Výsledná mutace tak snižuje hladinu enzymu, který je za standardních podmínek citlivý vůči azinphos-methylu (Kim & Clark 2002).

### 3.2.3.2 *LdVssc1*

Rezistence vůči pyrethroidům je popisována jako mutace, která vede ke změně cytosinu na thymin. Z aminokyseliny leucin se tak stává phenylalanin (L1014F) (Clark et al. 2001). Právě tato mutace byla odpovědná za nervovou necitlivost mandelinky vystavené permethrinu (Lee et al. 1999). Gen zodpovědný za danou necitlivost je u mandelinky bramborové lokalizován na pohlavním chromozomu X (Hawthorne 2001).

### 3.2.3.3 *Metody detekce*

Vzhledem k tomu, že rezistence mandelinky bramborové vůči organofosfátům a pyrethroidům souvisí se záměnou jedné aminokyseliny za jinou, k odhalení těchto mutací na úrovni DNA lze využít tři metody. První z nich je PCR amplifikace známá pod názvem Bi-PASA, dále metoda jednovláknového konformačního polymorfismu (SSCP) a metoda sekvenování. Tyto metody jsou schopné odhalit a detekovat alely S191G a L1014F, které jsou odpovědné právě za rezistenci k již zmíněným účinným látkám.

Metoda Bi-PASA využívá dva, pro alely specifické, primery a zdá se být nejrychlejší a nejspolehlivější metodou, která je schopná detekce rezistentních i senzitivních homozygotů a heterozygotů (Clark et al. 2001). Obecně se tedy jedná o dvoustupňovou metodu, která obsahuje čtyři samostatné primery. Dva vnitřní primery jsou pro alely v místě mutace specifické a dva vnější primery jsou pro alely nespecifické. Pro správný průběh reakce je jedna alela amplifikována v jednom směru, zatímco druhá alela je amplifikována ve směru opačném, což má za následek různou délku výsledných pro alely specifických fragmentů (Williamson et al. 1996).

Metoda jednořetězcového konformačního polymorfismu známá pod zkratkou SSCP z anglického single stranded conformational polymorphism (Corstau & ffrench-Constant 1995) je na rozdíl od Bi-PASA méně závislá na kvalitě vzorků, je jednoduchá, finančně nenáročná a opět zvládá detekci jak homozygotů, tak heterozygotů (Zhang et al. 1999). Na druhou stranu je její velkou nevýhodou výrazně delší doba zpracování vzorků. Amplifikovaný úsek DNA je denaturován za vzniku jednovláknové DNA a nanesen na polyakrylamidový gel. Nachází-li se v daném templátu mutace, jednovláknová DNA zaujme odlišnou konformaci oproti původní sekvenci, což se projeví odlišnou pohyblivostí obou molekul DNA v gelu (Zhang et al. 1999). K vyhodnocení je nutná vizualizace obarvením fragmentů DNA například pomocí stříbra (Switzer et al. 1979) nebo ethidiumbromidu (Hongyo et al. 1993).

## 4 Metodika

Při zpracování této práce byly detekovány geny rezistence mandelinky bramborové pomocí metody SSCP, konkrétně šlo o geny *AChE* a *LdVssc1*. Identické vzorky byly následně osekvenovány s cílem porovnání výsledků obou metod.

### 4.1 Biologický materiál

Byli nasbíráni dospělci mandelinky bramborové na výzkumné stanici ve Valečově u Havlíčkova Brodu. Pro účel této práce bylo použito 20 dospělých jedinců s neznámou rezistencí k organofosfátům a pyrethroidům. DNA dospělců bylo využito pro obě metody, tedy pro SSCP i sekvenování.

### 4.2 Izolace DNA

Izolace dospělců mandelinky bramborové proběhla za použití CTAB pufru. Nejprve byly odebrány všem broukům 4 končetiny sterilizovanou pinzetou, které byly následně vloženy do zkumavky o objemu 1,5 ml. Poté bylo do zkumavky přidáno 400  $\mu$ l CTAB pufru a 2  $\mu$ l merkptoethanolu, načež se vzniklá směs homogenizovala skleněnou tyčinkou. Po přidání 2  $\mu$ l proteinázy K byly vzorky zvortexovány a inkubovány při 60 °C po dobu několika hodin, v tomto případě přes noc.

Druhý den byly ke každému vzorku přidány 4  $\mu$ l RNázy. Vše bylo důkladně zvortexováno a následně inkubováno po dobu 20 minut při 25 °C. Po inkubaci byla do každé zkumavky, ve sterilním prostředí laminárního boxu, přidáno 400  $\mu$ l směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Po zvortexování byly vzorky vloženy do centrifugy při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut, aby došlo ke správnému oddělení jednotlivých frakcí. Vzniklý supernatant čili tekutina nad sedimentem byl přendán do nové 1,5 ml zkumavky. Snahou bylo přesunout množství vzorku v minimálním rozmezí 300 - 350  $\mu$ l. Při přenosu bylo nutné nenabrat fenol, který se sedimentoval na dno zkumavky. Do nové zkumavky bylo opět přidáno po 400  $\mu$ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1. Vše bylo opět důkladně zvortexováno a centrifugováno po dobu 10 minut tentokrát při 12 000 otáčkách. Poté byla horní část vzorku přenesena do nové už finální 0,5 ml zkumavky s plochým víčkem. Přibližně šlo o 250  $\mu$ l z každého vzorku.

K výslednému vzorku byl přidán vychlazený izopropanol, konkrétně množství mezi 250 - 280  $\mu$ l. Jemným převrácením došlo k promíchání vzorků, dokud nedošlo k vytvoření sraženiny. Posléze byly vzorky inkubovány při -20 °C po dobu 1,5 hodiny. Po inkubaci byly

vzorky opět centrifugovány při 10 000 otáčkách po dobu 10 minut. Poté došlo k opětovnému oddělení supernatantu, ke kterému se přidalo 225  $\mu$ l 70 % etanolu a 25  $\mu$ l octanu sodného o pH 5,6. Následovala znovu centrifugace po dobu deseti minut a při 10 000 otáčkách za minutu. V tento moment byl již pelet DNA dobře viditelný a mohlo dojít ke slítí supernatantu. K DNA bylo přidáno 200  $\mu$ l 100 % etanolu, aby došlo k odstranění zbytkového octanu sodného. Vše bylo znovu vloženo na 10 minut do centrifugy při 10 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl následný etanol odsán pipetou a vzorky byly vysušené při teplotě kolem 45 °C v termobloku. Suchý pelet byl následně přes noc rozpuštěn v 40 až 50  $\mu$ l TE pufru, který se skládal z 1,0 mM EDTA a 10 mM tris o pH = 8.

### 4.3 Amplifikace

Byla provedena amplifikace 20 vzorků pomocí markerů pro *AChE* a *LdVssc1*. Složení výsledné PCR reakční směsi pro oba markery mělo celkový objem 12,5  $\mu$ l. Reakční směs obsahovala 1x reakční pufr (10x Taq Buffer s KCl, Fermentas, Litva), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP o koncentraci 0,2 mM, primery F (forward) a R (reverse) o koncentraci 0,4  $\mu$ M, 0,5 jednotky Taq polymerázy (Fermentas, Litva) a 5 ng DNA. Všechny analýzy pomocí PCR probíhaly v 0,2 ml sterilních polypropylénových zkumavkách v termocykleru T-gradient Thermocycler (Biometra, SRN).

Podmínky průběhu PCR reakcí byly následující. Nejprve proběhla první denaturace u obou markerů při teplotě 94 °C po dobu 180 sekund. Následovala druhá denaturace, annealing a elongace. Druhá denaturace opět probíhala při 94 °C, ale pouze po dobu 30 sekund. Annealing trval 30 sekund, pro *AChE* marker při teplotě 60 °C a pro *LdVssc1* marker při teplotě 66 °C. Následná elongace byla pro oba markery stejná, 72 °C po dobu 60 sekund. Tento proces, druhá denaturace, annealing a elongace, se opakoval 35x. Závěrečným krokem byla finální elongace při 72 °C po dobu 300 sekund. Finální elongace probíhala pro oba markery za stejných podmínek.

### 4.4 Gelová elektroforéza

Produkty PCR amplifikace byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Pro přípravu 1,5 % agarózního gelu byly naváženy 3 g agarózy. Poté bylo skleněným válcem odměřeno 200 ml TBE pufru, který byl přidán do baňky k agaróze. Pomalým kroužením byly obě látky promíchány. Následně byl vzniklý roztok zahříván v mikrovlnné troubě. Zahřívání bylo ukončeno poté, co obsah baňky začal probublávat. K rozehřátému gelu bylo přidáno 5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>



ethtidiumbromidu, obsah baňky byl znovu promíchán. Do připravené vany byl následně přelit gel. Do gelu byl vložen hřebínek pro tvorbu jamek na pipetování vzorků a případné bubliny vzduchu byly odstraněny pomocí pipetové špičky. Agarózový gel tuhl přibližně 30 minut.

Po ztuhnutí byl hřebínek vyndán z gelu ven a vana byla přemístěna do elektroforetické cely s TBE pufrům tak, aby byl celý gel ponořen. Následně bylo do jamek gelu nanášeno 5  $\mu$ l amplifikovaného vzorku, který byl pro potřeby vizualizace obarven bromfenolovou modří. Produkty PCR byly separovány po dobu 25 minut při napětí 5 V. Výsledky byly zdokumentovány systémem GelDoc<sup>TM</sup>XR (Bio-Rad, USA) a následně vyhodnoceny. Vhodné vzorky byly využity pro metodu SSCP.

## 4.5 SSCP

Pro uskutečnění metody bylo nutné připravit polyakrylamidový gel. Zásobním roztokem byl 40 % roztok akrylamidu a bisakrylamidu v poměru 37,5:1. Pro 100 ml pracovního roztoku bylo nutné smíchat 8 ml zásobního roztoku, 10 ml glycerolu, 5 ml 10x TBE pufru a zbytek dolít vodou. Výsledný roztok byl chlazen přes noc. K přípravě skel byl použit vytvořený polyakrylamidový gel, TEMED a persíran amonný. Skla byla sestavena dle návodu výrobce. Doba zrání gelu mezi skly mimo pufr byla alespoň 1 hodina.

Pro udržení stabilního prostředí elektroforézy bylo nutné připravit elektrodový pufr o objemu 6,5 l. Pro potřeby *LdVssc1* markeru bylo vhodné pufr před použitím zchladit na teplotu do 10 °C. Pro marker *AChE* byl vhodný pufr nechlazený. Elektroforéza probíhala při 30 V po dobu 3 hodin a 30 minut v přístroji Bio-Rad DCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection. Napětí i doba elektroforézy byla pro oba dva markery shodná.

Po uplynutí dané doby byl přístroj rozebrán a vzniklé vzorky byly obarveny stříbrem. K barvení bylo nutné připravit fixační a barvicí roztok a vývojku. Pro přípravu 1 l fixačního roztoku bylo použito 100 ml 96 – 99 % ethanolu a 5 ml ledové kyseliny octové. Zbytek do 1 l byl doplněn vodou. Barvicí roztok se skládal z 1 l vody a z 1,5 g dusičnanu stříbrného. K přípravě vývojky se využilo 15 g hydroxidu sodného a 1 l vody. Následoval proces barvení. Nejprve došlo k fixaci gelu ve fixačním roztoku po dobu 5 minut. Poté byl fixační roztok slit do prázdné nádoby, aby byl později znovu využit. Následovalo barvení gelu pomocí barvicího roztoku, ke kterému bylo těsně před barvením přidáno 1,5 ml formaldehydu. Po 7 minutách se slil barvicí roztok a gel byl opláchnut vodou. Následovalo ponoření gelu do vývojky, do které byl opět přidán formaldehyd, v tomto případě 3 ml. Finálním krokem byla znovu fixace fixačním roztokem, která trvala 3 – 5 minut.

Na závěr bylo nutné archivovat gel do nitrocelulozové folie zvláčené ve 100 ml 10 % glycerolu. K archivaci byla využita tabulka skla, na kterou byla rozprostřena fólie. Na fólii přišel výsledný gel, který byl překryt druhou folií. Následně byly okraje fólie přeloženy na spodní stranu tabulky skla.

## 4.6 Sekvenace

Pro ověření metody SSCP byly použité vzorky osekvenovány. Naamplifikované PCR produkty 20 genotypů byly separovány v 1 % agarózovém gelu a v 1x TBE pufru. Separace probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut. Výsledné fragmenty o požadované velikosti byly z gelu vyříznuty pomocí skalpelu. Tyto fragmenty byly následně z agarózových bločků izolovány pomocí Gene Jet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific) kitu dle manuálu výrobce. Fragmenty byly následně kvantifikovány prostřednictvím UV spektrometrie. Výsledná koncentrace DNA byla upravena dle požadavků poskytovatele sekvenačních služeb (Eurofins Genomic Germany GmbH).

U sekvenace 4 genotypů pouze ošetřením fosfatázou a exonukleázou byly k 10  $\mu$ l naamplifikovaného PCR produktu byly přidány 2 U (unit = jednotka) FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher Scientific, Litva) a 20 U Exonuclease I (Thermo Fisher Scientific, Litva). Následně byla tato směs v termocykleru T-gradient Thermocycler (Biometra, SRN) zahřata na 15 minut na 37 °C a po uplynulých 15 minutách na dalších 15 minut, ale při teplotě 85 °C.

Každý amplikon byl sekvenován v jednom opakování od F i R primerů, které byly do reakční směsi přidány v koncentraci 2,5  $\mu$ M. Pro vytvoření konsenzu sekvence byl použit program BioEdit version 7.2.5 (Hall 1999).

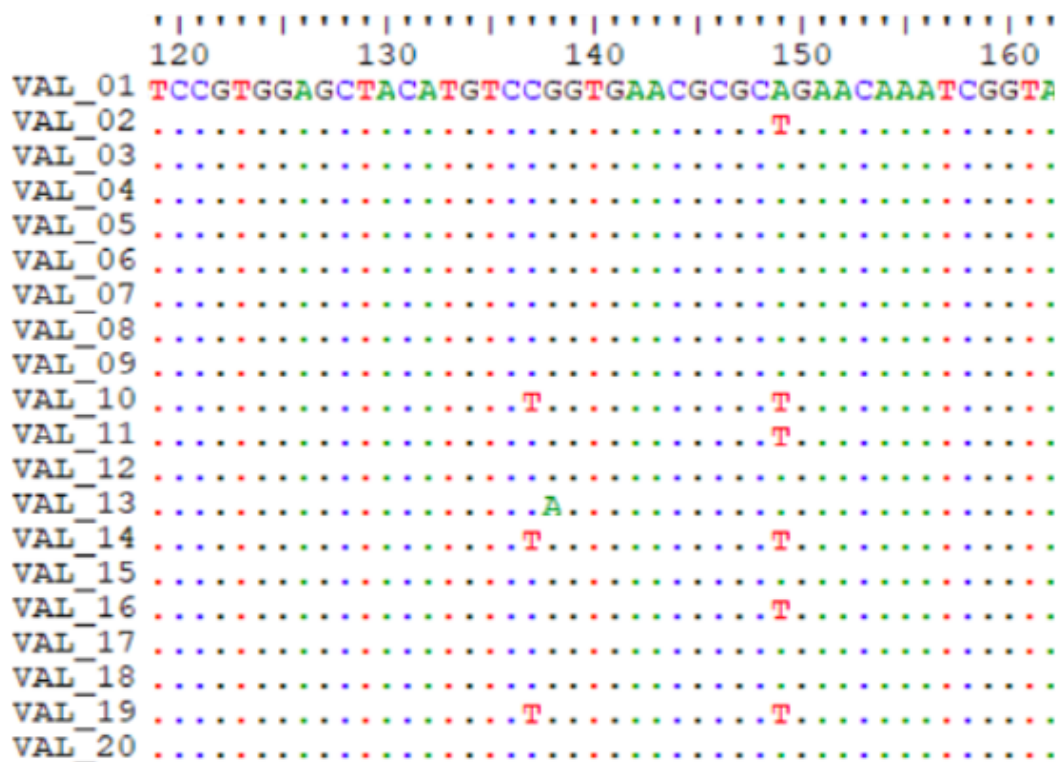
## 5 Výsledky

### 5.1 Vyhodnocení sekvenování

#### 5.1.1 Rezistence v genu *AChE*

Bylo osekvenováno a porovnáno 20 vzorků brouků mandelinky bramborové s cílem detekce rezistence v genu *AChE*. Vzniklá rezistence k organofosfátům byla způsobena změnou adeninu na guanin (Zhu et al. 1995). Vzorky s bází A byly tedy senzitivní a vzorky s bází G naopak rezistentní. Místo mutace bylo nalezeno v pozici 138 bp námi osekvenovaného fragmentu DNA. Z Obrázku 1 je zřejmé, že z 20 zkoumaných vzorků bylo rezistentních 19 jedinců. Jediný vzorek VAL\_13 byl senzitivní. Tedy 95 % vzorků mandelinky byli rezistentní jedinci, na které by aplikace insekticidů, konkrétně organofosfátů, nepůsobila a zbylých 5 % tvořili jedinci senzitivní.

Obrázek 1: Sekvence pro gen *AChE*

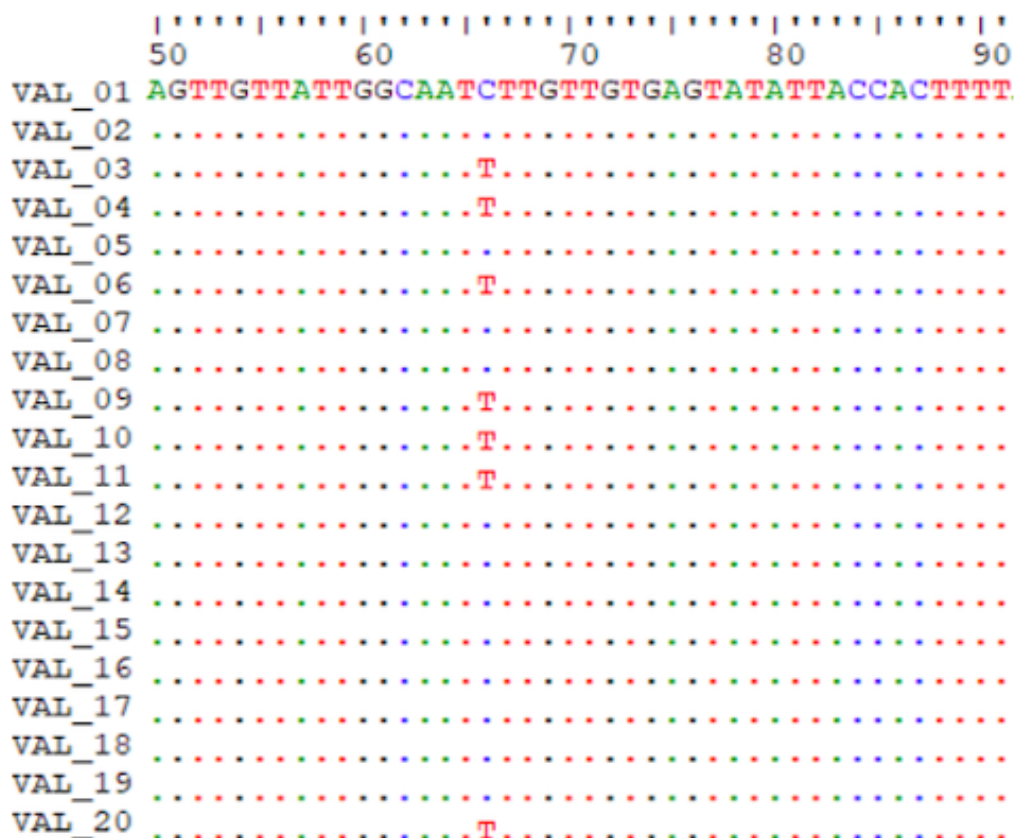


### 5.1.2 Rezistence v genu *LdVssc1*

Rezistence vůči pyrethroidům v genu *LdVssc1* byla nalezena v pozici 66 bp námi osekvenovaného fragmentu DNA. K vzniklé rezistenci došlo záměnou cytosinu za thymin (Clark et al. 2001). Jedinci s bází C byly senzitivní a jedinci s bází T rezistentní. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 2, kde z celkového počtu zkoumaných brouků mandelinky bramborové bylo pouze 7 rezistentních vůči pyrethroidům. Konkrétně šlo o vzorky VAL\_03, VAL\_04, VAL\_06, VAL\_09, VAL\_10, VAL\_11 a VAL\_20. Z 20 zkoumaných vzorků bylo tedy 65 % senzitivních a 35 % rezistentních.

V případě, že by se ve výsledcích vyskytl heterozygotní jedinec v místě mutace v genu *LdVssc1*, byl by označen písmenem Y. Heterozygot však může být pouze samice z důvodu umístění genu *LdVssc1* na gonozomu X. Samice mají pohlaví určeno jako XX, zatímco samci jako XO (Sidorenko & Berezovska 2002).

Obrázek 2: Sekvence pro gen *LdVssc1*



### 5.1.3 Porovnání sekvenace pomocí kitu a sekvenace fosfatázovou metodou

U čtyřech genotypů byla navíc provedena sekvenace pomocí fosfatázy a exonukleázy s cílem porovnat dva možné způsoby sekvenace. Z výsledků je patrné, že sekvenace pomocí kitu a sekvenace za pomoci ošetření vzorků fosfatázou a exonukleázou jsou srovnatelné a jejich výsledky jsou zcela identické, viz Obrázek 3 a Obrázek 4, a to pro oba dva geny. Vzorky s označením „f“ jsou vzorky, na které byla aplikovaná fosfatázová metoda sekvenace.

Obrázek 3: Porovnání sekvenací v genu *AChE*

```

      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      120      130      140      150      160
VAL_01 CCGTGGAGCTACATGTCGGGTGAACGCGCAGAACAATCGGTA
VAL_01f .....
VAL_02 .....T.....
VAL_02f .....T.....
VAL_03 .....
VAL_03f .....
VAL_04 .....
VAL_04f .....

```

Obrázek 4: Porovnání sekvenací v genu *LdVssc1*

```

      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      50      60      70      80      90
VAL_01 AGTTGTTATTGGCAATCTTGTGTGAGTATATTACCACTTTT
VAL_01f .....
VAL_02 .....
VAL_02f .....
VAL_03 .....T.....
VAL_03f .....T.....
VAL_04 .....T.....
VAL_04f .....T.....

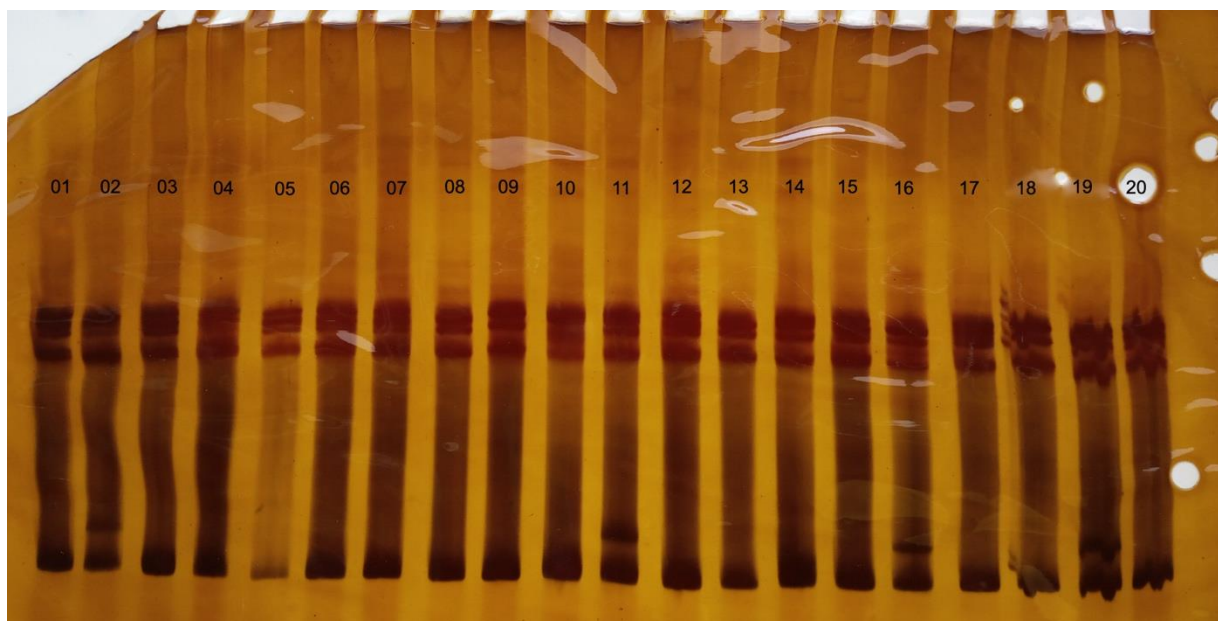
```

## 5.2 Vyhodnocení SSCP

### 5.2.1 Rezistence v genu *AChE*

Výsledky metody SSCP nebyly tak snadno rozeznatelné pravděpodobně kvůli přítomnosti většího množství dalších bodových mutací v naamplifikovaném fragmentu DNA genu *AChE* nacházejícím se na autozomu. Dle pozorování bylo patrných s největší pravděpodobností 25 % senzitivních jedinců, 25 % recesivních a polovinu tvořili jedinci heterozygotní. V případě senzitivních genotypů šlo konkrétně o vzorky 02, 08, 13, 16 a 19 a rezistentní byly vzorky 09, 10, 11, 14 a 18. Výsledný gel je zaznamenán na Obrázku 5.

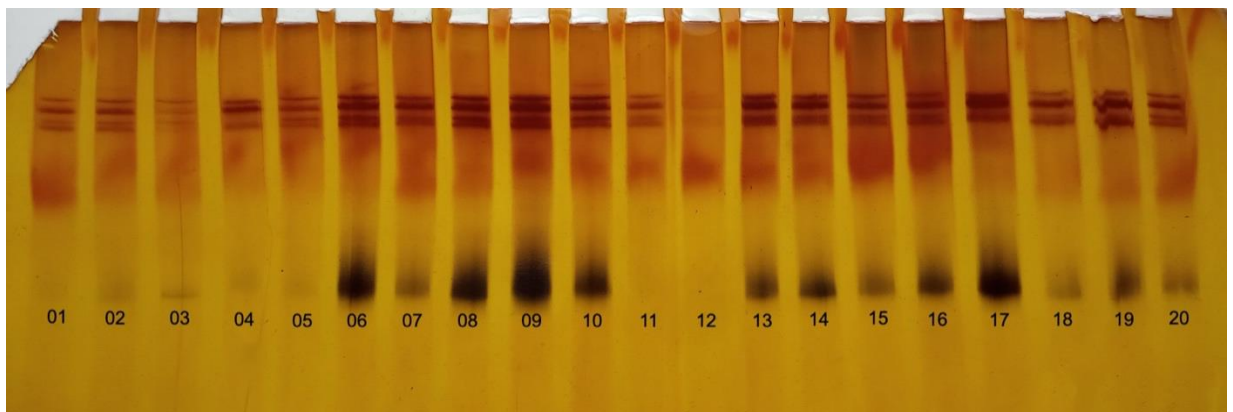
Obrázek 5: Výsledný gel pro gen *AChE*



### 5.2.2 Rezistence v genu *LdVssc1*

Z výsledků metody SSCP v naamplifikovaném fragmentu DNA genu *LdVssc1* nebylo možné na základě získaného profilu rozeznat a identifikovat, zdali se jedná o jedince s rezistentním či senzitivním genotypem. Námi získané výsledky bohužel neodpovídají výsledkům v literatuře, podle které byl experiment prováděn. Ve výsledcích byly detekovány dvě různé varianty uskupení fragmentů. Jeden typ uskupení fragmentů nese vzorek s označením 04, zbytek vzorků má uspořádání fragmentů identické, nicméně od vzorku 04 odlišné. Výsledný gel je zaznamenán na Obrázku 6.

Obrázek 6: Výsledný gel pro gen *LdVssc1*



## 6 Diskuze

I přes všechny vědecký a technologický pokrok mandelinka bramborová stále zůstává největší hrozbou v produkci bramborových hlíz a je stále výzvou pro řadu odborníků. Brát ohled na vznik rezistence je tak proto jednou ze zásadních myšlenek pro udržitelnou produkci brambor (Alyokhin et al. 2008).

Jedním z cílů předkládané bakalářské práce bylo využití metody SSCP pro detekci genů rezistence u mandelinky bramborové a ověření její funkčnosti porovnáním s metodou sekvenování. Výsledky obou metod byly porovnány v následujících podkapitolách.

Ukázalo se, že využití metody SSCP pro detekci genů rezistence bylo v našem případě velice nepřesné a nespolehlivé. Ze všech 40 vzorků (20 vzorků pro gen *AChE* a 20 vzorků pro gen *LdVssc1*), na kterých byla provedena metoda SSCP, se shodoval s výsledky sekvenování pouze jeden jediný vzorek, v procentuálním vyjádření šlo tedy o pouhých 2,5 % ze všech zkoumaných vzorků. Ostatní práce na obdobné téma měly však výrazně pozitivnější výsledky. Například Kim et al. (2005) udává spolehlivost metody SSCP pro detekci rezistentních genů kolem 95,3 %. Přestože se jednalo o snadnou a efektivní metodu, námi získané výsledky byly s největší pravděpodobností ovlivněné dalšími bodovými mutacemi, což ve výsledku vedlo k získání nejednoznačných výsledků. Stejně tak jako Clark et al. (2001) bychom doporučili využití metody SSCP až jako sekundární metodu k ověření primárních výsledků získaných například metodami Bi-PASA nebo sekvenováním, které jednoznačně prokazují vyšší úspěšnost detekce genů rezistence.

Naopak výsledky sekvenování byly průkazné a jednoznačné, a to jak pomocí komerční metody sekvenování pomocí kitu, tak pomocí sekvenace vzorků ošetřených fosfatázou a exonukleázou. Ze všech našich zkoumaných vzorků, které nám byly poskytnuty výzkumnou stanicí ve Valečově u Havlíčkova Brodu, bylo ze zkoumaných vzorků vůči organofosfátům rezistentních 95 % a vůči pyrethroidům rezistentních 35 % vzorků. V případě práce Zichové et al. (2010), byly porovnávány hodnoty rezistence, také vůči organofosfátům a pyrethroidům, ve třech různých oblastech v České republice. Konkrétně se jednalo o Litoměřice, Svitavy a Ruzyni. Míra rezistence vůči pyrethroidům se v průměru stále pohybovala kolem 22 %. Naproti tomu míra rezistence vůči organofosfátům se mezi jednotlivými oblastmi výrazně lišila (Zichová et al. 2010). V případě porovnání našich výsledků a výsledků Zichové et al. (2010) je nutné brát ohled na to, že hlavním cílem naší práce nebylo provést analýzu zastoupení rezistentních jedinců v dané oblasti a z toho důvodu byla detekce rezistentních genů provedena na menším souboru vzorků.



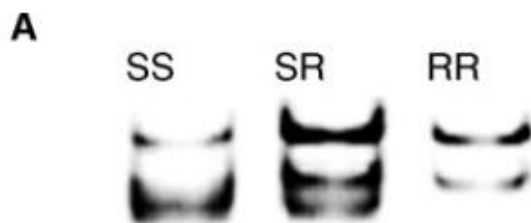
## 6.1 Vyhodnocení výsledků metod SSCP a sekvenování pro gen *AChE*

Výsledky metody SSCP pro gen *AChE* byly porovnány s výsledky práce Clark et al. 2001. Na Obrázku 7 jsou zobrazeny výsledné profily jednotlivých fragmentů, které určují, zdali se jedná o senzitivního či rezistentního jedince. Podle vzoru Clarka et al. (2001) je senzitivním jedincem vzorek s označením SS a rezistentním jedincem je vzorek s označením RR. V případě vzorku SR jde o heterozygotního jedince. Bohužel v námi získaném výsledném profilu byly vzorky hůře čitelné, pravděpodobně kvůli přítomnosti dalších bodových mutací, a získané vzorky se tak nedaly se stoprocentní jistotou označit za senzitivní či rezistentní, a to i přesto, že jsme postupovali přesně podle metodiky.

Naopak výsledky sekvenování byly přesné a shodovaly se s výsledky práce Zichová et al. 2010. Zichová et al. (2010) k detekci genů rezistence využila metodu RFLP, Bi-PASA a sekvenování. V případě sekvenování byla odhalena u rezistentních jedinců změna dusíkaté báze, stejně jako ve výsledcích námi provedených sekvenací. Výsledky obou námi provedených sekvenací, tedy sekvenace pomocí komerčního kitu a sekvenace ošetřená fosfatázou a exonukleázou, byly rovnocenné a nijak se nelišily ve svých výsledcích. Pro případnou budoucí aplikaci metody sekvenování je možné doporučit metodu sekvenace pomocí fosfatázy a exonukleázy, která je časově kratší a vyžaduje menší finanční náklady.

Bohužel námi získané výsledky obou metod, tedy SSCP a sekvenování, se navzájem téměř neshodují. S největší pravděpodobností došlo během metody SSCP k posunu vlásenek v důsledku přítomnosti dalších bodových mutací. V procentuálním vyjádření odhalila metoda SSCP správně pouze 5 % vzorků. Tedy takové vzorky, které se shodovaly s výsledky sekvenování. Konkrétně se jednalo o vzorek číslo 13.

Obrázek 7: Profily fragmentů jednotlivých vzorků získané metodou SSCP pro gen *AChE* (Clark et al. 2001)



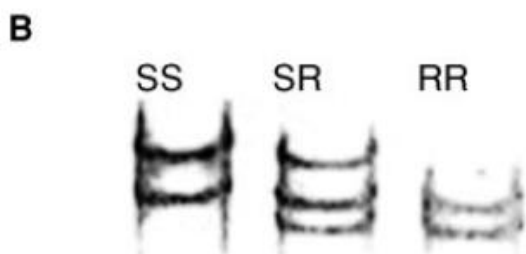
## 6.2 Vyhodnocení výsledků metod SSCP a sekvenování pro gen *LdVssc1*

Výsledky metody SSCP pro gen *LdVssc1* byly opět porovnány s výsledky práce Clark et al. 2001. Na Obrázku 8 jsou vyobrazené výsledné profily jednotlivých fragmentů, které popisují, zdali se jedná o senzitivního nebo rezistentního jedince. Označení je stejné jako u Obrázku 7. Nicméně výsledky, které se nám podařilo získat, neodpovídaly ani jednomu ze vzorů na Obrázku 8. Z takových výsledků tedy nebylo možné určit, jestli šlo o senzitivního či recesivního jedince.

Výsledky sekvenování obou metod se opět plně shodovaly s výsledky Zichova et al. 2010. Metody sekvenování opět odhalily u rezistentních jedinců změnu dusíkaté báze. Výsledky tedy byly totožné jako u námi provedených sekvenací. Výsledky sekvenace pomocí kitu a sekvenace pomocí fosfatázy a exonukleázy byly opět identické a je tak možno v rámci ušetření nákladů a času doporučit metodu fosfatázovou.

Na závěr bohužel nemohlo dojít ke srovnání výsledků metody SSCP a sekvenování z důvodu nečitelných výsledků metody SSCP.

Obrázek 8: Profily fragmentů jednotlivých vzorků získané metodou SSCP pro gen *LdVssc1* (Clark et al. 2001)



## 7 Závěr

Závěry jsou shrnuty v následujících bodech.

- Prostudování problematiky rezistence u mandelinky bramborové bylo splněno sepsáním literární rešerše v rozsahu 12 stran. Literární rešerše byla rozdělena do dvou částí. První část pojednávala o samotné mandelince bramborové, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), a následovalo shrnutí problematiky týkající se rezistence.
- Metoda SSCP byla vyzkoušena a následně porovnána s výsledky sekvenace. Bohužel byly detekovány odlišné výsledky v genu *AChE* i v genu *LdVssc1*. Z výsledků bylo patrné, že metoda SSCP byla vzhledem dalším jiným bodovým mutacím v rámci amplifikovaného fragmentu nepřesná, a to z důvodu poskytnutí většího množství vlásenek. Tuto metodu nelze doporučit pro přesnou identifikaci senzitivních a rezistentních genotypů.
- Pomocí metody sekvenování byly detekovány rezistentní i senzitivní genotypy, jak pro gen *AChE*, tak pro gen *LdVssc1*, a bylo zjištěno, že klasická metoda sekvenace pomocí kitu je plně srovnatelná s fosfatázovou metodou sekvenace. Dané metody byly ekvivalentní. Pro účely detekce rezistentních genů byla doporučena metoda fosfatázová z důvodu toho, že byla rychlejší, levnější a stejně spolehlivá jako klasická metoda sekvenace.

## 8 Literatura

Abbas MST. 2018. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. Egyptian Journal of Biological Pest Control **28**:1-12.

Al-Saleh I. 1994. A. Pesticides: a review article. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer **13**:151-161.

Alvarez JM, Srinivasan R, Carvantes FA. 2013. Occurrence of the carabid beetle, *Pterostichus melanarius* (Illiger), in potato ecosystems of Idaho and its predatory potential on the Colorado potato beetle and aphids. American journal of potato research **90**:83-92.

Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology **3**:10-19.

Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. American Journal of Potato Research **85**:395-413.

Alyokhin A, Dively G, Patterson M, Mahoney M, Rogers D, Wollam J. 2006. Susceptibility of imidacloprid-resistant Colorado potato beetles to non-neonicotinoid insecticides in the laboratory and field trials. American Journal of Potato Research **83**:485-494.

Argentine JA, Zhu KY, Lee SH, Clark JM. 1994. Biochemical mechanisms of azinphosmethyl resistance in isogenic strains of Colorado potato beetle. Pesticide Biochemistry and Physiology **48**:63-78.

Arthropod Pesticide Resistance Database (APRD). *Leptinotarsa decemlineata*-Shown Resistance to Active Ingredient(s). Available online: <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=141> (accessed on November 2020).

Bethune CJS. Report of the Entomological Society of Ontario for the year 1871. 1872. Hunter, Ross, Toronto. In Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* **3**:10-19.

Biever KD, Chauvin RL. 1992. Suppression of the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) with augmentative releases of predaceous stinkbugs (*Hemiptera: Pentatomidae*). *Journal of Economic Entomology* **85**:720-726.

Bishop BA, Grafius E. 1991. An on-farm insecticide resistance test kit for Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *American Potato Journal* **68**:53-64.

Bolter CJ, Dicke M, Van Loon JJA, Visser JH, Posthumus MA. 1997. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of chemical ecology* **23**:1003-1023.

Brown AWA. 1951. Chemical control of insects feeding on plants. *Insect control by chemicals*. In Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* **3**:10-19.

Cantwell GE, Cantelo W, Schroder R. 2017. Effect of *Beauveria bassiana* on underground stages of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *The Great Lakes Entomologist* **19**:6.

Caprio MA, Grafius EJ. 1990. Effects of light, temperature, and feeding status on flight initiation in postdiapause Colorado potato beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *Environmental Entomology* **19**:281-285.

CLARK, J. Marshall, et al. 2001. DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutations associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest management science* **57**:968-974.

Database of Insects and their Food Plants. Available from <http://www.brc.ac.uk/dbif/invertebratesresults.aspx?insectid=4742> (accessed November 2020).

De Kort CAD. 1990. Thirty-five years of diapause research with the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **56**:1-13.

De Wilde J. 1948. Développement embryonnaire et postembryonnaire du Doryphore (*Leptinotarsa decemlineata* Say) en fonction de la température. International Congress of Entomology, Stockholm, Sweden. In Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research* **85**:395-413.

Dickens JC. 2000. Orientation of Colorado potato beetle to natural and synthetic blends of volatiles emitted by potato plants. *Agricultural and forest entomology* **2**:167-172.

Dik A, Ceglarska E, Ilovai Z. 2000. Sweet pepper: development in plant pathology. Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Springer, Netherlands.

Corstau C, French-Constant R. 1995. Detection of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations by single-stranded conformation polymorphism analysis. *Pestic. Science* **43**:267-271.

Dvořák P, Bicanová E. 2007. Brambory v systému ekologického zemědělství. Pages 131-133. Organic farming conference. Katedra rostlinné výroby, Česká zemědělská univerzita v Praze.

Faculty of Humanities University of Copenhagen. 2019. Available from <https://humanities.ku.dk/news/2019/risk-and-unnaturalness-cannot-justify-eus-strict-policy-on-gmo/> (accessed February 2021).

Fernandez P, Hilker M. 2007. *Host plant location by Chrysomelidae*. *Basic and Applied Ecology* **8**:97-116.

Ferro DN. 1993. Potential for resistance to *Bacillus thuringiensis*: Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) a model system. *American Entomologist* **39**:38-44.

Ferro DN, Logan JA, Voss RH, Elkinton JS. 1985. Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) temperature-dependent growth and feeding rates. *Environmental entomology* **14**:343-348.

Ferro DN. 1994. Biological control of the Colorado potato beetle. *Advances in Potato Pest Biology and Management*. APS Press, St. Paul 357-375. In Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* **3**:10-19.

Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO STAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed on January 2021).

Gauthier NL, Hofmaster RN, Semel M. 1981. History of Colorado potato beetle control. *Advances in potato pest management*.

Grafius, E. 1997. Economic impact of insecticide resistance in the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) on the Michigan potato industry. *Journal of Economic Entomology* **90**:1144-1151.

Grafius EJ, Douches DS. 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified potato cultivars in IPM. *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs*. Springer, Dordrecht.

Groden E, Drummon FA, Casagrande RA, Hayness DL. 1990. *Coleomegilla maculata* (*Coleoptera: Coccinellidae*): Its Predation upon the Colorado Potato Beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) and Its Incidence in Potatoes and Surrounding Crops. *Journal of Economic Entomology* **83**:1306-1315.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* **41**:95-98.

Hama H. 1983. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Pest resistance to pesticides*. Springer, Boston.

Hausvater E, Doležal P. 2014. Metodika integrované ochrany brambor proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod.

Hare JD. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. Annual review of entomology **35**:81-100.

Hare DJ. 1980. Impact of defoliation by the Colorado potato beetle on potato yields. Journal of Economic Entomology **73**:369-373.

Hauwthorne DJ. 2001. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. Genetics **158**:695-700.

Hazzard RV, Ferro DN, Van Driesche RG, Tuttle AF. 1991. Mortality of eggs of Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) from predation by *Coleomegilla maculata* (*Coleoptera: Coccinellidae*). Environmental Entomology **20**:841-848.

Hellmich RL, Albajes R, Bervinson D, Prasifka JR, Wang ZY, Weiss MJ. 2008. The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer, Dordrecht.

Hitchner LS. 1952. The insecticide industry. Insects, The Yearbook of Agriculture, *USDA*.

Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. 1993. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. Nucleic Acids Research **21**:3637-3642.

Ioannidis PM, Grafius E, Whalon ME. 1991. Patterns of insecticide resistance to azinphosmethyl, carbofuran, and permethrin in the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). Journal of Economic Entomology **84**:1417-1423.

Kadoic Balaško M, Mikac KM, Bažok R, Lemic D. 2020. Modern techniques in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) control and resistance management: history review and future perspectives. Insects **11**:581.



- James C. 2011. Global status of commercialized biotech/GM crops. Ithaca, NY.
- Kennedy GG. 2009. Colorado potato beetle. Encyclopedia of insects. Academic Press.
- Kim HJ, Clark JM. 2002. Evaluation of resistant point mutations in recombinant acetylcholinesterase of Colorado potato beetle. Abstracts of Papers of the American Chemical Society. In Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. American Journal of Potato Research **85**:395-413.
- Kim HJ, Hawthorne DJ, Peters T, Dively GP, Clark JM. 2005. Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of kdr-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle. Pesticide Biochemistry and Physiology **81**:85-96.
- Lashomb JH, Ng YS. 1984. Colonization by Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), in rotated and nonrotated potato fields. Environmental Entomology **13**:1352-1356.
- Lee SH, Dunn JB, Clark JM, Sodenlund DM. 1999. Molecular Analysis of kdr-like Resistance in a Permethrin-Resistant Strain of Colorado Potato Beetle. Pesticide biochemistry and physiology **63**:63-75.
- Logan PA, Casagrande RA, Faubert HH, Drummond FA. 1985. Temperature-dependent development and feeding of immature Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). Environmental entomology **14**:275-283.
- Maharijaya A, Vosman B. 2015. Managing the Colorado potato beetle; the need for resistance breeding. Euphytica **204**:487-501.
- May ML. 1981. Role of body temperature and thermoregulation in the biology of the Colorado potato beetle. Advances in Potato Pest Management, Hutchinson Ross Publishing Co., Stroudsburg. In Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. American Journal of Potato Research **85**:395-413.
- Migranov MG. 1994. Piretroidy: otechestvennye analogi i ikh toksikologiya.

Patočka J. Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové. 2015. Jedovatý dipeptid mandelinky bramborové. Available from <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=789> (accessed January 2021).

Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant molecular biology* **22**:313-321.

Quinton RJ. 1955. DDT-resistant Colorado potato beetles. Proceeding of the North Central Entomological Society of America. In Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* **3**:10-19.

Radcliffe EB, Lagnaoui A. 2007. Insect pests in potato: Insects. *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives*. Elsevier, Amsterdam. In Vreugdenhil D, et al. *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives*. 2011.

Registr přípravků na ochranu rostlin. eAGRI. Available from <http://eagri.cz/public/app/eagri-app/POR/Vyhledavani.aspx> (accessed March 2021).

Scott A. 2008. Europe Rejects Appeal for Use of Azinphos-methyl Pesticide. *Chemical Week*. Available from [http://www.chemweek.com/enviro\\_tech/regulatory/13435.html](http://www.chemweek.com/enviro_tech/regulatory/13435.html) (accessed March 2021).

Sexson DL, Wyman JA. 2005. Effect of crop rotation distance on populations of Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*): Development of areawide Colorado potato beetle pest management strategies. *Journal of economic entomology* **98**:716-724.

Sidorenko AP, Berezovska OP. 2002. Genetic structure of populations of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *Russian Journal of Genetics* **38**:1256-1261.

Skryabin K. 2010. Do Russia and Eastern Europe need GM plants?. *New biotechnology* **27**:593-595.

Szafranek B, Synak E, Waligóra D, Szafranek J, Nawrot J. 2008. Leaf surface compounds of the potato (*Solanum tuberosum*) and their influence on Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) feeding. *Chemoecology* **18**:205-216.

Switzer RC, Merrill CR, Schifrin S. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* **98**:231-237.

Tauber CA, Tauber MJ, Gollands B, Wright RJ, Obrycki JJ. 1988. Preimaginal development and reproductive responses to temperature in two populations of the Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *Annals of the Entomological Society of America* **81**:755-763.

Thomas PE, Kaniewski WK, Lawson EC. 1997. Reduced field spread of potato leafroll virus in potatoes transformed with the potato leafroll virus coat protein gene. *Plant Disease* **81**:1447-1453.

ÚKZÚS Rostlinolékařský portál. Available from [http://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/?key=%22c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c263e14%22#r|p|so|skudci|detail:c18ccd9-cbe2ba381e37b810d0c263e14|popis](http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c263e14%22#r|p|so|skudci|detail:c18ccd9-cbe2ba381e37b810d0c263e14|popis) (accessed March 2021).

Voss RH, Ferro DN. 1990. Phenology of flight and walking by Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) adults in western Massachusetts. *Environmental Entomology* **19**:117-122.

Walgenbach JF, Wyman JA. 1984. Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) development in relation to temperature in Wisconsin. *Annals of the Entomological Society of America* **77**:604-609.

Weber D. 2003. Colorado beetle: pest on the move. *Pesticide outlook* **14**:256-259.

Weber DC, Ferro DN. 1993. Distribution of overwintering Colorado potato beetle in and near Massachusetts potato fields. *Entomologia experimentalis et applicata* **66**:191-196.

Weber DC, Ferro DN, Zehnder GW. 1994. Colorado potato beetle: diverse life history poses challenge to management. *Advances in potato pest biology and management*. In Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* **3**:10-19.

Weber DC, Rowley DL, Greenstone MH, Anthanas MM. 2006. Prey preference and host suitability of the predatory and parasitoid carabid beetle, *Lebia grandis*, for several species of *Leptinotarsa* beetles. *Journal of Insect Science*.

Weisz R, Smilowitz Z, Christ B. 1994. Distance, rotation, and border crops affect Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) colonization and population density and early blight (*Alternaria solani*) severity in rotated potato fields. *Journal of economic entomology* **87**:723-729.

Whalon ME, Ferro DN. 1998. Bt-potato resistance management. Now or Never: Serious New Plans to Save a Natural Pest Control, Union of Concerned Scientists. In Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research* **85**:395-413.

Whalon ME, Wingerd BA. 2003. Bt: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America* **54**:200-211.

Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA. 1996. Analysis of sodium channel gene sequences in pyrethroid-resistant houseflies in *Molecular Genetics and Evolution of Pesticide Resistance* ed Brown TM.

Wright RJ. 1984. Evaluation of crop rotation for control of Colorado potato beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*) in commercial potato fields on Long Island. *Journal of Economic Entomology* **77**:1254-1259.

Wustman R, Carnegie SF. 2000. Assessment of new potato cultivars in Europe: a survey. *Potato research* **43**:97-106.

Zabel A, Stankovic S, Kostic M, Rahovic D, Tomic V, Kostic I, Alkhammas IO. 2017. Acetylcholinesterase [AChE] activity of Colorado potato beetle populations in Serbia resistant to carbamates and organophosphates. *Romanian Biotechnology Letters* **22**:12584-12596.

Zhang A, Dunn JB, Clark JM. 1999. An efficient strategy for validation of a point mutation associated with acetylcholinesterase sensitivity to azinphosmethyl in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **65**:25-35.

Zhu KY, Clark JM. 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**:1129-1138.

Zichová T, Kocourek F, Salava J, Nad'ová K, Stará J. 2010. Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods. *Pest management science* **66**:853-860.

Žižka J. 2020. Situační a výhledová zpráva brambory.