

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

katedra agroekologie a biometeorologie

Mechanismy herbicidní rezistence u chundelky metlice

(*Apera spica-venti* (L.) Beauv.)

doktorská disertační práce

Doktorand: Ing. Pavlína Košnarová

Školitel: prof. Ing. Josef Soukup, CSc.

Konzultant: Ing. Kateřina Hamouzová, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Mechanismy herbicidní rezistence u chundelky metlice (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.)“ vypracovala samostatně a použila pouze pramenů, které uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne

.....

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. Definice a příčiny vzniku herbicidní rezistence.....	3
2.2. Historie vzniku a vývoj herbicidní rezistence	4
2.3. Mechanismy herbicidní rezistence	6
2.3.1. Rezistence mimo místo účinku.....	7
2.3.2. Rezistence v místě účinku.....	9
2.4. Rezistence k významným skupinám herbicidů.....	11
2.4.1. Rezistence k inhibitorům fotosystému II.	11
2.4.2 Rezistence k inhibitorům acetylkoenzym – A karboxylázy	13
2.4.3. Rezistence k inhibitorům stavby mikrotubulů	14
2.4.4. Rezistence k inhibitorům EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy).....	14
2.4.5. Rezistence plevelů k inhibitorům ALS (acetolaktát-syntázy)	15
2.5. Vyjádření stupně rezistence	18
2.6. Metody stanovení rezistence	19
2.6.1. Biologické studie	19
2.6.2. Fyziologické a biochemické metody	21
2.6.3. Molekulárně-genetické metody	23
2.7. Charakteristika studovaného plevelu - chundelka metlice (<i>Apera spica-venti</i> (L.) Beauv.).....	27
2.7.1. Botanická charakteristika	27
2.7.2. Biologické vlastnosti	27
2.7.3. Rozšíření a škodlivost chundelky metlice.....	28
2.7.4. Současné možnosti regulace chundelky metlice.....	30
2.7.5. Rezistence chundelky metlice k herbicidům.....	33
3. CÍLE PRÁCE.....	36
4. MATERIÁL A METODIKA	37
4.1. Pokusný materiál	37
4.2. Biologické studie	38
4.2.1. Stanovení citlivosti vybraných biotypů k herbicidům	38
4.2.2. Výběr rezistentních jedinců z populace	40

4.2.3. Metoda agarových kultur - RISQ (Resistance In-Season Quick) test	41
4.3. Fyziologické studie.....	42
4.3.1. Test aktivity enzymu ALS	42
4.4. Molekulárně-genetické studie	44
4.4.1. Izolace DNA	44
4.4.2. Navržení primerů, polymerázová řetězová reakce (PCR)	45
4.4.3. Purifikace produktů PCR.....	48
4.4.4. Detekce mutací v genu <i>als</i>	48
4.4.5. Sekvencování celého genu <i>als</i>	49
4.4.6. Metoda dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence -	49
4.5. Metabolické studie	50
4.5.1. Studium reakce rostlin ošetřených chlorsulfuronem s přídavkem malathionu	50
5. VÝSLEDKY	52
5.1. Stanovení účinnosti herbicidů u vybraných biotypů	52
5.2. Poměrné třídění četnosti a výběr rezistentních jedinců.....	61
5.3. Testování rezistence pomocí agarových kultur.....	63
5.4. Test enzymatické aktivity ALS	68
5.5 Studium reakce rostlin ošetřených chlorsulfuronem s přídavkem malathionu	76
5.6. Sekvencování a detekce mutací v genu <i>als</i>	80
5.7. Metoda dCAPS	85
6. DISKUZE.....	86
7. ZÁVĚR.....	96
8. POUŽITÁ LITERATURA	98
9. SEZNAM PŘÍLOH.....	109

1. ÚVOD

Změny v plevelových společenstvech a populacích plevelů na zemědělské půdě probíhají nepřetržitě a je velmi pravděpodobné, že i nadále budou procházet dalším vývojem. Plevel se neustále přizpůsobují celé řadě faktorů, které působí na jejich růst, reprodukci a šíření do okolí. Populace většiny plevelů se vyznačují vysokou genetickou variabilitou, která jim umožňuje přizpůsobovat se a přežívat v měnících se ekologických podmínkách.

Významné změny v druhovém spektru plevelů byly v posledních desetiletích ovlivněny zejména selekčním tlakem herbicidů. Herbicidy patří v současnosti k nejvíce využívaným pesticidům u nás i ve světě. Používají se ve všech pěstovaných plodinách na orné i nezemědělské půdě. Pěstování většiny plodin na celém světě by bez použití herbicidů nebylo možné. Velkoplošné a opakované používání herbicidů má však mnoho rizik. Jednak jsou to rizika ekologická a ekotoxikologická a vedle toho jsou dlouhodobému působení herbicidů vystavena i vlastní společenstva a populace plevelů. Opakované používání herbicidů má za následek postupné změny jak v druhovém spektru plevelů ve prospěch přirozeně odolných druhů (tzv. shift), tak i postupnou selekci tolerantních jedinců v populacích, která může vyústit v herbicidní rezistenci celé populace. V každé populaci se nacházejí jedinci, kteří se vyznačují přirozenou schopností přežít herbicidní ošetření. Postupným potlačováním citlivých fenotypů uvnitř populace může díky selekčnímu tlaku herbicidu dojít ke vzniku rezistence.

Zjednodušování agrotechniky (zvláště úzké oseední postupy a minimalizace ve zpracování půdy) spolu s orientací na několik mechanismů účinků herbicidů vedlo ke zvýšení škodlivosti trávovitých plevelů a nárůstu případů herbicidní rezistence.

Největší nárůst populací rezistentních plevelů je v poslední době zaznamenáván u skupiny herbicidů inhibující enzym acetolaktát syntázu (ALS). Hospodářsky nejvýznamnějším plevellem s potvrzenou rezistencí vůči ALS inhibitorům v podmínkách střední a severovýchodní Evropy je chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.), jejíž rezistentní populace byly nalezeny a popsány také v České republice. Počet případů snížené účinnosti herbicidů používaných v ochraně proti chundelce metlici na našem území přibývá a výskyt dalších rezistentních populací je velmi pravděpodobný.

Tato práce se snaží vysvětlit mechanismy rezistence, jejichž znalost je důležitá jak z pohledu evoluce herbicidní rezistence, tak i její prevence a managementu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Definice a příčiny vzniku herbicidní rezistence

Podle mezinárodní organizace HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) je rezistence v přirozené populaci plevelů definovaná jako spontánně vystupující dědičná vlastnost jednotlivých biotypů přežít ošetření herbicidem, který za normálních aplikačních podmínek tuto populaci účinně potlačí.

Green (1990) definuje rezistenci jako absolutní toleranci plevelné rostliny vůči takové dávce herbicidu, která je za běžných podmínek pro příslušný druh letální, přičemž toleranci nazývá jako přirozenou a normální variabilitu citlivosti vůči herbicidům, která je danému druhu plevele vlastní. Menne a Köcher (2007) uvádějí, že rezistence je přirozený jev, na kterém lze v populaci plevele v krátkém časovém úseku pozorovat to, co se jinak vyvíjí přes miliony let.

Existují dva předpoklady pro vznik herbicidní rezistence v plevelné populaci: přítomnost genetické proměnlivosti a selekční tlak vyvolaný opakovanou herbicidní aplikací (Cousens, Mortimer, 1995). Za vznikem rezistence stojí významné evoluční faktory jako je frekvence rezistentních alel v přirozených populacích, stupeň dědivosti rezistence, životaschopnost a konkurenceschopnost citlivých a rezistentních biotypů v přítomnosti herbicidu a přenos genů mezi populacemi a uvnitř populací (Maxwell, Mortimer, 1994). Úroveň a rychlost evoluce herbicidní rezistence je závislá na typu rozmnožování populace, dědičnosti rezistentního znaku, schopnosti křížit se a možnosti přenosu genů (Jaseniuk a kol., 1996). Na základě matematických zákonitostí lze dokázat, že téměř v každé populaci je jedinec rezistentní vůči dané účinné látce. Původní počet rezistentních jedinců v přirozené populaci se pohybuje v míře 10^{-4} až 10^{-12} (Maxwell, Mortimer, 1994). Důležitou roli v uplatnění rezistentního biotypu hraje to, zda bude mít jedinec dostatečnou fitness, aby se mohl množit a působit škody. Jako fitness označujeme celý komplex vlastností, které umožňují, aby potomstvo rezistentního jedince přeživalo a množilo se v konkurenci původní citlivé části populace, plodiny, i dalších plevelů. Nové mutace jsou zpravidla recesivní a méně životaschopné. V případě, že přestaneme používat danou látku, pomine selekční výhoda rezistentních jedinců a v populaci postupně začnou převládat citliví jedinci s lepším fitness. Vznik rezistence je významným problémem u herbicidů zasahujících zpravidla do jediného biochemického procesu řízeného jedním nebo

několika málo geny. Rezistence jako prakticky významný problém nastává tehdy, jestliže je snížení citlivosti některých jedinců v populaci škodlivého organismu dědičné. Za zdroj nového znaku – rezistence, jsou většinou považovány mutace (Veverka, 2009).

2.2. Historie vzniku a vývoj herbicidní rezistence

První nálezy rezistentních plevelných rostlin vůči herbicidům byly odezvou na zavedení perzistentních herbicidů ze skupiny triazinů. Tyto herbicidy byly používány opakovaně především v monokulturách kukuřice a jabloňových sadů. První zpráva o nalezení rezistentního plevelu vůči triazinům pochází z roku 1968 (Ryan, 1970). Jednalo se o rezistentní biotyp starčku obecného (*Senecio vulgaris* L.) nalezený v ovocných školkách, kde byly po dobu deseti let kontinuálně používány triaziny. V průběhu 70. – 80. let především v Severní Americe a v Evropě docházelo k výraznému nárůstu počtu rezistentních populací vůči těmto herbicidům a byly popsány další rezistentní druhy (*Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L., *Chenopodium strictum* aj.). Od 90. let minulého století se pak velmi rychle objevovaly populace plevelů rezistentní k dalším herbicidním skupinám, především vůči inhibitorům acetolaktát-syntázy a acetylkoenzym A- karboxylázy (ACCázy).

Do současné doby (červen 2013) byla herbicidní rezistence popsána u 217 plevelných druhů, z toho u 129 dvouděložných a 88 jednoděložných. Rezistence byla zjištěna u 21 z 25 známých mechanismů účinku herbicidů, přičemž nejvíce případů je známo u herbicidů ze skupiny inhibitorů enzymu acetolaktát-syntázy (129) a inhibitorů fotosystému II (70). Počet rezistentních biotypů stoupá i v dalších skupinách, nyní zejména u inhibitorů 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS) a inhibitorů ACCázy. Celkem již byla rezistence plevelů popsána k 148 různým herbicidům, v 63 plodinách a v 61 různých zemích (Heap, 2013).

Plochy, na kterých byly zjištěny rezistentní rostliny, se zvýšily ze 1,7 milionu hektarů v roce 1996 na 70 milionů hektarů v roce 2005 (Menne a Köcher, 2007). Obecně se ve světě předpokládají ještě mnohem větší plochy zasažené rezistencí, protože počet hlášených případů úzce souvisí s úrovní studia detekce rezistence v jednotlivých státech světa. Nejvíce je situace zmapovaná v Severní Americe, Evropě a Austrálii.

V Evropě v současné době neexistuje stát, na jehož území se nevyskytují rezistentní populace plevelů. Rezistentní populace se nacházejí jak na zemědělské půdě, tak i na půdě nezemědělské (železnice, dopravní komunikace), a proto hrozí velké nebezpečí šíření těchto rezistentních populací jak uvnitř uvedených států, tak i napříč jednotlivými státy.

Z pohledu evropského zemědělství je nejzávažnějším hospodářským problémem výskyt rezistence u trávovitých plevelů jako je psárka polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.), jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lamk.), jílek tuhý (*Lilium rigidum* Gaud.), oves hluchý (*Avena fatua* L.), chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) a svěřep jalový (*Bromus sterilis* L.), jejichž význam stále stoupá. Velmi závažnou skutečností je fakt, že mnohé populace psárky polní, jílku tuhého a ovsa hluchého již vykazují mnohonásobnou rezistenci (multiple resistance) vůči substituovaným močovinám, sulfonylmočovinám a inhibitorům acetyl-koenzym A-karboxylázy. Mnohonásobná rezistence spočívá v tom, že plevele vykazují rezistenci vůči herbicidům ze zcela odlišných chemických skupin s různým mechanismem účinku. Proto může být jejich regulace velmi obtížná (Chodová, Salava, 2006). Tento typ rezistence byl potvrzen u mnoha druhů z čeledi lipnicovitých a za jeho rozvojem stojí biologické vlastnosti plevelného druhu, jako je cizosprašnost, vysoká genetická variabilita, produkce semen a počet rostlin na pozemku (Hamouzová a kol., 2012). V Belgii byla popsána rezistence u psárky polní vůči pěti účinným látkám (atrazine, chlorotoluron, fenoxaprop, pendimethalin, propaquizafop) ze čtyř různých chemických skupin (Moss a kol., 2007). Poměrně velkým problémem je z pohledu hubení rezistentních populací plevelů také křížová rezistence (cross-resistance). Rostlina, u níž byla vyvolána rezistence jedním herbicidem, je rezistentní vůči dalším herbicidům se stejným nebo podobným mechanismem účinku. Tyto rostliny jsou rezistentní vůči širokému spektru herbicidních přípravků a ochrana proti nim je velmi komplikovaná (Mikulka a kol., 1999).

Závislost mezi rostlinnými čeleděmi a jejich sklonem tvořit rezistentní populace není zcela zřejmá, přestože rezistentních populací trávovitých plevelů je registrováno nejvíce. Zatímco plevele z čeledi lipnicovitých tvoří 33 % všech rezistentních druhů a 40 % všech rezistentních populací, podíl této čeledi na celkovém světovém druhovém spektru plevelů je pouze 25 %. Vedle čeledi lipnicovitých mají relativně vyšší zastoupení druhů tvořící rezistentní populace, než

je jejich podíl na celkovém plevelném druhovém spektru, také druhy z čeledí laskavcovitých, brukvovitých, merlíkovitých a krtičníkovitých (Heap, 1999).

V České republice bylo doposud popsáno 16 druhů rezistentních plevelů. Většina druhů s potvrzenou rezistencí byla nalezena na nezemědělské půdě a na stanovištích s intenzivní chemickou ochranou, zejména se jednalo o železnice a ovocné sady - laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus* L.), laskavec zelenoklasý (*Amaranthus Powellii* S. Watson), turanka kanadská (*Coryza canadensis* L. Cronq), rosička krvavá (*Digitaria sanguinalis* L.), bytel metlatý (*Kochia scoparia* (L.) Schrader), lipnice roční (*Poa annua* L.), rdesno blešník (*Persicaria lapathifolia* L.), rdesno červivec (*Persicaria maculosa* S.F: Gray), starček obecný (*Senecio vulgaris* L.). Tyto případy rezistence byly popsány během 80. a 90. let a byla u nich potvrzena rezistence zejména k triazinovým přípravkům (Salava, Chodová, 2006). V posledních letech se začal zájem obracet i na polní plevele. V porostech kukuřice a cukrovky byly nalezeny druhy rezistentní vůči PS II inhibitorům – ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.), merlík bílý (*Chenopodium album* L.), merlík tuhý (*Chenopodium strictum* Roth), lilek černý (*Solanum nigrum* L.) (Mikulka, Slavíková, 2008).

Nejvýznamnějším druhem v porostech obilnin v ČR, u něhož byla potvrzena rezistence vůči ALS inhibitorům a v několika málo případech i PS II inhibitorům, je chundelka metlice (Nováková a kol, 2006). V oblasti jižních Čech začínají přibývat také problémy s účinností sulfonylmočovín na psárku polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.) v porostech obilnin a již byly popsány první rezistentní populace vůči chlorsulfuronu (Slavíková a kol. 20011) a vůči herbicidům obsahujícím účinnou látku mesosulfuron a iodosulfuron (Hamouzová, Košnarová, 2010).

2.3. Mechanismy herbicidní rezistence

Herbicidy potlačují plevele narušením jejich základních fyziologických nebo biochemických procesů, obvykle prostřednictvím specifické interakce s jednou cílovou molekulou v rostlině. Zpravidla se jedná o inhibici jednoho nebo více enzymů, které katalyzují některou z reakcí při biosyntéze organických sloučenin – aminokyselin, karotenoidů, lipidů, apod. Následně však může docházet k druhotným projevům na místech, kde jsou dané sloučeniny zapotřebí v navazujících biochemických procesech či jako stavební jednotky buněčných

organel. Rostliny se mohou stát rezistentními vůči účinku herbicidů vzhledem k modifikacím těchto enzymů, které redukují nebo znemožňují schopnost herbicidu navázat se na cílové místo. Častým mechanismem rezistence je snížení citlivosti cílového místa účinku herbicidu tzv. target site resistance neboli rezistence v místě účinku. Druhý základní mechanismus rezistence spočívá v tom, že herbicid nedosáhne místa účinku z důvodu omezeného příjmu, translokace či metabolické přeměny herbicidu. Tato rezistence se označuje jako non-target site resistance, neboli mimo místo účinku, která je někdy též označována za rezistenci metabolickou (Lutman, Heath, 1990).

2.3.1. Rezistence mimo místo účinku

Podstatou rezistence mimo místo účinku je redukce koncentrace herbicidně aktivních sloučenin či zabránění přístupu molekuly herbicidu do místa, kde má účinkovat, tedy vyvolat zde toxickou reakci. Toto může proběhnout několika způsoby. Jednou z cest je změněný příjem, kdy rezistentní rostlina herbicid nepřijímá např. díky morfologickým změnám jako je nadprodukce vosků apod. (Tharayil-Santhakumar, 2003).

Důležitým mechanismem rezistence mimo místo účinku je kompartmentace translokace herbicidu neboli jeho přemístění a uložení na místo, odkud nemůže účinkovat (Heap, LeBaron, 2001). Lipofilní herbicidy mohou být například imobilizovány v tukových buňkách (Steging, Vaughn, 1988). Nejčastějším druhem rezistence mimo místo účinku je detoxikace prostřednictvím oxidace, redukce, hydrolýzy či konjugace a následná kompartmentace herbicidu či jeho metabolitů. Herbicid je v těchto biochemických reakcích odbourán dříve, než dosáhne místa účinku (Yuan a kol., 2006). Mezi reakce první fáze patří oxidace, redukce a hydrolýza, přičemž nejběžnější transformační reakcí je oxidace. Tyto reakce snižují toxicitu molekuly herbicidu a zvyšují její polaritu tak, aby byla schopna konjugace ve druhé fázi detoxikace (Kreuz a kol., 1996). Schopnost deaktivovat herbicid má rostlina díky enzymům, jejichž zvýšená aktivita může vést k metabolické rezistenci plevelu. Nejvýznamnějším z nich je cytochrom P450 monooxygenáza se širokou substrátovou specifiitou, která má v první detoxikační fázi schopnost oxidovat velké množství cizorodých látek. Ze skupiny herbicidů je to např. skupina sulfonylmočovín, aryloxyfenoxypionátů a triazinů (Mallory-Smith, Namuth, 2010). Široká substrátová specifita enzymu P450 monooxygenázy

je způsobena značným strukturálním polymorfismem enzymu, který je dán rychlými mutacemi genu pro P450 (Yun, 2005). Zvýšená metabolizace herbicidů způsobená aktivitou skupiny těchto enzymů již byla popsána jako příčina stojící za vznikem rezistence k inhibitorům ACCázy, ALS a inhibitorům fotosyntému II (PS II) u řady trávovitých plevelů (Tharayil-Santhakumar, 2003).

Ve druhé fázi detoxikace herbicidu dochází ke konjugaci velkých hydrofilních molekul s aktivovanými xenobiotiky. Endogenní molekuly, které se váží s herbicidy, jsou nejčastěji sacharidy, glutathion nebo kyseliny. Vzniká konjugát, který obvykle vykazuje větší rozpustnost ve vodě, než jakou měla molekula původní. Důležitou skupinou enzymů v tomto kroku jsou glutathion-S-transferázy (GST), které katalyzují konjugaci glutathionu s různými substráty za vzniku glutathionového konjugátu, který je následně transportován do vakuol. GST se účastní syntézy řady různých sekundárních metabolitů a umožňuje detoxifikovat širokou škálu chemických látek. Dalším významným enzymem, který se účastní fáze II je O-glykosyltransferáza (OGT), která má podobnou funkci jako GST. Brazier (2002) ve své práci dokazuje, že tento enzym hraje např. významnou roli u metabolické rezistence psárky polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.) k účinné látce mefenpyr. Třetí fáze detoxikace herbicidu zahrnuje transport konjugovaných molekul do vakuol nebo mimobuněčných prostor aktivním transportem, na němž se nejčastěji podílejí ABC přenašeče (Bartholomew, 2003). ABC přenašeče se nacházejí na buněčných membránách a mají v rostlinách značné množství funkcí jako např. vylučování toxických sloučenin, translokaci mastných kyselin a fosfolipidů, sekvestraci sekundárních metabolitů nebo transport katabolitů z chloroplastu, auxinů a těžkých kovů za účelem udržení buněčné homeostáze. ABC přenašeče hrají významnou roli v herbicidní rezistenci díky schopnosti transportu a kompartmentace herbicidů a jejich metabolitů (Schulz, Kolukisaglu, 2006).

Ve čtvrté fázi detoxikace herbicidu dochází k dalším degradacím konjugovaných molekul ve vakuolách a mimobuněčných prostorech. Ve vakuolách např. dochází k odštěpení peptidů za vzniku cysteinu, který může být využit jako substrát pro tvorbu dalších aminokyselin (Yuan a Tranel, 2006).

2.3.2. Rezistence v místě účinku

Mechanismus rezistence v místě účinku je obvykle spojován se zamezením efektivního navázání herbicidu s cílovým místem z důvodu změny vazebného místa (Tharayil-Santhakumar, 2003). Cílovým místem jsou obvykle enzymy, proteiny nebo jejich komponenty, se kterými se herbicidy váží a tím narušují v rostlině základní funkce. Počet těchto míst účinku se pohybuje mezi 15-20 (Cobb, Kirkwood, 2000). Modifikace vazebného místa herbicidu většinou vzniká zpravidla jako důsledek jednobodových mutací genu, který kóduje enzym, se kterým by se herbicid normálně vázal. Záměna pořadí aminokyselin v primární struktuře cílového proteinu způsobená bodovou mutací umožní enzymu jeho normální funkci i za přítomnosti herbicidu (Devine, Eberlein, 1997). Díky těmto mutacím mohou enzymy v rostlině katalyzovat důležité biochemické reakce i za přítomnosti herbicidu, což rostlinám umožní dále přežít a rozmnožovat se (Tharayil-Santhakumar, 2003). Tyto změny již byly popsány u všech významných míst účinku herbicidů – D1 proteinů, ALS, ACCázy a EPSPS (Devine, Shukla, 2000).

Rezistence v místě účinku může být dále způsobena polymorfismem cílových enzymů herbicidů. Polymorfní molekulární formy enzymů (isozymy) jsou enzymy katalyzující stejnou reakci, které se liší sekvencí a složením aminokyselin. Variabilita metabolické aktivity je způsobena přítomností několika typů alel pro daný enzym, které předurčují různou aktivitu kódovaného enzymu. V populaci se tak vyskytují alely, u jejichž nositelů můžeme předpokládat rychlý metabolismus substrátů daného enzymu. Tento zrychlený metabolismus herbicidu může být příčinou rezistence.

Dalším případem rezistence v místě účinku je nadprodukce cílového enzymu, na který má herbicid působit. Enzym je produkován v pletivech rezistentního jedince v takové míře, že jej herbicid aplikovaný v normální dávce nepostačuje k zablokování veškerého jeho množství. Příčinou nadprodukce enzymu je zvýšené množství kopií genu pro cílový enzym. Zvýšená exprese genu může být způsobena několika mechanismy. Obecně se exprese zvyšuje během stresové odpovědi.

Genetický základ rezistence

Genetické studie zjistily, že target site rezistence je obvykle založena na jednom jaderném genu, jehož rezistentní alely vykazují vysoký stupeň dominance. Nicméně dědičné vlastnosti mohou být založeny různě:

- úplná dominance alel,
- neúplná dominance alel,
- recesivita alel,
- nejaderná, mateřská dědičnost chloroplastové deoxyribonukleové kyseliny (DNA),
- polygenně založená dědičnost.

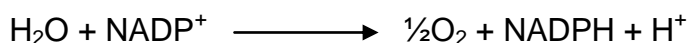
Stupeň dominance rezistentních genů je obzvláště důležitý u cizosprašných druhů, neboť plně recesivní geny se v heterozygotních jedincích ředí. Naopak stupeň dominance má jen malý význam pro vývoj rezistence u druhů, které jsou obligátně samosprašné, protože mezi potomstvem rezistentního jedince jsou vždy homozygoti nesoucí gen rezistence.

Je-li rezistence udělena recesivními alelami, trvá obvykle velmi dlouho, než se četnost alel v populaci dostane na takovou úroveň, aby se rezistence projevila. Je-li naopak rezistence udělována dominantními alelami, je šíření rezistentní populace výrazně rychlejší. Rezistence plevelů k triazinovým herbicidům není obvykle kódována chromozomální DNA, ale nejadernou DNA, která je v chloroplastech buněk mateřské rostliny. Z toho plyne, že gen rezistence se nemůže přenášet pylem, ale semena vzniklá na rezistentní rostlině produkují vždy rezistentní jedince. Předpokládá se, že vysoké dávky herbicidů podporují selekci target site rezistentních populací, jejichž rezistence je založena monogenně. Naopak nízké dávky herbicidů nebo herbicidy s nižší účinností podporují vznik polygenně založených rezistencí, jako je metabolická rezistence (Vila-Aiub, Ghersa, 2005; Neve, Powles, 2005).

2.4. Rezistence k významným skupinám herbicidů

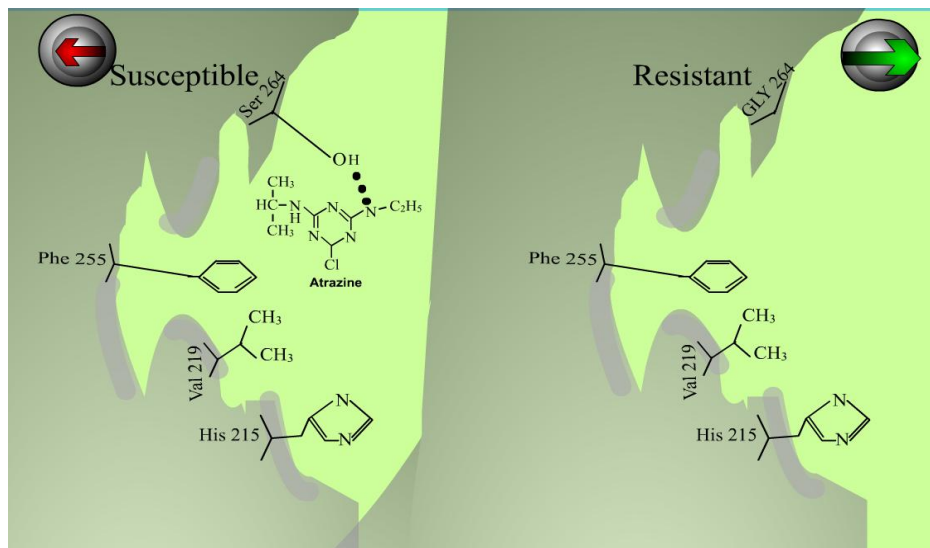
2.4.1. Rezistence k inhibitorům fotosystému II.

Mezi inhibitory fotosystému II (PS II) patří účinné látky z velké skupiny chemicky nepříbuzných sloučenin. Řadí se mezi ně např. triaziny (atrazin, simazin) triazinony, nitrily, pyridazinony, substituované močoviny (chlorotoluron, isoproturon) a další skupiny. Komplex PS II katalyzuje rozklad vody za uvolnění molekulárního kyslíku. Je součástí komplexu elektronového transportu, který se nachází na membránách thylakoidů v chloroplastech (Tharayil-Santhakumar, 2003). Zároveň je molekulami plastochinonu funkčně spojen s komplexem cytochromů b_6/f (Procházka, 1998). Mechanismus účinku inhibitorů PS II způsobuje inhibici Hillovy reakce (fotolýza vody) při fotosyntéze (Pfister, 1979).



Podstatou účinku je zabránění toku elektronů přes thylakoidní membránu chloroplastů k akceptorům prostřednictvím plastochinonů v PS II z důvodu vazby herbicidu na tzv. D1 (Qb) protein. Volné elektrony se hromadí v reakčním centru a vzniklá energie je absorbována chlorofylem a karotenoidy, v důsledku čehož dochází k jejich fotooxidaci (chloróza listů). Volná energie dále iniciuje tvorbu chlorofylových tripletů, které reagují s O_2 za vzniku jednomocných kyslíkových radikálů, které způsobují destrukci lipidových membrán (peroxidace), vylítí obsahu buněk do mezibuněčných prostorů a následně desikaci pletiv (nekrózy listů). Příznaky poškození rostlin herbicidem se projevují žloutnutím okrajů či špiček starších listů, které později nekrotizují (Fuerst, 1991). U rezistentních biotypů plevelů nedochází k adsorpci herbicidu ve vazebném místě na thylakoidní membráně a fotosyntéza tedy není přerušena (Pfister, 1979). Nejčastější příčinou rezistence k triazinům je bodová mutace *psbA* genu, který kóduje D1 protein v PS II. Při této mutaci dochází v D1 proteinu nejčastěji v pozici 264 (určení pozice aminokyseliny podle modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh). – pozn. autora) k nahrazení aminokyseliny serinu glycinem (obr. č. 1), což znemožní vazbu molekuly herbicidu s D1 proteinem a transport elektronů může probíhat i za jeho přítomnosti (Hirschberg a kol., 1984). Poměrně časté jsou i další mutace v pozicích 219, 266, 251 a 255 téhož genu, které snižují poutání triazinových

herbicidů na thylakoidní membránu chloroplastů. Rezistence je obvykle úplná, takže ani několikanásobné zvýšení dávky není efektivní (Gronwald, 1997). Plevelé rezistentní k triazinům vykazují rozdílný stupeň cross-rezistence k dalším PS II inhibitorům, především triazinonům a uracilům (Mengistu a kol., 2005). Ačkoliv se tyto herbicidy váží na stejný protein ve fotosystému II, každý herbicid se poutá na jiném místě tohoto proteinu, což je pravděpodobně hlavní příčinou rozdílného charakteru cross-rezistence vůči PS II inhibitorům (Moss, 2002). Dalším mechanismem rezistence k PS II inhibitorům může být metabolizace herbicidu. U rezistentních rostlin mračňáku Theophrastova (*Abutilon Theophrasti Medic.*) byla jako příčina rezistence k PS II inhibitorům zjištěna zvýšená aktivita enzymu glutathion-S-transferázy. Herbicid byl v rostlinách odbourán díky zvýšené konjugaci s glutathionem (Anderson, Gronwald, 1991). Poprvé byla rezistence k inhibitorům PS II popsána u starčku obecného (*Senecio vulgaris L.*) v roce 1968 (Ryan, 1970). Od té doby bylo popsáno již 70 plevelných druhů rezistentních k této skupině herbicidů (druhů Heap, 2013). Na našem území bylo dosud objeveno 14 rezistentních biotypů plevelů k triazinům (Mikulka, Slavíková, 2008). Podrobněji jsou popsány v příloze v tab. 21.



Obr. č. 1: Náhrada aminokyseliny serin za glycin v D1 proteinu v pozici 264 u rezistentní rostliny (zdroj: <http://plantandsoil.unl.edu>)

2.4.2 Rezistence k inhibitorům acetylkoenzym – A karboxylázy

Acetylkoenzym-A karboxyláza (ACCáza) je enzymatický komplex, který katalyzuje biosyntézu mastných kyselin nezbytných např. k tvorbě fosfolipidů, základu buněčných membrán (Burton a kol., 1987). Inhibitory ACCázy jsou reprezentovány třemi chemickými skupinami – cyklohexandiony, areloxy-fenoxypropionáty a fenylpyrazoly. Herbicidy z těchto skupin jsou známé jako graminicidy se systémovým účinkem používané k regulaci jednoletých i vytrvalých trávovitých plevelů. Mechanismem účinku těchto herbicidů je zabránění karboxylace acetylkoenzymu A a znemožnění vzniku malonylkoenzymu na metabolické dráze syntézy mastných kyselin (Preston, Mallory-Smith, 2001). Mají zpravidla výrazný účinek, ačkoliv první symptomy se objevují pomalu. Zasažené rostliny během 2-3 dní po aplikaci přestávají růst a nevytvářejí nové listy. V závislosti na počasí a růstové fázi trav tento proces trvá 14-28 dní (Buton a kol., 1987).

Příčinou výskytu rezistentních plevelů k inhibitorům ACCázy je ve většině případů pozměněné místo účinku herbicidu - mutace genu, který kóduje ACCázu (Tharayil-Santhakumar, 2003). Liu a kol. (2007) objevili u ovsa jalového (*Avena sterilis* L.) pět aminokyselinových substitucí - Ile-1781-Leu, Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn, a Asp-2078-Gly (číslováno podle *Alopecurus myosuroides* Huds.) souvisejících se vznikem rezistence k inhibitorům ACCázy. Záměny Ile-1781-Leu a Asp-2078-Gly udělují rezistenci k cyklohexandionům a aryloxyfenoxypropionátům (APPs), substituce Trp-2027-Cys a Ile-2041-Asn jsou příčinou rezistence pouze k APPs, a záměny Trp-1999-Cys udělují rezistenci k fenoxapropu. Tyto mutace jsou velmi pravděpodobně příčinou rezistence k inhibitorům ACCázy i u dalších trávovitých plevelů. Byly detekovány i další mechanismy – u rezistentních populací ovsa hluchého (*Avena fatua* L.) byl kromě target-site rezistence potvrzen dále zvýšený metabolismus a redukovaný příjem herbicidu diclofop (Maneechote, 1995). První případ rezistence k inhibitorům ACCasy byl zaznamenán u jílku tuhého (*Lolium rigidum* Gaud.) v Austrálii. Rezistentní populace jílku se zde vyseletovala po čtyřech letech opakované aplikace herbicidu diclofop (Heap, Knight, 2003). V současnosti je popsáno 42 rezistentních plevelů k herbicidům ze skupiny inhibitorů ACCázy (Heap, 2013).

2.4.3. Rezistence k inhibitorům stavby mikrotubulů

Mezi historicky nejstarší z této skupiny herbicidů patří dinitroaniliny, které inhibují polymeraci jednotek tubulinu nezbytnou k výstavbě mikrotubulů, důležitých při přímém dělení somatických buněk (mitóze) v meristematických pletivech (Devine, Preston, 2000). Dále se mezi tyto inhibitory řadí např. karbamáty, deriváty kyseliny benzoové a pyridiny. Rostliny zasažené těmito herbicidy ve fázi klíčení přestávají vzcházet, případně jsou slabé, mají retardované a deformované kořeny, mohou být zbarveny anthokyanově (Nováková a kol., 2005). Následkem inhibice stavby mikrotubulů dochází k zeslabení buněčných stěn, absenci dělicího vřeténka, čímž je znemožněn rozchod chromozómů při mitóze, vznik tetraploidních jader a cytokineze není dokončena. To je příčinou různých deformací kořenů a ztráty prodlužovacího růstu (Tharayil-Santhakumar, 2003).

Jako příčina vzniku rezistence některých druhů (např. oves hluchý, ježatka kuří noha) ke skupině inhibitorů stavby mikrotubulů byla zjištěna bodová mutace v α -tubulin genu. Záměna bází cytosinu za thymin způsobí změnu aminokyseliny threoninu v pozici 239 (číslování dle *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) za isoleucin. Tato záměna znemožní molekule herbicidu vazbu na tubulin nebo způsobí to, že se herbicid váže 60x slaběji (Preston, Mallory-Smith, 2001).

2.4.4. Rezistence k inhibitorům EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy)

Aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin a tryptofan) a další různorodé sloučeniny fenypropanoidového metabolismu (flavonoidy, ligniny, auxiny, antokyaniny, alkaloidy a kumariny) vznikají tzv. šikimátovou cestou. Zelené rostliny syntetizují tyto aromatické aminokyseliny v chloroplastech za přítomnosti enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS). Inhibice EPSPS je primárním místem působení těchto herbicidů. Sekundárně tyto herbicidy působí také na porfyrinový cyklus, ve kterém se syntetizují například chlorofyly, cytochromy, peroxidázy atd. Rostliny však obvykle hynou dříve, než dochází k projevům sekundárního působení. EPSPS inhibitory jsou snadno disociovatelné soli glyphosate isopropylamin (glyphosate-IPA) a trimesium (sulphosate). Herbicidně aktivní je však pouze glyphosátový anion (Devine a kol., 1993).

Glyfosát je neselektivní, systemický, postemergentní herbicid, který patří mezi celosvětově nejpoužívanější a nejrozšířenější herbicidy. Kontinuální

používání glyfosátu vedlo k selekci 13 plevelných druhů rezistentních k této účinné látce (Shaner, 2009). Rezistence ke glyfosátu se na polích poprvé objevila v populaci jílku tuhého (*Lolium rigidum* Gaudin.) v roce 1996 v Austrálii po více než patnáctiletém používání tohoto herbicidu (Powles a kol., 1998). Jako primární mechanismus rezistence byla u turanky kanadské (*Conyza canadensis* (L.) Cronq), *Conyza bonariensis* (L.) Cronq., jílku tuhého (*Lolium rigidum* Gaudin.) a jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum* Lamk.) detekována snížená translokace glyfosátu do meristemických pletiv (Shaner, 2009). Devin a Preston (2000) popisují rezistenci ke glyfosátu udělenou jednobodovou mutací *epsp* genu, která je způsobena substitucí aminokyseliny glycin za alanin v pozici 101 či záměnou aminokyseliny serin za prolin v pozici 106, ve vazebném místě herbicidu. Gaines a kol. (2010) studovali rezistenci ke glyfosátu u laskavce Palmerova (*Amaranthus palmeri* S. Watson) pomocí kvantitativní Real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) a u rezistentních biotypů zjistili o 6-160x více kopií genu pro enzym EPSPS v porovnání s citlivým biotypem. Zvýšené množství enzymu EPSPS u rezistentních rostlin nebyl glyfosát schopen inhibovat. Celkem je dnes známo šest příčin vzniku rezistence vůči glyphosatu – vakuolární sekvestrace, snížený příjem herbicidu, snížená translokace herbicidu do meristemických pletiv, zvýšená metabolizace herbicidu, zvýšená aktivita enzymu EPSPS vlivem bodové mutace v genu pro EPSPS, nadprodukce enzymu EPSPS a velmi pravděpodobné jsou kombinace těchto mechanismů (Sammons, 2013).

2.4.5. Rezistence plevelů k inhibitorům ALS (acetolaktát-syntázy)

Klíčovým enzymem biosyntézy esenciálních aminokyselin s rozvětveným řetězcem valinu, leucinu a isoleucinu je acetolaktát-syntáza (ALS) označovaná též z širšího pohledu jako acetohydroxyacid-syntáza (AHAS). Tento enzym katalyzuje dvě souběžné reakce, reakci dvou molekul pyruvátu, ze kterých vzniká 2-acetolaktát a konjugaci ketobutyátu s pyruvátem za vzniku acetohydroxybutyrátu (Duggleby, Pang, 2000). Na ALS se reverzibilně a nekompetitivně vážou herbicidy ze skupiny sulfonylmočoviny, imidazolinonů, triazolopyrimidinů, pyrimidinyl-thiobenzoátů a sulfonylaminokarbonyltriazolinů.

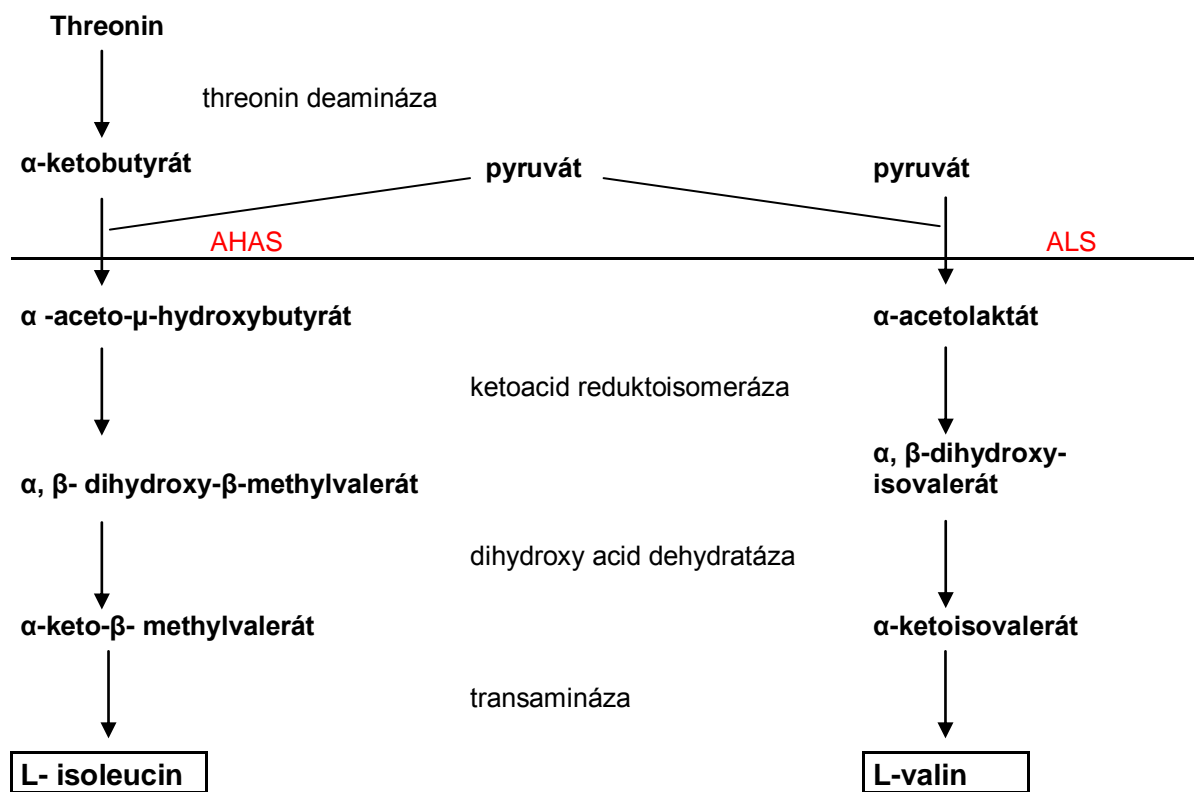
Porušení funkce ALS se bezprostředně projeví zastavením tvorby jmenovaných aminokyselin a následně i proteinů. Druhotným následkem zablokování těchto enzymů je inhibice syntézy DNA a zástava buněčného dělení

v meristemických pletivech, následně pak omezení transportu asimilátů vodivými pletivy (floémem) a zastavení růstu (Hock, Elstner 2005). Úhyn rostlin může trvat i několik týdnů, nejdříve odumírají meristemická pletiva a následuje pomalá nekróza zralých pletiv. Fyziologické změny, které následují po aplikaci herbicidu, zahrnují akumulaci cytotoxického ALS substrátu 2-ketobutyryátu nebo jeho derivátů (LaRossa a kol., 1987; Rhodes a kol., 1987) a nerovnováhu v obsahu aminokyselin (Höfgen a kol., 1995). U citlivých rostlin se objevují typické symptomy: zastavení růstu, žluté a fialové diskolorace na listech, nekrózy, zasychání a úhyn ještě před tvorbou semen (Delabays a kol., 2006).

Herbicidey ze skupiny inhibitorů ALS se začaly v zemědělství používat od 80. let minulého století, byly velmi rychle přijaty a rozšířily se do celého světa. V současnosti jsou sulfonylmočoviny registrovány v 80 zemích světa a používají se ve více než 25 plodinách (DuPont, 2012). Největší uplatnění nacházejí sulfonylmočoviny při regulaci plevelů v porostech obilnin. Výsledkem dlouhodobých aplikací je vznik velkého počtu rezistentních plevelů k této skupině (Powles, a kol., 1997). Poprvé byla rezistence plevelů k ALS inhibitorům objevena v roce 1987 již pět let po užívání sulfonylmočoviny chlorsulfuron u lociky kompasové (Mallory-Smith a kol., 1990). V současnosti je popsáno již 129 rezistentních plevelných druhů, většina z nich patří do skupiny dvouděložných plevelů, zastoupeny jsou ale i plevele jednoděložné (Heap, 2013).

Rezistence k ALS inhibitorům je z převážné většiny (80% případů) způsobena sníženou citlivostí cílového místa účinku herbicidů. V řadě případů jde tedy o rezistenci v místě účinku způsobenou modifikací genu kódujícího pro enzym ALS (Devine, Shukla, 2000). Rezistence k ALS inhibitorům může být podmíněna celou řadou bodových mutací. U velkého počtu testovaných biotypů na rezistenci k ALS inhibitorům bylo dosud objeveno a popsáno pět domén na genu *als*, kde dochází k nukleotidovým substitucím a záměnám aminokyselin. Na základě popsaných aminokyselin u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) byly tyto sekvence očíslovány jako Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Trp₅₇₄, Asp₃₇₆, Arg₃₇₇, Trp₅₇₄, a Ser₆₅₃ (Tranel, Wright, 2013). Mutace vykazují buď úplnou, nebo neúplnou dominanci, přičemž u většiny případů byla prokázána neúplná dominance. Protože tyto geny mají jadernou dědičnost, může se rezistence šířit pylem i semeny (Tranel, Wright, 2002). Situace se ještě komplikuje tím, že se může u jedince vyskytnout jedna až 5 kopií genu *als*. Vzhledem k tomu, že herbicidey ze skupiny

ALS inhibitorů patří mezi celosvětově nejrozšířenější a jejich spotřeba každoročně stoupá, můžeme očekávat další případy rezistence.



Obr. č. 2: Metabolická dráha syntézy aminokyselin L - isoleucinu a L - valinu a znázornění místa působení ALS inhibitorů

2.5. Vyjádření stupně rezistence

Stupeň rezistence lze určit na základě porovnání citlivého standardu a tolerantního/rezistentního biotypu. Rozdíly v míře herbicidní rezistence mezi jedinci téhož druhu lze vyjádřit pomocí hodnot LD_{50} (lethal dose), ED_{50} (effective dose) nebo I_{50} (inhibition). Hodnoty LD_{50} jsou dávky herbicidu, po jejichž aplikaci hyne 50% rostlin, ED_{50} je definováno jako dávka, při které dochází k redukci nadzemní biomasy z 50-ti % a I_{50} je koncentrace herbicidu působící 50%-ní inhibicí aktivity enzymu, na který se účinná látka herbicidu váže (Moss, 1995). Chceme-li vypočítávat ED_{50} , musíme mít v pokusu dávky, které pokryjí celou škálu účinností. Je třeba mít dávku, která bude mít účinnost kolem 20%, pak dávky pod a nad 50% a aspoň jednu dávku kolem 80%. Pokud máme dávky, které mají jen nízkou účinnost a jednu dávku těsně nad padesát procent, ED_{50} nelze vypočítat. (Veverka, 2009). V pokročilých statistických metodách lze tuto skutečnost částečně obejít použitím modelu s nastaveným horním limitem, nicméně ani v těchto případech nemusíme vždy dosáhnout uspokojivých výsledků. Porovnáním hodnot ED_{50} u jednotlivých biotypů lze odhadnout stupeň citlivosti či rezistence vůči různým herbicidům. Poměrem hodnot (ED_{50} citlivý biotyp/ ED_{50} rezistentní biotyp apod.) získáme faktor rezistence (RF). Tato relativní hodnota vyjadřuje, kolikrát větší dávku herbicidu musíme u rezistentního biotypu použít, aby bylo dosaženo stejné účinnosti jako u biotypu citlivého (Moss, 1995).

2.6. Metody stanovení rezistence

V polních podmínkách je téměř nemožné od sebe odlišit citlivé a rezistentní populace plevelů. Rozdíl většinou zaznamenáme až po zjištění nedostatečného účinku herbicidu na část populace (Tharayil-Santhakumar, 2003). Po vyloučení faktorů, které by se mohly podílet na selhání účinku herbicidu, je vhodné přistoupit k vlastnímu podrobnému testování a prověřování rezistence. Metody vhodné pro diagnostiku rezistentních plevelů mají obecnou platnost pro rezistenci vůči všem skupinám herbicidů, některé jsou specifické pro herbicid s určitým mechanismem účinku (Chodová, Salava, 2006).

2.6.1. Biologické studie

Růstový test

Jedná se o praktickou univerzální metodu, která spočívá v herbicidním ošetření rostlin vypěstovaných ze semen pocházejících z populace o neznámé citlivosti (s podezřením na rezistenci). Rostliny ošetřujeme podle typu přípravku stupňovanými dávkami herbicidu, jehož účinek nebyl v porostu dostatečný. Účinek herbicidu se hodnotí za jeden až čtyři týdny. Pro porovnání je vhodné mít otestovaný citlivý biotyp. Vlastní hodnocení může být vizuální. Silné poškození rostlin nebo jejich odumření znamená, že se jedná o citlivý biotyp, jestliže jsou rostliny bez viditelných příznaků, jedná se pravděpodobně o biotyp rezistentní. Tímto způsobem se také zjišťuje zastoupení rezistentních jedinců v populacích, ve kterých mohou být zastoupeny oba biotypy v různém poměru. Jestliže chceme porovnat účinek několika herbicidů, postupujeme tak, že ošetřujeme rostliny herbicidem s účinnou látkou dávkovanou podle doporučené polní dávky, případně jejího dvojnásobku. Po jednom až třech týdnech porovnáme čerstvou hmotnost a sušinu nadzemních částí plevelů ošetřených různými herbicidy s neošetřenou kontrolou. Uvedená metoda má univerzální použití pro testování rezistence u všech plevelů a vůči všem účinným látkám (Chodová, Salava, 2006).

Mezi růstové testy lze zahrnout také metodu stanovení rezistence z půdní zásoby semen. Z lokality s podezřením na rezistenci se odebírají vzorky půdy z hloubky 0-10 cm půdního profilu, z plochy 1 ha se provádí 10 odběrů. Odebraná zemina se promíchá a naplní se jí kontejnery nebo speciální nádoby, které se umístí buď do skleníku nebo do klimaboxu. Po vzejití rostlin a vytvoření

2 – 4 pravých listů se v každém kontejneru určí druhy plevelů, jejich počet a rostliny se ošetří herbicidem ve 2-3 stupňovaných dávkách. Za 1-2 týdny se hodnotí počet živých, tj. rezistentních a uhynulých, tj. citlivých rostlin (Mikulka, Slavíková, 2008). Metoda se používá převážně u postemergentně aplikovaných herbicidů.

Metoda vodních kultur a agarových půd

Při použití metody vodních kultur se naklíčená semena vkládají do speciálních nádob a vzrostlé rostliny se pěstují v živném roztoku s herbicidem. Rezistence či citlivost je hodnocena pomocí počtu uhynulých rostlin. Metoda agarových půd využívá pěstování rostlin v agarovém médiu s rozpuštěným testovaným herbicidem a sledování počtu živých a uhynulých rostlin (Mikulka a kol., 1999). Na tomto principu je založen RISQ test (Resistance In-Season Quick test) vypracovaný ve firmě Syngenta (Kaundun a kol., 2010), který je používán při detekci herbicidní rezistence k inhibitorům ALS a inhibitorům ACCasy především u trávovitých plevelů. Klíčící rostliny jsou ve fázi 1-2 listů přesazovány do Petriho misek na agarové médium, ve kterém je rozpuštěn herbicid ve zvolené koncentraci. Petriho misky jsou umístěny do růstových komor, fytotronů či skleníku s definovaným světelným režimem, teplotou a světelnou intenzitou a po 7-10 dnech po přesazení rostlin je hodnocena účinnost herbicidu. Sledován je rozvoj nových kořenů a listů a barevné změny na rostlinách. Výhodou metody je rychlý výsledek a možnost zavedení antirezistentního opatření ještě v daném vegetačním období.

2.6.2. Fyziologické a biochemické metody

Metoda stanovení aktivity Hillovy reakce

Tato metoda se uplatňuje u herbicidů, které narušují aktivitu fotosyntézy. Umožňuje porovnat aktivitu fotosystémů v přítomnosti herbicidu. Po izolaci chloroplastů ze zelených rostlin se po osvětlení a přidání umělého akceptoru elektronů polarograficky měří produkce kyslíku. Herbicid se přidává přímo k suspenzi chloroplastů do expoziční komůrky. U chloroplastů z citlivých rostlin je narušen přenos elektronů ve fotosystému II, což se projeví zastavením produkce kyslíku. U chloroplastů vyizolovaných z rostlin rezistentních probíhá produkce kyslíku i v přítomnosti herbicidu (Kočová, 1998).

Fluorescenční metoda

Fluorescenční metoda je využívána pro detekci rezistence především vůči PS II inhibitorům u rostlin během vegetace. Spočívá v rozdílném průběhu fluorescence chlorofylu po ošetření herbicidy u rostlin citlivých a rezistentních. Zvýšení úrovně fluorescence odpovídá změnám ve fotosystému II., které jsou důsledkem narušení funkce herbicidu. Jestliže je rostlina obsahující chlorofyl adaptována ve tmě a pak náhle osvětlena, projeví se zde různá úroveň fluorescenční aktivity, která je úměrná přeměně energie ve fotosyntéze. Průběh fluorescenční křivky a hodnoty z ní odvozené mohou být využity jako spolehlivý test pro změny fotosyntetické aktivity v závislosti na citlivosti rostliny (PS II) k herbicidu (Kočová, 1998).

Enzymatické studie

Metoda pro stanovení aktivity enzymu acetolaktát syntázy (ALS)

Pomocí této metody lze určit typ rezistence různých druhů rostlin vůči herbicidům ze skupiny ALS-inhibitorů, zejména k sulfonylmočovinám a imidazolinům. V současné době je využívána ke stanovení mechanismu rezistence, tedy zda se jedná o rezistenci metabolickou či rezistenci v místě účinku. Aktivita enzymu je zjišťována spektrofotometricky jako množství produktu – acetolaktátu, získaného z extraktu nadzemní části rostliny po dekarboxylaci v přítomnosti kyseliny za vzniku acetoinu. Specifická aktivita je poté vypočtena ze standardní křivky a vyjádřena jako množství vyprodukovaného acetoinu

za jednotku času. Přidáním herbicidu inhibujícího acetolaktát syntázu k rostlinnému extraktu je u citlivých rostlin zabráněno vzniku acetoinu. Vyšší obsah acetoinu indikuje přítomnost rezistence k těmto herbicidům (Singh a kol., 1988).

Metoda pro stanovení aktivity enzymu acetylkoenzym-A karboxylázy (ACCázy)

Pomocí této metody lze studovat mechanismy rezistence vůči herbicidům ze skupiny inhibitorů enzymu acetylkoenzym-A karboxylázy. Aktivita enzymu ACCázy je pomocí této metody kvantifikována měřením rychlosti inkorporace acetylkoenzymu A z H_4CO_3 do stabilního C14 produktu.

Studium aktivity enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS)

Touto metodou je nejčastěji studována rezistence ke glyfosátu. Tato rychlá a jednoduchá spektrofotometrická analýza je založena na stanovení aktivity fosfatázy pomocí měření odtržení p-nitrofenolu od p-nitrofenofosfátu. Aktivita enzymu EPSPS je vyjádřena jako množství meziprojektu – kyseliny šikimátové.

Studium změn absorpce a translokace herbicidu

Absorpce a translokace herbicidu v rostlinách je studována pomocí radioaktivně značených herbicidů. Nejčastěji se jedná o herbicidy značené radioaktivním izotopem uhlíku C14. Radioaktivně značená účinná látka je nejprve smíšená s testovaným herbicidem a poté je roztok aplikován na listy rostlin. Po čtyřech dnech působení jsou rostliny usušeny při 60°C a spáleny v tepelném oxidizéru. Uvolněný $^{14}\text{CO}_2$ je zachycen do směsi Carbo-Sorbu E a Permafluoru (Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV) a je stanoveno jeho množství. Radioaktivita vzorků je měřena pomocí scintilačního počítáče (Scintillation Counter, Beckman LS 6500) a procento absorbovaného herbicidu je vyjádřeno jako $[\text{kBq spáleného pletiva}/\text{kBq spáleného pletiva} + \text{kBq směsi z omytého listu}] * 100$. Vizualizace translokace herbicidu je provedena pomocí skeneru Phosphor Imager (Cyclone, Perkin-Elmer, Packard Bioscience BV). Ošetřené a následně omyté a vysušené rostliny jsou umístěny na fosforový filmový nosič po dobu 6 hodin a poté skenovány za účelem vizualizace rozmístění radioaktivních stop v rostlinných částech (González – ústní sdělení, 2009). Existují různé modifikace těchto popsaných metod studujících absorpci a translokaci herbicidu v závislosti na testovaných druzích a účinných látkách.

2.6.3. Molekulárně-genetické metody

V současnosti existuje řada molekulárně-genetických metod, které je možno použít pro detekci mutací způsobujících rezistenci plevelů vůči herbicidům (Chodová, Salava, 2006). Spočívají v přímém prokázání příslušné sekvence DNA kódující změnu pořadí aminokyselin, a tím i struktury či vazebného místa inhibovaného enzymu (Zima a kol., 2007). Mezi molekulárně-genetické metody patří sekvencování, restriční analýza (RFLP), polymerázová řetězová reakce (PCR) s alelově specifickými primery (PASA), ligázová řetězová reakce (LCR) a délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA (CAPS), pyrosequencing a další.

Výhodou molekulárních metod ve srovnání s biologickým testem je vedle jejich rychlosti i to, že jejich výsledek není ovlivňován podmínkami vnějšího prostředí (Chodová, Salava, 2006).

Izolace nukleových kyselin

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě (Rosypal, 2002). Základní principy izolace spočívají v uvolnění nukleových kyselin z vazby na proteiny rozrušením buněk a následném odstranění kontaminujících buněčných komponent. Pro izolaci se používá celá řada různých protokolů a v poslední době se často používají komerčně vyráběné speciální soupravy – kity (Zima a kol., 2004).

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Podstatou polymerázové řetězové reakce (PCR) je enzymatické zmnožení určitého úseku nebo více úseků DNA. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA vzorku se při hybridizují krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nové DNA zprostředkovaná dependentní DNA polymerázou (Břicháček, Krčmář, 1993). Jako primery se obvykle používají dva uměle připravené oligonukleotidy o délce zhruba 18 - 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá pak syntéza nových řetězců na obou matricových řetězcích protisměrně. Využívají se termostabilní polymerázy, které jsou izolovány z termofilních organismů, např. Taq-polymeráza z *Thermus*

aquaticus odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů, při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky – denaturace DNA, nasednutí primerů a polymerace (prodlužování primerů).

Tyto kroky se cyklicky opakují, pro dostatečnou amplifikaci původní molekuly DNA obvykle postačuje 30 cyklů. V případě, že na začátku byla ve vzorku pouze jediná molekula DNA, po 32 cyklech teoreticky dostaneme až 1 miliardu nasyntetizovaných molekul DNA. Jejich přítomnost v reakční směsi lze prokázat:

- stanovením jejich velikosti elektroforézou v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu
 - Southernovou hybridizací se značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku
 - stanovením sekvence DNA
- (Rozsypal, 2002)

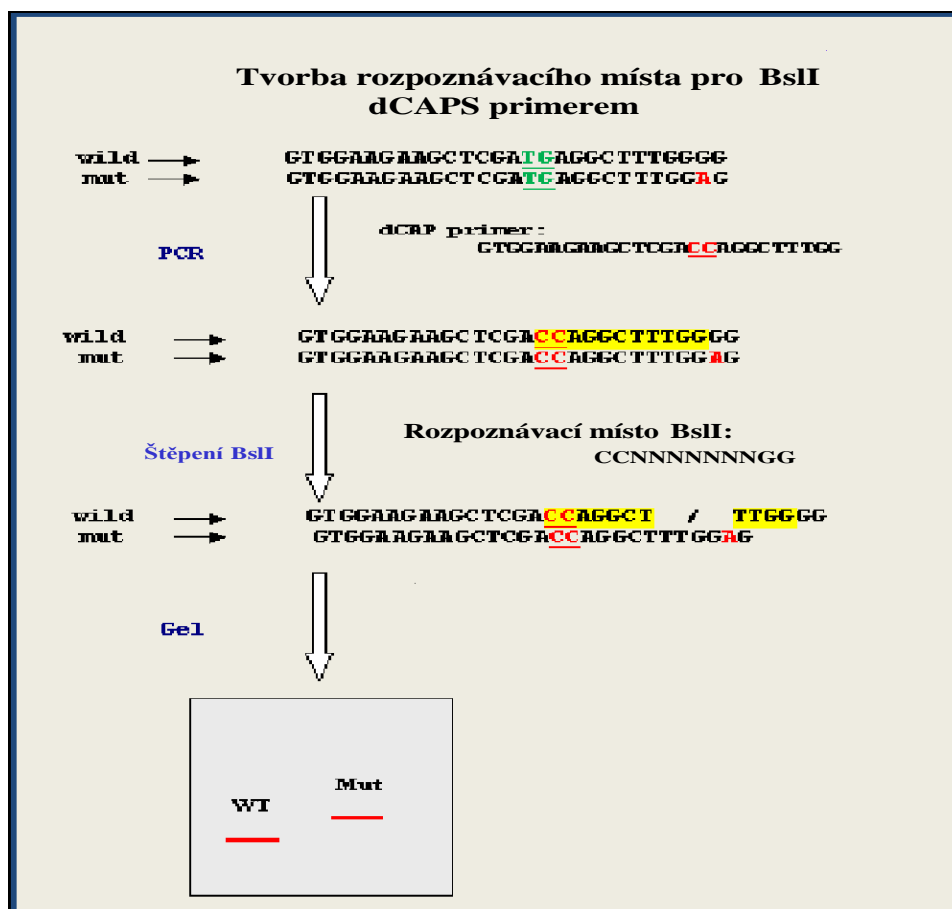
Sekvenování DNA

Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí bazí v molekulách DNA. V současnosti jsou k sekvenování DNA používány dvě principiálně odlišné metody. První je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin, zatímco druhá metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA. Sekvenací daného úseku DNA můžeme odhalit polymorfní místo genu přímo zodpovědné za daný fenotypový projev. Porovnáváním polymorfních úseků rezistentní a senzitivní rostliny můžeme nalézt mutace spojené se vznikem rezistence. V herbologii se tato metoda využívá k hledání mutací, které představují takovou změnu cílového místa – enzymu, že herbicid nemůže být na tomto místě poután.

Délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA (CAPS)

CAPS patří mezi molekulárně genetické metody založené na PCR. Jedná se o obdobu RFLP, avšak štěpení je místo původní genomické DNA prováděno na amplifikovaných produktech. Použití této metody je omezeno pouze na detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), které jsou cílovým místem příslušných restričních endonukleáz. Pro nalezenou restriční endonukleázu jsou výsledkem digesce PCR produktu specifické elektroforetické vzorce (počet a délka fragmentů) odpovídající jednotlivým alelám. Odvozená metoda dCAPS (Derived

Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) se liší od CAPS zejména v použití specifických primerů, které jsou navrženy jako částečně nekomplementární, obsahují jednu nebo dvě záměny nukleotidů. V průběhu amplifikace dojde k přenesení této mutace na cílovou sekvenci. Výsledkem je vznik unikátního restrikčního místa u jedné ze studovaných alel (Hrubá, 2007). Tato metoda se využívá v případě, kdy se ve zkoumané sekvenci nalézá určité polymorfní místo, které ovšem neleží v cílové sekvenci žádné vhodné restrikční endonukleasy. Principem metody je navržení primerů, jež nejsou shodné se zkoumanou sekvencí, ale obsahují tzv. mismatch (jeden či více nukleotidů primeru se liší od sekvence templátu). V PCR reakci s těmito primery je do cílové sekvence vnesena taková mutace, že zkoumaný polymorfismus je součástí sekvence rozpoznávané určitou restrikční endonukleasou (Obr. č. 3). Následující postup je stejný jako u metody CAPS, s tím rozdílem, že místo standardní PCR se používá nested PCR. V první PCR reakci se použijí primery amplifikující požadovanou sekvenci se širším okolím a templátem je genomická DNA (Neff et al. 1998). Metoda dCAPS umožňuje také přesné rozlišení homozygotních a heterozygotních jedinců a stanovení mutantních alel v populaci (Kaundun, Windass, 2006).



Obr. č. 3: Schéma metody dCAPS

upraveno dle:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechDCAPS.shtml>)

2.7. Charakteristika studovaného plevelu - chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.)

2.7.1. Botanická charakteristika

Chundelka metlice je jednoletá tráva z čeledi *Poaceae*. Vytváří volné trsy, má ploché žlutozelené, 3-5 mm široké, na líci drsné listy. Jazyček bývá protáhlý, zpravidla roztřepený, až 6 mm dlouhý. Mladé listy jsou v pochvě stočeny. Pochvy listů bývají hladké nebo pouze mírně drsné. Listová čepel je na líci žebrovaná. Trichomy bývají na líci četnější a delší než na rubu listu. Stéblo je chudě olistěné, hladké, lesklé, přímé nebo kolénkatě vystoupavé. Bohatá jehlancovitá lata se skládá z tenkých, drsných, obvykle vlnovitě zprohýbaných větví až 10 cm dlouhých, jež nesou drobné osinaté klásky. Klásky mají nestejně velké plevy, na hřbetě draslavé. Plucha je kopinatá, dlouze osinatá, pluška o něco menší, bezosinná (Regal, 1953).

Rostliny chundelky metlice jsou poměrně vzrůstné a dosahují výšky přes 100 cm. V případě dostatku prostoru silně odnožují. Jedna rostlina je schopna vytvořit i několik desítek lat. V porostech je nepřehlédnutelná vzhledem k charakteristické červenohnědé až nafialovělé barvě klásků (Mikulka, Kneifelová, 2004). Podle Dostála (1989) je počet chromozomů $2n = 14$.

2.7.2. Biologické vlastnosti

Na základě Hronovy a Kohoutovy klasifikace plevelů (1988) podle jejich biologických vlastností (zvl. vytrvalosti, rytmu růstu a vývoje během vegetace, způsobu rozmnožování apod.) lze chundelku metlici zařadit mezi plevely jednoleté ozimé (přezimující).

Obilky chundelky metlice mají po uzrání jen krátkou dormanci a snadno klíčí (Koch, 1970). Nejvíce chundelka metlice klíčí na podzim za vhodné teploty a vlhkosti v ozimých plodinách. Ke klíčení na podzim stačí výskyt rosy. Proto masově vzchází i v suchých periodách především na lehké písčité nebo skeletovité půdě, kdy na těchto částicích dochází v nočních hodinách při poklesu teplot ke kondenzaci vody (Mikulka, Kneifelová, 2004). Obilky také mohou klíčit časně na jaře za příznivé teploty a vlhkosti a zaplevelovat tak i zaseté jařiny. Nejlépe klíčí a vzchází z povrchu půdy, případně těsně pod povrchem půdy (Fišer, 2002). Životnost obilek v půdě je jen krátká. Podle Kocha a Hurleho (1978) je životnost obilek přibližně jeden až čtyři roky. Obilky mají delší životnost

v laboratorních podmínkách, a to více než pět roků (Nový, 1992). Koch (1970) udává délku životnosti obilek v laboratorních podmínkách na 13 až 20 let.

Chundelka metlice se rozmnožuje výhradně generativně. Hlavním obdobím kvetení je červen a červenec. Rostliny, které vzejdou později, např. na okrajích polí a na nezemědělské půdě, mohou kvést až do podzimu. Na orné půdě obilky dozrávají zejména v červenci (Szekeres, 1991), ještě před dozráním ozimých obilnin a řepky ozimé. Chundelka metlice vytváří velké množství malých, lehkých obilek a jedna rostlina jich může vyprodukovat až 16 000 kusů. V ozimém ječmeni jich běžně vytváří 600-850, v ozimé pšenice 1300-5000 (Melander, 1993). Produkce semen je závislá na délce vegetačního období, na počtu odnoží a konkurenceschopnosti plodiny (Hurle, 1993).

Semena chundelky metlice jsou vzhledem ke své malé velikosti a nízké hmotnosti snadno rozšiřovány pomocí větru (anemochorně). Velké množství zralých obilek se šíří barochorně - vypadáváním vlivem gravitace přímo pod mateřskou rostlinu na půdu ještě před dozráním pěstovaných plodin. Dále se mohou na delší vzdálenosti rozšiřovat hydrochorně při přívalech vody, vodní erozi, popř. vodními toky (Warwick a kol. 1985).

2.7.3. Rozšíření a škodlivost chundelky metlice

Chundelka metlice je domácí v Evropě a severní Asii (Hron, Vodák, 1959). Hlavní rozšíření má v pásu od Středního východu přes jihovýchodní a střední Evropu až po Velkou Británii, kde však je již její výskyt poměrně řídký. Severní hranice rozšíření v Evropě je vymezena přibližně 70° severní šířky (Wellmann, Fecht, 2002). Z celosvětového pohledu má chundelka metlice pouze okrajový hospodářský význam. V ČR však patří k nejvýznamnějším plevelům ozimých obilnin.

V našem státě se hojně vyskytuje od nížin až po horské oblasti. Ve velké míře zejména ve vlhčích letech nebo na vlhčích stanovištích, často též při okrajích polí, na mezích apod. (Deyl, 1956).

V několika posledních letech došlo na území celého našeho státu k poměrně významnému rozšíření chundelky metlice (Mikulka, Kneifelová, 2004). K jejímu šíření výrazně přispěly změny v pěstebních systémech, především značné zúžení spektra pěstovaných plodin, dominance ozimých obilnin v osevních postupech,

časné podzimní setí a minimalizace v orebních technologiích. Nejsilnější výskyty byly zaznamenány v západní části republiky v blízkosti Českého lesa, na Českomoravské vrchovině a východní části Moravy (Soukup a kol., 2006). Během posledních let se velmi rozšířila v Německu, Polsku, Rakousku a na Slovensku. V Německu je po psárce polní druhým nejrozšířenějším trávovitým plevelem. Rozšíření chundelky metlice v Německu bylo umožněno hlavně díky snížení ploch jarních obilnin ve prospěch pěstebních ploch ozimých obilnin (Hurle, 1993). Hintzsche a Wittmann (1992) uvádějí, že za značné rozšíření vděčí zejména minimalizaci ve zpracování půdy a vysokému zastoupení ozimů ve struktuře plodin. Ztráty na výnosech způsobuje zejména v porostech ozimé pšenice a ozimého ječmene, ve kterých má nejlepší růstové podmínky (Gerowitt a Heitefuss, 1990, Melander, 1995). Škodlivě se může projevit i v ozimé řepce, ve víceletých pícevinách a v ozimých zeleninách. Při vzejití časně zjara zapleveluje chundelka metlice řídké porosty ozimů a brzo seté jařiny, což je způsobeno změnami v cyklech vzcházení, které se pravděpodobně z důvodu převažující podzimní ochrany posunují u některých biotypů do jarního období (Soukup, 2006). Vysoká škodlivost je z velké míry dána její vzrůstností a delším vývojovým cyklem, protože laty zastiňují porost obilniny nejvíce právě v době nalévání zrna (Soukup a kol., 2005). Vokřál (2007) uvádí, že při výskytu 100 lat chundelky metlice na 1 m² může dojít ke snížení výnosu pšenice ozimé až o 0,5-1,2 t z hektaru.

2.7.4. Současné možnosti regulace chundelky metlice

Preventivní a nechemické metody

K preventivnímu opatření proti rozšiřování chundelky metlice patří dodržování osevního postupu. Je zapotřebí se především vyhnout sledu 2-3 ozimých plodin. Obilky chundelky klíčí výborně z vrchních vrstev ornice, nejlépe pak z povrchu půdy. Z tohoto důvodu není příliš vhodné bezorebné zpracování půdy, kdy obilky chundelky zůstávají na povrchu půdy a lépe klíčí. Obilky chundelky metlice zaklopené orbou hlouběji do půdy nemají možnost vzcházet

a konkurovat tak pěstované plodině (Náměstek, 2008). Účinnou nechemickou metodou ochrany je opakované vláčení prutovými nebo síťovými branami v raných růstových fázích chundelky metlice (Mikulka, Kneifelová, 2005).

Chemická ochrana

Chundelku metlici je možné s úspěchem potlačovat vhodnými herbicidy, jejichž portfolio proti tomuto plevelu je široké a umožňuje provést ošetření v různých plodinách, růstových fázích a aplikačních termínech.

K regulaci je registrováno mnoho účinných látek z různých chemických skupin herbicidů. Mezi nejpoužívanější patří v České republice sulfonylmočoviny ze skupiny inhibitorů ALS, substituované močoviny ze skupiny inhibitorů PS II a dinitroaniliny (inhibitory stavby mikrotubulů). V ozimých obilninách a ozimé řepce jsou upřednostňovány preemergentní a časně postemergentní aplikace, které mají většinou vysoký účinek.

Preemergentní ošetření ozimých obilnin je možné použít při očekávaném vysokém podzimním zaplevelení. Pro tento způsob ošetřování mohou být použity přípravky na bázi pendimethalinu (Stomp 330 E, Stomp 400 SC, Maraton), dále prosulfocarb (Boxer) a isoproturonu (Maraton, Protugan 50 SC, atd.) a další. Pro dosažení dobré účinnosti preemergentních aplikací je nezbytné vytvoření drobtovité struktury půdy a dostatečná vlhkost půdního povrchu. Účinnost na chundelku, která vzchází z povrchových vrstev půdy, bývá velmi dobrá. Problémem může někdy být poměrně dlouhé období od preemergentní aplikace až do jara, kdy může účinek herbicidu za nepříznivých podmínek prostředí odeznít.

Vysokou spolehlivost na vzešlou chundelku do fáze tři listů mají podzimní postemergentní aplikace. Dlouhá léta používanými účinnými látkami pro tento aplikační termín jsou isoproturon a chlortoluron. Ze skupiny sulfonylmočoviny je vhodný pro tento aplikační termín chlorsulfuron (Glean 75 WG), během odnožování až počátku sloupkování chundelky pak iodosulfuron (Husar) nebo sulfosulfuron (Monitor 75 WDG). Proti chundelce metlici je možno použít i propoxycarbazone-sodium (Attribut 70 WG), ale jeho účinnost v pokročilejších růstových fázích konce odnožování již nebývá při vyšším výskytu chundelky dostatečná. (Nováková a kol., 2005).

Pokud se chundelku metlici nepodaří potlačit do začátku sloupkování obilniny (selhání účinnosti herbicidu či z jiných důvodů), je možno použít fenoxaprop (Puma Extra) nebo pinoxaden (Axial), které na jednoleté plevelné trávy účinkují až do fáze přibližně druhého kolénka, i když účinnost se samozřejmě s pokračující růstovou fází snižuje. Nejspolehlivějšího účinku dosáhneme, pokud aplikujeme přípravek v růstové fázi chundelky od tří listů až do fáze prvního kolénka. Pokud je aplikace opožděná, účinek je slabší, avšak rostliny jsou přinejmenším silně retardovány v růstu (Jursík a kol., 2007)

Tab. č. 2: Přehled nejvýznamnějších účinných látek herbicidů používaných k regulaci chundelky metlice v obilninách v ČR

Skupina HRAC	Mechanismus účinku	Chemická skupina	Účinná látka
A	Inhibice acetyl-CoA karboxylázy (ACCase)	Aryloxyfenoxo-propionáty 'tzv. FOPy' DENy	fenoxaprop-P-ethyl pinoxaden
B	Inhibice acetolactát syntázy (ALS, též acetohydroxyacid syntáza AHAS)	Sulfonylmočoviny	chlorsulfuron flupyrsulfuron-methyl-Na iodosulfuron sulfosulfuron mesosulfuron
		Sulfonylaminocarbonyl-triazolinony	propoxycarbazone-Na
		Triazolopyrimidines "TPS"	pyroxulam
C2	Inhibice PS II (fotosyntézy ve fotosystému II)	Substituované močoviny	chlorotoluron isoproturon
F1	Inhibice biosyntézy karotenoidů (PDS)	Pyridinecarboxamide	diflufenican
K1	Inhibice tvorby mikrotubulů	Dinitroaniliny	pendimethalin trifluralin

2.7.5. Rezistence chundelky metlice k herbicidům

První výskyty rezistentních biotypů chundelky metlice byly popsány v polovině devadesátých let ve Švýcarsku. Konkrétně se jednalo o rezistenci vůči účinné látce isoproturon (inhibitor PS II). Biotypy vykazující rezistenci byly nalezeny na pokusných pozemcích ve výzkumné stanici v Changins. Výzkum prokázal, že tyto biotypy mají křížovou rezistenci k dalším herbicidům ze skupiny inhibitorů PSII (Mayor, Maillard, 1997). Další případ rezistence chundelky metlice k isoproturonu byl objeven v roce 1997 v Německu (Niemann, 2000). Niemann a Zwerger (2006) ve svých pokusech popisují z celkem 90 testovaných biotypů 21 jako rezistentních k isoproturonu. Jeden biotyp prokazoval dále rezistenci i k iodosulfuronu, propoxycarbazonu a fenoxapropu, citlivý byl k sulfosulfuronu. Pomocí molekulárních analýz dále zjistili u některých rostlin, které přežily ošetření fenoxapropem, křížovou rezistenci k účinným látkám se stejným mechanismem účinku (inhibice ACCázy) - clodinafopu, cycloxydimu a sethoxydimu. První případy rezistence chundelky metlice vůči sulfonylmočovinám byly objeveny a popsány začátkem 21. století. V Polsku byla ve skleníkových pokusech prokázána rezistence chundelky metlice vůči chlorsulfuronu aplikovanému ve stupňovaných dávkách ve výši 0,5 - 64 násobek doporučené dávky. Účinnost se objevila až při dávce 180 g.ha⁻¹. 360 g.ha⁻¹ kompletně regulovalo oba biotypy, jak citlivý, tak i rezistentní (Marczewska, Rola, 2002). Své pokusy opakovali Marczewska a Rola v následujících letech. V roce 2005 při testování dalších biotypů zjistili, že při dávce 360 g.ha⁻¹, která byla v předchozím pokuse dostatečná, dochází k redukci nadzemní hmoty u rezistentního biotypu pouze z 25%. Nižší dávky (1-4 násobky doporučené dávky) ve stejném pokusu způsobovaly poškození rostlin maximálně do 10% jejich hmotnosti. V dalším experimentu (2006) vykazovaly rezistentní rostliny při 32 násobné dávce velmi malé růstové poškození a redukce jejich biomasy byla oproti neošetřeným rostlinám asi 25%. U rezistentních rostlin byl zjištěn výrazně vyšší obsah aminokyselin, které jsou výsledkem exprese genu *als*. Tyto výsledky ukazují na pravděpodobnost rezistence v místě účinku. Adamczewski a Kierzek (2010) objevili mezi 35 polskými vzorky 3 biotypy rezistentní k fenoxapropu. Tyto biotypy byly testovány deseti stupňovanými dávkami této účinné látky a dále účinnou látkou pinoxaden. U dvou biotypů byly pomocí nelineární regresní analýzy vypočteny hodnoty faktorů rezistence

k fenoxaprofu 5,0 a 6,4 a k pinoxadenu 8,4 a 10,5, na jejichž základě lze prohlásit, že biotypy jsou k těmto herbicidům rezistentní. Stejné biotypy vykazovaly také křížovou rezistenci k inhibitorům ALS.

Studiem příčin a mechanismů rezistence chundelky metlice k ALS inhibitorům se zabývali Balgheim a kol. (2007). Při měření aktivity enzymu ALS v přítomnosti účinných látek sulfosulfuron a propoxycarbazone zjistili statisticky významné rozdíly mezi rezistentním a citlivým biotypem. Po sekvenci příslušného úseku genu *als* objevili bodovou mutaci zodpovědnou za záměnu enzymu. V pozici 197 byla nalezena substituce nukleotidu cytosin za adenin způsobující záměnu aminokyseliny prolin za treonin.

Metabolickou rezistenci chundelky metlice se podrobněji věnuje studie Massy a kol. (2010). Ve své práci se zabývali degradací sulfosulfuronu a detekcí a kvantifikací specifických metabolitů tohoto herbicidu v testovaných populacích chundelky metlice za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s využitím detektoru s diodovým polem (HPLC/DAD) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS). Sledována byla degradace sulfosulfuronu u populací chundelky metlice, u kterých nebyla v genu *als* nalezena mutace. U všech testovaných populací byla zjištěna zvýšená degradace sulfosulfuronu, jako primární metabolit byl detekován desmethyl sulfosulfuron, jehož přítomnost naznačuje, že prvním degradačním krokem sulfosulfuronu u chundelky metlice je přímá demethylace zajištěna enzymatickým komplexem cytochrom P450 monooxygenázou.

V České republice se problematikou rezistence chundelky metlice a jejích mechanismů dlouhodobě zabývá Hamouzová a kol. (2011). První rezistentní populace chundelky metlice pocházejících z jižních Čech objevili již roku 2005. Jednalo se o populace s vysokým faktorem rezistence (6,7-1815) vůči účinné látce chlorsulfuron. V roce 2011 publikovali výsledky o křížové rezistenci ke třem sulfonylmočovinám, které jsou k regulaci chundelky velmi často používané - chlorsulfuronu, sulfosulfuronu a iodosulfuronu. Rezistence byla potvrzena nádobovými, polními a enzymatickými studii. Rozlišné stupně rezistence u těchto populací naznačily, že se mechanismy uvnitř jednotlivých populací budou lišit.

Tab. č. 1: Doposud popsané rezistentní populace APESV ve světě

Země výskytu	Popsána v roce	Plodina	Účinná látka	Místo účinku
Česká republika	2005	obilniny, ozimá pšenice	chlorsulfuron, iodosulfuron-methyl-sodium, isoproturon, mesosulfuron-methyl, pyroxsulam, sulfosulfuron	ALS inhibitory (B/2) PS II inhibitory (C2/7)
Dánsko	2011	ozimá pšenice	iodosulfuron-methyl-sodium, sulfosulfuron	ALS inhibitory (B/2)
Německo	1997	obilniny, ozimá pšenice	isoproturon	PSII inhibitory (C2/7)
Německo	2005	pšenice	chlorsulfuron, florasulam, flupyrsulfuron-methyl-sodium, iodosulfuron-methyl-sodium, mesosulfuron-methyl, pyroxsulam, sulfometuron-methyl, sulfosulfuron	ALS inhibitory (B/2)
Německo (mnohonásobná rezistence)	2009	ječmen, ozimá pšenice	fenoxaprop-P-ethyl, iodosulfuron-methyl-sodium, isoproturon, mesosulfuron-methyl, pinoxaden, pyroxsulam, sulfosulfuron	ACC inhibitory (A/1) ALS inhibitory (B/2) PS II inhibitory (C2/7)
Polsko	2005	ozimá pšenice	chlorsulfuron, iodosulfuron-methyl-sodium, procarbazon-sodium, sulfosulfuron	ALS inhibitory (B/2)
Polsko	2010	ozimá pšenice	fenoxaprop-P-ethyl, pinoxaden	ACC inhibitory (A/1)
Švýcarsko	1994	pšenice	isoproturon	PS II inhibitory (C2/7)

Zdroj: Heap (2013)

3. CÍLE PRÁCE

Chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) je vysoce škodlivým plevelem a patří k ekonomicky nejzávažnějším plevelům ozimých obilnin ve střední Evropě. V několika posledních letech se na našem území značně rozšířila a dnes zapleveluje přibližně 80% ploch s ozimými obilninami. V roce 2006 byly v ČR publikovány první případy rezistence chundelky metlice k inhibitorům ALS. Vzhledem k obtížnosti hubení rezistentních populací je důležité význam tohoto problému nepodcenit a je nezbytné mít zavedeny efektivní metody pro detekci dalších rezistentních biotypů a důsledně v těchto lokalitách uplatňovat antirezistentní strategie. Tato práce si klade následující cíle:

1. Provést monitoring lokalit s pravděpodobným výskytem rezistentních biotypů chundelky metlice vůči nejpoužívanějším účinným látkám herbicidů a potvrdit jejich rezistenci.
2. U biotypů s potvrzenou rezistencí pomocí exaktních laboratorních metod popsat její typ a mechanismus.
3. Otestovat a navrhnout účinné látky herbicidů použitelné v lokalitách s výskytem rezistentních populací.

Testovány budou následující výzkumné hypotézy:

1. Na území České republiky se v lokálních populacích chundelky metlice vyskytují biotypy rezistentní vůči dlouhodobě používaným skupinám herbicidů ze skupiny inhibitorů enzymu acetolaktát syntázy.
2. Rezistence je geneticky podmíněna strukturální změnou cílového enzymu herbicidního účinku inhibitorů ALS - acetolaktát syntázy.
3. Nalezené biotypy pravděpodobně mají další mechanismy rezistence, jako je snížený příjem nebo metabolizace účinné látky.
4. Ze současného sortimentu herbicidů lze vybrat takové, které účinkují i v rezistentních populacích.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Pokusný materiál

Za účelem získání vhodného rostlinného materiálu pro následné laboratorní a skleníkové experimenty byly v průběhu let 2005-2010 vytipovány lokality, kde na polích s ozimými obilninami v posledních letech docházelo k neúspěšné regulaci chundelky metlice. Na základě komunikace s agronomy bylo zjištěno, že na těchto polích byly v minulosti opakovaně aplikovány sulfonylmočovinné herbicidy. Celkem bylo v pokusech na rezistenci testováno 23 biotypů. Jako citlivý standard byl vybrán český biotyp z lokality Benešov u Kamenice nad Lipou (49°20'46.632"N, 15°0'22.204"E) z pozemku ekologického zemědělce, druhý otestovaný citlivý biotyp pocházel ze Švýcarska a byl poskytnut firmou Syngenta.

Z rostlin, které přežily aplikaci herbicidů, byly v době dozrávání lat odebírány vzorky semen. Z každé vytipované lokality bylo v červenci před sklizní obilniny v transektu sebráno přibližně 100 g semen, což odpovídá cca 300 rostlinám chundelky metlice. Laty byly v laboratoři dosušeny a poté z nich byly získány obilky, které byly do výsevu uchovány ve tmě při teplotě 20 °C. Pro účely testování rezistence pomocí metody agarových kultur byly z vytipovaných polí s ozimými obilninami na jaře odebírány klíčící rostliny ve fázi dvou až tří listů. Z každého pole bylo odebráno 200-300 rostlin.

Herbicidy

V biologických, fyziologických i metabolických studiích byly použity komerční formulace herbicidů poskytnuté výrobcí. Konkrétně se jednalo o: Glean 75 WG, (75% chlorsulfuron, DuPont), Husar (5% iodosulfuron-methyl-Na, Bayer CropScience), Atlantis WG (iodosulfuron-methyl-sodium- 6g.kg⁻¹, mesosulfuron-methyl- 90g.kg⁻¹, Bayer CropScience), Powerflex (7,5% úč. l. pyroxsulam, Dow AgroSciences), Oust (75% sulfometuron methyl, DuPont), Puma Extra (69 g.kg⁻¹ fenoxaprop-P-ethyl, Bayer CropScience) a Axial (100g.l⁻¹ pinoxaden, Syngenta). Herbicid Powerflex u nás v době pokusu nebyl registrován. V současnosti je u nás dostupný pod obchodním názvem Corello (7,5% úč. l. pyroxsulam, Dow AgroSciences).

4.2. Biologické studie

4.2.1. Stanovení citlivosti vybraných biotypů k herbicidům

Za účelem zjištění stupně rezistence a citlivosti chundelky metlice vůči různým účinným látkám herbicidů ze skupiny inhibitorů enzymů acetolaktátsyntázy a acetylkoenzym-A karboxylázy byly na třech vybraných biotypech (Lomnice, Vlastějovice, Dynín) provedeny růstové analýzy sledující reakci rostlin na dávku herbicidu (tzv. dose-response assay). Účinnost vybraných herbicidů byla zároveň testována na citlivém biotypu z lokality Benešov u Kamenice nad Lipou, u kterého je znám faktor rezistence vůči účinné látce chlorsulfuron. Rostliny byly pěstovány v kryté vegetační hale. Do plastových nádob o rozměrech 50 x 50 x 70 mm byly vysety obilky chundelky metlice. Pro výsev byla použita půda z demonstračního pokusného pozemku ČZU (černozem), která neobsahovala žádná rezidua pesticidů a obilky chundelky metlice. Obsah jílových částic byl 46 %, pH (KCL) 7.5, sorpční kapacita: 209 mmol (+), 87 ppm P, 203 ppm K, 197 ppm Mg, a 8073 ppm Ca. Po vzejití rostlin chundelky metlice bylo provedeno jednocení na 10 – 15 rostlin na jednu nádobku. Rostliny byly zalévány podmokem ad libitum a dvakrát za vegetaci přihnojeny hnojivem N-P-K (6-12-6), hnojení bylo provedeno záhlvkou. Postemergentní listová aplikace herbicidů byla provedena ve fázi 2 - 3 listů chundelky metlice. Za účelem zjištění ED₅₀, RF a letální dávky herbicidů byly aplikovány stupňované dávky herbicidů uvedené v tabulce č. 3. V případě herbicidu Glean 75 WG bylo zvoleno jiné dávkování. Aby mohla být vypočtena hodnota ED₅₀, byla jako nejnižší dávka zvolena doporučená aplikační dávka, jelikož tato již by měla spolehlivě regulovat citlivý biotyp. Každá varianta měla čtyři opakování. Aplikace herbicidů byla provedena přesným laboratorním postřikovačem AVIKO 5, byla použita tryska Lurmark 01 E 80 a nastaven tlak na hodnotu 0,23 MPa, celkový objem postřikové kapaliny odpovídal dávce 250 l.ha⁻¹. Rostliny chundelky metlice bylo také nutno ošetřit proti padlí travnímu. K tomuto účelu byl použit systémový fungicid Fandango 200 EC v registrované dávce (účinná látka fluoxastrobin 100 g.l⁻¹, prothioconazole 100 g.l⁻¹, BayerCropScience, ČR). Účinnost herbicidů byla měsíc po aplikaci hodnocena procenticky odhadovou metodou - porovnáním s neošetřenými vzorky na základě typických symptomů (chlorózy, zástava růstu, nekrózy). Dále byla odebrána a zvážena čerstvá nadzemní biomasa, usušena při teplotě 105 °C a sušina rovněž zvážena.

Statistické zpracování dat a modelování bylo provedeno pomocí software R-project R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008). Na základě nelineárních modelů byly sestaveny grafy a pro každý biotyp vypočteny hodnoty ED₅₀ (g.ha⁻¹) a stanoveny faktory rezistence RF jako podíly hodnot ED₅₀ rezistentního a citlivého biotypu.

Výsledky byly popsány pomocí parametrů nelineárních rovnic s vyjádřením směrodatné odchylky průměrů ze čtyř opakování. Byly použity různé modely na základě tzv. lack-of-fit testů, byly vybrány nejvhodnější pro daný biotyp a herbicid. Jednotlivé rovnice (viz níže) jsou obecně parametrizovány takto: y je závisle proměnná (např. účinnost), c a d jsou koeficienty odpovídající spodnímu (0%) a hornímu limitu účinnosti (100%) a ED₅₀ je inflexní bod funkce nacházející se mezi spodní a horní asymptotou a vyjadřující dávku, při níž bylo dosaženo 50% účinnosti; b je šikmost křivky a x je nezávislá proměnná (dávka). V některých případech byly u modelů přednastaveny horní a spodní limity.

Obecná rovnice pro čtyřparametrický log-logistický model LL.4

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \exp(b(\log x - \log(e)))}$$

Obecná rovnice pro Weibullův čtyřparametrický W1.4 model

$$f(x) = c + (d - c) (1 - \exp(- \exp (b(\log(x) - \log(e))))$$

Obecná rovnice pro Weibullův tříparametrický test W1.3u model s přednastaveným horním limitem rovným 1

$$f(x) = 0 + (1 - 0) \exp(- \exp(b(\log(x) - e)))$$

Tab. č. 3: Aplikace stupňovaných dávek použitých herbicidů

Herbicid	Dávka herbicidu na ha						
	20	60	180	540	1620	4860	14580
Glean 75 WG (g)	20	60	180	540	1620	4860	14580
Atlantis WG (g) + Biopower (l)	37,5	75	150	300	600	900	1800
Powerflex (g)	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
Puma Extra (l)	0,25	0,5	0,75	1	2	4	8
Axial (l) + Adigor(1,35l)	0,075	0,15	0,3	0,6	0,9	1,8	-

4.2.2. Výběr rezistentních jedinců z populace

Cílem postupu bylo vyselektovat z dané populace rezistentní jedince chundelky metlice vůči sulfonylmočovinám pro izolaci DNA a molekulární analýzu. Součástí testu bylo dále zjištění poměru citlivých a rezistentních jedinců v populaci včetně odhadu typu a míry rezistence, vizuální hodnocení poškození rostlin po aplikaci herbicidů a účinnosti aplikovaných dávek herbicidů.

Rostliny byly pěstovány v kryté vegetační hale v pokusných nádobách. Testováno bylo z každé lokality (Lomnice, Vlastějovice a Dynín) celkem 100 jedinců. Ve fázi 3 listů až jedné odnože bylo z každé rostliny odebráno 0,2 g nadzemní biomasy pro následnou izolaci DNA. Vzorky byly uchovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odběru byla v nádobovém postřikovači (AVIKO 5) provedena aplikace herbicidu. Použita byla tryska Lurmark 01 E 80 a nastaven tlak na hodnotu 0,23 MPa, celkový objem postřikové kapaliny odpovídal dávce $250\text{ l}\cdot\text{ha}^{-1}$. Pro selekci byl vybrán neselektivní herbicid Oust XP s účinnou látkou sulfometuron v dávce $300\text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ (registrovaná dávka $70\text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$) z důvodu případného vyloučení jedinců s metabolickou rezistencí. Dávkování bylo stanoveno na základě předchozích nádobových (dose-response) pokusů (nejsou v práci uvedeny).

Na základě viditelných symptomů a vážení čerstvé biomasy a sušiny byly rostliny měsíc po ošetření herbicidy rozděleny do následujících čtyř skupin (upraveno podle klasifikačního systému R Resistance Classification System - Moss a kol., 1999).

1. skupina - rostliny citlivé vykazující 90-100% poškození, projevy všech symptomů poškození inhibitory ALS - žloutnutí, antokianové zbarvení, přítomnost nekrotizace, zastavení růstu
2. skupina - mírně snížená citlivost, 70-89% poškození, rostliny retardovány v růstu, jeví známky chlorózy, přecházejících v nekrotizaci
3. skupina s podezřením na metabolickou rezistenci, 50-69% poškození, rostlina je retardována v růstu, jeví známky chlorózy eventuelně dalších barevných anomálií, nekrotizovaná pletiva jsou přítomna minimálně
4. skupina s podezřením na rezistenci v místě účinku (target-site), poškození do 50%, rostliny jsou velmi mírně či vůbec retardovány v růstu, prakticky nejeví žádné zjevné známky poškození.

Na základě tohoto hodnocení bylo vybráno z každé populace pět rostlin citlivých a pět rostlin s podezřením na rezistenci v místě účinku a odebrané vzorky těchto rostlin byly testovány molekulárními metodami.

Výsledky byly dále statisticky zpracovány v programu Statistica ver. 10 (StatSoft CR s r.o., 2007) pomocí testu normálního rozdělení dat.

4.2.3. Metoda agarových kultur - RISQ (Resistance In-Season Quick) test

Pro velmi rychlé stanovení rezistence u nových biotypů s podezřením na rezistenci byla použita metoda agarových kultur - RISQ test (Kaundun, 2012). Klíčící rostliny byly ve fázi dvou až tří listů odebírány z vytipovaných polí s ozimými obilninami, na kterých se vyskytly problémy s regulací chundelky metlice. Celkem bylo otestováno 20 biotypů z nových lokalit. Z každého pole bylo odebráno 200-300 rostlin. Seznam vybraných lokalit včetně GPS souřadnic je uveden v příloze v tab. č. 22.

Klíčící rostliny s omytými kořeny byly umístěny do Petriho misek o rozměrech 10x10 cm na 0,8 % agarové médium, do kterého byl v příslušných dávkách přidán a rozpuštěn herbicid. Protože tato metoda nebyla v ČR dosud k detekci rezistence chundelky metlice použita, bylo nejprve nutné nalézt optimální dávkování. Testování dávek účinných látek iodosulfuron a pinoxaden bylo tedy předem testováno za použití citlivých a rezistentních standardů. Na základě těchto pokusů za účelem optimalizace metody pro chundelku metlici byly následně zvoleny tyto dávky: iodosulfuron (0,2 -0,4 -0,8 -1,6 -6,4 μ M), pinoxaden (0,1 -0,2 -0,4 -0,8-1,6 μ M). Každá varianta měla tři opakování. Jako referenční vzorek byl použit citlivý biotyp ze Švýcarska poskytnutý firmou Syngenta a biotyp z lokality Lomnice s potvrzenou rezistencí k sulfonylmočovinám. Petriho misky byly umístěny do růstových komor (Sanyo, MLR 351H) se světelným režimem 16 hod světlo/8 hodin tma, teplotou 20 °C den/16 °C noc a relativní vlhkostí 55-65%. 10 dní po přesazení byl u přeživších rostlin hodnocen rozvoj listů a kořenů a porovnán s neošetřenou kontrolou. Pro kvantitativní hodnocení nárůstu biomasy během doby testování byla stanovena listová a kořenová plocha rostlin pomocí analýzy obrazu. Snímky rostlin byly pořízeny fotoaparátem NIKON 990 vybaveným IR filtrem (Hoya, Infrared R72) v den založení pokusu a v den ukončení pokusu. Pomocí analytického nástroje softwaru Adobe Photoshop byl pro každou rostlinu stanoven počet pixelů, které ve snímku pokrývá. Následnou kalibrací velikosti pixelů byla vypočtena skutečná

plocha rostlin. Statistické zpracování dat a modelování bylo provedeno pomocí software R-project R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008). Na základě nelineárních modelů byly sestaveny grafy a pro každý biotyp a variantu vypočteny hodnoty ED_{50} ($g \cdot ha^{-1}$) a stanoveny faktory rezistence RF. Výsledky byly dále statisticky zpracovány v programu Statistica ver. 10 (StatSoft CR s r.o. (2007) pomocí analýzy rozptylu a post hoc testem Tukey ($\alpha=0,05$).

4.3. Fyziologické studie

4.3.1. Test aktivity enzymu ALS

Test aktivity ALS byl proveden na základě modifikovaných metod popsanych Rayem (1984) a Singhem a kol. (1988). Aktivita enzymu byla měřena jako množství produktu – acetolaktátu získaného z nadzemní části rostliny po jeho přeměně na acetoin dekarboxylací v kyselém prostředí.

Rostlinný materiál pro extrakci byl získán z pět týdnů starých rostlin, které byly vypěstovány ze semen v kryté vegetační hale. Z listů rostlin byl odebrán směsný vzorek biomasy o hmotnosti 2 gramy pocházející z 15-20 jedinců. Vzorek biomasy byl v kapalném dusíku rozmělněn na jemný prášek, homogenizován v extrakčním pufru při teplotě $5^{\circ}C$ po dobu 10 min. a průběžně promícháván na magnetické míchačce. Homogenát byl přefiltrován přes bavlněnou tkaninu. Filtrát byl centrifugován (15 min. při 10 000g) a ke každému získanému mililitru supernatantu bylo přidáno 0,313 g síranu amonného k vysrážení proteinů. Po 30 min. inkubaci při teplotě $5^{\circ}C$ a následné centrifugaci (20 min, 20 000 g) byla získaná peleta rozpuštěna v extrakčním pufru. K získanému extraktu byl přidán analytický pufr a rostoucí koncentrace účinné látky herbicidu (tab. č. 4). Směs byla inkubována 2 hodiny při $37^{\circ}C$ ve vodní lázni. Reakce byla zastavena přidáním 0,05 ml 6M H_2SO_4 a zahřátím 15 minut při teplotě $65^{\circ}C$ za účelem dekarboxylace acetolaktátu na acetoin. Acetoin byl detekován po převedení na barevný komplex, který vznikl přidáním směsi obsahující 250 μl kreatinu a 250 μl 1-naftolu a inkubací při $65^{\circ}C$ v termobloku (Thermoblock TB1, Biometra) po dobu 15 minut. Spektrofotometricky (Helios Gamma, Thermo Spectronics) byla stanovena absorbance při $\alpha=540nm$. Specifická aktivita enzymu byla vypočtena ze standardní křivky a vyjádřena jako $\mu mol_{acetoin} mg^{-1} protein h^{-1}$. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bradfordovy metody (1976) za použití bovinního séra jako standardu.

Statistické zpracování dat a modelování bylo provedeno pomocí software R-project R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008). Na základě dat absorbance byly sestaveny nelineární modely, a pro každý biotyp a variantu vypočteny hodnoty I_{50} (nM) a stanoveny faktory rezistence RF.

Složení použitých pufrů (standardizováno pro 2 g čerstvé hmoty rostlinného materiálu)

Extrakční pufr (celkový objem 20 ml):

- 2 ml K-P pufru (pH 7,5, 1M)
- 2 ml Na-pyruvátu (10 mM)
- 2 ml $MgCl_2$
- 200 μ l thiaminpyrofosfátu (TPP)
- 200 μ l flavinadenindinukleotidu (FAD)
- 2 ml glycerinu
- 11,6 ml destilované H_2O

Eluční pufr (celkový objem 125 ml):

- 12,5 ml K-P pufru (pH 7,5, 1M)
- 5 ml Na-pyruvátu (0,5 M)
- 625 μ l $MgCl_2$ (0,1 M)
- 106,9 ml destilované H_2O

Analytický pufr (celkový objem 15 ml):

- 1,25 ml K-P-pufru (pH 7, 1M)
- 5 ml Na-pyruvát (0,5M)
- 2,5 ml $MgCl_2$ (0,1 M)
- 500 μ l thiaminpyrofosfátu (50 mM)
- 2,5 ml flavinadenindinukleotidu (1mM)
- 3,25 ml destilované H_2O

Tab. č. 4: Koncentrace účinných látek herbicidů použitých v reakci

Účinná látka	Koncentrace (nM)								
	0	$9,5 \cdot 10^{-7}$	0,0095	0,095	0,95	9,5	95	950	9500
chlorsulfuron	0	$9,5 \cdot 10^{-7}$	0,0095	0,095	0,95	9,5	95	950	9500
iodosulfuron	0	$4,5 \cdot 10^{-8}$	0,00045	0,0045	0,045	0,45	4,5	45	450
sulfometuron	0	$9,8 \cdot 10^{-6}$	0,098	0,98	9,8	98	980	9800	98000

4.4. Molekulárně-genetické studie

4.4.1. Izolace DNA

K izolaci DNA bylo na základě výsledků pokusu 4.2.2. Výběr rezistentních jedinců z populace použito z každé populace 5 citlivých a 5 rezistentních rostlin. DNA z jednotlivých rostlin byla izolována pomocí komerční soupravy DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

Rostlinná pletiva byla v kapalném dusíku rozdrovena na jemný prášek a přenesena do mikrozkušavky se 400 μ l AP1 pufru a 4 μ l zásobního roztoku RNasy A (100 mg/ml). Směs byla intenzivně vortexována za účelem rozpuštění buněčných stěn a odstranění shluků a poté 10 minut inkubována při 65°C. Ke směsi bylo přidáno 130 μ l pufru AP2. Následovala pětiminutová inkubace na ledu. Lyzát byl převeden do kolonky QIAshredder umístěné v 2 ml jímací mikrozkušavce a centrifugován 2 minuty při maximální rychlosti. Ke každému získanému mililitru čistého lyzátu bylo přidáno 1,5 ml pufru AP3/E. Ze směsi bylo odebráno 650 μ l, přeneseno na kolonku DNeasy mini spin umístěnou na 2 ml mikrozkušavku a centrifugováno (1 min při 10 000 g). Proteklá frakce byla odstraněna a celý krok zopakován se zbylým množstvím směsi. Směs byla 2x promyta 500 μ l pufru AW a centrifugována při maximální rychlosti, aby došlo k vysušení membrány kolonky. Kolonka DNeasy byla přenesena na 2 ml mikrocentrifugační zkumavku a na membránu bylo napipetováno 100 μ l předeřátého (65°C) pufru AE. Po pětiminutové inkubaci při pokojové teplotě byla kolonka centrifugována (1 min při 10 000g). Tento krok byl zopakován. DNA byla uchována při -20°C. Pufry použité pro izolaci DNA jsou standardně dodávány se soupravou DNeasy Plant Mini Kit a jejich složení je uvedeno v příslušném manuálu.

4.4.2. Navržení primerů, polymerázová řetězová reakce (PCR)

Specifické primery pro PCR (Tab. č. 5) byly navrženy na základě známých sekvencí genů *als* u geneticky příbuzných rostlin chundelce metlici pomocí programu Primer 3 (Rozen, Skaletsky, 2000). Konkrétně se jednalo o sekvence genů psárky polní (*Alopecurus myosuroides*) AJ437300, jílku mnohokvětého (*Lolium multiflorum*) AF310684, pšenice seté (*Triticum aestivum*) AY210405, AY210406, AY210407, AY210408, ječmene obecného (*Hordeum vulgare*) AF059600, sveřepu střešního (*Bromus tectorum*) AF488771, AF487459, rýže seté (*Oryza sativa*) AY885674, AY885675, AB049822, AB049823 a kukuřice seté (*Zea mays*) X63553. Sekvence nukleotidů byly získány z veřejné databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Primery byly navrženy pro amplifikaci zájmových úseků genu *als*, tzv. domén, ve kterých se bodové mutace nacházejí a pro sekvenování celého genu *als*.

Tab. č. 5: Seznam použitých primerů použitých pro amplifikaci a genotypizaci genu *als* chundelky metlice

kPrimer	Sekvence (5'-3')	Pozice*	t (°C)	Místo mutace	Velikost produktu (bp)
F1	AGCCGTCGCCTTCTCAGG	20-38	55	Ala-122	167
R1	GGAGACGAGGTTGGTAGC	433-415			
F11	CTCAATGGAGATCCACCAGG	267-287	60	Ala-122	254
R1	GGAGACGAGGTTGGTAGC	433-415			
F12	CATCACCAACCACCTCTTCC	306-326		Pro-197 Ala-205	264
R11	ATCTGCTGCTGGATGTCCTT	687-667			
F2	CCGCATCAGGTGCTCAGC	111-129	55	Ala-122 Pro-197 Ala-205	415
R2	ATGGGCGTCTCCTGGAAC	534-516			
F3	GTGCTACCAACCTCGTCTCC	413-433	55	Pro-197 Ala-205	213
R3	CAGCCACCACCAACATACAG	831-811			
F4	AAGGACATCCAGCAGCAGAT	667-687	55	Asp-376 Arg-377	350
R4	GCACAATCTTGGACCTGCTT	1079-1059			
F4	AAGGACATCCAGCAGCAGAT	667-687	55		374
R41	CAGTCACGCGATCATCAAAC	1040-1020			
F5	CTGTTGCTTGCATTTGGTGT	997-1017	55	Asp-376 Arg-377	265
R5	AAGGGAACCTCCCTCTTCTGC	1262-1242			
F6	GCATGTCTCCATTTGTGCAG	1122-1142	55		271
R6	GTAATACTGAGCCGCCACA	1393-1373			
F62	TTTAGTTCGTGGCATGAGGA	1213-1233	55		335
R62	TTCTCGATGCGAATCAGTGC	1569-1549			
F63	CAGGTGTCACGTTGTTGAC	1487-1507	55	Trp-574	201
R63	CGCTCATTCTCTGGGTTCC	1690-1670			
F7	TTGGGAACCCAGAGAATGAG	1667-1687	55	Ser-653 Gly-654	237
R7	CTGCCATCACCTTCCATGAT	1905-1885			
F8	TTGAGACTCCAGGGCCATAC	1790-1890	55	Ser-653 Gly-654	233
R8	GCAAAACACATGCTTTATTAGTTGA	*1			

Amplifikace genu *als* byla provedena podle standardní metodiky. Pro příslušný počet PCR reakcí byla připravena směs (mastermix) tohoto složení:

Tab. č. 6: Složení PCR reakcí o objemu 25 μ l

Chemikálie (koncentrace)	Objem (μl)
sd H ₂ O (2x předestilovaná)	19,10
10 x PCR pufr	2,50
MgCl ₂ (25mM)	1,50
primer 1 (100 μ M)	0,25
primer 2 (100 μ M)	0,25
směs dNTP (25mM)	0,20
Taq polymeráza (5u/ μ l)	0,20 (1 jednotka)
celkem v mastermixu	24,00
templátová DNA	1,00
celkem v reakci	25,00

Mastermix byl rozdělen do PCR mikrozkušavek a do každé mikrozkušavky byla přidána templátová DNA. Mikrozkušavky byly umístěny do termocykleru (Whatman, Biometra), na kterém byl nastaven příslušný program. PCR proběhla podle protokolu uvedeného v tabulce č. 7. Kontrola výsledků byla provedena elektroforetickou separací na agarózovém gelu. Výsledek frakcionace byl pozorován po přenesení gelu na UV transiluminátor při vlnové délce 310 nm. Byly pořízeny fotografické snímky jednotlivých gelů fotoaparátem NIKON 950 vybaveným příslušným UV filtrem.

Tab. č. 7: Teplotní a časový průběh PCR

Kroky PCR	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	97°C	3 min	1x
denaturace	97°C	0,5 min	40x
nasedání primerů	55°C	1 min	
prodlužování primerů	72°C	1,5 min	
konečná polymerace	72°C	8 min	1x
uchování vzorků	10°C	∞	

4.4.3. Purifikace produktů PCR

Před sekvenční analýzou bylo nejprve pomocí komerční soupravy QIAquick Gel Extraction KIT (QIAGEN) provedeno přečištění PCR produktů. Amplifikované fragmenty DNA byly nanесeny na 2% agarózový gel a elektroforeticky separovány. Poté byly z gelu skalpelem vyříznuty, zváženy a ke každým 100 mg bylo přidáno 300 µl QG pufru. Po dobu 10 minut byly vzorky inkubovány při 50 °C, přičemž každé dvě minuty byly z vodní lázně vyjmuty a vortexovány. Poté, co se agarózový gel zcela rozpustil, bylo na každých 100 mg gelu přidáno 100 µl isopropanolu. Vzorky byly v mikrozkuhavce promíchány Pasterovou pipetou, nanесeny na kolonku (QIAquick spin column) umístěnou ve 2 ml zkuhavce a jednu minutu centrifugovány při 10 000 g. Supernatant byl odstraněn, na kolonku napipetováno 0,5 ml pufru QG a kolonka se vzorkem opět jednu minutu centrifugována (10 000 g). Tento krok odstraní všechny zbytky agarózového gelu. Poté byla kolonka promyta 0,75 ml PE pufru a po 2-5 minutách centrifugována (1 min, 10 000 g). Supernatant byl odstraněn a kolonka při stejných otáčkách opět jednu minutu centrifugována. Poté byla kolonka umístěna do nové 1,5 ml mikrozkuhavky a na střed membrány kolonky bylo nanесeno 50 µl elučního pufru (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Po jedné minutě proběhla centrifugace (1 min, 17 900g). Takto získané purifikované DNA vzorků byla použita pro sekvenování.

Pufry použité pro purifikaci produktů PCR jsou standardně součástí soupravy QIAquick Gel Extraction KIT (QIAGEN).

4.4.4. Detekce mutací v genu *a/s*

Sekvenování fragmentů DNA bylo provedeno na automatickém sekvenátoru Beckman pomocí soupravy DTCS Qiuck Start KIT (Beckman Coulter) podle protokolů doporučených výrobcem. Aby byly vyloučeny amplifikační chyby, byla sekvenována obě vlákna fragmentů DNA. Sekvence byly upraveny a analyzovány za pomoci programu BLAST (Altschul a kol., 1997). K překladu nukleotidových sekvencí byl použit program ExPASy (Gasteiger a kol., 2003). Sekvence nukleotidů specifických oblastí genu *a/s* rezistentních biotypů chundelky metlice byly srovnávány s nukleotidovými sekvencemi citlivých biotypů. Byly hledány nukleotidové a aminokyselinové záměny ve specifických doménách genu *a/s*, ve kterých se nejčastěji nalézají bodové mutace.

4.4.5. Sekvencování celého genu *als*

Celý *als* gen byl sekvenován u jedné rezistentní rostliny a jedné senzitivní rostliny pocházející z populace z lokality Dynín pro porovnatelnost sekvencí. Toto sekvencování bylo provedeno za účelem zjištění, zda se v genu vyskytují ještě jiné než známé domény a mutace zodpovědné za změnu vazebného místa a vznik rezistence.

Pro amplifikaci *als* 5' cDNA konce sekvence chundelky metlice byla v souladu s doporučeními výrobce použita souprava FirstChoice®RLM-RACE Kit (Ambion). Před touto analýzou byla z listů rostlin pomocí soupravy RNeasy Mini Kit (QIAGEN) extrahována celková RNA. Byly navrženy specifické reverzní vnitřní a vnější primery (R13i 5'- GAACGCCTCTCCCTGCTC -3', R13o 5'- GGAGACGAGGTTGGTAGCAC -3') pro PCR amplifikaci. Výsledky byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu. Sekvencování bylo provedeno přímo z PCR produktů. Přečištěné dvouvlákové amplifikované produkty byly sekvenovány pomocí automatického Beckmanova sekvenátoru za použití DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter). Sestavení a analýza sekvencí byla provedena pomocí programu BLAST (Altschul a kol., 1997). K překladu nukleotidových sekvencí byl použit program ExpASy (Gasteiger a kol., 2003).

Na základě aminokyselinových substitucí odhalených při sekvenování celého genu *als* byly pomocí PCR amplifikovány a přesně sekvenovány oblasti v okolí pozic 263, 272 a 446 (číslováno dle *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) u pěti rezistentních a pěti citlivých rostlin.

4.4.6. Metoda dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence - délkový polymorfismus restikčně štěpené amplifikované DNA)

Tato metoda byla použita za účelem zjištění procentuálního zastoupení citlivých a rezistentních jedinců uvnitř jedné populace.

V první fázi metody byly získány extrakty DNA pomocí rychlé extrakční izolace DNA podle Délye (2002). Z jednotlivých testovaných rostlin byl odebrán 1 cm dlouhý úsek z prvního listu a umístěn do 0,2 ml mikrocentrifugačních zkumavek, které obsahovaly 100 µl extrakčního pufru (100mM Tris HCl, pH 9,5; 1M KCl, 10mM EDTA) a jednu skleněnou kuličku. Obsah mikrozkušavek byl homogenizován v přístroji Tissue Lyser II (Qiagen) po dobu 1,5 min při 25Hz. Po izolaci byla provedena PCR podle následujícího protokolu: 95°C po dobu

5 min., 37 cyklů při 95°C po dobu 5 s, 10s při teplotě 60-65°C (podle použitého primeru) a 72°C po dobu 30s. Primery byly navrženy pomocí softwaru dCAPS Finder 2.0 (Neff a kol., 2002) pro pozice 197 a 574, místa, kde se u trávovitých plevelů nacházejí mutace genu *als*.

Použité primery:

P197 (koncentrace 1,6 μ M)

ALVBamHI 5'TTC TCG ACT CCA TCC CGA TGG TCG CTA TCA CGG GAC
AGG AT 3'

AVL8R 5'ATC TGC TGC TGG ATG TCC TTG GG 3'

ALV6 5'CAA GGG CGC CGA CAT CCT CGT C 3'

W574 (koncentrace 0,8 μ M)

ALVBstXI 5'GGT GAT GAT ACT GAA CAA TCA ACA TCT GGG AAT GCC 3'

ALV6R 5'CAG GCA CAT TGC ACC TTT AGG TCT TCT AGG 3'

Poslední fází metody dCAPS je digesce PCR produktů za přítomnosti specifických restričních endonukleáz. Použity byly enzymy BamHI (Fermentas) pro pozici P197 a BstXI (Fermentas) pro pozici W574. Ke každému PCR produktu bylo přidáno 5 μ l enzymu (rozpuštěn v příslušném pufru pro enzym a sd-2x předestilované vodě). Inkubace probíhala 3 hodiny ve 37°C pro P197 a v 55°C pro W574. Digesce byla ukončena přemístěním vzorku na led na dobu 10 minut. Výsledky byly vizualizovány pomocí elektroforézy na 3% agarózovém gelu.

4.5. Metabolické studie

4.5.1. Studium reakce rostlin ošetřených chlorsulfuronem s přidavkem malathionu

Ve snaze objasnit další mechanismy rezistence, byl v této studii sledován vliv malathionu na metabolismus chlorsulfuronu v rostlinách chundelky metlice.

Semena chundelky metlice biotypů Lomnice, Vlastějovice, Dynín a Švýcarsko byly vyseta do pokusných nádob o rozměrech 5 x 5 x 7 cm naplněných černozemí, která pocházela z pokusného pozemku ČZU v Suchdole. Pravidelně zavlažované rostliny byly pěstovány v kryté vegetační hale. Po vzejití byly vyjednoceny na konečný počet deset rostlin na nádobu. Ve fázi tří listů byla u všech biotypů provedena aplikace malathionu v dávkách 0; 65; 250 a 1000 g.ha⁻¹. Ihned po ošetření insekticidem byl na rostliny postemergentně aplikován herbicid chlorsulfuron v dávkách 0; 10; 20; 40; 80; 160; 320; 640; 1280 a 2560 g.ha⁻¹.

Každá varianta byla provedena ve čtyřech opakováních. Aplikace byla provedena v nádobovém postřikovači (AVIKO 5). Účinnost byla měsíc po ošetření hodnocena pomocí odhadové procentní metody na základě vizuálních symptomů poškození. Čerstvá nadzemní biomasa byla odebrána, zvážena, a usušena při teplotě 105°C. Poté byla zjištěna hmotnost sušiny. Výsledky byly zpracovány ve statistickém programu R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008). Na základě nelineárních modelů byly sestaveny grafy a pro každý biotyp a variantu vypočteny hodnoty ED₅₀ (g.ha⁻¹) a faktory rezistence RF.

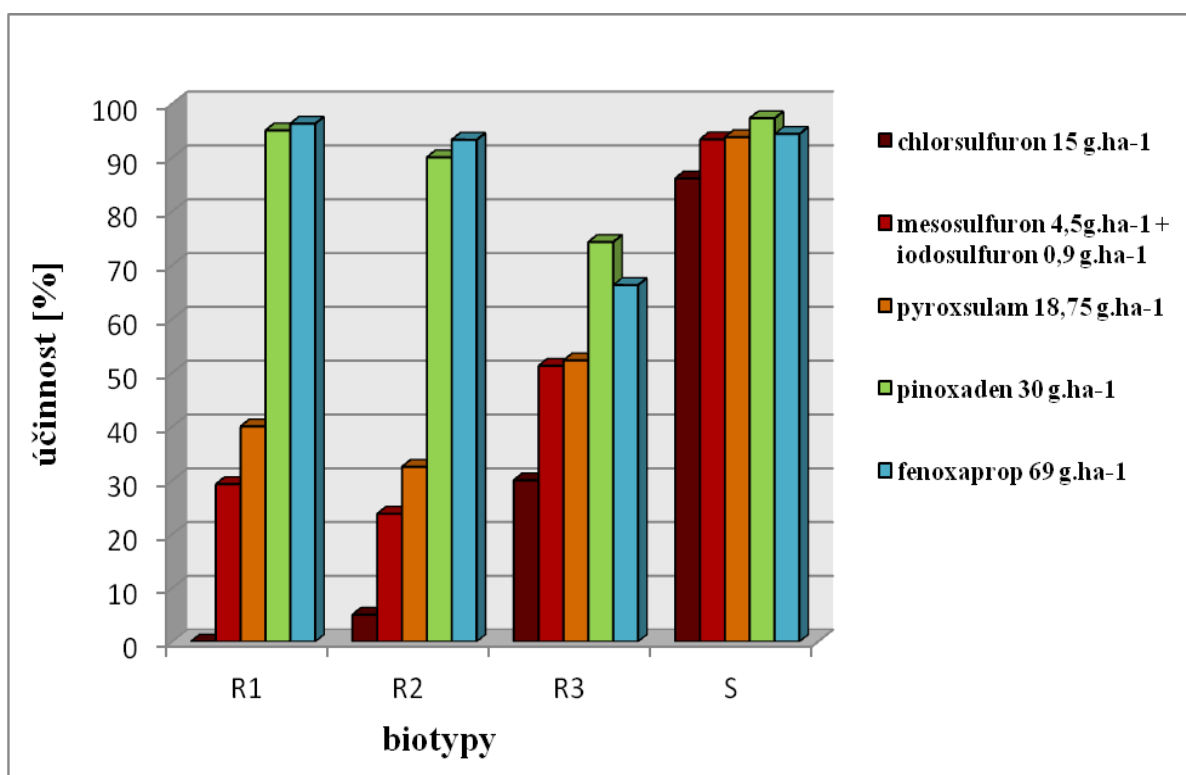
5. VÝSLEDKY

5.1. Stanovení účinnosti herbicidů u vybraných biotypů

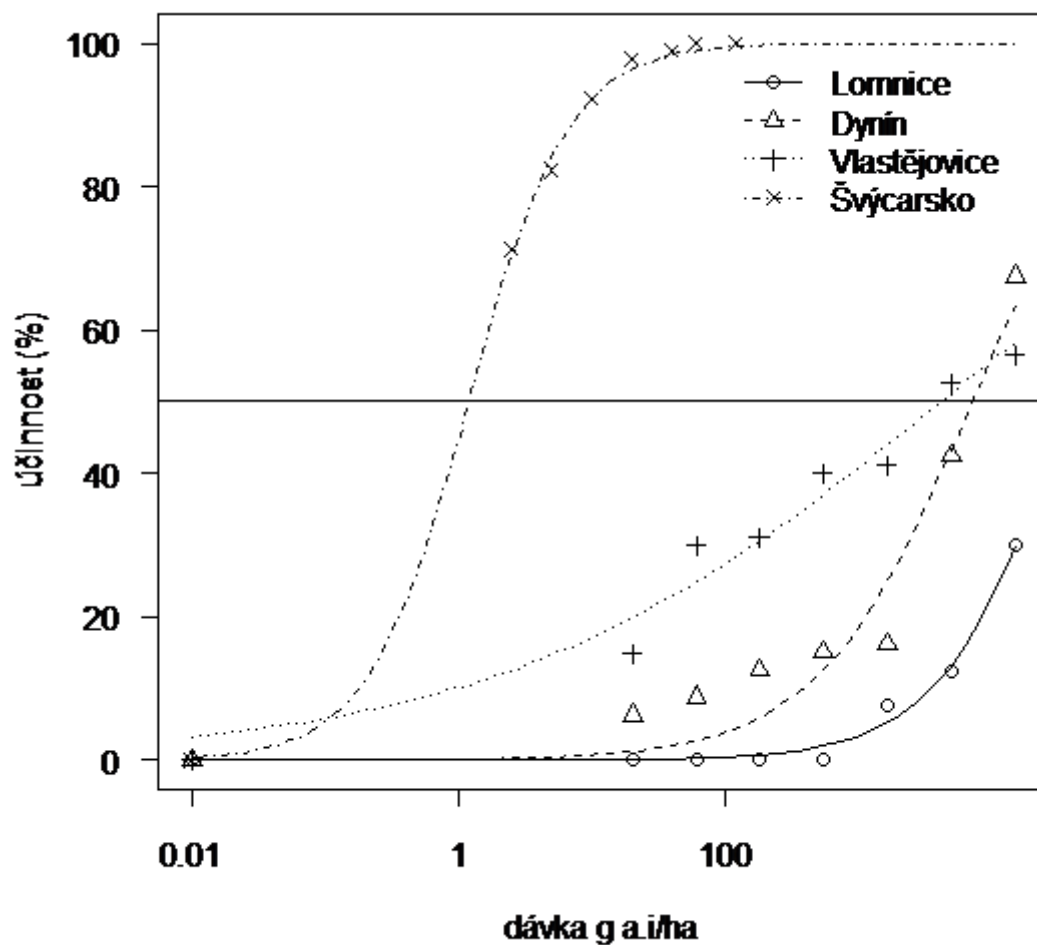
U všech testovaných biotypů byly v účinnosti herbicidů v porovnání s citlivým biotypem shledány statisticky průkazné rozdíly. Citlivý biotyp byl spolehlivě regulován všemi použitými herbicidy (graf. č. 1), na rostlinách byly po ošetření v doporučených dávkách patrné typické příznaky poškození již 10 dní po aplikaci. Biotypy testované na rezistenci tyto dávky v případě použití účinných látek chlorsulfuron, mesosulfuron + iodosulfuron a pyroxsulam přežívaly a byly u nich zjištěny vysoké faktory rezistence RF (tab. č. 8-10). Nejvyšší hodnoty RF byly shledány vůči účinné látce chlorsulfuron, která patří mezi nejdéle a nejčastěji používané sulfonylmočoviny. Hodnoty RF u všech biotypů přesahovaly u účinné látky chlorsulfuron hodnotu 2000, což ukazuje na vysokou pravděpodobnost rezistence způsobenou díky pozměněnému místu účinku. Redukce 50% nadzemní biomasy bylo např. u biotypu z Vlastějovic dosaženo dávkou 4038,1 g.ha⁻¹, biotyp z Dynína se nepodařilo redukovat ani nejvyšší použitou dávkou (14 580 g.ha⁻¹), přičemž doporučená dávka chlorsulfuronu je 20-25 g.ha⁻¹. Nejvyšší aplikovanou dávkou bylo dosaženo účinnosti pouze okolo 20%. Vysoké stupně rezistence byly zjištěny i u dalších dvou použitých herbicidů. U mesosulfuron + iodosulfuronu se hodnoty RF pohybovaly v rozmezí hodnot 18-46 a u pyroxsulamu v rozmezí 25-81. K redukci 50% nadzemní biomasy (ED₅₀) u biotypu Lomnice bylo zapotřebí dávky vyšší než 250 g.ha⁻¹ pyroxsulamu, přičemž ke kontrole biotypu citlivého stačila i nižší dávka než doporučená. U mesosulfuron+iodosulfuronu bylo dosaženo nejlepší účinnosti, avšak při doporučené dávce 150 g.ha⁻¹ se odolné biotypy dařilo redukovat pouze z 20-50%. Účinnost stupňovaných dávek testovaných herbicidů popisují podrobněji grafy č. 2-4. U mesosulfuron+iodosulfuronu byly zjištěny v porovnání s chlorsulfuronem a pyroxsulamen nižší hodnoty faktorů rezistence, ale i v tomto případě lze konstatovat, že testované biotypy jsou k mesosulfuron+iodosulfuronu vysoce rezistentní a v místech, kde se objevují komplikace s regulací chundelky metlice, nelze tento herbicid k její regulaci doporučit.

Jako vysoce účinné se již několik dní po aplikaci jeví obě použité látky ze skupiny inhibitorů enzymu acetyl-koenzym A karboxylázy. Spolehlivě redukoval a způsobil úhyn všech biotypů herbicid pinoxaden i fenoxaprop.

Při použití doporučených dávek bylo v případě pinoxadenu dosaženo účinnosti mezi 74 - 95%, u fenoxaprofu 66 - 96% (grafy č. 5,6). Také nízké hodnoty RF (0,3-4) (tab. č. 11,12) ukazují, že chundelka metlice je u nás zatím k této skupině látek citlivá. Např. u biotypu z Dynína, který vykazoval nejvyšší stupeň rezistence k inhibitorům ALS, bylo v případě použití fenoxaprofu dosaženo 50% redukce nadzemní hmoty již při dávce 0,308 l.ha⁻¹, přičemž doporučená dávka činí 1 l.ha⁻¹. Účinnosti všech pěti účinných látek na jednotlivé biotypy popisují grafy č. 7.-10.



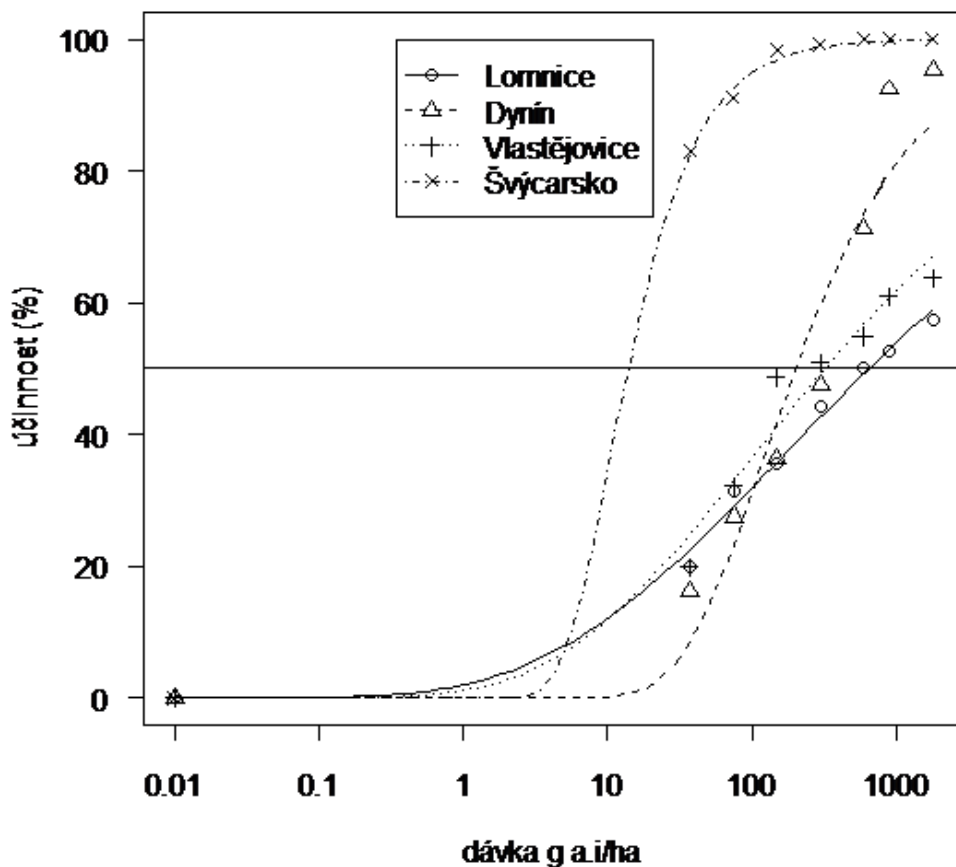
Graf č. 1: Účinnosti herbicidů v doporučených dávkách na vybrané biotypy (R1 – Lomnice, R2 – Vlastějovice, R3 – Dynín, S – citlivý biotyp)



Graf č. 2: Účinnost stupňovaných dávek chlorsulfuronu na tři rezistentní biotypy z českých lokalit a citlivý biotyp ze Švýcarska

Tab. č. 8: Odhady parametrů vypočtené na základě log logistického LL.4 modelu pro herbicidní účinnost chlorsulfuronu, hodnoty efektivních dávek ED_{50} ($g \cdot ha^{-1}$) a faktorů rezistence RF.

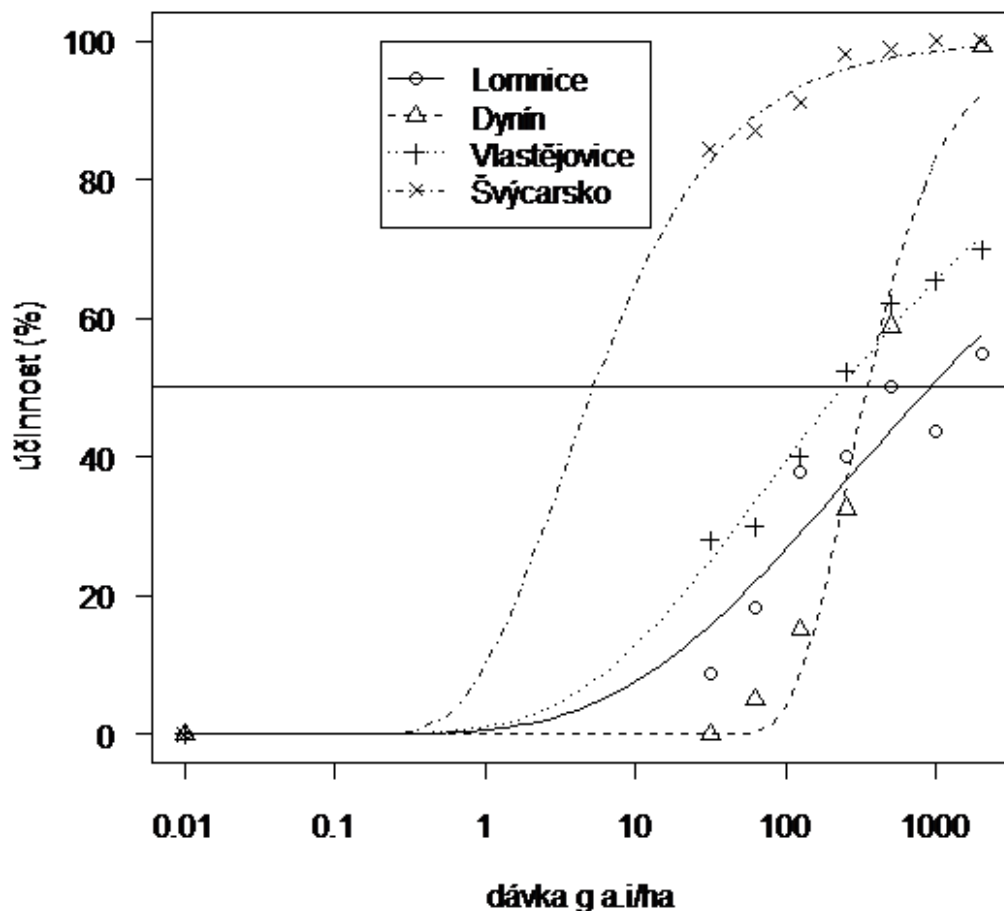
Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED_{50}	
Lomnice	-0,931	0	100	3638,9	3060,47
Vlastějovice	-0,262	0	100	4038,1	3396,22
Dynín	-0,753	0	100	7004,7	5891,25
citlivý biotyp	-1,163	0	100	1,189	-



Graf č. 3: Účinnost stupňovaných dávek mesosulfuron+iodosulfuronu na tři rezistentní biotypy z českých lokalit a citlivý biotyp ze Švýcarska

Tab. č. 9: Odhady parametrů vypočtené na základě nelineárního regresního Weibullova modelu W1.4 pro herbicidní účinnost mesosulfuron+iodosulfuronu, hodnoty efektivních dávek ED_{50} ($g \cdot ha^{-1}$) a faktorů rezistence RF.

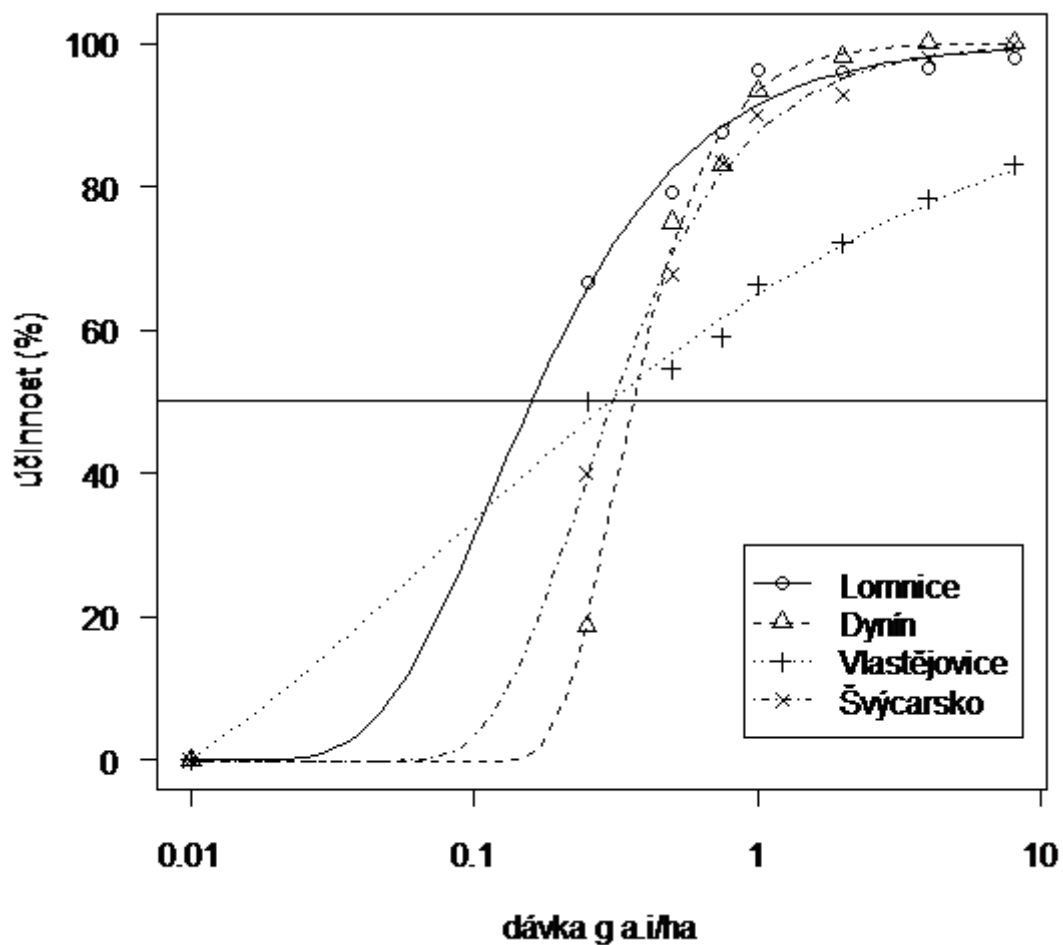
Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED_{50}	
Lomnice	-0,267	0	100	641,08	45,79
Vlastějovice	-0,323	0	100	311,09	22,22
Dynín	-0,747	0	100	246,59	17,61
citlivý biotyp	-1,309	0	100	14	-



Graf č. 4: Účinnost stupňovaných dávek pyroxsulamu na tři rezistentní biotypy z českých lokalit a citlivý biotyp ze Švýcarska

Tab. č. 10: Odhady parametrů vypočtené na základě nelineárního regresního Weibullova modelu W1.4 pro herbicidní účinnost pyroxsulamu, hodnoty efektivních dávek ED_{50} (g .ha⁻¹) a faktorů rezistence RF.

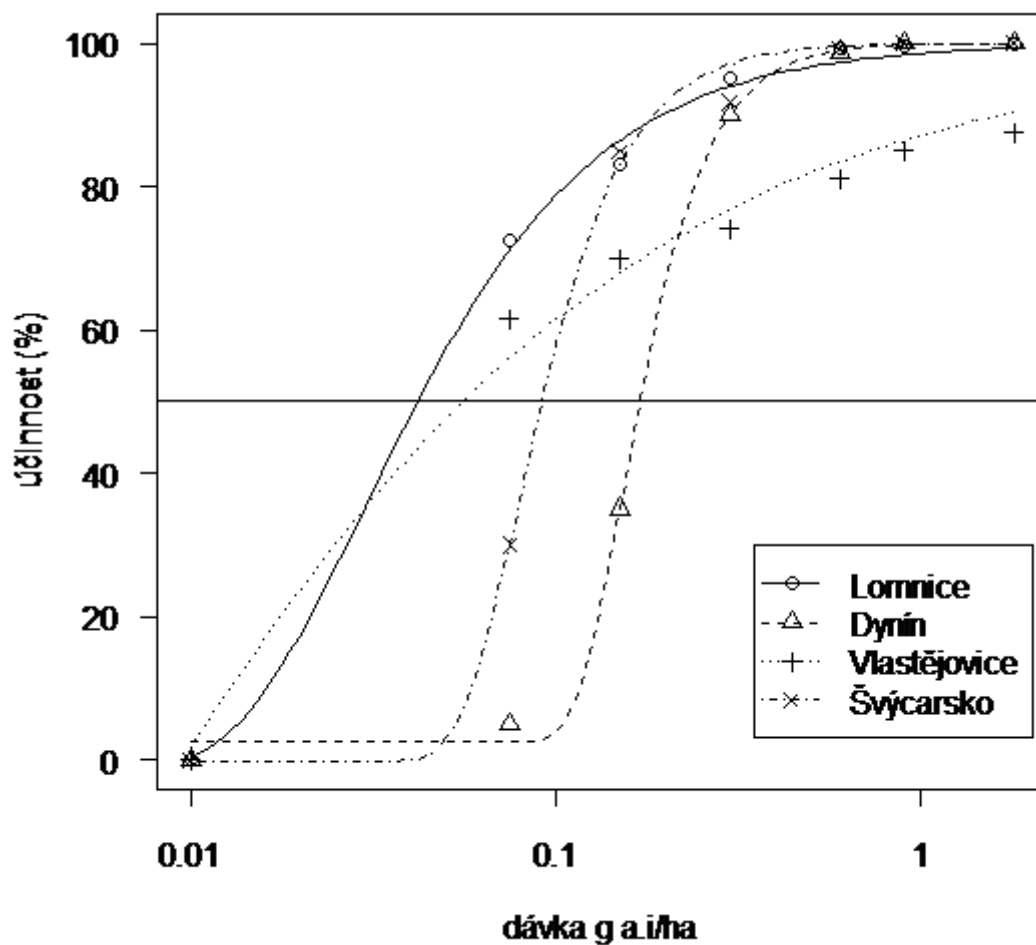
Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED_{50}	
Lomnice	-0,293	0	100	257,71	80,79
Vlastějovice	-0,344	0	100	80,75	25,31
Dynín	-1,233	0	100	257,03	80,57
citlivý biotyp	-0,729	0	100	3,19	-



Graf č. 5: Účinnost stupňovaných dávek Pumpy Extra na tři rezistentní biotypy z českých lokalit a citlivý biotyp ze Švýcarska

Tab. č. 11: Odhady parametrů vypočtené na základě nelineárního regresního Weibullova modelu W1.3u pro herbicidní účinnost Pumpy Extra, hodnoty efektivních dávek ED_{50} (g .ha⁻¹) a faktorů rezistence RF.

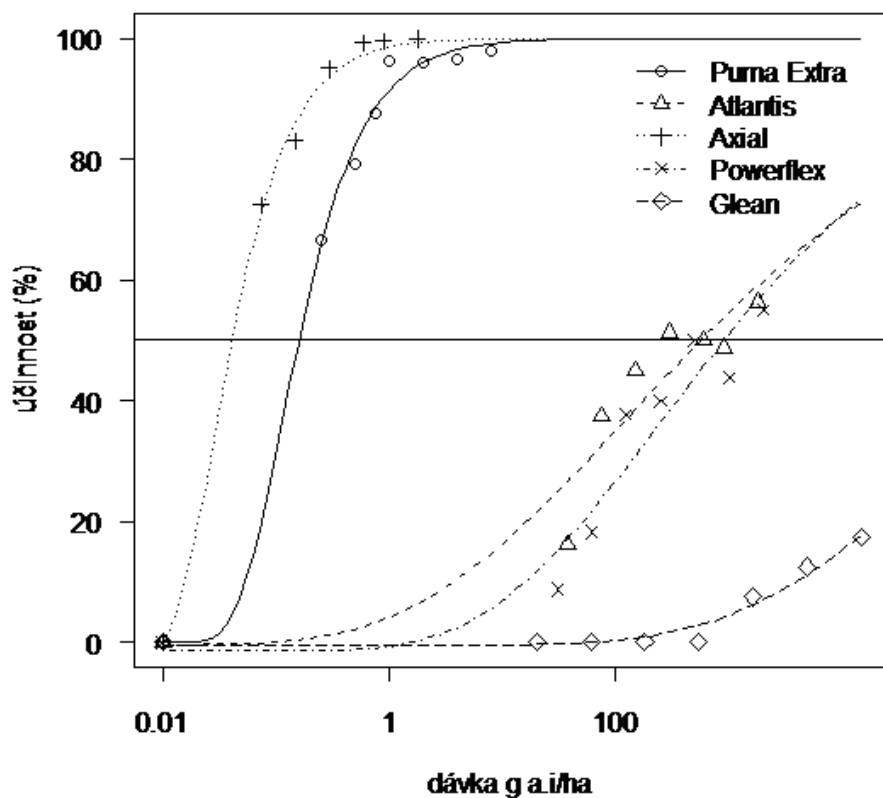
Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED_{50}	
Lomnice	-1,11	-0,046	100	0,114	0,48
Vlastějovice	-0,377	-14,0359	100	0,07	0,30
Dynín	-0,294	-0,294	100	0,308	1,30
citlivý biotyp	-1,397	-0,123	100	0,237	-



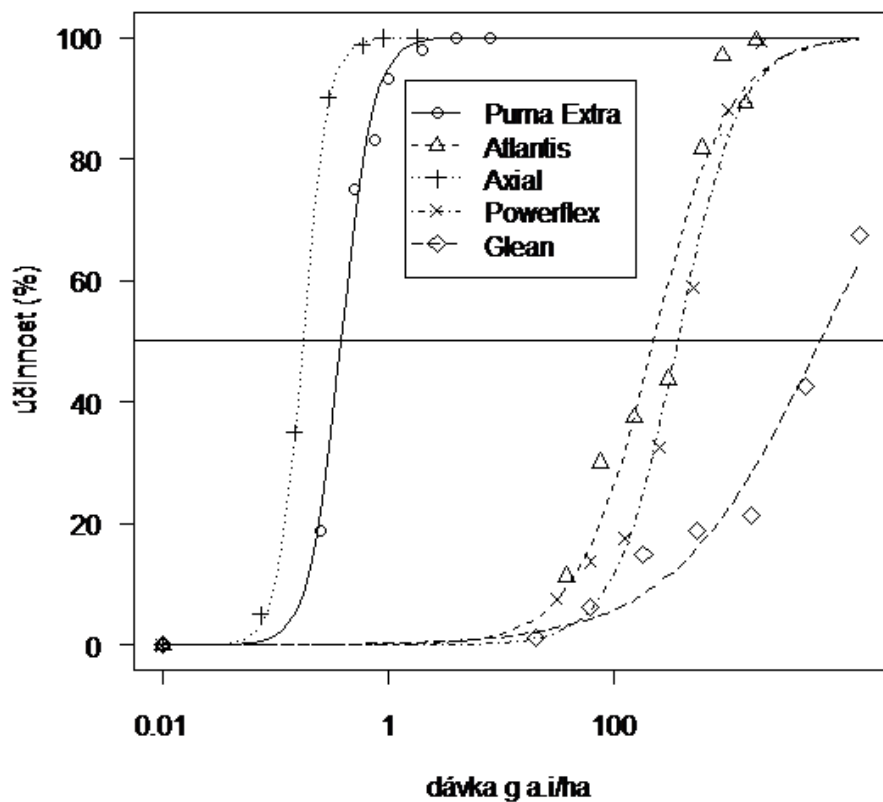
Graf č. 6: Účinnost stupňovaných dávek pinoxidenu na tři rezistentní biotypy z českých lokalit a citlivý biotyp ze Švýcarska

Tab. č. 12: Odhady parametrů vypočtené na základě nelineárního regresního Weibullova modelu W1.3u pro herbicidní účinnost pinoxidenu, hodnoty efektivních dávek ED₅₀ (g .ha⁻¹) a faktorů rezistence RF.

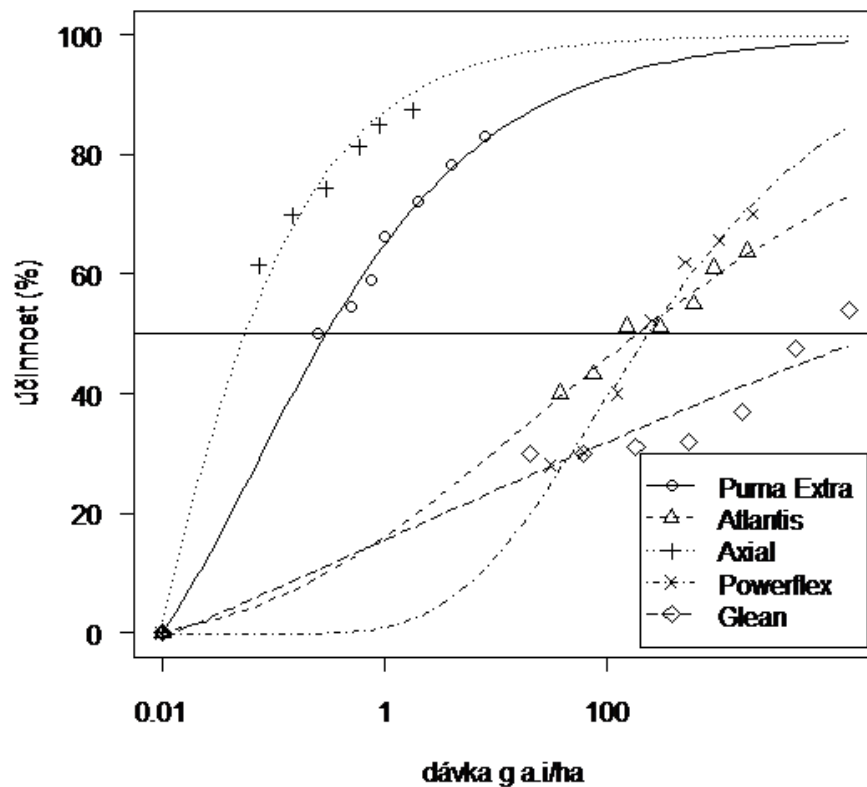
Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED ₅₀	
Lomnice	-1,216	-1,877	100	0,03	4,29
Vlastějovice	-0,511	-8,298	100	0,005	0,71
Dynín	-3,339	2,513	100	0,015	2,14
citlivý biotyp	-2,674	-0,134	100	0,007	-



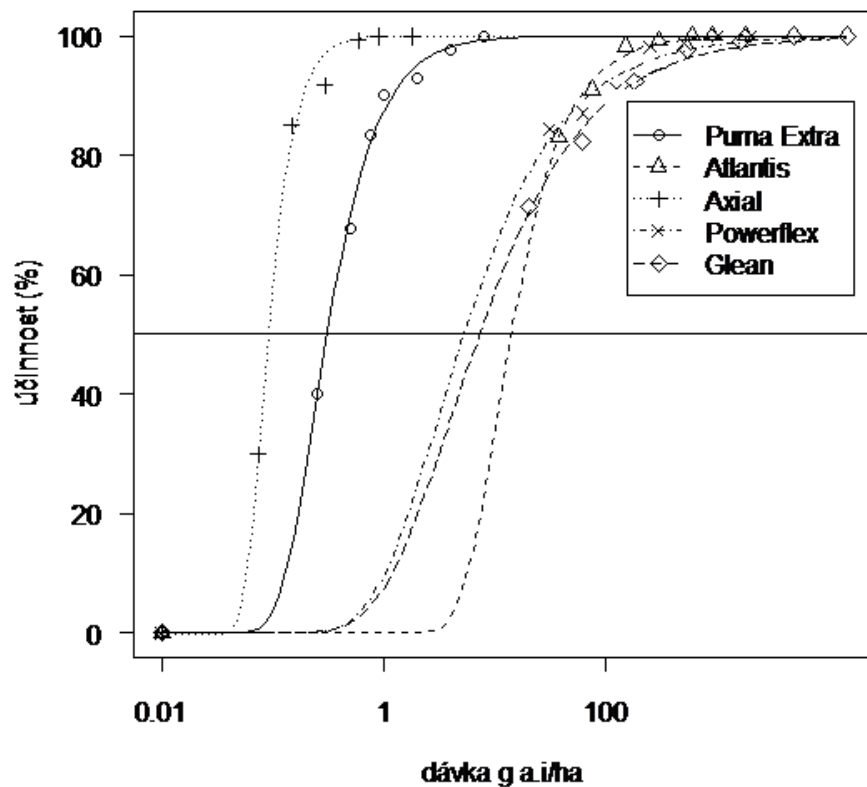
Graf č. 7: Účinnost stupňovaných dávek pěti vybraných herbicidů na biotyp z Lomnice



Graf č. 8: Účinnost stupňovaných dávek pěti vybraných herbicidů na biotyp z Dynína.



Graf č. 9: Účinnost stupňovaných dávek pěti vybraných herbicidů na biotyp z Vlastějovic.

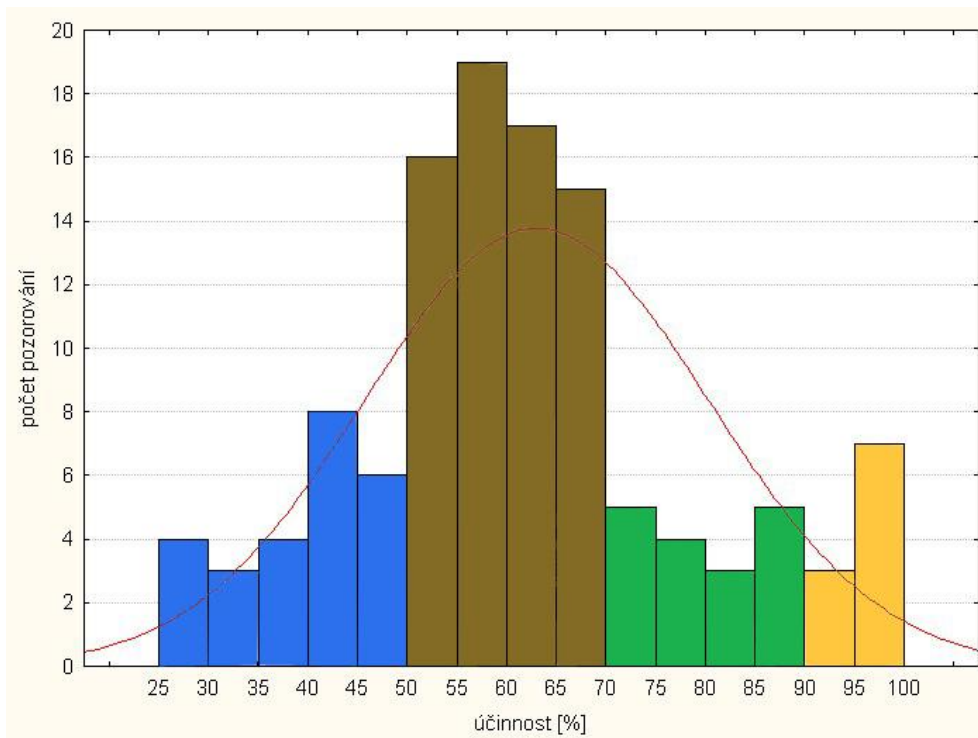


Graf č. 10: Účinnost stupňovaných dávek pěti vybraných herbicidů na citlivý biotyp.

5.2. Poměrné třídní četnosti a výběr rezistentních jedinců

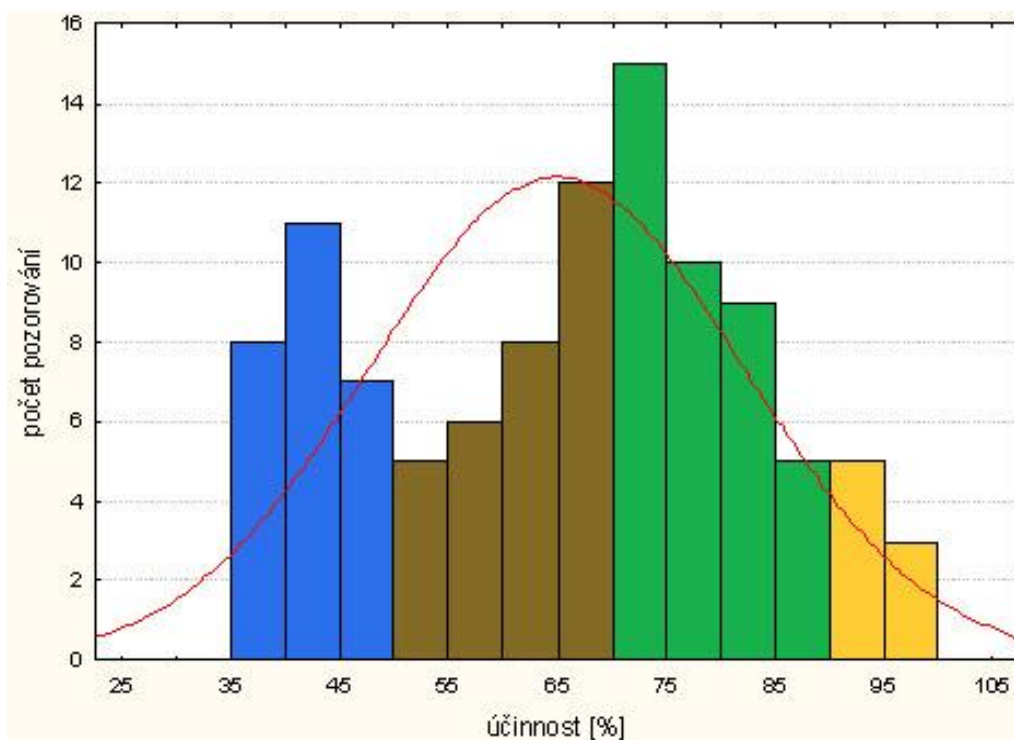
V rámci každého ze tří sledovaných biotypů byly mezi jednotlivými rostlinami patrné rozdílné příznaky účinku sulfometuronu. Na základě symptomů a vážení čerstvé biomasy a sušiny bylo možné u každé rostliny provést fenotypizaci a zařadit ji do jedné ze čtyř skupin podle klasifikačního systému R Resistance Classification System (Moss, a kol., 1999) (grafy č. 11-13). U všech rezistentních biotypů se podařilo vybraným herbicidem a použitou dávkou vyselektovat jedince, kteří nejevili téměř žádné zjevné známky poškození a mohli být zařazeni do skupiny s podezřením na rezistenci v místě účinku. Tito jedinci byli dále podrobeni molekulárně-genetickým studiím.

U citlivého standardu nebyla schopna dávka 300 g. ha⁻¹ přežít ani jedna rostlina. Reakce na aplikaci sulfometuronu byla u tří rezistentních biotypů různá. V rámci biotypu Lomnice došlo k selekci ve prospěch rezistentních rostlin, přibližně 70% jedinců bylo zařazeno do skupiny č. 3 - s podezřením na metabolickou rezistenci a 15 % do skupiny č. 4 - s podezřením na rezistenci v místě účinku. U biotypu Vlastějovice byla naopak více než polovina rostlin zařazena do skupiny 1 - citlivé a skupiny 2 - rostliny s mírně sníženou senzitivitou. U biotypu Dynín 6% rostlin přeživalo zcela bez poškození a bylo zařazeno mezi jedince s podezřením na specifickou rezistenci a 8 % jedinců aplikaci sulfometuronu v dáce 300 g.ha⁻¹ nepřežilo. Zbytek populace byl ohodnocen jako rostliny s podezřením na metabolickou rezistenci a rostliny s mírně sníženou senzitivitou.



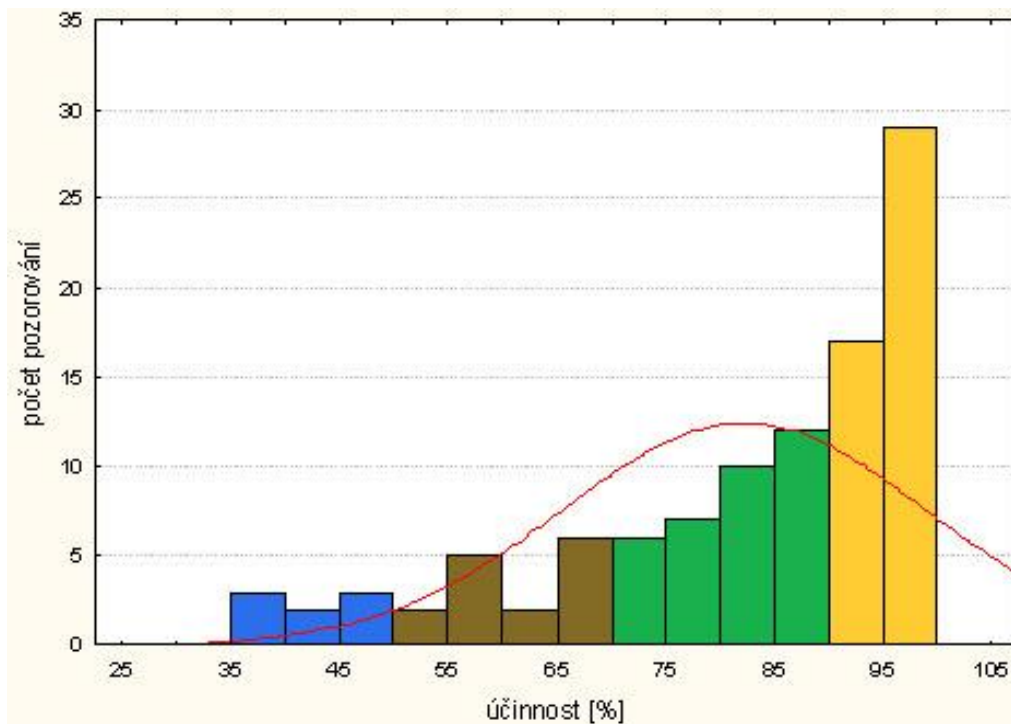
Graf č. 11: Poměrné zastoupení počtu jedinců biotypu Lomnice na základě 4 klasifikačních skupin po selekci sulfometuronem v dávce 300 g.ha⁻¹

■ sk. 1, ■ sk. 2, ■ sk. 3 ■ sk. 4



Graf č. 12: Poměrné zastoupení počtu jedinců biotypu Dynín na základě 4 klasifikačních skupin po selekci sulfometuronem v dávce 300 g.ha⁻¹

■ sk. 1, ■ sk. 2, ■ sk. 3, ■ sk. 4



Graf č. 13: Poměrné zastoupení počtu jedinců biotypu Vlastějovice na základě 4 klasifikačních skupin po selekci sulfometuronem v dávce 300 g.ha⁻¹

■ sk. 1, ■ sk. 2, ■ sk. 3, ■ sk. 4

5.3. Testování rezistence pomocí agarových kultur

Pomocí metody agarových kultur RISQ bylo již po deseti dnech od založení pokusu možné spolehlivě určit, zda testovaný biotyp vykazuje jistou míru rezistenci či nikoliv. V případě použití pinoxadenu byly na rostlinách již během několika dnů patrné typické příznaky poškození – zástavení růstu, fialovění, žloutnutí a nekrózy (obr. č. 4, příloha). Při aplikaci dávky 1,6 μM bylo u všech 20 testovaných biotypů dosaženo vysoké účinnosti 83-100% (tab. č. 13). Většina z těchto biotypů byla na základě vypočtených faktorů rezistence (tab. č. 15) hodnocena jako citlivé k účinné látce pinoxaden, čímž byly potvrzeny výsledky z růstového testu. U čtyř biotypů byly zjištěny faktory rezistence téměř 10, což může představovat poměrně vysoký stupeň rezistence. Jednalo se o tytéž biotypy, u kterých byly shledány velmi vysoké RF i k iodosulfuronu.

Iodosulfuron vykazoval velmi nízkou účinnost (32%) u rezistentního standardu a proměnlivou účinnost u ostatních testovaných biotypů. Pouze citlivý biotyp a dva testované biotypy na rezistenci (Libichov – grafy č. 14,15, Trutnov) ošetření herbicidem nepřežily a byly ohodnoceny jako citlivé k iodosulfuronu. Pouze u těchto dvou populací nebyl rovněž zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi

nárůstem biomasy v porovnání s citlivým biotypem. U zbývajících 18 biotypů byly mezi nárůstem biomasy shledány statisticky průkazné rozdíly (viz příloha tab. č. 23-29). Na základě těchto statistických výsledků, účinností hodnocených pomocí vizuální odhadové metody a faktorů rezistence vypočtených pomocí výsledků ze statistického programu R 2.13.1 (tab. č. 14,15) byly tyto biotypy zařazeny mezi rezistentní.

Rostliny z populací Býště, Milostína, Mladé Vožice, Povlčina (grafy č. 16,17), Prašného Újezdu, Vejvanova a Vítání přeživaly ošetření i při použití nejvyšší dávky (6,4 μM) a byl u nich patrný i rozvoj nových kořenů a nárůst nadzemní biomasy (obr. č. 4, příloha). U těchto biotypů byly zjištěny vysoké stupně rezistence (RF 107-3599) (tab. č. 14) a je u nich velmi pravděpodobné, že se zde jedná o specifickou rezistenci v místě účinku. U zbývajících 11 biotypů byly zjištěny střední hodnoty RF a je u nich předpoklad vzniku metabolické rezistence.

Tab. č. 13: Účinnosti a nárůst biomasy při použití herbicidů Husar a Axial při trstování biotypů na agarových půdách

biotyp	herbicid	dávka (μM)	účinnost	nárůst biomasy (cm ²)
Běloky	Husar	6,4	70	3,19
Běloky	Axial	1,6	83	1,43
Byšť	Husar	6,4	48	7,86
Byšť	Axial	1,6	99	1,84
Čejtice	Husar	6,4	80	12,45
Čejtice	Axial	1,6	98	2,01
Domašov I	Husar	6,4	74	1,56
Domašov I	Axial	1,6	100	0,49
Domašov II	Husar	6,4	76	1,46
Domašov II	Axial	1,6	100	1,16
Chlístovice	Husar	6,4	82	3,26
Chlístovice	Axial	1,6	99	2,19
Libichov	Husar	6,4	85	2,96
Libichov	Axial	1,6	99	2,68
Lovčice	Husar	6,4	82	1,19
Lovčice	Axial	1,6	98	2,46
Lysice	Husar	6,4	76	2,56
Lysice	Axial	1,6	100	1,7
Meclov	Husar	6,4	71	2,79
Meclov	Axial	1,6	100	2,16
Milostín	Husar	6,4	31	5,03
Milostín	Axial	1,6	100	1,56
Mladá Vožice	Husar	6,4	57	4,43
Mladá Vožice	Axial	1,6	100	2,39
Povlčín	Husar	6,4	18	6,47
Povlčín	Axial	1,6	100	2,08
Prašný Újezd	Husar	6,4	52	3,39
Prašný Újezd	Axial	1,6	97	0,43
Strachaly	Husar	6,4	73	1,5
Strachaly	Axial	1,6	99	0,99
Sv. Jiří	Husar	6,4	80	2,79
Sv. Jiří	Axial	1,6	97	0,9
Trutnov	Husar	6,4	89	0,14
Trutnov	Axial	1,6	100	0,25
Vejvanov	Husar	6,4	25	4,97
Vejvanov	Axial	1,6	98	0,43
Vítání	Husar	6,4	35	9,58
Vítání	Axial	1,6	89	2,68
Voděradý	Husar	6,4	72	1,87
Voděradý	Axial	1,6	99	0,77
citlivý biotyp	Husar	6,4	98	0,49
citlivý biotyp	Axial	1,6	100	0,12
rezist. standard	Husar	6,4	32	5,24
rezist. standard	Axial	1,6	100	0,21

Tab. č. 14: Hodnoty parametrů B, C, D, ED₅₀ a RF u biotypů testovaných pomocí agarových kultur při použití herbicidu Husar

Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED ₅₀	
Běloky	-0,504	-0,671	93,53	0,179	16,27
Býšť	-0,854	0,418	58,94	1,369	124,45
Čejtice	-0,957	-0,533	90,95	0,231	21,00
Domašov I	-1,269	-0,096	80,14	0,069	6,27
Domašov II	-1,763	0,101	81,09	0,071	6,45
Chlistovice	-0,648	-9,009	99,38	0,041	3,73
Libichov	-1,1	-0,476	92,34	0,027	2,45
Lovčice	-0,852	-1,071	117,25	0,617	56,09
Lysice	-2,388	-0,024	94,61	0,106	9,64
Meclov	-0,556	-12,87	99,801	0,039	3,55
Milostín	-1,131	2,257	104,8	30,37	2760,91
Mladá Vožice	-1,207	-0,351	95,43	1,514	137,64
Povlčín	-0,081	-0,195	89,9	39,59	3599,09
Prašný Újezd	-2,442	1,167	53,49	1,345	122,27
Strachaly	-0,759	-0,32	106,52	0,497	45,18
Svatý Jiří	-1,915	0,036	83,64	0,097	8,82
Trutnov	-0,881	-2,454	94,82	0,042	3,82
Vejvanov	-0,992	-0,263	97,28	28,181	2561,91
Vítání	-1,366	-1,424	8,083	1,174	106,73
Voděradý	-0,559	-5,042	95,92	0,191	17,36
citlivý biotyp	-1,167	-5,674	97,42	0,011	-

b - šikmost křivky

c a d - koeficienty odpovídající spodnímu (0%) a hornímu limitu účinnosti (100%)

ED₅₀ - inflexní bod funkce nacházející se mezi spodní a horní asymptotou a vyjadřující dávku, při níž bylo dosaženo 50% účinnosti

RF – faktor rezistence (podíl hodnot ED₅₀ rezistentního a citlivého biotypu)

Tab. č. 15: Hodnoty parametrů B,C,D,ED₅₀ a RF u biotypů testovaných pomocí agarových kultur při použití herbicidu Axial

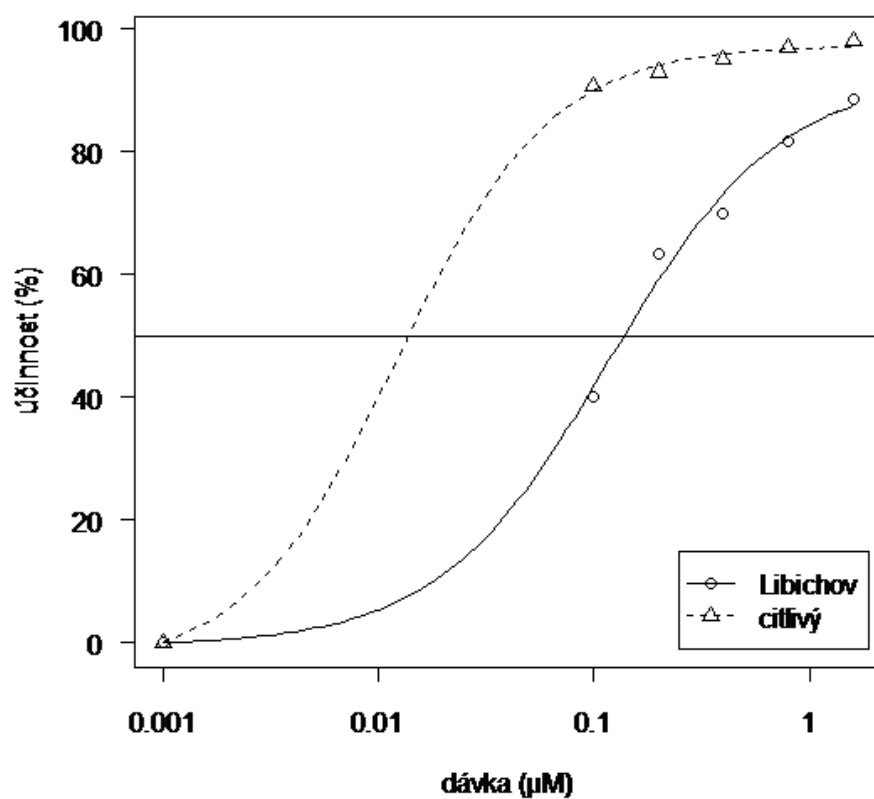
Biotyp	Parametry				RF
	B	C	D	ED ₅₀	
Běloky	-0,477	-9,269	98,08	0,001	0,17
Býšť	-0,579	-5,135	101,71	0,001	0,17
Čejtice	-0,777	-99,013	100,69	0,01	1,67
Domašov I	-0,552	-49,84	104,03	0,003	0,50
Domašov II	-0,549	-46,122	101,79	0,004	0,67
Chlistovice	-0,89	-10,58	100,104	0,012	2,00
Libichov	-1,87	-0,015	99,82	0,039	6,50
Lovčice	-1,093	-2,279	100,41	0,033	5,50
Lysice	-0,609	-39,446	101,73	0,004	0,67
Meclov	-1,297	-0,726	100,72	0,036	6,00
Milostín	-0,598	-41,498	101,76	0,004	0,67
Mladá Vožice	-3,845	0,166	99,38	0,057	9,50
Povlčín	-0,553	-48,294	98,14	0,003	0,50
Prašný Újezd	-1,133	-0,343	96,25	0,056	9,33
Strachaly	-4,439	-0,041	98,69	0,006	1,00
Svatý Jiří	-0,844	-16,303	97,59	0,008	1,33
Trutnov	-1,055	-18,348	99,67	0,004	0,67
Vežvanov	-0,841	-3,394	100,85	0,058	9,67
Vítání	-0,848	-2,494	95,39	0,072	9,00
Voděrády	-0,988	-13,434	97,19	0,007	1,17
citlivý biotyp	-0,972	-14,804	97,89	0,006	-

b - šikmost křivky

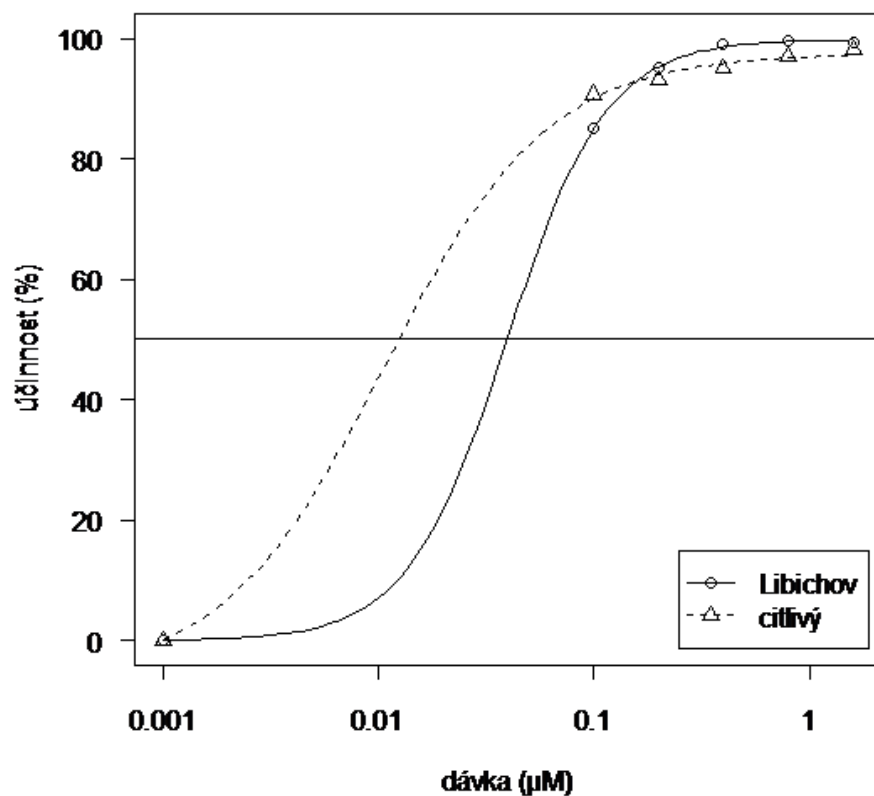
c a d - koeficienty odpovídající spodnímu (0%) a hornímu limitu účinnosti (100%)

ED₅₀ - inflexní bod funkce nacházející se mezi spodní a horní asymptotou a vyjadřující dávku, při níž bylo dosaženo 50% účinnosti

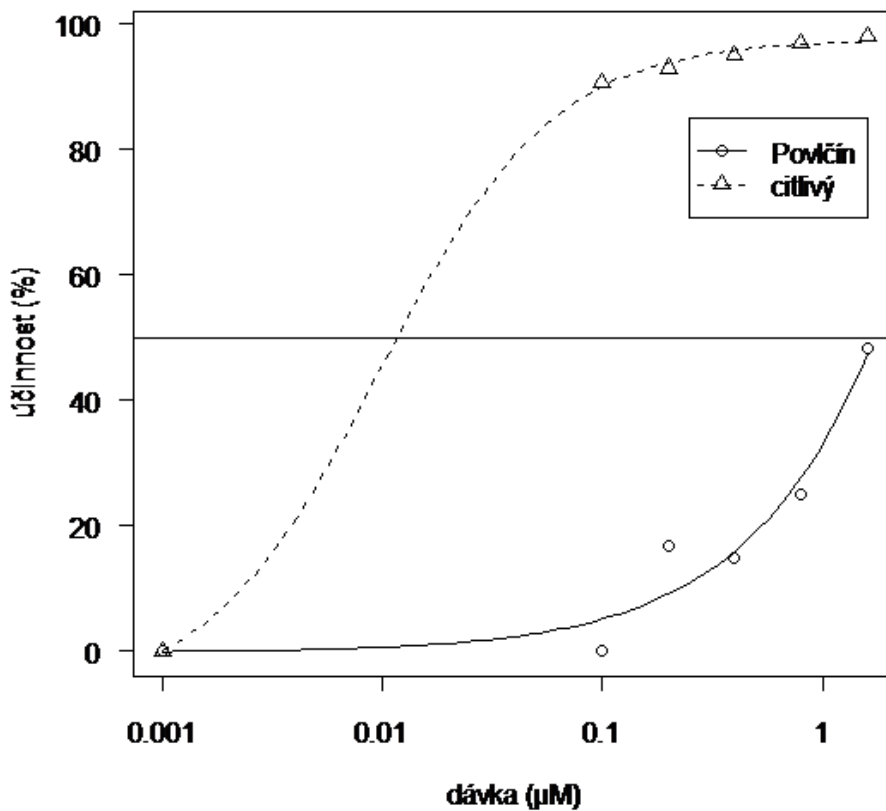
RF – faktor rezistence (podíl hodnot ED₅₀ rezistentního a citlivého biotypu)



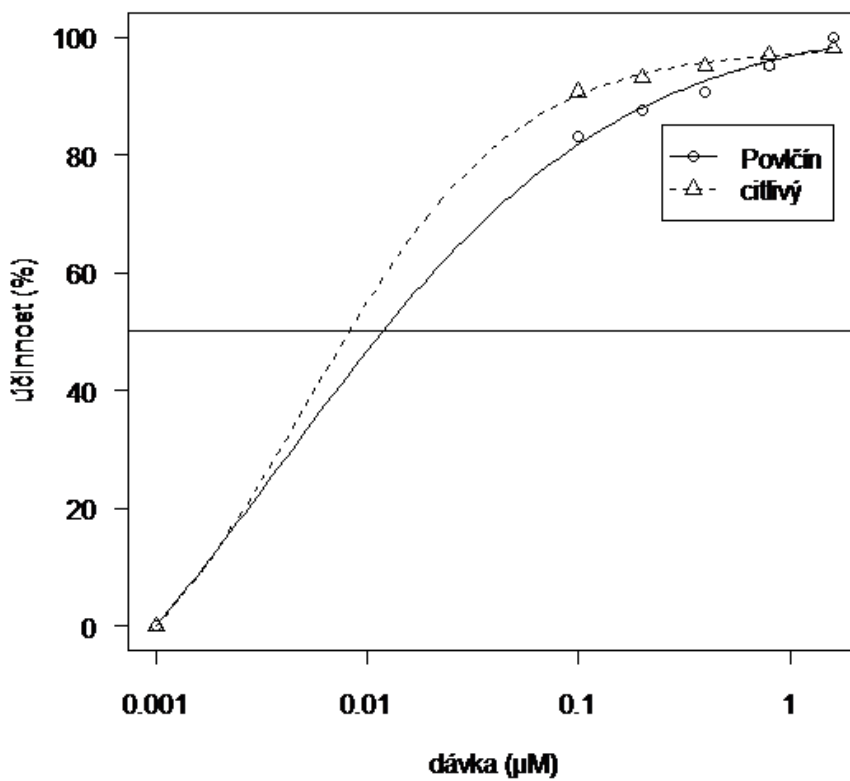
Graf č. 14: Účinnost stupňovaných dávek chlorsulfuronu na biotyp Libichov a citlivý standard



Graf č. 15: Účinnost stupňovaných dávek pinoxadenu na biotyp Libichov a citlivý standard



Graf č. 16: Účinnost stupňovaných dávek chlorsulfuronu na biotyp Povolčín a citlivý standard



Graf č. 17: Účinnost stupňovaných dávek pinoxadenu na biotyp Povolčín a citlivý standard

5.4. Test enzymatické aktivity ALS

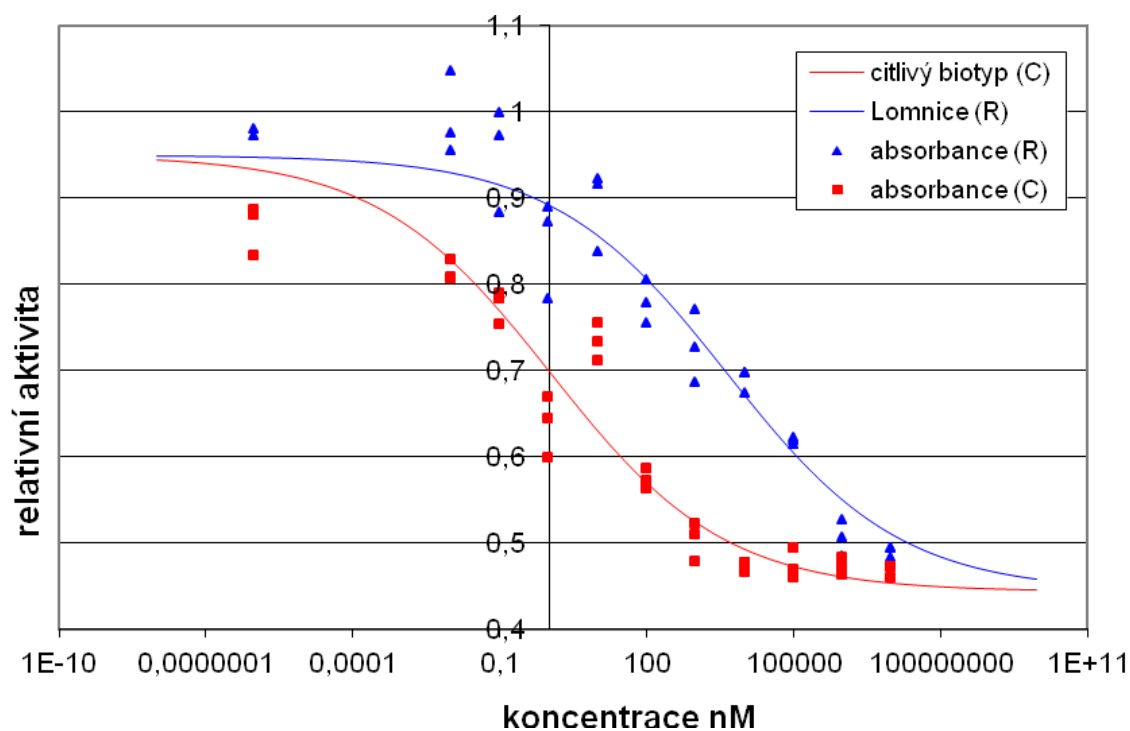
Citlivost enzymu ALS extrahovaného z rostlin rezistentních a citlivého biotypu se výrazně lišila po přidání účinných látek chlorsulfuronu, iodosulfuronu i sulfometuronu (grafy č. 18-26). Nejvyšší stupně rezistence vykazovaly všechny tři biotypy stejně jako v biologických testech k účinné látce chlorsulfuron (RF 803-3848). Poměrně nízké koncentrace byly zapotřebí k 50 % inhibici enzymu při použití účinné látky iodosulfuron u biotypů Vlastějovice a Dynín. O něco více rezistentní k iodosulfuronu byl enzym izolovaný z rostlin pocházejících z Lomnice (RF=88). Různá citlivost enzymů byla zjištěna k účinné látce sulfometuron. Zatímco u biotypu z Lomnice byl detekován vysoký stupeň rezistence (RF=439), u biotypu z Vlatějovic faktor rezistence činil pouze 3,5.

Je pravděpodobné, že rezistentní rostliny ze všech sledovaných lokalit mohou vykazovat křížovou rezistenci. Výsledky testu enzymatické aktivity ALS u některých biotypů potvrdily výsledky biologického testu, v některých případech se lišily. Příčiny rozdílných výsledků budou dále diskutovány.

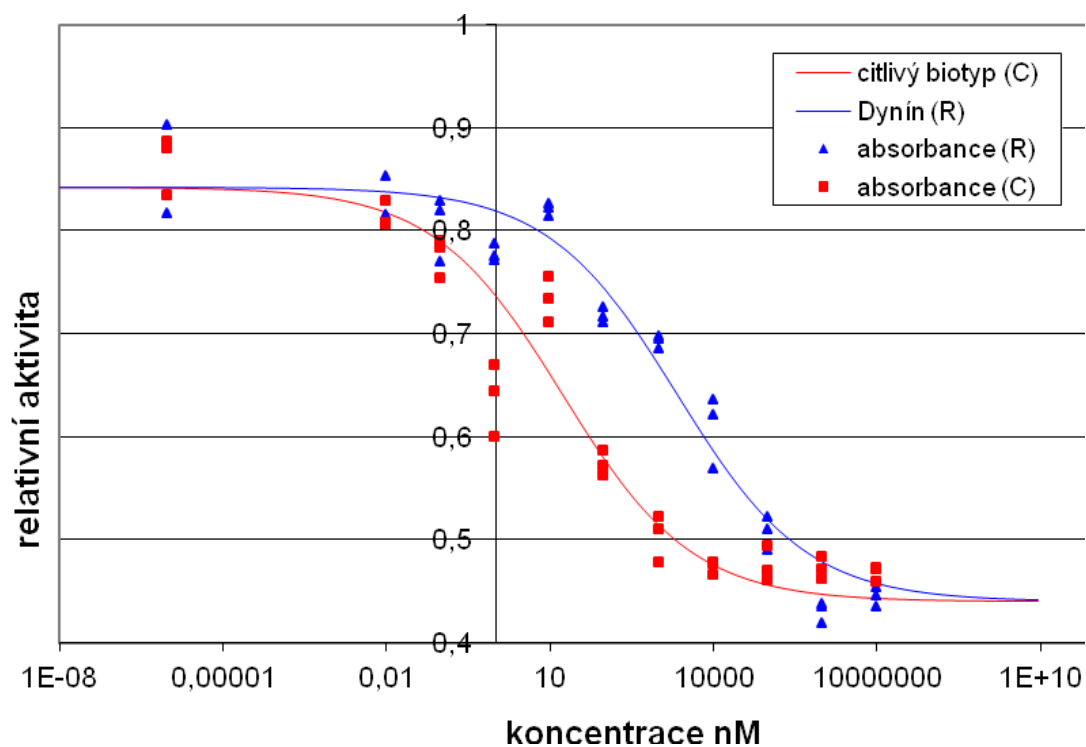
Tab č. 16: Hodnoty parametrů, I_{50} a RF citlivého a tří testovaných biotypů chundelky metlice vycházející ze čtyřparametrického nelineárního modelu LL.4 u čtyř sledovaných účinných látek

chlorsulfuron				
lokality	Lomnice	Vlastějovice	Dynín	citlivý biotyp
parametry				
b	0,2	0,1	0,3	1,1
c	8,2	16,9	14,6	7,3
d	96,1	95,4	94,7	94,8
I_{50} (nM)	3463,2	1222,8	722,6	0,9
RF	3848	1358,7	802,9	-
iodosulfuron				
lokality	Lomnice	Vlastějovice	Dynín	citlivý biotyp
parametry				
b	0,3	0,5	0,4	0,9
c	2,2	1,3	4,9	0,9
d	93,1	96,5	90,8	94,1
I_{50} (nM)	8,8	2,5	4,8	0,1
RF	88	25	48	-
sulfometuron				
lokality	Lomnice	Vlastějovice	Dynín	citlivý biotyp
parametry				
b	0,22	1,2	0,3	1,2
c	19,4	18,2	89,1	13,3
d	98,1	97,1	98,3	98,4
I_{50} (nM)	5138,9	41,5	328,7	11,7
RF	439,2	3,5	28,1	-

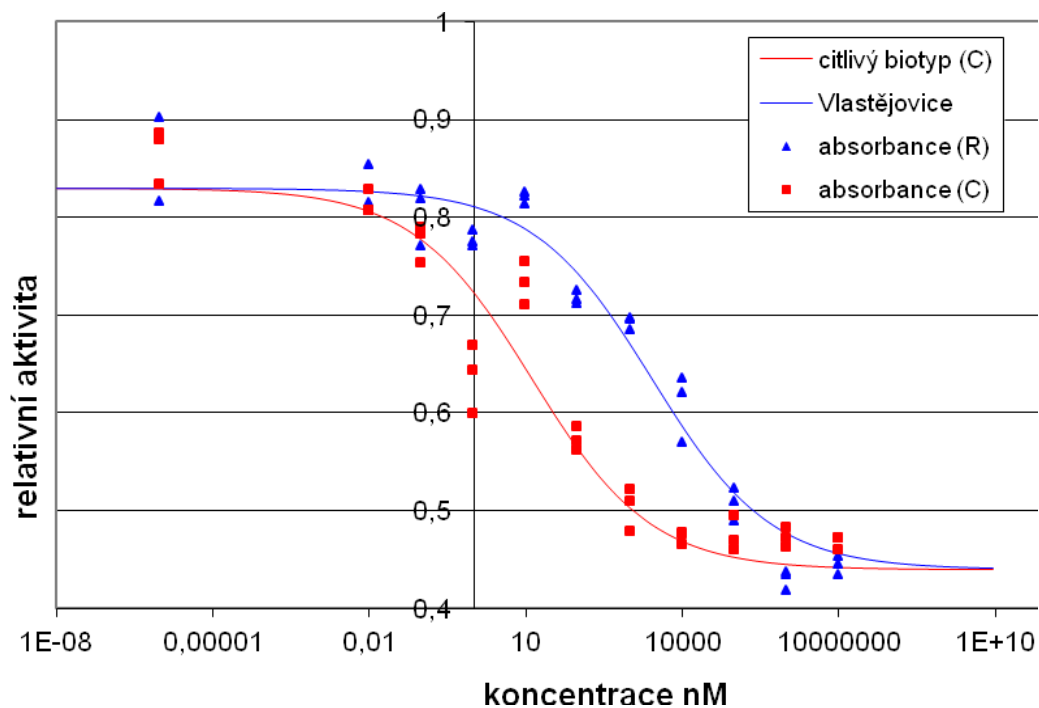
b-šikmost křivky, c-minimum aktivity ALS, d-maximum aktivity ALS, I_{50} - koncentrace herbicidu, která způsobí 50% inhibici aktivity ALS (vztaženo k maximální aktivitě), RF – faktor rezistence, $RF=I_{50R}/I_{50S}$



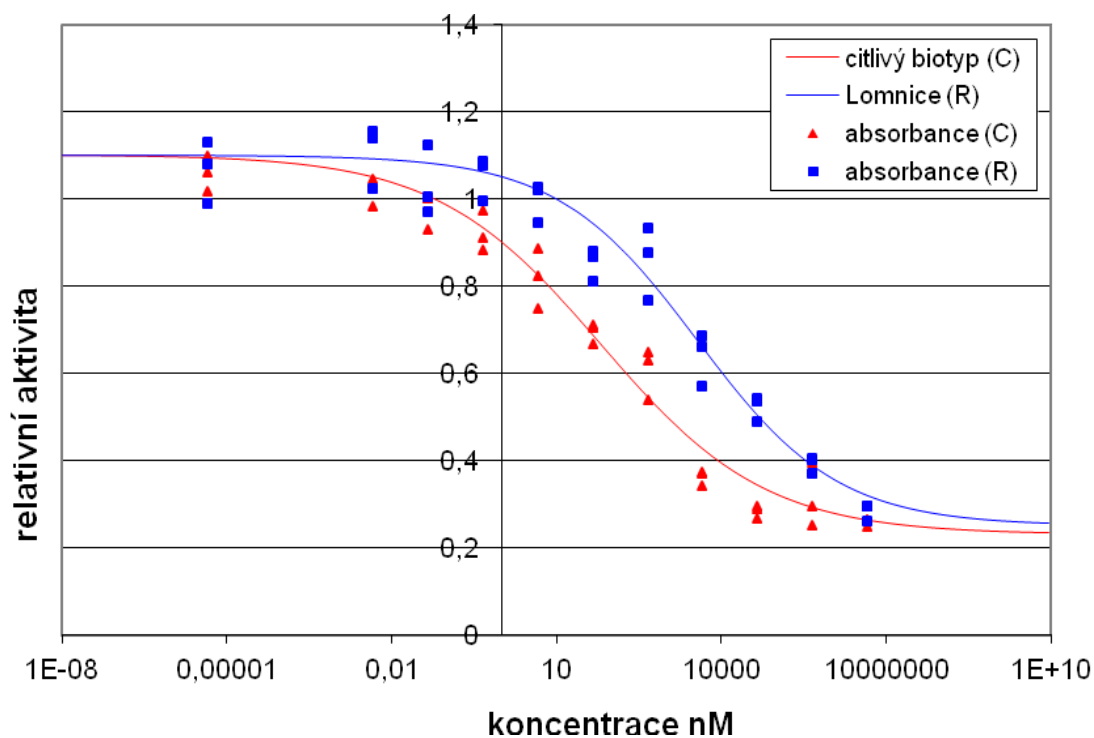
Graf č. 18: Inhibice enzymové aktivity ALS chlorsulfuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Lomnice



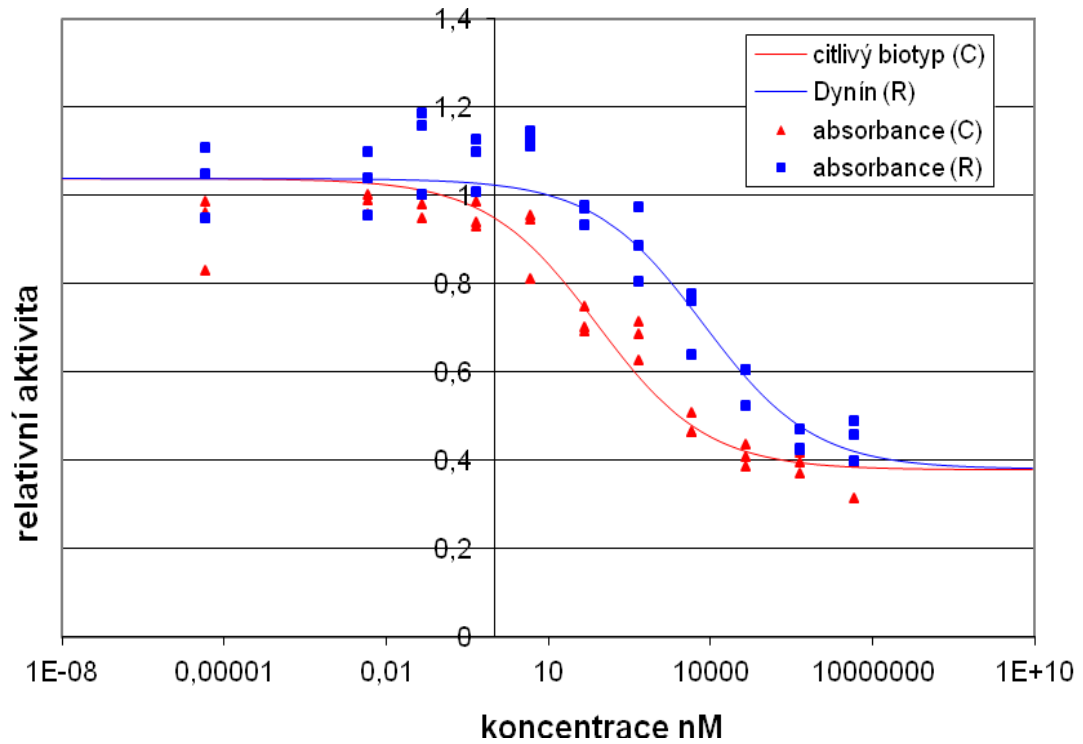
Graf č. 19: Inhibice enzymové aktivity ALS chlorsulfuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Dynín



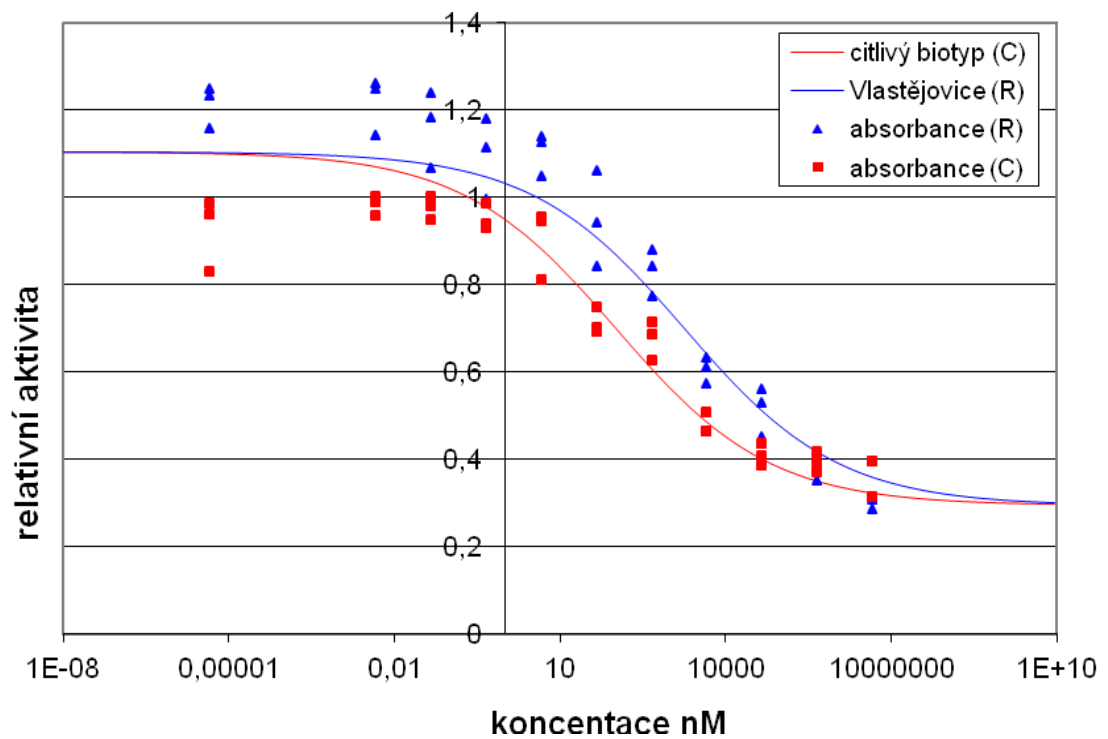
Graf č. 20: Inhibice enzymové aktivity ALS chlorsulfuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Vlastějovice



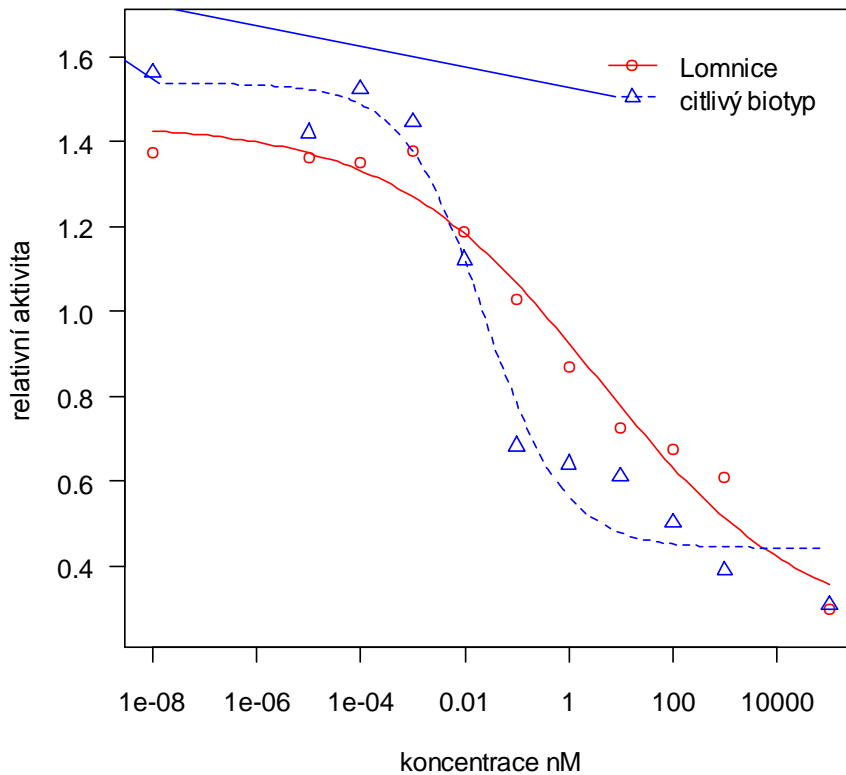
Graf č. 21: Inhibice enzymové aktivity ALS idosulfuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Lomnice



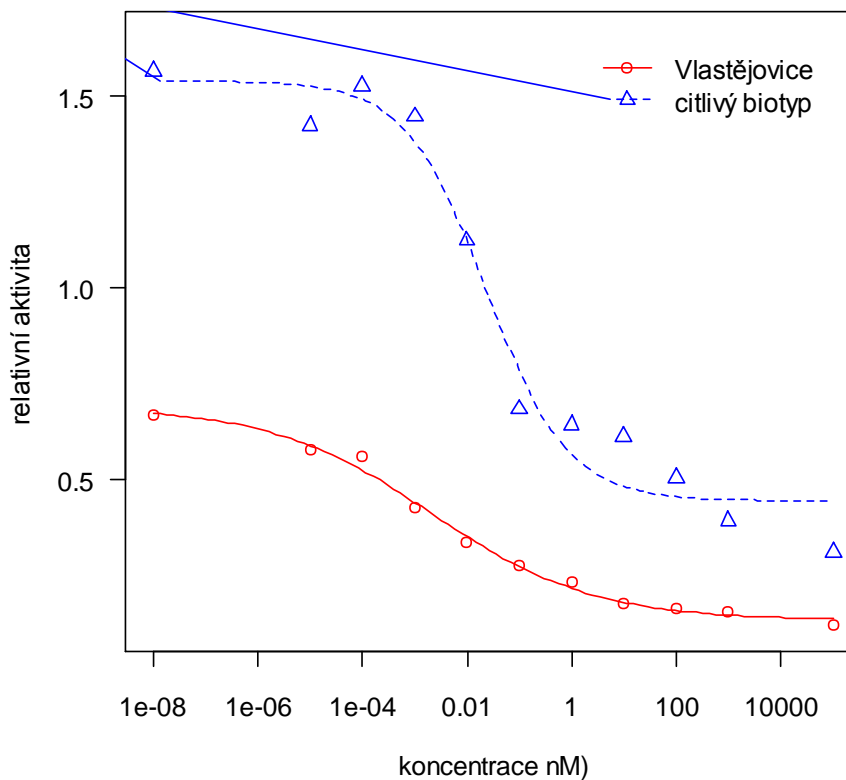
Graf č. 22: Inhibice enzymové aktivity ALS idosulfuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Dynín



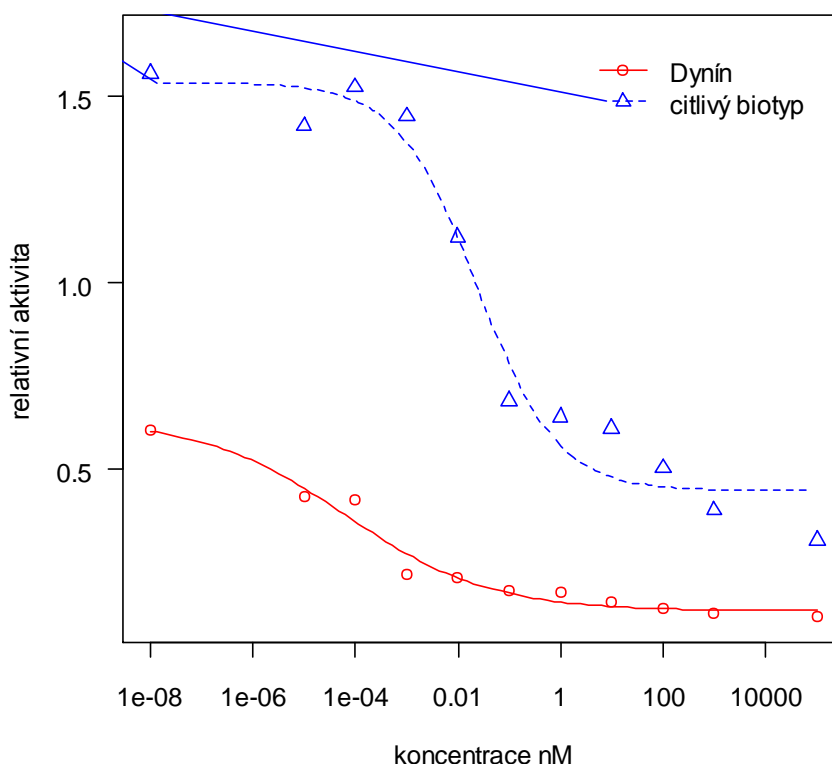
Graf č. 23: Inhibice enzymové aktivity ALS idosulfuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Dynín



Graf č. 24: Inhibice enzymové aktivity ALS sulfometuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Lomnice



Graf č. 25: Inhibice enzymové aktivity ALS sulfometuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Vlastějovice



Graf č. 26: Inhibice enzymové aktivity ALS sulfometuronem u citlivého biotypu a rezistentního biotypu chundelky metlice z lokality Dynín

5.5 Studium reakce rostlin ošetřených chlorsulfuronem s přidavkem malathionu

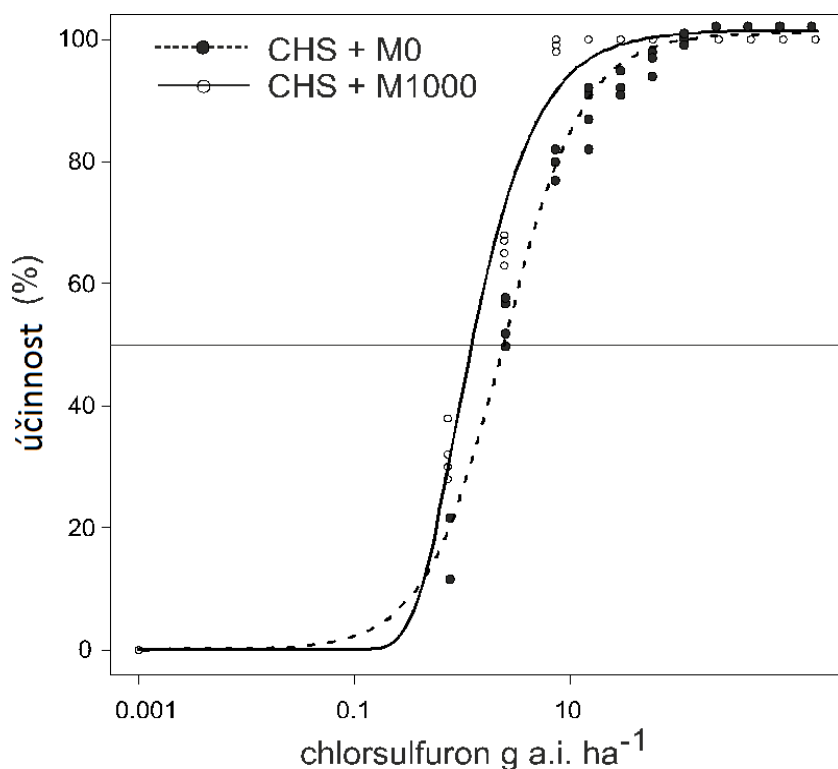
Hodnoty ED_{50} pro chlorsulfuron byly u všech biotypů nižší, pokud byl chlorsulfuron aplikován v přítomnosti malathionu v dávkách od 250 do 1000 $g \cdot ha^{-1}$. V případě, kdy byl herbicid aplikován na citlivý biotyp v přítomnosti malathionu v dávce 1000 $g \cdot ha^{-1}$, účinnost se zvýšila třikrát v porovnání s variantou aplikace chlorsulfuronu bez malathionu (grafy č. 27-30). Ještě nižší hodnoty ED_{50} byly pozorovány u biotypu z Vlastějovic, kdy ED_{50} pro samostatný chlorsulfuron byla vyšší než 1920 $g \cdot ha^{-1}$ a v přítomnosti malathionu poklesla 40x na dávku 45 $g \cdot ha^{-1}$. U biotypu z Dynína se ED_{50} v přítomnosti insekticidu snížilo 28x na dávku 67 $g \cdot ha^{-1}$ a u biotypu Lomnice 10x na dávku 193 $g \cdot ha^{-1}$. Mezi účinností chlorsulfuronu s přidavkem malathionu v dávce 65 $g \cdot ha^{-1}$ a účinností samotného chlorsulfuronu u biotypu z Vlastějovic nebyl zjištěn průkazný rozdíl. Přestože se hodnoty ED_{50} u rezistentních populací v přítomnosti malathionu výrazně snížily, v porovnání s citlivým biotypem byly stále mnohem vyšší. Přehled všech statisticky

zpracovaných výsledků z nelineárních regresí je pro každou variantu uveden v tabulce č. 17.

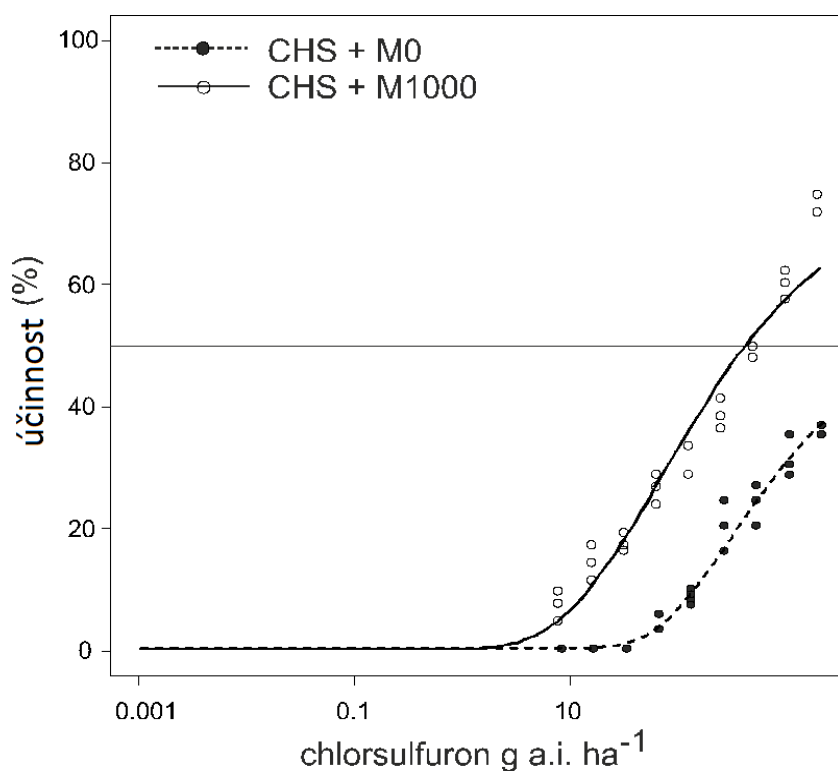
Tab. č. 17: Odhady parametrů z nelineárních regresních analýz pro jednotlivé varianty pokusu vypočítané z hodnot herbicidní účinnosti (%).

Biotyp/ aplikace	model	Parametry				RF
		B	C	D	ED ₅₀	
Dynín/M0	W1.3	-0.62	0	53.3	>1920	>777
Dynín/M65	W1.3u	-0.74	0	50	>1920	>1010
Dynín/M250	W1.3	-0.48	0	89.9	141.6	157.3
Dynín/M1000	W1.3	-0.47	0	80	67.1	88.3
Vlastějovice/M0	W1.3	-1.3	0	46.8	>1920	>777
Vlastějovice/M65	W1.3	-0.78	0	61.0	>1920	>1010
Vlastějovice/M250	W1.3	-0.65	0	80	85.0	94.4
Vlastějovice/M1000	W1.3	-0.53	0	80	44.5	58.6
Lomnice/M0	W1.3	-1.33	0	40	>1920	>777
Lomnice/M65	W1.3u	-0.37	-0.6	100	>1920	>1010
Lomnice/M250	W1.3u	-0.42	-1.5	100	285.7	317.4
Lomnice/M1000	W1.3	-0.36	2.7	100	193.7	254.9
citlivý/M0	LL.4	-1.16	-1.4	98.9	2.47	-
citlivý/M65	LL.4	-1.7	1.2	100	1.90	-
citlivý/M250	LL.3	-0.47	0	100	0.90	-
citlivý/M1000	LL.3	-1.08	0	100	0.76	-

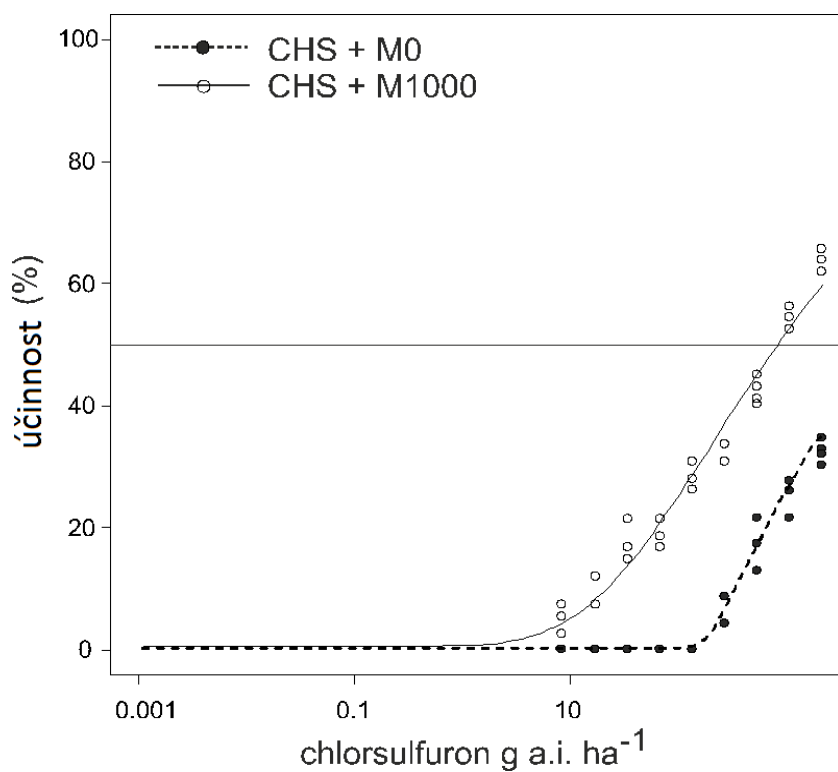
Zkratky: M0 – chlorsulfuron bez malathionu, M65-M1000 chlorsulfuron + malathion v příslušných dávkách, W1.3 – Weibullův model, LL.3. LL.4 – log-logistický model se 3 nebo 4 parametry odhadu, b – sklon křivky, c – spodní limit, d- horní limit, GR₅₀ – inflexní bod, RF –faktor rezistence



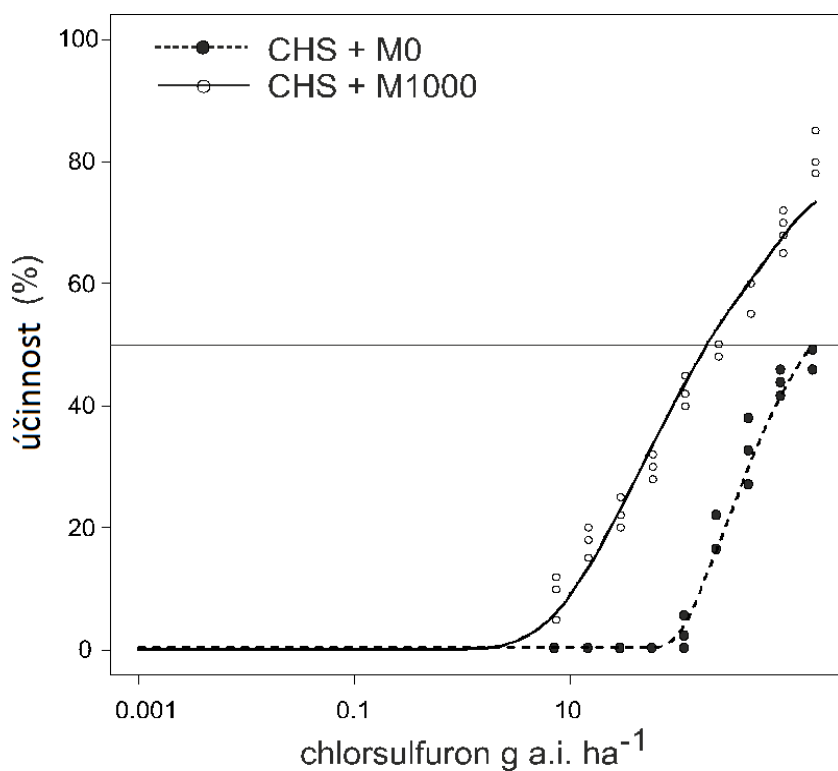
Graf č. 27: Účinnost (%) stuňovaných dávek chlorsulfuronu v přítomnosti malationu v dávce 1000 g.ha⁻¹ (M1000) a samotného chlorsulfuronu (M0) u citlivého biotypu chundelky metlice



Gra č. 28: Účinnost (%) stuňovaných dávek chlorsulfuronu v přítomnosti malationu v dávce 1000 g.ha⁻¹ (M1000) a samotného chlorsulfuronu (M0) u biotypu chundelky metlice z lokality Dynín



Graf č. 29: Účinnost (%) stužovaných dávek chlorsulfuronu v přítomnosti malationu v dávce 1000 g.ha⁻¹ (M1000) a samotného chlorsulfuronu (M0) u biotypu chundelky metlice z lokality Lomnice



Graf č. 30: Účinnost (%) stužovaných dávek chlorsulfuronu v přítomnosti malationu v dávce 1000 g.ha⁻¹ (M1000) a samotného chlorsulfuronu (M0) u biotypu chundelky metlice z lokality Vlastějovice

5.6. Sekvencování a detekce mutací v genu *als*

V zájmových oblastech genu *als* bylo u rezistentních jedinců, kteří přežili ošetření sulfometuronem, objeveno několik nukleotidových záměn, přičemž některé z nich způsobily zařazení jiné aminokyseliny, než jaká se vyskytovala v původním proteinu. Tyto substituce vedou ke změnám ve struktuře enzymu ALS a zabránění navázání herbicidních látek ze skupiny inhibitorů tohoto enzymu. Celkem byly u testovaných rezistentních populací identifikovány čtyři bodové mutace.

U populace Dynín byly nalezeny dvě záměny aminokyselin vedoucí k mutaci. V pozici 197 došlo díky nukleotidovým substitucím k náhradě aminokyseliny alanin za prolin a aminokyseliny treonin za prolin. V pozici 574 byla detekována substituce leucinu za tryptofan a v populaci Vlastějovice jeden polymorfismus způsobil u rezistentního biotypu substituci methioninu za tryptofan.

Rezistentní jedinci byli ve většině případů heterozygotní. U populace Dynín se vyskytovalo 7% homozygotů (alanin/alanin v pozici 197) a 3% jedinců mělo ve stejné pozici aminokyselinu treonin/treonin.

V populaci Dynín bylo nalezeno mnoho nukleotidových záměn, většina z nich však díky degeneraci genetického kódu neměla za následek záměnu aminokyseliny a nevedla k rezistenci. Bylo rovněž identifikováno několik mutací, při kterých došlo ke změně proteinu. Nicméně u rostliny z tohoto biotypu, která byla vybrána pro sekvenování celého genu *als*, nebyla nalezena žádná mutace v pozicích 197, 377 a 574, o kterých je známo, že způsobují rezistenci k ALS inhibitorům u trávovitých i dvouděložných plevelů. U této rezistentní rostliny byly identifikovány tři aminokyselinové substituce (Ser-263-Ala, Arg-272-Ser a Glu-446-Asp (tab č. 19), u kterých však stále není zřejmé, zda vedou k rezistenci.

Dvě rezistentní alely byly nalezeny u populace Lomnice. 36% jedinců tohoto biotypu bylo rezistentních k ALS inhibitorům díky záměně threoninu za prolin v pozici 197 genu *als*. Kromě toho 20% rezistentních jedinců mělo jednu rezistentní alelu v pozici 574. Jedna rezistentní rostlina měla rezistentní dvě alely: Pro-197-Thr a Trp-574-Met.

Velká část populace Vlastějovice byla shledána jako citlivá k sulfonylmočovinám.

Sekvence celého genu *als* rezistentní a citlivé rostliny chundelky metlice z populace Dynín je uvedena na obr. č. 7. Sekvence je umístěna do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a zveřejněna pod kódem JN646110.1.

Tab. č. 18: Aminokyselinové záměny spojené s rezistencí u tří testovaných populací chundelky metlice

Populace	Počet osekvenovaných rostlin	Aminokyselinová (AK) substituce	Počet rostlin s AK substitucí (homozygoti)
Dynín	38	Pro-197-Ala Pro-197-Thr Trp-574-Leu	12 (3) 5 (1) 2 (0)
Vlastějovice	15	Trp-574-Met	2 (0)
Lomnice	22	Pro-197-Thr Trp-574-Met	8 (4) 5 (1)

Zkratky aminokyselin: Ala – alanin, Thr – threonin, Pro – prolin, Met – methionin, Trp– tryptophan

Tab. č. 19: Zjištěné fenotypy a genotypy u citlivé a rezistentní rostliny z populace Dynín (číslování podle sekvence *Arabidopsis. thaliana* (L.) Heynh).

Fenotyp	Rezistentní	Citlivá	Rezistence	Marker
AK/Biotyp	D13	D20	HM458301.1	Marker
263	Ala	Ser	Ala	R ⁺
272	Ser	Arg	Ser	R ⁺
291	Pro	Gln	Gln	- ⁺
311	Ser	Ser	Ala	D ⁺
427	Leu	Leu	Gln	D ⁺
440	Ala	Ser	Ser	- ⁺
446	Asp	Glu	Asp	R ⁻
*623	Arg	Arg	Pro	D ⁺
664	Glu	Glu	Asp	D ⁻
669	Val	Val	Ile	D ⁻

Vysvětlivky: R – rezistentní, D – Dynín, (-) - neutrální marker (bez ovlivnění fenotypu nebo populace), aa – substituce aminokyseliny: + změna ve struktuře proteinu, – bez změny ve struktuře proteinu

Zkratky aminokyselin: Ala – alanin, Ser – serin, Pro – prolin, Leu – leucin, Asp – aspartan, Arg – arginin, Glu – kys. glutamová, Val – valin, Gln – glutamin, Ile – isoleucin

Oblast 1

1 A T N L V S A L A D A L L D S
1 G C C A C T A A C C T C G T C T C C G C G T C G C C G A T G C T C T T C T C G A C T C C
T

Doména A

S 16 I P M V A I T G Q V P R R M I
S 46 A T C C C G A T G G T C G C C A T C A C G G G G C A G G T T C C C C G C C G C A T G A T C
R T
R S

Doména D

31 G T D A F Q E T P I V E V T R
91 G G C A C G G A C G C C T T C C A A G A G A C G C C C A T A G T A G A G G T C A C C C G C

46 S I T K H N Y L V L D V E D I
136 T C C A T C A C C A A G C A C A A T T A C C T G G T C C T C G A C G T G G A G G A C A T T
C

61 P R V I Q E A F F L A S S G R
181 C C C C G C G T C A T T C A G G A A G C C T T C T T C C T C G C C T C C T C C G G C C G G

76 P G P V L V D I P K D I Q Q Q
226 C C A G G G C C G G T G C T G G T C G A C A T C C C C A A G G A C A T C C A G C A G C A G

Obr. č. 5: Porovnání sekvencí nukleotidů a aminokyselin rezistentní a citlivé rostliny chundelky metlice z lokality Lomnice. Zvýrazněné nukleotidy a aminokyseliny označují mutace.

Oblast 2

1 E L T K G E A I I A T G V G Q
1 G A G C T G A C G A A A G G G G A G G C G A T C A T T G C C A C T G G T G T T G G G C A G

16 H Q M W A A Q Y Y T Y K R P R
46 C A C C A G A T G T G G G C G G C T C A G T A T T A C A C T T A C A A G C G G C C A C G G

31 Q W L S S S G L G A M G F G L
91 C A G T G G C T G T C T T C G T C T G G T C T G G G G G C A A T G G G G T T T G G G T T G

S 46 P A A A G A A V A N P G V T V
S 136 CCTGCTGCAGCTGGTGGCTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTCACGGTT
R G

61 V D I D G D G S F L M N I Q E
181 GTTGACATTGATGGGGATGGTAGCTTCCTCATGAATATTCAGGAG

76 L A L I R I E N L P V K V M I
226 TTGGCACTGATTCGCATCGAGAACCCTCCCGGTTAAGGTGATGATA

Doména B

91 L N N Q H L G M V V Q W E D R
271 CTGAACAACCAACATCTAGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGA

106 F Y K A N R A H T Y L G N P E
316 TTTTACAAGGCCAATCGGGCGCACACTTACCTAGGGAACCCAGAG

121 N E S E I Y P D F V T I A K G
361 AATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGG

136 F K V P
406 TTCAAAGTTCCT

Obr. č. 6: Porovnání sekvencí nukleotidů a aminokyselin rezistentní a citlivé rostliny chundelky metlice z lokality Dynín. Zvýrazněné nukleotidy označují záměnu.

5.7. Metoda dCAPS

Pouze u rostlin pocházejících z lokality Lomnice byli u obou kodónů P197 a W574 identifikováni homozygotní mutanti. Většina rezistentních rostlin byli heterozygoti v P197 nebo W574, nebo většinou u obou domén. Uvnitř populace z Dynína se nacházely 2% rezistentních homozygotů a 65% heterozygotů u domény Pro-197 a 40% heterozygotů u domény Trp-574. U všech jedinců se substitucí v pozici Trp-574 se vyskytovala záměna tryptofanu (TGG) za metionin (ATG). Data se shodují s výsledky získanými ze sekvenčních analýz a se závěry z pokusu na výběr rezistentních a citlivých jedinců z populace za použití herbicidu sulfometuron. Jednotlivé genotypové frekvence rostlinných jedinců jsou uvedeny v tab. č. 20.

Tab. č. 20: Polymorfismus jedinců u tří vybraných populací chundelky metlice zjištěný na základě dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence analysis)

pozice mutace / haploidní genotyp	Populace								
	Dynín			Vlastějovice			Lomnice		
	RR	RS	SS	RR	RS	SS	RR	RS	SS
Pro-197	2	65	33	0	0	100	5	60	35
Trp-574	0	40	60	0	5	95	5	90	5

RR- dominantní homozygoti, RS – heterozygoti, SS – recesivní homozygoti

6. DISKUZE

Vznik a vývoj rezistence k inhibitorům ALS připravil pěstitelům z celého světa významný problém, který vyžaduje zvláštní pozornost jak po teoretické stránce, tak i z pohledu praktických řešení. Stále častěji jsou od českých pěstitelů hlášeny informace o snížené účinnosti sulfonylmočovín a dalších přípravků se stejným mechanismem účinku na chundelku metlice. První nálezy rezistence tohoto plevelného druhu prokázali na pěti lokalitách Nováková a kol. (2006) a Soukup a kol. (2006). Vzhledem k obtížnosti regulace rezistentních biotypů, ale také z důvodu prevence nežádoucích změn ve společenstvech plevelů, je nutné výskytu rezistentních biotypů chundelky nepodcenit a danému problému věnovat pozornost.

Za účelem detekce a monitoringu dalších rezistentních biotypů byly v této práci testovány rostliny chundelky metlice z lokalit, na kterých byla z důvodu dlouhého selekčního tlaku sulfonylmočovín rezistence velmi pravděpodobná. Vybrané biotypy s podezřením na rezistenci byly testovány pomocí růstových testů a fyziologickými a molekulárně genetickými metodami.

Studiem rezistence chundelky metlice za použití růstových pokusů se zabývalo mnoho prací (Marczewska, Rola, 2002), (Niemann a Zwerger 2006) a další. Novější výsledky přinášejí práce Krysiaka (2011), Massy a kol. (2011) a Adamczewskiho a Matysiaka (2012).

Krysiak a kol. (2011) u několika biotypů chundelky metlice detekovali pomocí dose response testů různé stupně rezistence vůči účinným látkám chlorsulfuron, sulfosulfuron, propoxycarbazon-sodium a mesosulfuron + iodosulfuron. Nejvyšší stupeň rezistence shledali vůči účinné látce chlorsulfuron, kdy u jednoho biotypu zaznamenali stupeň rezistence 20,6.

Massa a kol. (2011) pomocí nádobových pokusů testovali rezistenci k ALS inhibitorům u 72 populací a potvrdili ji u všech případů. 67 populací vykazovalo silnou rezistenci k těmto účinným látkám ze skupiny sulfonylmočovín-flupyr-sulfuron, chlorsulfuron, sulfosulfuron, mesosulfuron+iodosulfuron a sulfometuron. Tyto sulfonylmočoviny byly v doporučovaných látkách neschopné redukce populací a při jejich aplikaci bylo dosaženo účinnosti pouze 0-10%. Účinnost k látkám propoxycarbazon-sodium ze skupiny sulfonylaminocarbonyl-triazolinonů (SCTs) a k florasulam + pyroxsulam ze skupiny triazolopyrimidinů

(TPs) v doporučených dávkách byla výrazně vyšší (55-70%), nicméně byly nalezeny rezistentní populace i k těmto látkám.

Také v této práci byla rezistence k účinným látkám ze skupiny ALS inhibitorů biologickým testem potvrzena. Biotypy testované na rezistenci přeživaly doporučené dávky testovaných sulfonylmočoviny a triazolopyrimidinu. U všech byly zjištěny vysoké faktory rezistence RF. Nejvyšší hodnoty RF byly shledány vůči chlorsulfuronu, který patří mezi nejdéle a nejčastěji používané herbicidy k regulaci chundelky metlice. Hodnoty RF přesahovaly hodnotu 2000, což ukazuje na vysokou pravděpodobnost rezistence způsobenou díky pozměněnému místu účinku, tedy specifickou rezistenci. Herbicidem mesosulfuron+iodosulfuron bylo ze třech použitých ALS inhibitorů dosaženo nejlepší účinnosti, avšak při doporučené dávce $150 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ se odolné biotypy dařilo redukovat pouze z 20-50%. U tohoto herbicidu byly také v porovnání s chlorsulfuronem a pyroxsulamen zjištěny nižší hodnoty faktorů rezistence, ale i v tomto případě lze konstatovat, že testované biotypy jsou k mesosulfuron-iodosulfuronu vysoce rezistentní a v místech, kde se objevují komplikace s regulací chundelky metlice, nelze tento herbicid k její regulaci doporučit. U herbicidu pyroxsulam bylo k redukci 50% nadzemní biomasy (ED_{50}) u biotypu Lomnice zapotřebí dávky vyšší než $250 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$, přičemž ke kontrole biotypu citlivého stačila i nižší dávka než doporučená. Herbicid Powerflex (pyroxsulam) je v České republice registrován pod obchodním názvem Corello a účinná látka pyroxsulam je obsažena také v herbicidu Hurricane, který je také k regulaci chundelky metlice doporučován. Lze tedy předpokládat, že biotypy odolné k Powerflexu/Corellu budou vykazovat křížovou rezistenci i k tomuto přípravku.

Křížovou rezistenci chundelky metlice na našem území popisují ve své práci Soukup a kol. (2005). Rostliny chundelky ve výsledcích jejich pokusů vykazovaly rezistenci k chlorsulfuronu, iodosulfuronu a sulfosulfuronu. Všechny tyto účinné látky jsou u nás k regulaci chundelky stále často používány. Otázkou zůstává, zda se rezistence pod jejich selekčním tlakem vyvinula ke každé účinné látce zvlášť a s odlišnými mechanismy účinku, nebo byla u dalších účinných látek vyvolána.

Vícenásobná rezistence k dalším skupinám herbicidů používaných k redukci chundelky metlice nebyla v práci potvrzena. Obě testované látky ze skupiny inhibitorů enzymu acetyl-koenzym A karboxylázy spolehlivě redukovaly a způsobily úhyn všech testovaných biotypů. Při použití doporučených dávek bylo

v případě účinné látky pinoxaden dosaženo účinnosti mezi 74 a 95%, u účinné látky fenoxaprop mezi 66 a 96%. Také nízké hodnoty RF (0,3-4,0) ukazují, že chundelka metlice je na našem území k této skupině látek prozatím citlivá a lze ji doporučit v antirezistentních strategiích.

K podobným výsledkům dochází i Klemová a kol. (2010), která uvádí, že fenoxaprop i pinoxaden byly schopny prakticky zastavit proces selekce rezistentních populací chundelky metlice, protože u kombinace sulfosulfuronu s těmito herbicidy nedocházelo ke zvyšování faktoru rezistence.

Vícenásobná rezistence k inhibitorům ACCázy však již byla prokázána v Polsku (Adamczewski, Matysiak, 2012) a v Německu (Petersen, 2009). Adamczewski a Matysiak detekovali resistenci u šesti biotypů k účinné látce chlorsulfuronu, přičemž některé biotypy vykazovaly křížovou rezistenci k dalším sulfonylmočovinám a u některých biotypů byla objevena rezistence k účinné látce fenoxaprop. Faktory rezistence u těchto biotypů činily 10,9-16,8 a k dosažení účinnosti 50 % bylo zapotřebí aplikovat dávku fenoxapropu 95,2-144,5 g.ha⁻¹.

V Německu byly objeveny v ječmeni ozimém a ozimé pšenici biotypy chundelky metlice s rezistencí k herbicidům inhibující ACCázu, ALS a herbicidům ze skupiny PS II inhibitorům. Konkrétně se jednalo o účinné látky fenoxaprop, iodofenuron, isoproturon, mesosulfuron, pinoxaden, pyroxsulam a sulfosulfuron (Petersen, 2009).

Výhodou nádobových pokusů na úrovni celé rostliny je, že ze všech metod pro detekci rezistence nejlépe simuluje podmínky, ve kterých můžeme projevy rezistence u plevelných rostlin pozorovat na polích. Nevýhodou těchto metod je ovšem prostorová náročnost a dlouhé časové období, než je dosaženo výsledku. Od aplikace herbicidů po vyhodnocení jejich účinnosti mohou na testované rostliny působit další faktory, které ovlivňují hodnocení pokusů. V případě této práce se jednalo např. o napadení některých rostlin padlím travním.

Z výsledků biologického testu také nelze přesně definovat typ rezistence, na základě výsledků – vypočtených hodnot faktorů rezistence a účinností hodnocených vizuálně ho lze pouze odhadnout.

Metodou, kterou lze dosáhnout rychlejšího výsledku je agarový RISQ test. Tento test byl v práci zvolen k otestování 20 vytipovaných populací s podezřením na rezistenci. Kaundun a kol. (2010), kteří pomocí RISQ metody testovali několik populací jílku tuhého s předem známou rezistencí k účinným látkám clodinafop-

propargyl, pinoxaden (inhibitory ACCázy) a iodo-mesosulfuron (ALS inhibitor), demonstrovali velmi dobrou korelaci výsledků s klasickými nádobovými pokusy. Při použití herbicidu pinoxaden byly v našich experimentech na rostlinách již během několika prvních dnů patrné typické příznaky poškození a při aplikaci dávky 1,6 μM bylo u všech populací dosaženo vysoké účinnosti 83-100%. U většiny těchto biotypů byly shledány i nízké faktory rezistence a tyto biotypy pak byly ohodnoceny jako citlivé stejně jako u nádobového pokusu. U čtyř biotypů byly zjištěny faktory rezistence 9,0-9,67, což může představovat i poměrně vysoký stupeň rezistence. Na základě vizuálního hodnocení a statistického hodnocení nárůstu biomasy se tyto biotypy však jeví jako citlivé. V těchto případech byl zřejmě použit nevhodný nelineární model, který vedl ke zjištění vysokého faktoru rezistence. K chlorsulfuronu vykazovaly citlivost pouze dva testované biotypy. U zbývajících 18 biotypů byly mezi nárůstem biomasy u rezistentních biotypů a citlivého standardu shledány statisticky průkazné rozdíly. Rostliny u sedmi populací přežily ošetření i při použití nejvyšší dávky a byl u nich patrný i rozvoj nových kořenů a nárůst nadzemní biomasy. U těchto biotypů je pravděpodobné, že se jedná o specifickou rezistenci v místě účinku. U zbývajících 11 biotypů byly zjištěny střední hodnoty RF a je u nich předpoklad vzniku metabolické rezistence. Mechanismus rezistence nemůže být tedy ani touto metodou spolehlivě určen.

Pro odhalení mechanismu a podstaty rezistence je tedy zapotřebí použít studie jako např. stanovení enzymatické aktivity ALS, kterým je rezistence detekována na fyziologické úrovni.

Předpokládá se, že vzrůstající používání herbicidů inhibujících enzym acetolaktát syntázu, může vést k selekci rostlin se zvýšenou aktivitou tohoto enzymu (Sarri, 1992). To by mohlo být příčinou rezistence způsobenou změnou cílového místa působení herbicidu. Fisher (2000) studoval specifickou aktivitu ALS u ježatky *Echinochloa phyllopogon* (Stapf) K.-Pol. rezistentní k účinné látce bispyribac-sodium. Ve své práci zjistil, že aktivita tohoto enzymu byla u rezistentních biotypů vyšší než u senzitivních biotypů.

Poznatky o studiu aktivity enzymu ALS chundelky metlice jsou popsány v práci Novákové a kol. (2006). V přítomnosti relativně vysokých dávek chlorsulfuronu zjistili vysoký obsah acetoinu u všech pěti testovaných biotypů s podezřením na rezistenci. U citlivého standardu došlo k zabránění vzniku acetoinu. Statisticky průkazně vyšší hodnoty I_{50} u pěti testovaných biotypů

naznačují, že rostliny mají pravděpodobně pozměněnou formu enzymu ALS a pokles jeho citlivosti k chlorsulfuronu je s velkou pravděpodobností mechanismem rezistence.

Další výsledky o chování izolovaného enzymu ALS z chundelky metlice v přítomnosti sulfonylmočoviny přináší práce Massy a kol. (2011). Aktivitu enzymu testovali v přítomnosti účinné látky flupyrsulfuron na čtyřech biotypech. U všech zjistili významné snížení inhibice enzymatické aktivity v porovnání s citlivým biotypem. Hodnoty faktorů rezistence dosahovaly u všech biotypů vysokých hodnot (RF 86 – 8333).

Balgheim a kol. (2007) při měření aktivity enzymu ALS v přítomnosti účinných látek sulfosulfuron a propoxycarbazonu zjistili statisticky významné rozdíly mezi rezistentním a citlivým biotypem.

V této práci byly u všech tří testovaných biotypů na rezistenci (Lomnice, Dynín, Vlastějovice) v přítomnosti vysokých dávek herbicidů zjištěny vysoké obsahy acetoinu. Množství vyprodukovaného acetoinu za jednotku času v přítomnosti rostoucích koncentrací účinných látek vyjadřuje specifickou aktivitu enzymu ALS. Vzhledem k tomu, že v koncentraci proteinů, které při této reakci za přítomnosti enzymu ALS vznikají, nebyly mezi citlivými a rezistentními biotypy prokázány statisticky průkazné rozdíly, se lze domnívat, že příčina vyšší koncentrace acetoinu není způsobena nadprodukcí enzymu, ale pravděpodobně snížením citlivosti enzymu k herbicidům inhibujícím ALS. U rezistentních biotypů patrně nedošlo k efektivnímu navázání herbicidu z důvodu modifikace vazebného místa na enzymu ALS. Také zjištěné hodnoty I_{50} a vysoké hodnoty faktorů rezistence ukazují na fakt, že biotypy vykazují nejspíše specifickou rezistenci v místě účinku. Mezi hodnotami I_{50} u citlivého a rezistentních biotypů byly v reakci na dávky herbicidů shledány statisticky průkazné rozdíly. Další možný mechanismus rezistence jako je např. metabolická detoxikace nebo transkolace herbicidu může být zapojen u rostlin z lokality Vlastějovice testovaných na rezistenci k sulfometuronu, u kterých byl zjištěn nízký faktor rezistence (3,5). Výsledky testu aktivity ALS plně neodráží výsledky biologických testů. V některých případech byly stupně rezistence zjištěné z výsledků biologického testu mnohonásobně vyšší. Důvodem detekce výrazně nižšího stupně rezistence pomocí ALS testu může být skutečnost, že se ke změně vazebného místa přidává ještě zvýšený metabolismus herbicidu. Enzymatický test pak přesně neodráží míru

rezistence (Sarri a kol., 1994). Další příčinou rozdílných výsledků může být to, že srovnáváme hodnoty z testů, kdy jeden měří aktivitu čistého enzymu *in vitro* a druhý testuje celé rostliny. V rostlině působí mnoho faktorů, které mohou vyústit v celou řadu odpovědí na aplikaci herbicidu a pouze jedním z nich je vlastní citlivost ALS na inhibici (Nováková a kol., 2006). V případě biologického testu může výsledky ovlivnit např. fyziologické stáří rostliny nebo průběh teplot při pokusu. Tyto faktory jsou ve fyziologickém testu redukovány. *In vitro* jsou testovány vždy rostliny ve stejné vývojové fázi a pěstované za stejných podmínek. Z tohoto důvodu pak mohou být při srovnání s testem na růstové úrovni zjištěny vyšší stupně rezistence.

Mezi metody, které podávají o mechanismu rezistence spolehlivé výsledky, patří molekulárně genetické techniky. Tyto metody začínají mít i v herbologii poslední dobou stále širší uplatnění a gen *als* byl sekvencován již u řady různých plevelů. Na genu *als* bylo dosud popsáno osm míst, ve kterých dochází k mutacím, a předpokládá se, že existují ještě další (Tranel, Wright 2013). Každá mutace vykazuje jiný stupeň rezistence k jednotlivým skupinám ALS inhibitorů (sulfonylmočoviny, imidazolinony, triazolopyrimidiny, apod.).

Detekcí mutací v genu *als* chundelky metlice se zabývali Balgheim a Wagner (2007). Po porovnání sekvencí genu ALS citlivého a rezistentního biotypu objevili záměnu nukleotidu cytosin za adenin v pozici 197. Touto mutací dochází ke vzniku aminokyseliny threonin místo prolinu.

Substituce aminokyselin v pozici Pro 197 jsou nejčastější změny, které způsobují vysoký stupeň rezistence k sulfonylmočovinám, vysoký až střední stupeň rezistence vůči triazolopyrimidinům a nízkou nebo žádnou cross-rezistenci vůči imidazolinonům (Marshall, Moss, 2008).

Také v této práci byla u chundelky metlice bodová mutace v pozici Pro-197 identifikována. Sekvencování genu *als* rostlin vyselektovaných v pokuse se sulfometuronem vedlo k odhalení celkem čtyř bodových mutací. V pozici 197 byla nalezena nukleotidová záměna cytosinu za thymin a cytosinu za adenin, přičemž první substituce vedla k záměně aminokyseliny alanin za prolin a druhá k záměně threoninu za prolin. Substituci Pro-197-Thr detekovali kromě Balgheim a Wagnera (2007) také Krysiak a kol. (2011). V pozici 574 byla u dvou testovaných populací v této práci nalezena substituce, která nebyla dosud publikována. Jednalo se o záměnu methioninu za tryptofan. V mnoha případech byla v této pozici

nalezena substituce leucinu za tryptofan (Beckie a kol., 2012). Tato záměna byla v práci rovněž detekována.

Pro rychlou detekci substitucí aminokyselin je vhodná metoda DCAPs. Pomocí této metody lze nalézt jednonukleotidové polymorfismy (SNPs), které jsou cílovým místem příslušných restričních endonukleáz.

Massa a kol. (2010) touto metodou při štěpení *als* amplikonu o velikosti 375 bp restriční endonukleázou BstEII odhalili substituci treoninu za prolin v pozici 197 u 67 testovaných populací chundelky metlice. U dvou populací našli při použití restriční endonukleázy HpaI (štěpení amplikonu o velikosti 375 bp) záměnu asparaginu za prolin v pozici 197. Tato mutace byla objevena a publikována poprvé.

Metoda dCAPS umožňuje také přesné rozlišení homozygotních a heterozygotních jedinců a stanovení mutantních alel v populaci (Kaundun, Windass, 2006).

V této práci byly pro digesci amplikonů použity enzymy BamHI pro pozici P197 a BstXI pro pozici W574. Pouze u rostlin pocházejících z lokality Lomnice byli u obou kodónů P197 a W574 identifikováni homozygotní mutanti. Většina rezistentních rostlin byli heterozygoti v P197 nebo W574, nebo většinou u obou domén. Uvnitř populace z Dynína se nacházely 2% rezistentních homozygotů a 65% heterozygotů u domény Pro-197 a 40% heterozygotů u domény Trp-574. U všech jedinců se substitucí v pozici Trp-574 se vyskytovala záměna tryptofanu (TGG) za metionin (ATG).

Po porovnání sekvencí *als* genu dvou rostlin z populace Dynín s jiným fenotypem, byly nalezeny tři substituce aminokyselin, které by mohly způsobit rezistenci k ALS inhibitorům (263, 272 a 446). Proto byla amplifikována a sekvenována příslušná oblast u dalších jedinců za účelem prokázání či vyvrácení těchto substitucí způsobujících rezistenci. Nicméně nebyly nalezeny žádné specifické substituce a nalezena jednoznačná vazba mezi fenotypovým projevem jedinců a popsanou záměnou, která by mohla souviset s rezistencí u populace Dynín. Molekulární podstata rezistence tedy zůstala neobjasněna a nelze vyloučit další místa, ve kterých k substitucím mohlo dojít.

Dalším cílem práce bylo ověřit také jiné možné příčiny mechanismu rezistence, jako je např. zvýšená metabolizace herbicidu. Hypotéza existence tohoto typu mechanismu rezistence byla testována pokusem, ve kterém byla

studována reakce rostlin chundelky metlice ošetřených chlorsulfuronem s přídávkem malathionu. Bylo zjištěno, že malathion má efektivní účinek v synergickém působení s chlorsulfuronem na jílek tuhý (*Lolium rigidum*) (Christopher a kol., 1994). Podporoval také účinek imazethapyremu v působení na rosičku krvavou (*Digitaria sanguinalis*) (Hidayat, Preston, 2001) a chlorotoluronu na psárku polní (*Alopecurus myosuroides*) (Hall a kol., 1995) a některých dalších herbicidů. Pravděpodobnou příčinou je kompetitivní inhibice enzymu cytochromu P-450 a zpomalení degradace účinné látky herbicidu při aplikaci spolu s insekticidem. Korelace s významným poklesem stupně rezistence k chlorsulfuronu byla potvrzena Christopherem a kol. (1994), Prestonem a kol. (1996) a dalšími. Existují také tvrzení, že enzymatický systém cytochromu P-450 je zapojen do metabolicky založené křížové rezistence, což významně přispívá k neshodnosti regulace plevelných populací s metabolickou site rezistencí (Yun a kol., 2005).

V našem pokuse bylo prokázáno, že efekt chlorsulfuronu s přídávkem malathionu byl u většiny populací mnohem vyšší než při použití samotného herbicidu. Tento výsledek naznačuje, že se u rostlin vyvinula metabolická rezistence. Na základě výsledků z předchozích pokusů i na základě podrobnějšího vyhodnocení tohoto pokusu s malathionem však nelze přijmout předpoklad výhradně tohoto typu mechanismu. Hodnoty ED_{50} u rezistentních rostlin při variantě ošetření chlorsulfuronu s malathionem v nejvyšší dávce byly přinejmenším minimálně 60x vyšší než hodnoty ED_{50} u citlivé populace ošetřené bez malathionu. Při použití malathionu v dávce $65 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ se zvýšila rychlost metabolizace chlorsulfuronu u všech rezistentních populací. Tento výsledek spíše podporuje pravděpodobnost pozměněného místa účinku, protože vysoce rezistentní rostliny se specifickou rezistencí velmi citlivě reagují na subletální dávky přípravku/ů hormezí.

Metabolické rezistenci chundelky metlice se podrobněji věnuje studie Massy a kol. (2010). Ve své práci se zabývali degradací dávky herbicidu sulfosulfuron a detekcí a kvantifikací specifických metabolitů tohoto herbicidu u populací chundelky metlice, ve kterých nebyla v genu *a/s* nalezena mutace. U všech populací byla zjištěna zvýšená degradace sulfosulfuronu, jako primární metabolit byl detekován desmethyl sulfosulfuron, jehož přítomnost naznačuje, že prvním degradačním krokem herbicidu sulfosulfuron u chundelky metlice je přímá

demethylace zajištěna enzymatickým komplexem cytochrom P450 monooxygenázou. K jednoznačné odpovědi, o jaký mechanismus rezistence se jedná, Massa v závěru své práce nedochází. Stejně jako tato práce se přiklání k názoru, že se u chundelky metlice kombinují různé typy rezistentních mechanismů.

7. ZÁVĚR

Na území České republiky bylo nalezeno a popsáno několik rezistentních biotypů chundelky metlice vůči inhibitorům acetolaktát syntázy (ALS). Všechny rezistentní biotypy pocházely z oblastí, kde byly na polích v minulosti opakovaně aplikovány herbicidy na bázi sulfonylmočoviny. V některých případech došlo ke vzniku rezistentních rostlin chundelky metlice jen během několika málo let. Rychlost selekce u tohoto druhu je tedy dána spíše selekčním tlakem herbicidních látek než neobvykle vysokou frekvencí mutací.

Celkem bylo v této práci testováno 21 rezistentních biotypů. 18 z nich vykazovalo v různé míře rezistenci k účinné látce iodosulfuron, kterou obsahuje herbicid Husar, jeden z nejčastěji používaných herbicidů proti chundelce metlici. Rezistence k iodosulfuronu byla ověřována pomocí RISQ (Resistance In-Season Quick) testu, kdy jsou na agarovém médiu pěstovány klíčící rostliny v přítomnosti herbicidu. Tento test se osvědčil jako rychlá a spolehlivá metoda, kdy je po detekci rezistence možno provést opravný zásah herbicidu ještě v daném vegetačním období.

U tří biotypů byla pomocí růstových testů a testu enzymatické aktivity ALS testována a detekována rezistence vůči dalším účinným látkám ze skupiny inhibitorů acetolaktát syntázy. Konkrétně se jednalo o účinnou látku chlorsulfuron obsaženou v herbicidu Glean, nejdéle používanou účinnou látku proti chundelce metlici, mesosulfuron + iodosulfuron (Atlantis), pyroxulam (Powerflex) a sulfometuron (Oust). V případě prvních tří účinných látek použitých v nádobových pokusech rostliny ošetřené i při vysokých dávkách přežily a byly u nich zjištěn vysoký faktor rezistence RF, který vyjadřuje míru rezistence. Hodnoty ED_{50} u rezistentních biotypů vypočtené z regresní rovnice několikanásobně převyšovaly doporučené aplikační dávky testovaných herbicidů.

Vícenásobná rezistence chundelky metlice nebyla v pokusech zjištěna. Obě testované účinné látky ze skupiny inhibitorů ACCázy, pinoxaden (Axial) a fenoxaprop (Puma Extra) měly u všech testovaných biotypů velmi dobrou účinnost a lze je doporučit jako vhodné přípravky v antirezistentních strategiích.

Účelnou a rychlou metodou, pomocí které lze určit typ rezistence různých druhů rostlin vůči herbicidům ze skupiny ALS-inhibitorů je test aktivity enzymu

ALS. Touto metodou lze detekovat rezistenci na biochemické úrovni a zjistit, zda se jedná o rezistenci metabolickou či rezistenci v místě účinku (target-site). U biotypů chundelky metlice, které byly v testu účinnosti herbicidů na intaktních rostlinách popsány jako vysoce rezistentní, byla fyziologickým *in-vitro* testem v přítomnosti účinných látek sulfonylmočovín zjištěna zvýšená aktivita enzymu acetolaktát syntázy. Vysoký obsah acetoinu, jehož vznik indikuje normální funkci acetolaktát syntázy, potvrdil, že i v přítomnosti relativně vysokých dávek je ALS k těmto herbicidům necitlivá. Vysoké hodnoty I_{50} u biotypů Lomnice naznačují, že enzym má u těchto rezistentních rostlin pravděpodobně pozměněnou formu a jeho zvýšená aktivita je příčinou mechanismu rezistence. Jedná se tedy o rezistenci způsobenou změnou cílového místa působení herbicidu. Poměrně nízké koncentrace byly zapotřebí k 50 % inhibici enzymu při použití účinné látky iodosulfuron u biotypů Vlastějovice a Dynín. V těchto případech může být u rostlin přítomen jiný mechanismus rezistence např. detoxikace, zvýšená metabolizace nebo transkolace herbicidu.

Stejně jako u jiných trávovitých plevelů tak se i u chundelky metlice vyskytovalo více mechanismů účinku rezistence. V pokuse, ve kterém byl testován efekt přídatku malathionu k chlorsulfuronu byl zjištěn mnohem vyšší účinek než v případě použití samotného chlorsulfuronu. Tento výsledek naznačuje, že se u testovaných rostlin vyvinula metabolická rezistence. Na základě výsledků z předchozích pokusů i na základě podrobnějšího vyhodnocení pokusu s malathionem, však nelze přijmout předpoklad výhradně tohoto typu mechanismu rezistence.

Tato studie prokázala existenci různých mutací genu *als*, které způsobují rezistenci u populací chundelky metlice. Molekulárně-genetické změny vedoucí k polymorfismu *als* byly detekovány pomocí molekulárních analýz PCR a sekvencování. Tyto metody zpravidla poskytují jednoznačné výsledky o mechanismu rezistence. Studovány byly oblasti genu ALS, ve kterých již byly u několika trávovitých plevelů nalezeny specifické mutace a posléze byl sekvenován celý gen *als* za účelem detekce dalších těchto domén.

Celkem byly u testovaných rezistentních populací identifikovány čtyři bodové mutace. U populace Dynín byly nalezeny dvě záměny aminokyselin vedoucí k mutaci. V pozici 197 došlo díky nukleotidovým substitucím k náhradě aminokyseliny alanin za prolin a aminokyseliny treonin za prolin. V pozici 574 byla

detekována substituce leucinu za tryptofan a v populaci Vlastějovice jeden polymorfismus způsobil u rezistentního biotypu substituci methioninu za tryptofan. V těchto případech, kde došlo k záměnám aminokyselin a tedy i změně struktury enzymu ALS, lze mluvit o rezistenci v místě účinku (target-site). U většiny rezistentních rostlin však mutace ve zkoumaných oblastech (doména A, B a D) zjištěny nebyly a příčina rezistence tímto testem objasněna nebyla. Příčinou může být jiný mechanismus.

Sekvencování celého genu *als* u rezistentní rostliny z biotypu Dynín a jeho porovnání s citlivou rostlinou z téhož biotypu neodhalily pravidelné aminokyselinové záměny spojované s rezistencí k ALS inhibitorům. Také z tohoto závěru lze usuzovat, že u některých rostlin je rezistence způsobena spíše jiným typem mechanismu než je target-site rezistence.

Rozlišné stupně rezistence mohou být způsobeny díky několikanásobným aminokyselinovým záměnám u ALS enzymu. Některé z těchto záměn nebyly pravděpodobně dosud objeveny.

8. POUŽITÁ LITERATURA

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402, 1997.

Anderson, M. P., Gronwald, J. W.: Atrazine resistance in Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due enhanced glutathione-S-transferase activity. *Plant Physiol.*, 96, str. 104-109, 1998.

Baerg, R. J., Barrett, M., Polge, N. D.: Insecticide and insecticide metabolite interactions with cytochrome P450 mediated activities in maize. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55, 10-20, 1996.

Balghem, N., Wagner, J., Gerhards, R.: Als-inhibitor resistant *Apera spica-venti* (L.) Beauv. due to target-site mutation. In: European Weed Research Society 14th EWRS Symposium, Hamar-Norway, eds. Netland, J., str. 147, 2007.

Bartholomew, D. M., Van Dyk, D. E, Lau, C, O'Keefe, D., Rea, P. A., Viitanen, P. V. .: Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiology*, 103, 1562-1572, 2002.

Beckie, H. J., Warwick, S. I., Sauder, C.A.: Acetolactate Synthase (ALS) Inhibitor-Resistant Wild Buckwheat (*Polygonum convolvulus*) in Alberta. *Weed Technology* 26 : 156 – 160, 2012-

Brazier, M. a kol.: O-glucosyltransferase activities toward phenolic natural produkts and xenobiotics in wheat and herbicide-resistan and herbicide-susceptible blaskgrass (*Alopecurus myosuroides*). *Phytochemistry*, 59, 149-156, 2002.

Brown, H. M. a kol.: Sulfonylureas. In *Metabolic pathways of agrochemicals. Part one – herbicides and plant growth regulators*. Ed-in-chief T Roberts, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.

Břicháček B., Krčmář M.: Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice. IVPZ Brno, str. 87, 1993.

Burton, J. D., Gronwald, J. W, Somers, D. A., Connelly, J. A., Gengenbach, B. G., Wyse, D. L.: Inhibition of plant acetyl-CoA carboxylase by the herbicides sethoxydim and haloxyfop. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148, str. 1039-1044, 1987.

- Cobb, A. H., Kirkwood, R. C.:** Challenges for herbicide development. In: Cobb, A.H., Kirkwood, R.C.: Herbicides and their Mechanism of action. In: Sheffield Academic Press, Sheffield, 2000.
- Cousens, R., Mortimer, M.:** Dynamics of weed population. Cambridge University Press, str. 247, 1995.
- Delabays, N., Mermillod, G., Bohren, Ch.:** First case of resistance to sulfonylurea herbicides reported in Switzerland: a biotype of loose silky-bent (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.). Journal of Plant Diseases and Protection, 20, str. 89-94, Stuttgart, 2006.
- Délye, Ch., Matějček, A., Gasquez, J.:** PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). Pest Management Science, 58, str. 474-478, 2002.
- Devine, M. D., Duke, S., O., Fedtke, C.:** Physiology of Herbicide Action. Prentice Hall, New Jersey, 1993
- Devine, M. D., Eberlein, C. V.:** Physiological, biochemical and molecular aspect of herbicide resistance based on altered target sites. In: Roe, R.M., Buton, J.D., Kuhr, R.J. (eds): Herbicide activity. Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology, IOS Press, Amsterdam, 1997.
- Devine, M. D., Preston, C.:** The molecular basis of herbicide resistance. Str. 72–104 in A. H. Cobb and R. C. Kirkwood, eds. Herbicides and Their Mechanisms of Action. Boca Raton, FL: CRC, 2000.
- Devine, M. D., Shukla, A.:** Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. Crop Protection, 19, str. 881-889, 2000.
- Dostál, J.:** Nová květena ČSSR 2. Akademia, Praha, str. 187, 1989.
- Duggleby, R. D., Pang, S. S.:** Acetohydroxyacid Synthase, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol 33, No 1, str. 1-36, 2000.
- Fišer, F.:** Možnosti hubení chundelky metlice a dvouděložných plevelů v porostech ozimé pšenice. Rostlinolékař, č. 5, s. 4-5, 2002.
- Fuerst, E. P., Norman, M. A.:** Interaction of herbicides with photosynthetic electron transport. Weed Science, 39, str. 458-464, 1991.
- Gaines, T. a kol.:** Gene Amplification Confers Glyphosate Resistance in *Amaranthus palmerii*. Proceedings of the National Academy of Sciences 1007, str. 1029-1034, 2010.

- Gardner, S. N, Gressel, J. a Mangel, M.:** A revolving dose strategy to delay the evolution of both quantitative vs major monogene resistances to pesticides and drugs. *International Journal of Pest Management* 44, str. 161–180, 1998.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi I., Appel, R. D., Airoch, A. B.:** ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.*, 31, str. 3784-3788, 2003.
- Gerowitt, T. B., Heitefuss, R.:** Requirements and possibilities for weed control according to economic thresholds in cereals. In: *Crop Protection in Northern Britain*, str. 55-62, 1990.
- Green, M. B., Le Baron, H. M., Moberg, W. K.:** Managing resistance to agrochemicals. From Fundamentals Research to Practical Strategy. Amer. Chem. So., 421, Washington DC, str. 52, 1990.
- Gronwald, J. W.:** Resistance to PSII inhibitor herbicides. In De Prado R., Jorr in J., Garcia-Torr es L. *Weed and Crop Resistance to Herbicides*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, str. 53–59, 1997.
- Hamouzová K, Soukup J, Jursík M, Hamouz P, Venclová V, Tůmová P.:** Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Weed Research* 51, str. 113–122, 2011.
- Hamouzová, K., Košnarová, P.:** Alopecurus myosuroides resistant to ALS-inhibiting herbicides found in the Czech Republic, In: 15th European Weed Research Society Symposium, Kaposvár, Hungary, str. 21, 2010.
- Hamouzová, K., Jursík, M., Košnarová, P.:** Rezistence plevelů vůči herbicidům. *Agrotip*, roč. 14, č. 9, str. 6-7, 2012.
- Hatzios, K. K., Burgos, N.:** Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Science*, 52, str. 454-467, 2004.
- Heap, I. M., Knight, R.:** A population of ryegrass tolerant to herbicide diclofop-methyl. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, 48, str. 156, In: Tharayil-Santhakumar N.: *Mechanism of Herbicide Resistance in Weeds*. Weed Science.org, 2003.
- Heap, I. M.:** The international survey of herbicide-resistant weeds: lesson and limitation. In *The British Crop Protection Conference –Weeds*, str. 769–776, 1999.
- Heap, I., LeBaron, H.:** Introduction and Overview of Resistance, In: Powles, S.B., Shaner, D.L.: *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC, Press LLC, 2001.

- Heap, I.:** International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [cit. 2013-3-10] dostupné z: <http://www.weedscience.com/summary/home.aspx>
- Hidayat, I., Preston, C., Chrispother, J. T.:** Cross-resistance to imazethapyr in a fluazifop-P-butyl-resistant population of *Digitaria sanguinalis*. Pesticide, Biochemistry and Physiology, 71(3), str. 190-195, Academic Press, 2001.
- Hirschberg, J., Bleeckes, A., Kyle, D. J., Macintosh, L., Arntzen, C. J.:** The molecular basis of triazine resistance in higher plant chloroplasts. Z. Naturforsch., 39C, str. 412-419, 1984.
- Hock, B., Elstner, E.:** Plant toxicology. CRC Press, str. 87, 2005.
- Höfgen, R., Laber, B., Schüttke, I., Klonus, A., K., Streber, W., Pohlenz, H., D.:** Repression of Acetolactate Synthase Activity through Antisense inhibition. Plant Physiology, 107, str. 469-477, 1995.
- Hron, F., Kohout, V.:** Plevelle polí a zahrad. Min. zem. a výživy ČR, Praha, str. 343, 1988.
- Hron, F., Vodák, A.:** Polní plevelle a boj proti nim. SZN, Praha, 1959.
- Hrubá, M.:** dCAPS method: advantages, troubles and solution, Plant soil environ., 53, 2007 (9), str. 417–420, 2007.
- Hurle, K.:** Integrated management of grass weeds in arable crops. In: Proceedings of an international conference, Brighton, UK, str. 81-88, 1993.
- Chodová, D., Mikulka, J., Kočová, M., Salava, J.:** Origin, Mechanism and Molecular Basis of Weed Resistance to herbicides. Plant Protection Science, Vol. 40, No. 4, str. 151-168, 2004.
- Chodová, D., Salava, J.:** Metody identifikace rezistence plevelů vůči herbicidům. Rostlinolékař, 17 (4), str. 30-32, 2006.
- Christopher J.T., Preston C. and Powles S.B.:** Malathion antagonises metabolism-based chlorsulfuron resistance in *Lolium rigidum*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 49: 172-182, 1994
- Jasieniuk, M., Brûlé-Babel, A. L., Morrison, I. L.:** The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. Weed Science 44, str. 176-193, 1996.
- Jursík, M., Holec, J., Náměstek, J.: Chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) P.B., Listy cukrovarnické a řepařské 126, č. 9-10, str. 276-280, 2007.
- Kampe, W.:** Zur Auflaufdynamik von Ackerfuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides*) und Windhalm (*Apera spica-venti*) in der Pfalz 1970 bis 1974. Chemie Technik 9, str. 262-263, 1976

- Kaundum, S. S. a kol.:** A novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACC and ALS herbicides in grass weeds. In: 15th EWRS Symposium, July, Kaposvar, Hungary, str. 12, 2010.
- Kaundun, S. S., J D Windass, J. D.:** Derived cleaved amplified polymorphic sequence, a simple method to detect a key point station conferring acetyl CoA carboxylase inhibitor herbicide resistance in grass weeds. *Weed Research* 46, str. 34–39, 2006.
- Kaundun, S.S., Hutchings, S.J., Dále, R.P., Bailly, G.C., Glanfield, P.:** Syngenta 'RISQ' test: a novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACCase and ALS inhibitor herbicides in grass Weeds. *Weed Research*, Vol. 51, str. 284-293, 2010.
- Klemová, Z., Svačinová, I., Klem, K., Jagošová, L., Matušinsky, P.:** Chundelka metlice s rezistencí k inhibitorům ALS – příčiny selekce rezistentních populací. *Obilnáfiské listy XVIII*, ročník 4, str. 91-95, 2010.
- Kočová, M. a kol.:** Využití metody Hillovy reakce pro rozlišování biotypů plevelů rezistentních a citlivých vůči atrazinu. *Agrochémia*, 28, str. 87-90, 1988.
- Kohout, V.:** Rozšíření ovesa hluchého a chundelky metlice závislosti na ekologických podmínkách. In.: Sbor.Konf. VTS- Ekologie polních plodin, Ústí n/L., str. 1-6, 1976.
- Koch, H. W., Hurle, K.:** Grundlagen der Unkrautbekämpfung. UTB Verlag Stuttgart, 1978.
- Koch, W.:** Unkrautbekämpfung. Eugen Ulmer, Stuttgart, 1970.
- Kreuz, K., Tommasini, R., Martinova, E.:** Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiol.* 111(2), str. 349–353, 1996.
- Krysiak, M. Gawroński, S., W., Adamczewski, K., Kierzek R.:** ALS gene mutations in *Apera spica-venti* confer broad-range resistance to herbicides, *Journal of Plant Protection Research*, Vol. 51, No. 3, str. 261-267, 2011.
- LaRossa, R. A., Van Dyk, T. K., Smulski, D. R.:** Toxic accumulation of α -ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 169, str. 1372–1378, 1987.

- Liu, W.J., Harrison, D.,K, Chalupska, D., Gornicki, P., O'Donnell, C.C, Adkins, S.W., Haselkorn, R., Williams, R.R.:** Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 3627–3632, 2007.
- Lutman, P. J. W., Health, C. R.:** Variation in the resistance of *Stellaria media* to mecoprop due to biotype, application method and 1-aminobenzotriazole. *Weed Research*, 30, str. 129-137, 1990.
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C., Dial, M. J.:** Identification of sulfonylurea herbicide-resistant prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, 4, str. 163-168, 1990.
- Mallory-Smith, C., Namuth, D.:** Overview & Objectives of Herbicide Resistance: Mechanisms, Inheritance & Molecular Genetics, [cit. 2010-10-27] , dostupné z http://plantandsoil.unl.edu/croptechology2005/weed_science/
- Maneechote, Ch.:** Mechanisms of herbicide resistance in wild oats (*Avena* spp.), [cit. 2010-10-30], dostupné z <http://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/>
- Marczewska, K., Rola, H.:** Biotypes of *Apera spica-venti* and *Centaurea cyanus* resistant to chlorsulfuron in Poland, In: 13th EWRS Symposium, June, Bari Italy, str. 19-23, 2005.
- Marczewska, K.:** Phytotoxicity and efficacy of chlorsulfuron in winter wheat, *Journal of plant protection research*, 45, str. 387-396, 2006.
- Marshall, R.; Moss, S. R.:** Characterisation and molecular basis of ALS inhibitor resistance in the grass weed *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research*, 48, str. 439–447, 2008.
- Massa, D., Kaiser, Y., Walker, F., Gerhards, R.:** First investigations on metabolism of the herbicide sulfosulfuron in resistant populations of *Apera spica-venti* (L.) Beauv. using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and combined Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS), In: 15th EWRS Symposium, July, Kaposvar, Hungary, str. 26-27, 2010.
- Massa, D., Krenz, B., Gerhards, R.:** Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Research*, 51, Issue 3, str. 294-303, 2011.
- Maxwell, B. D., Mortimer, A. M.:** Selection for Herbicide Resistance. In: Powles, S.B., Holtum, J.A.M.: *Herbicide Resistance in Plants, Biology and Biochemistry*, CRC Press, Inc., 1994.

- Mayor, J. P., Maillard, A.:** A wind bent grass biotype resistant to the herbicide isoproturon found in Changins. *Revue Suisse d'Agriculture*, 29, str. 39-44, 1997.
- Melander, B.:** Impact of drilling date on *Apera spica-venti* L. and *Alopecurus myosuroides* Huds. in winter cereals. *Weed Research*, 35, str. 57-166, 1995.
- Melander, B.:** Population dynamics of *Apera spica-venti* as influenced by cultural methods. Brighton Crop Protection Conference - Weeds, Brighton, str. 107-112, 1993.
- Mengistu, L. W.; Christofers, M. J.; Lym, R. G.:** A psbA mutation in *Kochia scoparia* (L) Schard from railroad right-of-way with resistance to diuron, tebuthiuron and metribuzin. *Pest Management Science*, 61, str. 1035–1042, 2005.
- Menne, H., Köcher, H.:** HRAC Classification of Herbicides and Resistance Development in Krämer, W., Schirmer, U.: *Modern Crop production compounds*, Wiley-Vch Verlag GmbH&Co.KGAA, 2007.
- Mikulka, J. a kol.:** Plevelné rostliny polí, luk a zahrad. *Farmář-Zemědělské listy*, str. 33 -35, 1999.
- Mikulka, J., Kneifelová, M.:** Plevelné rostliny. Profi Press, s.r.o., Praha, 2005.
- Mikulka, J., Kneifelová, M.:** Příčiny přemnožení chundelky metlice. *Úroda*, 9, str. 3-5., 2004.
- Mikulka, J., Slavíková, L.:** Metody diagnostiky a regulace rezistentních populací plevelů vůči herbicidům, uplatněná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha – Ruzyně, 2008.
- Mikulka, J.:** Trendy ve vývoji rezistence plevelů vůči herbicidům. *Rostlinolékař*, 4, str. 24-27, 2004.
- Moss, S. R.:** Herbicide-Resistant Weeds. In Naylor, R. E. L. *Weed Management Handbook*. British Crop Protection Council, Oxford: Blackwell Science, 2002.
- Moss, S. R., Clarke, J. H., Blair, A. M., Culley, T. N., Read, M. A., Ryan, P. J., Turner, M.:** The occurrence of herbicide resistant grass-weeds in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. In: *Proceedings Brighton Conference – Weeds*, str. 179-184, 1999
- Moss, S. R., Perryman, S. A. M, Tatnell, L. V.:** Managing herbicide-resistant blackgrass(*Alopecurus myosuroides*): theory and practice, *Weed technology*, 21, str. 300-309, 2007.
- Moss, S. R.:** Techniques for determining herbicide resistance. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Weeds*, str. 547-556, 1995.

- Náměstek, J.:** Biologie a geografické rozšíření chundelky metlice (*Apera spica-venti* ((L.) P.B.) v ČR a studium její senzitivity k vybraným herbicidům. Disertační práce, Katedra agroekologie a biometeorologie, ČZU Praha, 2008.
- Neff M. M., Turk E., Kalishman M.:** Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends Genet.*, 18, str. 613-615, 2002.
- Nielsen, O. K., C. Ritz, J. C. Streibig:** Nonlinear mixed-model regression to analyze herbicide dose-response relationships. *Weed Technology*, 18, str. 30-37, 2004.
- Niemann, P., Zwerger, P.:** Über Herbizidresistenzen bei *Apera spica-venti* (L.) P. B. *Journal of Plant Diseases and Protection, Special Issue XX*, str. 81-88, 2006.
- Niemann, P.:** Resistenz von Windhalm (*Apera spica-venti*) gegenüber Isoproturon. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 376, str. 147–148, 2000.
- Nováková, K., Soukup, J., Hamouz, P., Náměstek, J.:** Chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) - Regulace výskytu v polních plodinách. *Rostlinolékař*, 5, str. 24-26, 2005.
- Nováková, K., Soukup, J., Wagner, J., Hamouz, P., Náměstek, J.:** Chlorsulfuron resistance in silky bent-grass (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 20, str. 139-146, Stuttgart, 2006.
- Nový, O.:** Biologie, škodlivost a ochrana proti chundelce metlici. Disertační práce, KOPRA AF VŠZ Praha, 1992.
- Patzoldt W. L., Tranel P. J.:** Multiple ALS Mutations Confer Herbicide Resistance in Waterhemp (*Amaranthus Tuberculatus*). *Weed Science* 55(5), str. 421-428, 2007.
- Pfister, K. a kol:** Triazines in mode of action of herbicide. *Plant Physiol.*, 34, 1979.
- Pokluda a kol.:** Problematika vzniku rezistence plevelů vůči herbicidům [cit. 2010-10-20] , dostupné z <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/553/dzi/>
- Powles, S. B., Lorraine-Colwill D. F., Dellow J. J., and Preston, C.:** Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 46, str. 604-612, 1998.
- Powles, S. B., Preston, C., Bryan, I. B., Jutsum, A. R.:** Herbicide resistance: impact and management. *Adv. Argon.*, str. 58, 1997.

- Powles, S. B., Yu, Q.:** Evolution in Action: Plants resistant to herbicides. Annual Review of Plant Biology, 61, str. 317–347, 2010.
- Preston, Ch., Mallory-Smith, C.:** Biochemical Mechanism, Inheritance and Molecular Genetics of Herbicide Resistance in Weeds. In: Powles, S.B., Shaner, D.L.: Herbicide Resistance and World Grains, CRC Press LLC, 2001.
- Procházka, S. a kol:** Fyziologie rostlin. Academia Praha. 1998, str. 132-138.
- Regal, V.:** Pícní a plevelné trávy. SZN Praha, str. 69, 1953.
- Rhodes, D., Hogan, A., Deal, L., Jamieson, G. and Howarth, P.:** Amino acid metabolism of *Lemna minor* L.: II. Responses to chlorsulfuron. Plant Physiol. 84, str. 775–780, 1987.
- Rosypal, S.:** Úvod do molekulární biologie. Brno, 1200 s. ISBN 8-902562-4-4, 2002.
- Rozen, S., Skaletsky, H.:** Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, str. 365-386, 2000.
- Ryan, G. E.:** Resistance of common groundsel to smazine and atrazine. Weed Sci 18, str. 614-616, 1970.
- Saari, L. L, Maxwell, C. A.:** Target-site resistance for acetolactate synthase inhibitor herbicides. In: De Prado, R., Jorrín, J., García Torres, L.: Weed and Crop Resistance to Herbicides, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1997.
- Salava, J., Chodová, D.:** The mechanism of resistance to herbicides in Czech biotype of weeds. In XVIIth Czech and Slovak Conference on Plant Protection . Czech University of Agriculture in Prague, str. 581–586, 2006.
- Sammons, D.:** Overview on glyphosate resistant weed, dostupné z mechanisms, <http://www.slideshare.net/smamu/d-sammons> [cit. 2013-3-10]
- Shaner, D. L.:** Role of Translocation as A Mechanism of Resistance to Glyphosate, Weed Science 57(1), str. 118-123, 2009.
- Schulz, B., Kolukisaglu, H. U.:** Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes in Yuan, J.S., Tranel, P.J., Stewart, C.N.: Non-target-site herbicide resistance: a family bussines, 2006.
- Singh, B. K., M. A. Stidham, D. J. Shaner:** Assay of acetohydroxyacid synthase. Analytical Biochemistry, 171, str. 173-179, 1988.

- Slavíková L., Mikulka J., Kundu J.K.:** Tolerance of blackgrass (*Alopecurus myosuroides*) to silyfonylurea herbicides in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.*, 47, str. 55–61, 2011.
- Soukup, J., Nováková, K., Hamouz, P., Náměstek, J.:** Ecology of silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.), its importance and control in the Czech Republic. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 20, str. 73-80, Stuttgart, 2006.
- Steging, S. J., Vaughn, K.C.:** Norflurazon reduced abscised acid level in citron seedlings: A glandless isolate is more sensitive than its Flander counterpart. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 31, str. 269-275, 1988.
- Szekeres, F.:** The development of *Apera spica-venti*. *Botanikai-Kozlemlenyek*, 78, str. 113-125; 1991.
- Tharayil-Santhakumar N.:** Mechanism of Herbicide Resistance in Weeds. *WeedScience.org*, 2003.
- The R Development Core Team - R:** Copyright 2005, The R Foundation for Statistical Computing Version 2.1.0, ISBN 3-900051-07-0.
- Tranel, P. J., Wright, T. R.:** Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned?. *Weed Science*, 50, str. 700-712, 2002.
- Tranel, P.J., Wright, T.R., Heap, I.M.:** Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. Online <http://www.weedscience.com>. 4/12/2013
- Veverka, K.:** Obecné zákonitosti účinku toxických látek a vznik rezistence vůči nim. [cit. 2010-11-9] dostupné z <http://www.vurv.cz/index.php>
- Vila-Aiub, M. M.; Ghera, C. M.:** Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. *European Journal of Agronomy*, 22, str. 195–207, 2005.
- Neve, P.; Powles, S.:** High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity*, 95, str. 485–492, 2005.
- Vokřál, M.:** Axial - nový standard hubení chundelky metlice a ovsa hluchého v obilninách. *Agromanuál*, 2, str. 10-12, 2007.
- Warwick, S. I., Black, L. D., Zilkey, B. F.:** Biology of Canadian weeds. 72. *Apera spica-venti*. *Canadian Journal of Plant Science*, 65, str. 711-721, 1985.
- Wellmann, A., Fecht, D.:** Control of *Alopecurus myosuroides* Huds. and *Apera spica-venti* (L.) Beauv. With propoxycarbazone-sodium. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 55, str. 67-86, 2002.

Yuan, J. S., Tranel, P.J., Stewart, C. N.: Non-target-site herbicide resistance: a family business. Trends in Plant Science, Vol.12, str. 6-13, 2006.

Yun, M. S., Yogo, Y., Miura R., Yamasue, Y., Fischer A.: Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and –susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*) Pesticide Biochemistry Physiology, 83, str. 107-114, 2005.

Zajc, A.: Herbicide detoxification by glutathione S-transferases as implicated from X-ray structures, Pesticide Science 55, str. 248-252, 1999.

Zima, J. a kol.: Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha, 2004.

Seznam zkratek

ACCáza – acetyl koenzym A-karboxyláza

Ala – alanin

ALS – acetolaktát syntáza

APPs - aryloxyfenoxypropionáty

Arg – arginin

Asn- asparagin

Asp – kyselina asparagová

Cys - cystein

dCAPS - Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ED – efektivní dávka

EPSPS – 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza

Glu – kyselina glutamová

GST – glutathion S-transferáza

Ile – izoleucin

Leu - leucin

LL.4 – log- logistický čtyřparametrický model

Met – metionin

OGT – O-glykosyltransferáza

PCR – polymerázová řetězová reakce

Pro – prolin

PSII – fotosystém II

RF – faktor rezistence

RISQ - Resistance In-Season Quick test

RNA – ribonukleová kyselina

Ser – serin

Thr – treonin

Trp – tryptofan

W 1.3 – Weibullův tříparametrický model

7. SEZNAM PŘÍLOH

Tab. č. 21: Seznam rezistentních biotypů plevelných druhů detekovaných v ČR

Tab. č. 22: Vybrané biotypy chundelky metlice testované pomocí agarových kultur

Tab. č. 23-29: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

Obr. č. 8: Rozšíření rezistentních populací chundelky metlice v ČR

Obr. č. 9: Účinnost herbicidní látky pinoxaden v koncentraci 1,6 μM 10 dní po přesazení rostlin do agarového média

Obr. č. 10: Účinnost herbicidní látky iodosulfuron v koncentraci 6,4 μM 10 dní po přesazení rostlin do agarového média

Obr. č. 11: Převedení fotografie na černobílý obraz pro výpočet skutečné plochy rostlin

Obr. č. 12: Účinnost stupňovaných dávek herbicidu Glean WG měsíc po ošetření u biotypu Dynín

Obr. č. 13: Účinnost stupňovaných dávek herbicidu Axial měsíc po ošetření u biotypu Dynín

Obr. č. 14: Účinnost doporučených dávek pěti testovaných herbicidů u biotypu Dynín měsíc po ošetření

Obr. č. 15: Účinnost doporučených dávek pěti testovaných herbicidů u citlivého biotypu Švýcarsko měsíc po ošetření

Obr. č. 16: Neošetřená, rezistentní a citlivá rostlina chundelky metlice z lokality Vlastějovice po aplikaci Oustu ($300 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$), 30 DAT

Obr. č. 17: Neošetřená, rezistentní a citlivá rostlina chundelky metlice z lokality Dynín po aplikaci Oustu ($300 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$), 30 DAT

Obr. č. 18: Výstup ze sekvenátoru - úsek sekvence genu *als*

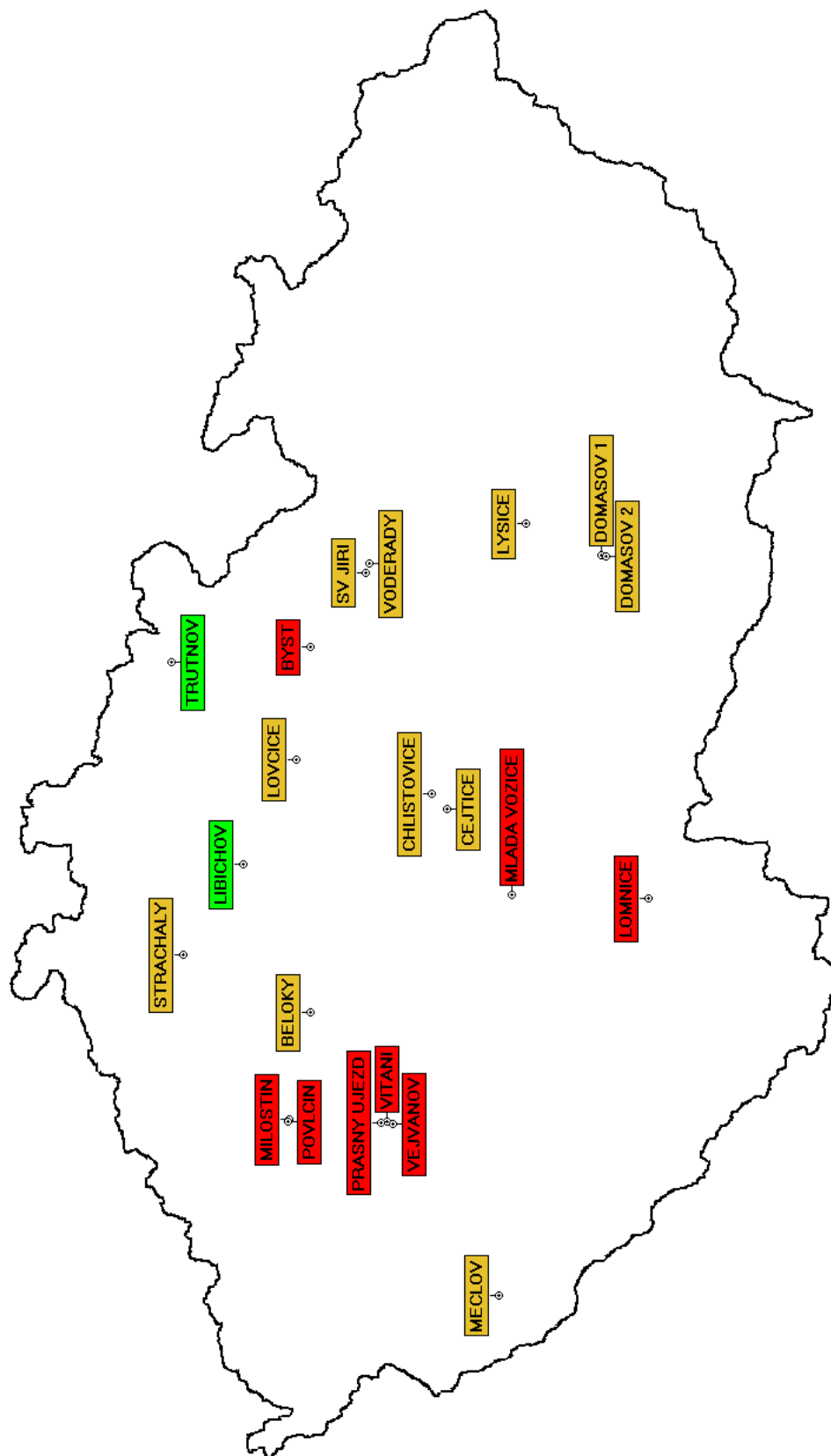
Tab. č. 21: Seznam rezistentních biotypů plevelných druhů detekovaných v ČR

Druh plevelu	Rok nálezu	Spektrum rezistence
Laskavec ohnutý <i>Amaranthus retroflexus</i>	1985	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, cyanazine
Laskavec Powellův <i>Amaranthus powellii</i>	1989	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, cyanazine
Merlík bílý <i>Chenopodium album</i>	1986	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, terbuthylazine, cyanazine, chloridazon, lenacil
Merlík tuhý <i>Chenopodium strictum</i>	1989	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, terbuthylazine, cyanazine, chloridazon, lenacil
Rdesno blešník <i>Polygonum lapathifolium</i>	1987	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, terbuthylazine, cyanazine, chloridazon, lenacil
Rdesno červivec <i>Polygonum persicaria</i>	1989	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, terbuthylazine, cyanazine, chloridazon, lenacil
Turanka kanadská <i>Conyza canadensis</i>	1987	atrazine, simazine, prometryn, cyanazine, paraquat, diquat
Starček obecný <i>Senecio vulgaris</i>	1988	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, terbuthylazine, cyanazine, chloridazon, lenacil
Lipnice roční <i>Poa annua</i>	1988	atrazine, simazine, prometryn, terbutryn, cyanazine
Ježatka kuří noha <i>Echinochloa crus-galli</i>	1994	atrazine, simazine
Bér zelený <i>Setaria viridis</i>	1994	atrazine, simazine
<i>Chenopodium pedunculare</i> *	1999	atrazine, simazine
Bytel metlatý <i>Kochia scoparia</i>	1998	atrazine, chlorosulfuron, imazapyr
Lilek černý <i>Solanum nigrum</i>	1999	atrazine
Rosička krvavá <i>Digitaria sanguinalis</i>	2006	atrazine
Chundelka metlice (<i>Apera spica-venti</i>)	2005	chlorsulfuron

Zdroj: Mikulka, Slavíková (2008)

Tab. č. 22: Vybrané biotypy chundelky metlice testované pomocí agarových kultur

Lokalita	Okres	GPS loc. (zem. d., zem. š.)
Běloky	Kladno	50°7'34.6"N, 14°10'34.3"E
Býšť	Pardubice	50°7'45.4"N, 15°54'56.3"E
Čejtice	Kutná Hora	49°42'41.5"N, 15°8'17.5"E
Domašov I	Brno	49°16'10.7"N, 16°18'42"E
Domašov II	Brno	49°14'39.6"N, 16°20'19.7"E
Chlístovice	Kutná Hora	49°45'27.5"N, 15°12'32.2"E
Libichov	Mladá Boleslav	50°19'58.5"N, 14°52'48.7"E
Lovčice	Hradec Králové	50°10'15.9"N, 15°22'25.7"E
Lysice Kunice	Blansko	49°28'23.8"N, 16°29'18"E
Meclov	Domažlice	49°33'15.9"N, 12°50'18"E
Milostín	Rakovník	50°11'26.4"N, 13°40'13.9"E
Mladá Vožice	Tábor	49°30'58"N, 14°44'4.2"E
Povlčín	Rakovník	50°11'43.4"N, 13°39' 47.1"E
Prašný Újezd	Rokycany	49°54'42.2"N, 13°39'24.4"E
Strachaly	Litoměřice	50°30'49.6"N, 14°26'52.6"E
Sv. Jiří	Ústí nad Orlicí	49°57'31.4"N, 16°15'26.8"E
Trutnov	Trutnov	50°32'48.7"N, 15°53'33.25"E
Vejvanov	Rokycany	49°52'31.4"N, 13°39'2.7"E
Vítání	Rokycany	49°53'42.9"N, 13°39'49.4"E
Voděrady	Ústí nad Orlicí	49°56'55.8"N, 16°17'52.5"E



Obr. č. 8: Rozšíření rezistentních populací chundelky metlice v ČR (červená barva označuje populace s rezistencí v místě účinku, žlutá označuje populace s rezistencí způsobenou zvýšeným metabolismem herbicidu a zelená označuje citlivé populace)

Tab. č. 23: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

HUSAR Běloky/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	181,9812	1	181,9812	302,7723	0,000000
lokalita	41,7107	1	41,7107	69,3964	0,000000
Chyba	12,0210	20	0,6010		
AXIAL Běloky/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	Stupně volnosti	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	50,25896	1	50,25896	171,8982	0,000000
lokalita	4,09812	1	4,09812	14,0166	0,012280
Chyba	5,84753	20	0,29238		
HUSAR Býšť/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	456,8384	1	456,8384	76,37673	0,000000
lokalita	205,6963	1	205,6963	34,38943	0,000010
Chyba	119,6276	20	5,9814		
AXIAL Býšť/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	62,41842	1	62,41842	151,7455	0,000000
lokalita	8,04040	1	8,04040	19,5470	0,015629
Chyba	8,22672	20	0,41134		
HUSAR Čejtice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	988,7035	1	988,7035	48,61379	0,000001
lokalita	595,9455	1	595,9455	29,30218	0,000027
Chyba	406,7585	20	20,3379		
AXIAL Čejtice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	45,39438	1	45,39438	108,1096	0,000000
lokalita	2,79746	1	2,79746	6,6623	0,017839
Chyba	8,39785	20	0,41989		

Tab. č. 24: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

HUSAR Domašov I/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	120,5045	1	120,5045	149,9517	0,000000
lokalita	15,5693	1	15,5693	19,3739	0,000275
Chyba	16,0724	20	0,8036		
AXIAL Domašov I/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	49,07779	1	49,07779	41,37075	0,000003
lokalita	3,76585	1	3,76585	3,17448	0,089989
Chyba	23,72584	20	1,18629		
HUSAR Domašov II/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	110,0512	1	110,0512	584,2452	0,000000
lokalita	11,9638	1	11,9638	63,5138	0,000000
Chyba	3,7673	20	0,1884		
AXIAL Domašov II/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	29,21520	1	29,21520	285,4381	0,000000
lokalita	0,11569	1	0,11569	1,1303	0,300373
Chyba	2,04704	20	0,10235		
HUSAR Chlistovice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	130,0875	1	130,0875	150,1254	0,000000
lokalita	19,1313	1	19,1313	22,0781	0,000138
Chyba	17,3305	20	0,8665		
AXIAL Chlistovice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	37,15194	1	37,15194	13,11330	0,001702
lokalita	1,06145	1	1,06145	0,37465	0,547375
Chyba	56,66298	20	2,83315		

Tab. č. 25: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

HUSAR Libichov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	57,90120	1	57,90120	28,14599	0,000040
lokalita	0,64830	1	0,64830	0,31514	0,581105
Chyba	39,08631	19	2,05717		
AXIAL Libichov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	44,15077	1	44,15077	9,323314	0,006273
lokalita	2,49524	1	2,49524	0,526919	0,476315
Chyba	94,71048	20	4,73552		
HUSAR Lovčice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	176,1521	1	176,1521	61,35060	0,000000
lokalita	38,9447	1	38,9447	13,56373	0,001475
Chyba	57,4247	20	2,8712		
AXIAL Lovčice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	26,89291	1	26,89291	32,91388	0,000013
lokalita	0,01461	1	0,01461	0,01788	0,894967
Chyba	16,34138	20	0,81707		
HUSAR Lysice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	169,6465	1	169,6465	174,2955	0,000000
lokalita	35,9182	1	35,9182	36,9025	0,000006
Chyba	19,4665	20	0,9733		
AXIAL Lysice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	72,15872	1	72,15872	121,7435	0,000000
lokalita	11,76254	1	11,76254	19,8453	0,031450
Chyba	11,85422	20	0,59271		

Tab. č. 26: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

HUSAR Milostín/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	525,7030	1	525,7030	77,01656	0,000000
lokalita	252,7004	1	252,7004	37,02112	0,000006
Chyba	136,5169	20	6,8258		
AXIAL Milostín/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	30,36712	1	30,36712	34,65841	0,000009
lokalita	0,19862	1	0,19862	0,22668	0,639154
Chyba	17,52366	20	0,87618		
HUSAR Meclov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	219,1214	1	219,1214	67,79559	0,000000
lokalita	60,3898	1	60,3898	18,68445	0,000331
Chyba	64,6418	20	3,2321		
AXIAL Meclov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	82,50540	1	82,50540	263,7261	0,000000
lokalita	16,14654	1	16,14654	51,6119	0,040120
Chyba	6,25690	20	0,31285		
HUSAR Mladá Vožice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	270,4862	1	270,4862	71,04944	0,000000
lokalita	88,6385	1	88,6385	23,28295	0,000103
Chyba	76,1403	20	3,8070		
AXIAL Mladá Vožice/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	70,87414	1	70,87414	40,15918	0,000003
lokalita	11,24734	1	11,24734	6,37304	0,020150
Chyba	35,29661	20	1,76483		

Tab. č. 27: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

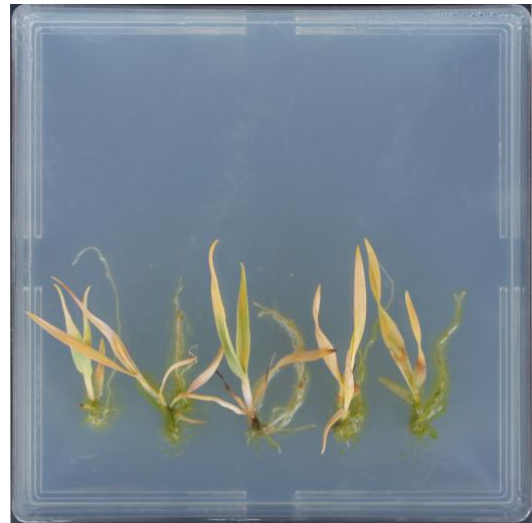
HUSAR Povlčín/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	584,1576	1	584,1576	83,14975	0,000000
lokalita	293,7005	1	293,7005	41,80570	0,000003
Chyba	140,5074	20	7,0254		
AXIAL Povlčín/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	47,25075	1	47,25075	69,09737	0,000000
lokalita	3,27228	1	3,27228	4,78524	0,040751
Chyba	13,67657	20	0,68383		
HUSAR Prašný Újezd/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	358,9404	1	358,9404	84,01724	0,000000
lokalita	141,9449	1	141,9449	33,22505	0,000012
Chyba	85,4445	20	4,2722		
AXIAL Prašný Újezd/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	22,22758	1	22,22758	53,08889	0,000000
lokalita	0,12275	1	0,12275	0,29318	0,594168
Chyba	8,37372	20	0,41869		
HUSAR Strachaly/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	222,8778	1	222,8778	79,34490	0,000000
lokalita	62,3694	1	62,3694	22,20362	0,000134
Chyba	56,1795	20	2,8090		
AXIAL Strachaly/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	43,25762	1	43,25762	229,7528	0,000000
lokalita	2,28638	1	2,28638	12,1436	0,023361
Chyba	3,76558	20	0,18828		

Tab. č. 28: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

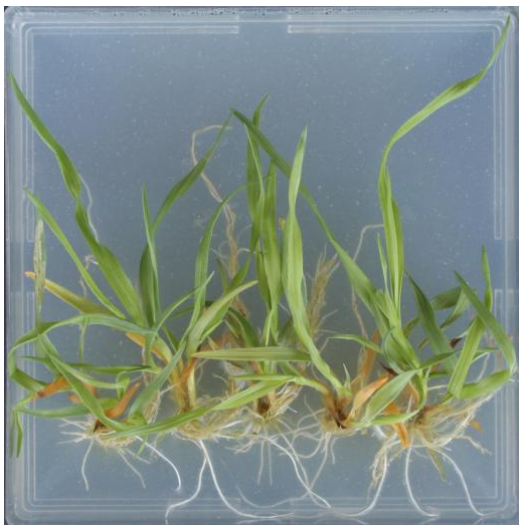
Tab. č. HUSAR Svatý Jiří/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	107,9431	1	107,9431	60,89470	0,000000
lokalita	11,2755	1	11,2755	6,36094	0,002025
Chyba	35,4524	20	1,7726		
AXIAL Svatý Jiří/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	34,36626	1	34,36626	108,7833	0,000000
lokalita	0,63569	1	0,63569	2,0122	0,171433
Chyba	6,31830	20	0,31591		
HUSAR Trutnov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	26,61715	1	26,61715	78,54003	0,000000
lokalita	3,50618	1	3,50618	10,34580	0,035401
Chyba	6,77798	20	0,33890		
AXIAL Trutnov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	10,79160	1	10,79160	130,9989	0,000000
lokalita	3,16810	1	3,16810	38,4575	0,091200
Chyba	1,64759	20	0,08238		
HUSAR Vejvanov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	382,8470	1	382,8470	105,6190	0,000000
lokalita	157,1215	1	157,1215	43,3464	0,000002
Chyba	72,4959	20	3,6248		
AXIAL Vejvanov/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	59,45703	1	59,45703	96,38341	0,000000
lokalita	7,00060	1	7,00060	11,34840	0,013054
Chyba	12,33761	20	0,61688		

Tab. č. 29: Výsledky analýzy rozptylu jednoduchého třídění – difference průměrů nárůstu biomasy při použití herbicidu Husar a Axial u vybraných lokalit

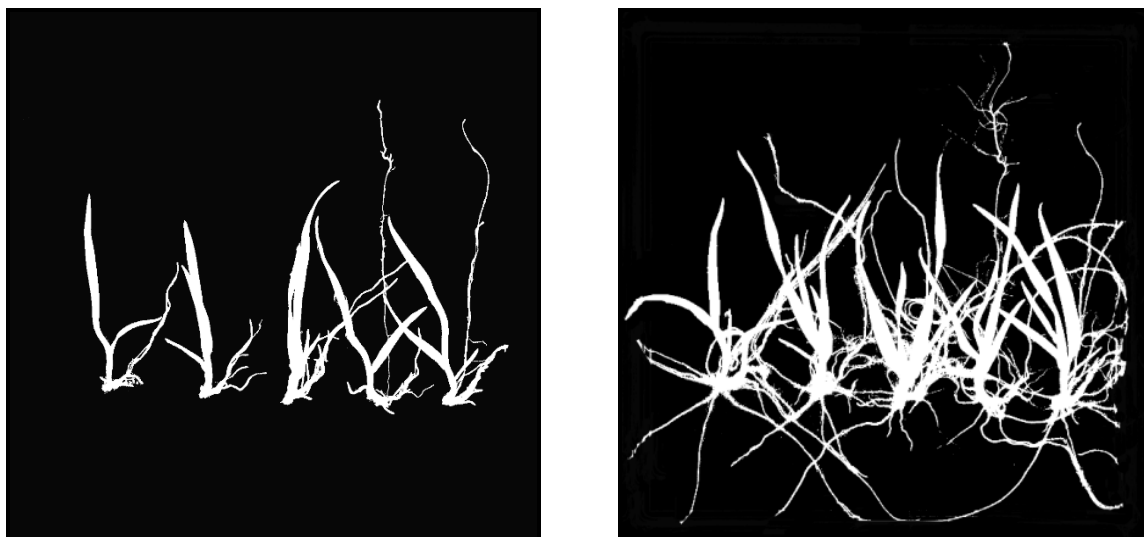
HUSAR Vítání/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	891,4456	1	891,4456	96,53239	0,000000
lokalita	521,0000	1	521,0000	56,41777	0,000000
Chyba	184,6936	20	9,2347		
AXIAL Vítání/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	143,2180	1	143,2180	28,61100	0,000031
lokalita	47,6431	1	47,6431	9,51778	0,015839
Chyba	100,1139	20	5,0057		
HUSAR Voděradý/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	891,4456	1	891,4456	96,53239	0,000000
lokalita	521,0000	1	521,0000	56,41777	0,000000
Chyba	184,6936	20	9,2347		
AXIAL Voděradý/citlivá					
efekt	SČ (suma čtverců)	df (stupně volnosti)	s ² (rozptyl)	F (hodnota testového kritéria)	p (pravděpodobnost)
Abs. člen	143,2180	1	143,2180	28,61100	0,000031
lokalita	47,6431	1	47,6431	9,51778	0,015839
Chyba	100,1139	20	5,0057		



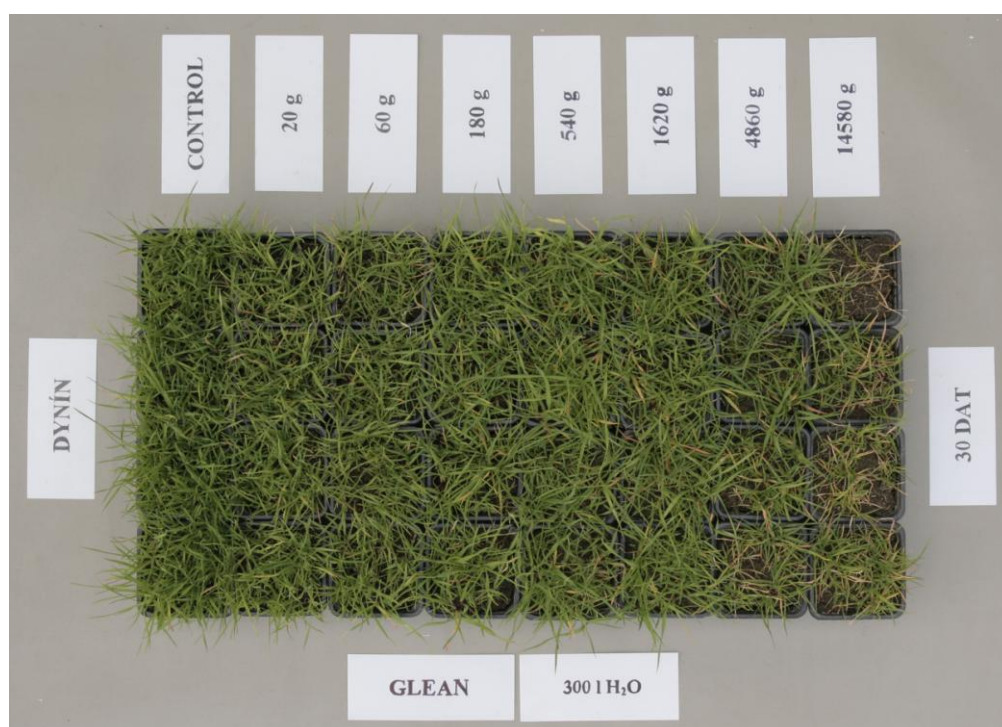
Obr. č. 9: Účinnost herbicidní látky pinoxaden v koncentraci 1,6 μM 10 dní po přesazení rostlin do agarového média



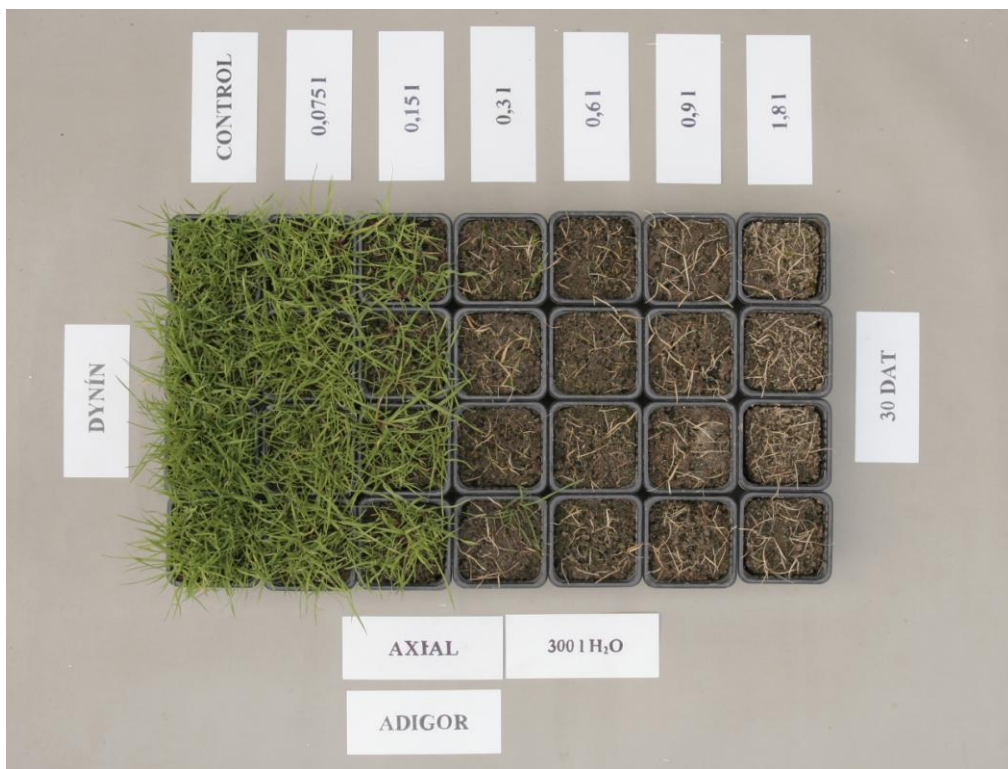
Obr. č. 10: Účinnost herbicidní látky iodosulfuron v koncentraci 6,4 μM 10 dní po přesazení rostlin do agarového média



Obr. č. 11: Převedení fotografie na černobílý obraz pro výpočet skutečné plochy rostlin



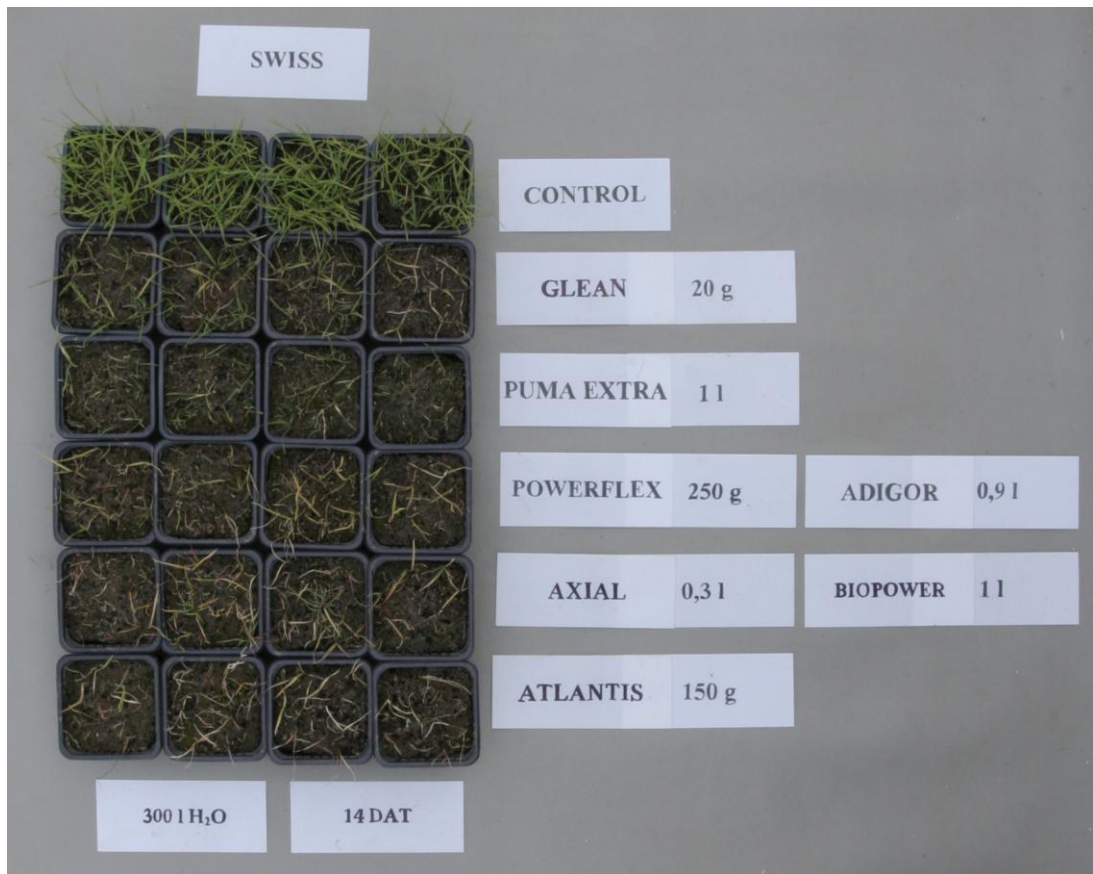
Obr. č. 12: Účinnost stupňovaných dávek herbicidu Glean WG měsíc po ošetření u biotypu Dynín



Obr. č. 13: Účinnost stupňovaných dávek herbicidu pinoxaden měsíc po ošetření u biotypu Dynín



Obr. č. 14: Účinnost doporučených dávek pěti testovaných herbicidů u biotypu Dynín měsíc po ošetření



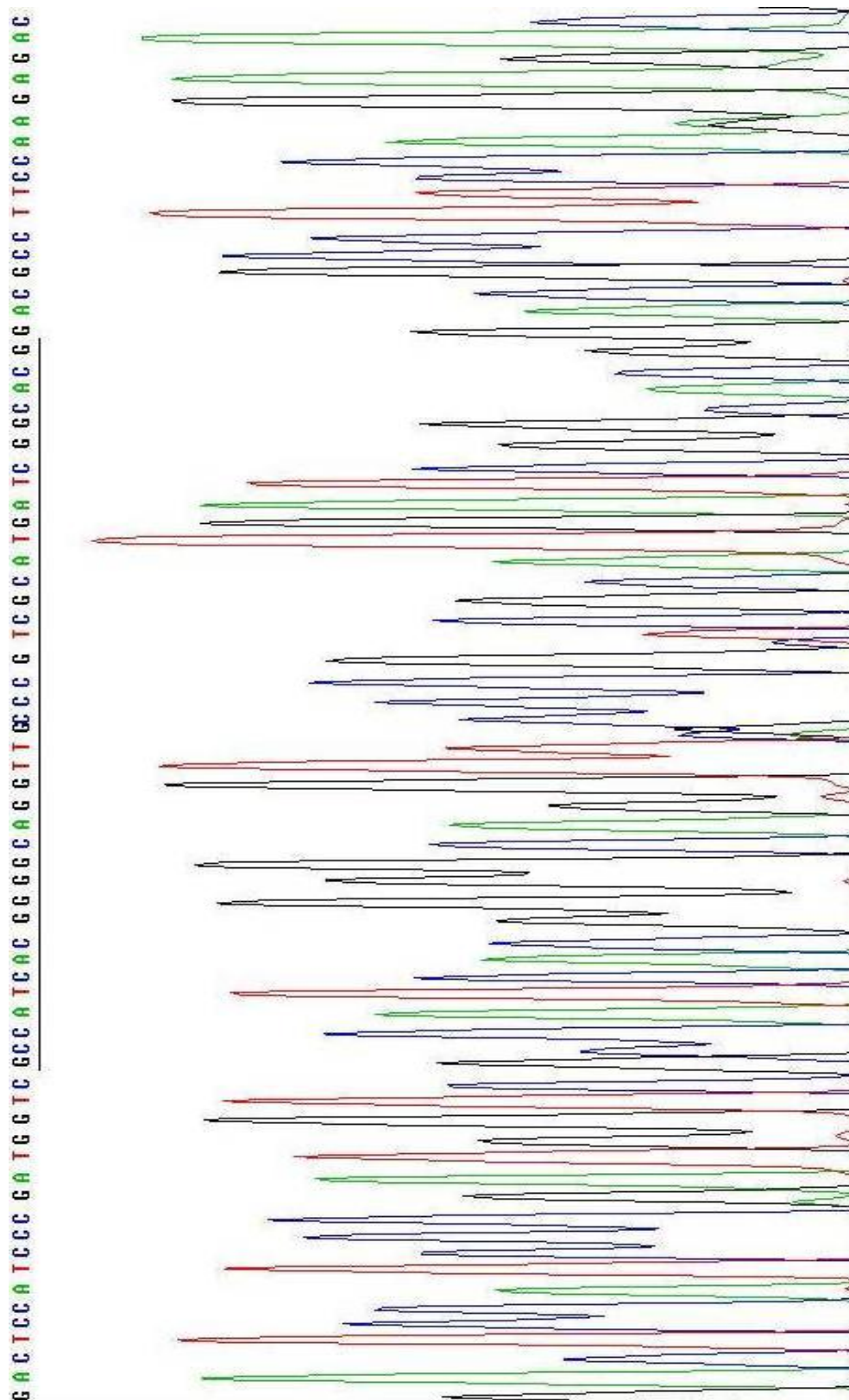
Obr. č. 15: Účinnost doporučených dávek pěti testovaných herbicidů u citlivého biotypu Švýcarsko měsíc po ošetření



Obr. č. 16: Neošetřená, rezistentní a citlivá rostlina chundelky metlice z lokality Vlastějovice po aplikaci Oustu ($300 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$), 30 DAT



Obr. č. 17: Neošetřená, rezistentní a citlivá rostlina chundelky metlice z lokality Dynín po aplikaci Oustu ($300 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$), 30 DAT



Obr. č.18: Výstup ze sekvenátoru - úsek sekvence genu *als*, podtržená oblast značí doménu A, ve které byla nalezena mutace