

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Molekulární detekce rezistence na herbicidy u ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli*)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Anna Ryšková

Studijní program: N0511A030012 Fytopatologie

Studijní obor: Fytopatologie

Forma studia: prezenční

Olomouc, 2023

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 31. 7. 2023

Poděkování

Největší poděkování náleží panu doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za podnětné rady, vstřícnost, odborné vedení mé diplomové práce a veškerý čas, který mi byl ochotný věnovat. Veliké díky patří taktéž pracovníkům z oddělení fytopatologie za vytvoření přátelské atmosféry, lidský přístup a vůbec za existenci našeho oboru. Poděkovat bych nadále chtěla i dalším členům Katedry botaniky za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě musím věnovat obrovský dík svým rodičům, příteli a bratrům, kteří při mně po celou dobu studia pevně stáli, podporovali mně, a s jejichž humorem nelze klesat na mysli.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Anna Ryšková
Název práce:	Molekulární detekce rezistence na herbicidy u ježatky kuří nohy (<i>Echinochloa crus-galli</i>)
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra botaniky
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023

Abstrakt:

Echinochloa crus-galli (L.) P. Beauv. je jedním z nejvíce problematických plevelů na celém světě, působícím závažné škody zejména v rýžových a kukuřičných polích. K regulaci tohoto plevele jsou velice často používány herbicidy ze skupiny inhibitorů acetylkoenzym A karboxylázy (ACCasy). Nadměrná a opakovaná aplikace těchto herbicidů však vedla k rozvoji rezistence u ježatky kuří nohy v mnoha zemích, přičemž se předpokládá, že rezistentních populací bude stále přibývat. Jedinou možností, jak lze rezistenci potvrdit, je pomocí molekulárních metod.

Tato diplomová práce je věnována detekci rezistence u ježatky kuří nohy, jejíž obilky byly sbírány na třech polních lokalitách Olomouckého kraje. Pomocí skleníkového pokusu a následujících dvou molekulárních metod se podařilo rezistenci potvrdit. Metodou RT-qPCR bylo zjištěno, že rezistence souvisela s nadměrnou expresí cílových genů, které byly nejvíce exprimovány 24 hodin po aplikaci inhibitoru ACCasy. Tímto mechanismem se rostliny dokážou působení herbicidu ubránit a jejich zásadní fyziologické procesy nejsou narušeny. U studovaných rostlin nebyla odhalena žádná ze zásadních bodových mutací, zodpovídajících v některých případech za rezistenci.

Klíčová slova:	<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P. Beauv.; ježatka kuří noha; TSR; ACCasa; rezistence; PCR; RT-qPCR
Počet stran:	64
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Bc. Anna Ryšková
Title of thesis: Molecular detection of resistance on herbicide in Barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*)
Type of thesis: Master's thesis
Department: Botany
Supervisor: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
The year of presentation: 2023

Abstract:

Echinochloa crus-galli (L.) P. Beauv. is one of the most problematic weeds in the world causing serious losses especially on rice and maize fields. This species is very often regulated by herbicides from a chemical group of acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors (ACCase). Nevertheless, the overuse and repeated applications of these herbicides have led to a development of resistance in barnyardgrass in many countries. It is also assumed that the level of resistant populations will constantly increase. However, molecular methods are the only option confirming plants resistance.

This Master's thesis aims to investigate the presence of resistance mechanism in barnyardgrass which seeds were collected at three different field locations in Olomouc region. The resistance mechanism was confirmed using the greenhouse experiment and two molecular methods. RT-qPCR, one of the molecular biology methods, revealed that resistance was related to overexpression of the target genes. The highest level of expression was detected 24 hours after ACCase inhibitor treatment. With mentioned mechanism plants are able to defend themselves against the herbicide action and their essential physiological processes are not disrupted. None of the amino acid substitutions that are known to confer herbicide resistance were detected in ACCase genes.

Keywords: *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.; barnyardgrass; TSR; ACCase; PCR; RT-qPCR
Number of pages: 64
Number of appendices: 0
Language: Czech

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce	2
3. Literární přehled.....	3
3.1 Charakteristika plevelných rostlin.....	3
3.1.1 Klasifikace plevelů.....	3
3.2 Historie a současný stav plevelných rostlin.....	4
3.3 Interakce plevelů s plodinami	5
3.3.1 Interakce antagonistické.....	5
3.3.2 Interakce synergické.....	6
3.4 Nechemická regulace plevelných rostlin.....	6
3.5 Herbicidní regulace plevelů.....	8
3.5.1 Klasifikace herbicidů.....	8
3.5.2 Inhibitory acetyl-CoA karboxylázy (ACCasy).....	10
3.6 Definice a vývoj herbicidní rezistence	12
3.7 Mechanismus rezistence.....	14
3.7.1 Target-site rezistence (TSR).....	14
3.7.2 Non-target-site rezistence (NTSR)	15
3.7.3 Rezistence křížová (cross-rezistence) a mnohonásobná (multiple rezistence).....	16
3.7.4 Rezistence k inhibitorům ACCasy	17
3.8 Ježatka kuří noha (<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P. Beauv.)	18
3.8.1 Biologie a ekologie ježatky kuří nohy	18
3.8.2 Původ a současné rozšíření ježatky kuří nohy	20
3.8.3 Rezistence ježatky kuří nohy	21
4. Materiál a metody.....	22
4.1 Biologický materiál	22
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	22
4.3 Použitá zařízení a přístroje	23
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	23
4.4.1 Pěstování experimentálních rostlin.....	23
4.4.2 Odběr listů <i>Echinochloa crus-galli</i> pro následné laboratorní analýzy	25
4.4.3 Izolace RNA	25
4.4.4 Ošetření RNA DNázou.....	26
4.4.5 Reverzní transkripce.....	27
4.4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
4.4.7 Purifikace produktů PCR a příprava vzorků na sekvenaci	29
4.4.8 Kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR)	30

5. Výsledky.....	32
5.1 Zhodnocení rezistence a náchylnosti rostlin při skleníkovém pokusu	32
5.2 Sekvenace <i>Acc-1</i> genů.....	33
5.3 Analýza genové exprese.....	38
5.3.1 Exprese <i>Acc-1</i> genů po 24 hodinách od aplikace herbicidu	38
5.3.2 Exprese <i>Acc-1</i> genů po 7 dnech od aplikace herbicidu	39
5.3.3 Exprese <i>Acc-1</i> genů po 15 dnech od aplikace herbicidu	40
6. Diskuse.....	41
7. Závěr	47
8. Literatura.....	48
9. Seznam zkratk	57

1. Úvod

Kosmopolitní rozšíření druhu *Echinochloa crus-galli* jakožto jednoho z nejvíce agresivních plevelů nabývá v posledních několika letech čím dál více na významnosti. Jedná se o třetí nejškodlivější plevel na světě, který je silným konkurentem kulturních plodin, má vysokou schopnost adaptace na různé podmínky prostředí, a navíc je schopen masivní reprodukce. Mimo tyto výhody má ježatka kuří noha schopnost dlouhodobého udržení semen v životaschopném stavu. Ačkoliv není známo centrum jejího původu, předpokládá se, že se rozšířila buď Evropy, nebo z východní či střední Asie. Na území České republiky se vyskytuje již od raného neolitu, avšak zásadní šíření na našem území, je spjato s používáním triazinových herbicidů v 60. letech 20. století.

K regulaci ježatky kuří nohy je používáno značné množství chemických sloučenin, včetně inhibitorů acetyl-CoA karboxylázy. ACCasa je enzym, který hraje zásadní roli v biosyntéze mastných kyselin, jelikož katalyzuje karboxylaci malonylu-CoA z acetylu-CoA. U většiny rostlin se vyskytuje ACCasa ve dvou izoformách, homomerní a heteromerní. Čeleď lipnicovitých rostlin je v tomto ohledu výjimečná, poněvadž se u ní nachází pouze homomerní izoforma ACCasy v plastidech i cytosolu. Z chemického hlediska jsou inhibitory ACCasy rozděleny na fopy, dimy a deny, přičemž většina přípravků inhibuje ACCasu v chloroplastech.

Nadměrné a opakované užívání herbicidů v rámci chemické regulace plevelů, vede k problematickému jevu, čímž je rezistence. V případě ježatky kuří nohy jsou rezistentní populace hlášeny prakticky celosvětově, a to k různým herbicidním skupinám. Obecně se rozlišují dva typy rezistence. Prvním z nich je tzv. target-site rezistence, kdy dochází ke změně místa působení herbicidu v rostlině nebo zvýšené genové expresi. Druhým typem je pak non-target-site rezistence neboli rezistence metabolická, podílející se zejména na detoxikaci herbicidu na jeho netoxickou formu. Poznatky ze zkoumání target-site mechanismů by mohly přispět k lepšímu zmapování situace ohledně rezistence u ježatky kuří nohy v ČR.

2. Cíle práce

Teoretická část:

1. Shromáždění literárních zdrojů.
2. Vypracování literární rešerše na téma diplomové práce.

Praktická část:

1. Založení skleníkového pokusu a testování účinnosti herbicidu ze skupiny inhibitorů acetylkoenzym A karboxylázy na rostliny ježatky kuří nohy.
2. Molekulární detekce mutací podmiňující rezistenci ježatky kuří nohy.
3. Izolace RNA, přepis do cDNA a následná analýza exprese genů souvisejících se vznikem rezistence u ježatky kuří nohy.

3. Literární přehled

3.1 Charakteristika plevelných rostlin

Existence plevelů sahá až daleko do historie vývoje lidstva a souvisí s přechodem člověka na zemědělský způsob života před více než 10 000 lety (Zimdahl, 2007). V souvislosti s antropologickým vnímáním plevelných rostlin, se v průběhu let měnila také definice slova plevel. To má za následek, že dnes prakticky neexistuje jediné vymezení, na němž by se shodovali všichni herbologové (Merfield, 2022). Například autoři Jursík *et al.* (2018) označují plevele všechny rostliny, které rostou na určitém stanovišti proti vůli člověka. WSSA (Weed Science Society of America) (2023) definuje plevele jako: „*Rostliny způsobující ekonomické ztráty nebo ekologické škody, způsobující zdravotní problémy u lidí či zvířat, nebo jsou nežádoucí v místě svého růstu.*“ Oproti tomu definice EWRS (The European Weed Research Society) z roku 2022 označuje plevele za: „*Rostliny, které mohou mít pozitivní i negativní vliv na ekonomické, estetické nebo environmentální aspekty jakéhokoliv agroekosystému.*“ Příhodnou definici používá také Merfield (2022), který uvádí, že plevelem je rostlina či společenství rostlin, vyskytující se v určitém čase na konkrétní lokalitě, kde dochází k působení závažných škod, a to buď ihned nebo v delším časovém horizontu. Stanovišti, na kterých mohou plevele působit největší problémy, jsou zejména pole s kulturními plodinami, ale také trvalé travní porosty, okrasné výsadby, sady či vinice (Jursík *et al.*, 2018).

3.1.1 Klasifikace plevelů

Plevelné rostliny je možno rozdělovat na základě mnoha kritérií. Čeští autoři odborných publikací nejčastěji klasifikují plevele dle jejich biologických vlastností, zejména jejich životního cyklu (Jursík *et al.*, 2018). Existuje ale i mnoho dalších způsobů rozdělení plevelů např. na základě rostlinného druhu, morfologie či stanoviště (Zimdahl, 2007).

Rozdělení plevelů dle životního cyklu

Klasifikace dle životního cyklu je v České republice, ale i v jiných oblastech ležících v mírném klimatickém pásmu, akceptována nejvíce (Zimdahl, 2007; Štrobach a Mikulka, 2021). Proto je v této práci uvedeno alespoň základní rozdělení podle Jursíka *et al.* (2018).

Plevele jednoleté: Jedná se o rostliny, které jsou schopny dokončit svůj životní cyklus během jediné sezóny, což jim umožňuje jejich rychlý růst. Zpravidla produkují velké množství semen a regulovatelné jsou snadněji, nežli je tomu v případě plevelů vytrvalých (Zimdahl, 2007; Jursík *et al.*, 2018). Jednoleté plevele lze dále rozdělovat podle doby vzcházení na plevele ozimé, efemérní, časně jarní a pozdně jarní (Jursík *et al.* 2018; Štrobach a Mikulka, 2020).

Plevele dvouleté až víceleté: Tyto rostliny tvoří v roce vzcházení listovou růžici, ale semena nebo plody produkují až v roce druhém. Poté buď odumírají (dvouleté) nebo setrvávají na stanovišti (Zimdahl, 2007; Jursík *et al.*, 2018). Problematické v jednoletých plodinách nebývají, negativně působí ve víceletých pícevních (Štrobach a Mikulka, 2021).

Plevele vytrvalé: Do této skupiny jsou řazeny plevelné druhy, které se rozmnožují především vegetativně pomocí oddenků, hlízek apod. (Jursík *et al.*, 2018; Štrobach a Mikulka, 2020). Ač jsou schopny i generativního rozmnožování, na orné půdě převládá rozšiřování vegetativním způsobem. Tyto plevely jsou považovány za zdatné konkurenty téměř kterýchkoliv kulturních porostů (Štrobach a Mikulka, 2020).

3.2 Historie a současný stav plevelných rostlin

Šíření plevelů na velké vzdálenosti bylo v minulosti, ale je i dnes, způsobováno primárně člověkem. Za ohnisko, odkud se semena plevelů rozšiřovala dál do Evropy, je považována oblast raných center civilizací v oblasti východního Středomoří. Z Evropy byly plevely dále šířeny do Severní Ameriky spolu s migrující populací, což je také důvod, proč se mnoho tamějších dominantních druhů nachází taktéž v Evropě (Zimdahl, 2007; Clements a Jones, 2021b). I na našem území bylo zemědělství již od počátku spjato s problémy zaplevelování políček, na nichž byly pěstovány zemědělské plodiny (Štrobach a Mikulka, 2020). U mnoha jednoletých plevelů existuje tzv. speirochorie, což znamená, že se plevely podobají morfologicky i ekologicky pěstované plodině. Zejména dříve, kdy se osivo nečistilo nebo bylo čištění osiva nekvalitní, se plevely šířily společně se semeny pěstované plodiny, a to proto, že mají velikostně a hmotnostně semena podobná (Štefánek, 2018). Plevely tak patřily mezi nejvíce problematické činitele, které od pradávna způsobovaly značné ztráty na výnosech zemědělských plodin a k jejich hubení bylo vynakládáno velké úsilí (Štrobach a Mikulka, 2020).

Úspěšnost v rozšiřování plevelných rostlin tkví v jejich schopnosti kolonizovat bez problémů nová území. Často jsou to druhy pionýrské, vykazující značnou adaptabilitu k měnícím se podmínkám prostředí (Clements a Jones, 2021a). Valná většina plevelů je tak schopna rychle reagovat na probíhající klimatické změny, zahrnující například nepřírozené výkyvy teplot, změny vlhkostních, povětrnostních a světelných podmínek, a také dostupnosti vody (Zimdahl, 2007; Clements & Jones, 2021b). Dalším faktorem, podněcujícím přechod rostlin na plevelný způsob života, je absence přirozeného antagonisty, který by byl schopen plevely regulovat (Ellstrand *et al.*, 2010). Taktéž samotná lidská činnost hraje zásadní roli v úspěšnosti rozšiřování plevelů. Jedná se především o s dobou se měnící agrotechnické postupy (Štrobach a Mikulka, 2020). Jako příklad lze uvést zpracování půdy, čištění osiva před setím, termín výsadby zemědělské plodiny, rotaci plodin, způsob zavlažování, různé možnosti hnojení a používání rozličných skupin herbicidů (selektivních i totálních) (Zimdahl, 2007; Štefánek, 2018; Štrobach a Mikulka, 2021).

Faktory přírodního rázu není člověk schopen přímo regulovat, což vede k dlouhodobým změnám diverzity u plevelných a kulturních společenstev (Štrobach a Mikulka, 2021). V minulosti bylo druhové spektrum plevelů v pěstovaných plodinách vždy poměrně bohaté. Mnohdy se zde nacházelo i několik desítek plevelů, které byly schopny zdatně konkurovat nejen pěstované plodině, ale i sobě vzájemně. Plevelná společenstva tak byla dříve o poznání stabilnější, než je tomu dnes (Štrobach a Mikulka, 2020; Štrobach & Mikulka, 2021). Díky výše zmíněným klimatickým změnám a lidskému

faktoru, některé historicky významné druhy plevelů z polí zcela vymizely. Lze tak jmenovat např. plevele vyskytující se ve lnu (kokotice hubilen, koleneček lnový, silenka lnová), koukol polní, jílek mámivý a mnoho dalších (Štefánek, 2018). Ačkoliv šlo lidem od pradávna především k absolutnímu vymýcení plevelů, díky narušení stability plevelných společenstev vznikají nové problémy, s nimiž se musí lidé potýkat (Zimdahl, 2007). Zásadním negativním dopadem je šíření mnohem agresivnějších a těžko regulovatelných plevelů, což je způsobeno hlavně změnami pěstebních technologií a opakovaným používáním herbicidů (Štefánek, 2018; Štrobach a Mikulka, 2020).

3.3 Interakce plevelů s plodinami

Kulturní plodiny a plevelné rostliny spolu koexistují v rámci jednoho stanoviště, na němž se obě skupiny rostlin vyskytují a vytváří tak společně agrofytocenózy (Navas, 2012; Jursík *et al.*, 2018). Interakce mezi oběma skupinami rostlin mohou být jak negativní, tak i pozitivní. Zpravidla se však zdůrazňují spíše škodlivé efekty plevelů na pěstované plodiny, neboť nad pozitivními vlivy stále převažují (Navas, 2012; Ekwealor *et al.*, 2019).

3.3.1 Interakce antagonistické

Antagonistickou interakcí se rozumí stav, kdy je jeden ze současně se vyskytujících druhů rostlin negativně ovlivněn druhem jiným. Často se za škodlivého činitele považují právě druhy plevelné, které mají vliv na celé agroekosystémy (Jursík *et al.*, 2018; Scavo a Mauromicale, 2020). Za nejzásadnější škodlivé efekty plevelných rostlin se považuje kompetice, alelopatie a parazitismus (Ekwealor *et al.*, 2019; Scavo a Mauromicale, 2020). Tyto hlavní tři faktory podstatně ovlivňují snižování výnosu plodin nebo jeho kvalitu (Navas, 2012; Ekwealor *et al.*, 2019).

Kompetice (konkurence): Tímto termínem se rozumí soutěžení rostlin o zdroje, čímž bývá nejčastěji voda, živiny, prostor nebo světlo (Andrew *et al.*, 2014; Scavo a Mauromicale, 2020). Kompetice může být pro pěstované plodiny zcela devastující, vyskytne-li se v prostoru dostatečně agresivní druh plevelu, a nemá-li pěstovaná plodina mechanismy, kterými by dostatečně plevelu konkurovala (Ekwealor *et al.*, 2019). Konkurence navíc může být intraspecifická (vnitrodruhová), ale i interspecifická (mezidruhová). V obou případech je to jev negativní, kdy všechny zúčastněné strany určitým způsobem strádají (Andrew *et al.*, 2014; Jursík *et al.*, 2018).

Parazitismus: V případě parazitismu se jedná o vztah mezi hostitelem a parazitem, který mu odebírá esenciální látky a využívá je ve svůj prospěch (Scavo a Mauromicale, 2020). Typickým příkladem parazita je rod kokotice (*Cuscuta* spp.), napadající různé druhy plodin. Velké ztráty na jetelovinách způsobuje kokotice jetelová, avšak nejvíce rozšířeným druhem v České republice je kokotice evropská (Jursík *et al.*, 2018; Štrobach a Mikulka, 2020).

Alelopatie: Alelopatie je popisována jako škodlivý jev, kdy dochází k vzájemnému ovlivnění plevelů a kulturních porostů produkcí tzv. alelopatik (alelochemikálií) (Scavo a Mauromicale, 2020). Alelopatika jsou sekundární metabolity, které jsou uvolňovány do okolí různými způsoby např. formou kořenových exsudátů, volatilizací nebo nadzemními orgány (Ekwealor *et al.*, 2019; Scavo

a Mauromicale, 2020). Příkladem plevelů, které mají potvrzenou schopnost alelopatie, jsou pýr plazivý nebo pcháč rolní (Jursík *et al.*, 2018). Taktéž některé kulturní plodiny jsou významnými producenty alelochemikálií, a tak brání klíčení plevelných rostlin. Jedná se např. o slunečnici, některé obilniny (čirok, rýže, pšenice), tabák nebo vojtěšku (Scavo a Mauromicale, 2020).

3.3.2 Interakce synergické

Ačkoliv je valná většina herbologických výzkumů věnována antagonistickým interakcím, někteří autoři upozorňují i na kladné působení plevelných rostlin (Blaix *et al.*, 2018). Jedním z hlavních pozitivních efektů plevelů, je obohacování půdy o živiny. Nejčastěji jsou zmiňovány rostliny bobovité, mající schopnost fixovat vzdušný dusík (Blaix *et al.*, 2018; Scavo *et al.*, 2020). Běžně se vyskytujícími bobovitými plevelnými rostlinami na orné půdě jsou jetele, hrachory a vikve (Jursík *et al.*, 2018). V zemích Středomoří se osvědčilo pěstování některých druhů jetelů jako krycích plodin v ovocných sadech, kde dopomáhají k obohacování půdy o vzdušný dusík (Scavo *et al.*, 2020). Plevelné rostliny mohou fungovat i jako rostlinný pokryv, který zabraňuje půdní erozi, vyplavování dusíku a dalších prvků (Blaix *et al.*, 2018; Jursík *et al.*, 2018).

Dalším vlivem, který plevelné rostliny vykazují, je jejich působení na různé skupiny hmyzu, jenž je nedílnou součástí každého agroekosystému (Blaix *et al.*, 2018; Jursík *et al.*, 2018). Plevely poskytují potravu opylovačům, predátorům a parazitoidům a zvyšují tak jejich populace, což spěje ke snížení abundance škůdců v polních porostech (Capinera, 2005; Blaix *et al.*, 2018). Opylovači mají v případě pestrého zastoupení plevelných rostlin neustálý přísun potravy a mohou tedy přežít v blízkosti agroekosystémů. Tímto způsobem pak dopomáhají opylovat i kulturní hmyzosubné plodiny (Capinera, 2005; Jursík *et al.*, 2018).

V rámci agroekosystémů je nezbytné zachování biodiverzity, která je dnes, zejména s pěstováním monokultur, negativně postižena. I když jsou plevely považovány za rostliny primárně škodlivé, svým výskytem zvyšují pestrost polních porostů (Jursík *et al.*, 2018; Storkey a Neve, 2018). Druhá variabilita plevelů tak značí i větší stabilitu celého agroekosystému. Může také docházet ke konkurenci mezi jednotlivými plevely, což zároveň zvýhodňuje pěstovanou plodinu (Storkey a Neve, 2018).

3.4 Nechemická regulace plevelných rostlin

Regulace plevelných rostlin v polních plodinách je nezbytnou součástí ochrany rostlin. Díky různým technikám lze zamezit rozšiřování plevelů, a tak i značným ztrátám na výnosech (Zimdahl, 2007; Jursík *et al.*, 2018). V minulosti byly metody regulace plevelů výhradně nechemické. První anorganické sloučeniny byly použity až na konci 19. století a ve 20. století již byly vyvinuty první účinné herbicidy (Jabran a Chauhan, 2018). Lidstvo se pak mnoho let spoléhalo primárně na chemickou kontrolu plevelů, jakožto nejvíce spolehlivou metodu. Záporné vlivy herbicidů nebyly ve velké míře zkoumány, avšak dnes je jich již mnoho objasněno. Proto se do popředí dostávají opět metody nechemické ochrany rostlin, které mají negativnímu působení chemických látek předcházet (Jabran a Chauhan, 2018; Pavlović *et*

al., 2022). Nechemické metody ochrany rostlin zahrnují zejména agrotechnické postupy, zamezující rozšiřování plevelů na nová stanoviště a likvidující zdroje zaplevelení. Jsou zde řazeny ale i metody mechanické, fyzikální nebo biologické, v ochraně rostlin běžně uplatňované (Jursík *et al.*, 2018, Scavo a Mauromicale, 2020). V rámci nechemických metod se často zmiňuje tzv. integrovaný management plevelů (Integrated Weed Management), což je soubor opatření, který si klade za cíl kombinovat preventivní zásahy, monitoring a kontrolu polních porostů, namísto pouhého využití herbicidů ke kompletní eradikaci plevelů (Lamichhane *et al.*, 2016; Scavo a Mauromicale, 2020). Cílem integrovaného managementu plevelů je tedy regulace výskytu plevelů pod hranici ekonomické významnosti, s využitím ekologicky nezávadných postupů a významným potlačením chemické kontroly (Scavo a Mauromicale, 2020; Pavlović *et al.*, 2022). Některé důležité nechemické přístupy v ochraně kulturních plodin jsou uvedeny níže.

Kontrola semenné banky plevelů: Půdní semenná banka funguje jako rezervoár semen plevelů, čímž se automaticky stává hlavním zdrojem zaplevelení v dalších sezónách, případně letech, jsou-li semena dlouho dormantní (Scavo *et al.*, 2019). Proto je zásadním krokem snížení množství semen plevelů, která se v půdě nacházejí. K tomu lze využít např. přípravu falešného setového lůžka, na němž se vytvoří vhodné podmínky ke klíčení semen plevelů a po vyklíčení jsou plevele likvidovány (Pavlović *et al.*, 2022). Scavo *et al.* (2019) navrhuje zahrnutí plodin schopných produkce alelopatik do osevního postupu, čímž by došlo k inhibici plevelných semen přímo v půdě. Tímto způsobem by bylo možno plevele regulovaly ekologicky, bez značných dopadů na životní prostředí.

Rotace plodin: Střídání plodin je dlouhodobě jednou z neúčinnějších preventivních metod, díky níž se snižuje zaplevelení polních porostů (Zimdahl, 2007; Lamichhane *et al.*, 2016). Pěstují-li se na polích opakovaně stejné druhy plodin, dochází ke snížení diverzity plevelných společenstev. Postupem času se tak vygenerují plevelné druhy, které dominují nad ostatními plevele a s plodinami si konkurují o zdroje (Lamichhane *et al.*, 2016; Jursík *et al.*, 2018). Ačkoliv je potvrzen pozitivní vliv rotace plodin v rámci nechemické regulace plevelů, od klasických osevních postupů se upouští. Tento fakt je zapříčiněn zejména tržní ekonomikou, kdy je vyvíjen nátlak na pěstitele, kteří se soustřeďují na pěstování pouze několika málo druhů plodin (Lamichhane *et al.*, 2016).

Mechanické a fyzikální metody: Mechanickými metodami se rozumí především kultivační zásahy a zpracování půdy před setím nebo během vegetace kulturní plodiny (Jursík *et al.*, 2018; Pavlović *et al.*, 2022). V minulosti byl mechanický způsob hubení plevelů jedinou uplatňovanou technikou, kdy se plevele ručně vytrhávaly. Tento způsob plevelné regulace je dnes možný prakticky jen na menších políčkách, ale uplatňuje se např. i v ekologickém zemědělství (Jursík *et al.*, 2018; Štrobach a Mikulka, 2021). Mezi mechanické způsoby regulace plevelů patří i strojové plečkování nebo válení, kdy se plevele eliminují až postemergentně (Lamichhane *et al.*, 2016; Scavo a Mauromicale, 2020). Mechanické způsoby regulace plevelů mohou být kombinovány zároveň s technikami fyzikálními, které jsou však většinou energeticky náročné (Jursík *et al.*, 2018). Rask a Kristoffersen (2007) uvádějí jako nejvýznamnější fyzikální možnosti regulace plevelů metody termické (využití hořáků, horké vody, páry

atd.) a radiaci (UV záření, laserová radiace). Scavo a Mauromicale (2020) doplňují fyzikální metody o solarizaci půdy a mulčování.

Biologické metody: Biologickou ochranou rostlin se myslí úmyslné využití živých organismů, které svou přítomností regulují množství plevelů (Lamichhane *et al.*, Scavo a Mauromicale, 2020). Cordeau *et al.* (2016) rozdělují bioagens do několika skupin: makroorganismy (predátoři, parazitoidi, nematoda), mikroorganismy (houby, bakterie, viry), přírodní substance z rostlin či živočichů a chemické mediátory např. feromony. I když je tento způsob ochrany udržitelný a šetrný k životnímu prostředí, nefunguje okamžitě, jeho účinnost se tedy projeví až za několik let (Jursík *et al.*, 2018; Pavlović *et al.*, 2022).

3.5 Herbicidní regulace plevelů

Herbicide jsou chemické substance, které slouží k regulaci plevelů na různých stanovištích. Svým působením narušují fyziologické procesy v rostlinném těle, v důsledku čehož rostlina chřadne a odumírá (Jursík *et al.*, 2018). Jak již bylo zmíněno, velká éra užívání herbicidů v zemědělství nastala po roce 1945, kdy byla vynalezena kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová, jakožto první syntetický herbicid (Reddy a Nandula, 2012). Od tohoto roku bylo vyprodukováno několik dalších syntetických herbicidů, patřících do různých skupin dle působení na rostlinný metabolismus a chemického složení (Reddy a Nandula, 2012; He *et al.*, 2022). Cílený vývoj herbicidů nastal v 50. letech 20. století. Za průlomový okamžik je považováno objevení skupiny triazinů (inhibitorů fotosyntézy), a to zejména atrazinu (Kraehmer, 2012; Kraehmer *et al.*, 2014). V 60. letech 20. století pak byly uvedeny na trh přípravky ze skupiny chloracetamidů, účinných zejména na čeleď *Poaceae* (Kraehmer, 2012). Od konce 70. let 20. století se výzkum zaměřil na vývoj nových chemických sloučenin s různorodými mechanismy působení (Mode of Action, MoA) (Kraehmer, 2014; Jursík *et al.*, 2018). To se týkalo i vývoje herbicidů ze skupiny inhibitorů ACCasy (acetylkoenzym A karboxylázy), které byly formulovány jako postemergentní selektivní přípravky, určené především k regulaci vytrvalých plevelů z čeledi lipnicovitých. Vyvinuty byly i další významné herbicide, a to zejména glufosinát, glyfosát a inhibitory ALS (acetolaktát syntáza) (Kraehmer *et al.*, 2014). Vývoj dalších herbicidů s novými mechanismy působení od 80. let 20. století však poměrně stagnuje (Kraehmer *et al.*, 2014; He *et al.*, 2022). Posledními významnými skupinami herbicidů, které byly uvedeny na trh koncem 90. let 20. století, jsou inhibitory 4-HPPD (4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza) (Jursík *et al.*, 2018).

3.5.1 Klasifikace herbicidů

Klasifikace herbicidů je možná dle různých hledisek. V praxi se často herbicide rozdělují na základě selektivity na herbicide **totální** (neselektivní) a **selektivní** (výběrové) (Green, 2014). Při vývoji nových herbicidů bylo v minulosti stěžejní vybrat chemickou sloučeninu, která by fungovala jako zdroj selektivity, nehubila pěstované plodiny, ale zároveň účinně eliminovala plevele (Carvalho *et al.*, 2009; Green, 2014). Selektivita herbicidů je založena na schopnosti různých druhů rostlin přijímat herbicide odlišnými způsoby a s různou rychlostí. Záleží ale také na metabolismu rostliny, případně zdali je

rostlina k herbicidu tolerantní (Carvalho *et al.*, 2009). Kraehmer *et al.* (2021) rozdělují dále herbicidy podle termínu jejich aplikace na **preemergentní**, **postemergentní** a **posklizňové**. Preemergentní herbicidy jsou významné zejména v ochraně širokořádkových plodin např. kukuřice, sóji či cukrové třtině. Aplikovány jsou na půdu ještě před vzejitím plodiny. Proto jsou přijímány hlavně kořeny, hypokotylem nebo koleoptile (v případě trav) (Jursík *et al.*, 2018). Postemergentní herbicidy jsou oproti tomu aplikovány až po vzejití plodiny i plevelů, a to zejména na listy, přičemž tento způsob regulace plevelů je nejčastější (Jursík *et al.*, 2018; Kraehmer *et al.*, 2021). Rozvod herbicidů v rostlině může být dle způsobu aplikace **systemový**, kdy je pomocí vodivých pletiv rozváděn akropetálně nebo bazipetálně v celé rostlině. Existují ale i herbicidy **kontaktní**, působící lokálně pouze na určitém místě, tzv. v místě kontaktu (Zimdahl, 2007; Kraehmer *et al.*, 2021). Translokace herbicidů v rostlině je pak možná skrze apoplast (mezibuněčnými prostory), symplast (přes plasmodesmata sousedních buněk) nebo vodivými pletivy (xylémem a floémem). Pro maximalizaci účinnosti se herbicidy často kombinují, avšak ani tímto způsobem nemůže být zaručena regulace celého spektra plevelných rostlin (Kraehmer *et al.*, 2021).

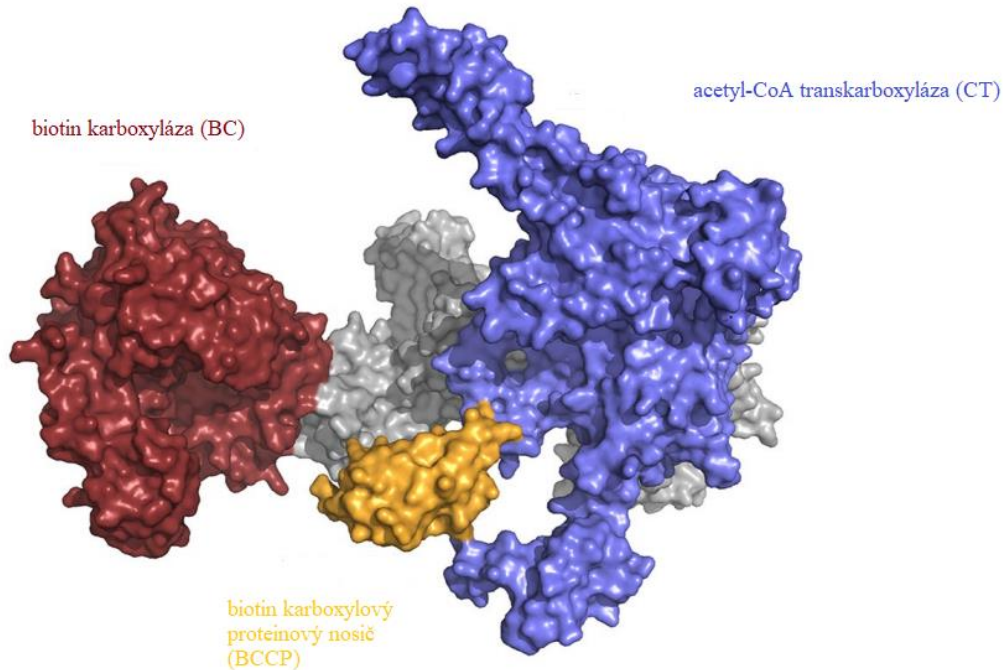
Zřejmě nejvíce komplexní klasifikace herbicidů je podle jejich **mechanismu a místa působení** (MoA). Většinou jsou herbicidní látky zacíleny na inhibici jednoho či více enzymů, podílejících se na biosyntéze organických sloučenin (Jursík *et al.*, 2018). Celosvětově jsou uznávány dva klasifikační systémy, a to podle databáze HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) a WSSA (Weed Science Society of America). Databáze HRAC byla dříve rozdělena dle MoA do patnácti základních skupin, které byly označeny písmeny A–P, zatímco databáze WSSA rozdělovala herbicidy podle MoA do skupin označených číselně. Aby došlo ke sjednocení systému, byla v roce 2020 databáze HRAC upravena, a proto jsou dnes jednotlivé skupiny herbicidů značeny taktéž číselně (WSSA, 2021; HRAC, 2022). Pro přehled jsou jednotlivé skupiny herbicidů podle databáze HRAC uvedeny na Obrázku č. 1.

HRAC ROZDĚLENÍ			HRAC ROZDĚLENÍ		
1	A	Inhibitory ACCasy	19	P	Inhibitory transportu auxinu
2	B	Inhibitory ALS	22	D	Inhibitory PS I
3	K1	Inhibitory shlukování mikrotubulů	23	K2	Inhibitory organizace mikrotubulů
4	O	Syntetické auxiny	24	M	Rozrušovače membrán
5	C1,2	Inhibitory fotosyntézy PS II - Serin 264	27	F2	Inhibitory HPPD
6	C3	Inhibitory fotosyntézy PS II - Histidin 215	28	none	Inhibitory dihydrorotát dehydrogenázy
9	G	Inhibitory EPSP syntázy	29	L	Inhibitory syntézy buněčné stěny
10	H	Inhibitory glutamin syntetázy	30	Q	Inhibitory thioesterázy mastných kyselin
12	F1	Inhibitory PDS	31	R	Inhibitory serin/threonin-protein fosfatázy
13	F4	Inhibitory DOXP syntázy	32	S	Inhibitory solanesyl-difosfát syntázy
14	E	Inhibitory PPO	33	T	Inhibitory HST
15	K3	Inhibitory VLCFAs	34	F3	Inhibitory lykopen cyklázy
18	I	Inhibitory DHP	∅	Z	Neznámý MoA

Obrázek č. 1: Rozdělení herbicidů podle databáze HRAC (převzato a upraveno dle HRAC, 2022).

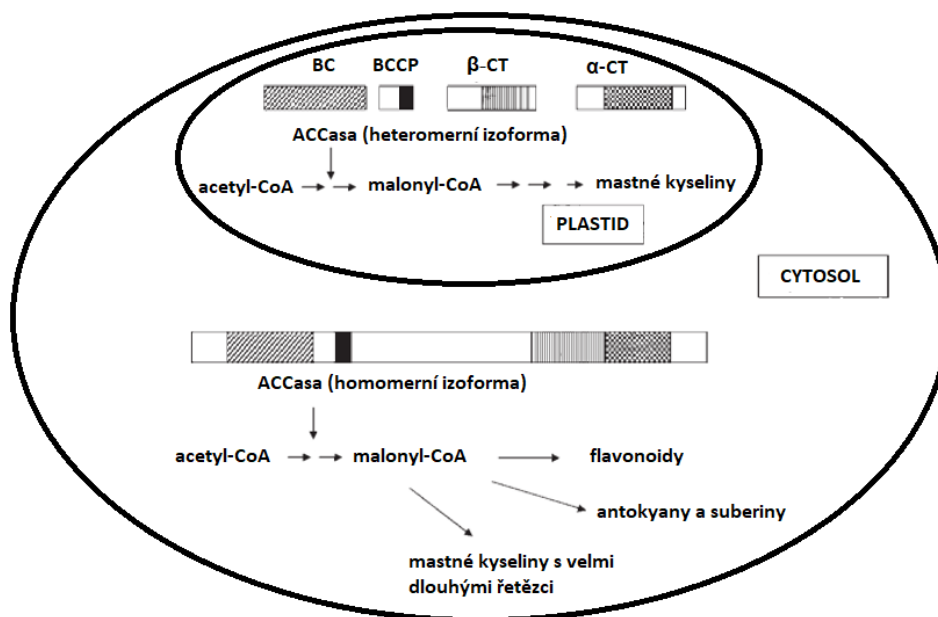
3.5.2 Inhibitory acetyl-CoA karboxylázy (ACCasy)

Acetyl-CoA karboxyláza je enzym, který je tvořen třemi odlišnými funkčními doménami: biotin karboxylovým proteinovým nosičem (BCCP), biotin karboxylázou (BC) a acetyl-CoA transkarboxylázou (CT), složenou z podjednotek α a β (viz Obrázek č. 2) (Nikolau *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2021).



Obrázek č. 2: Prostorové zobrazení rostlinné ACCasy (upraveno dle Takano *et al.*, 2021).

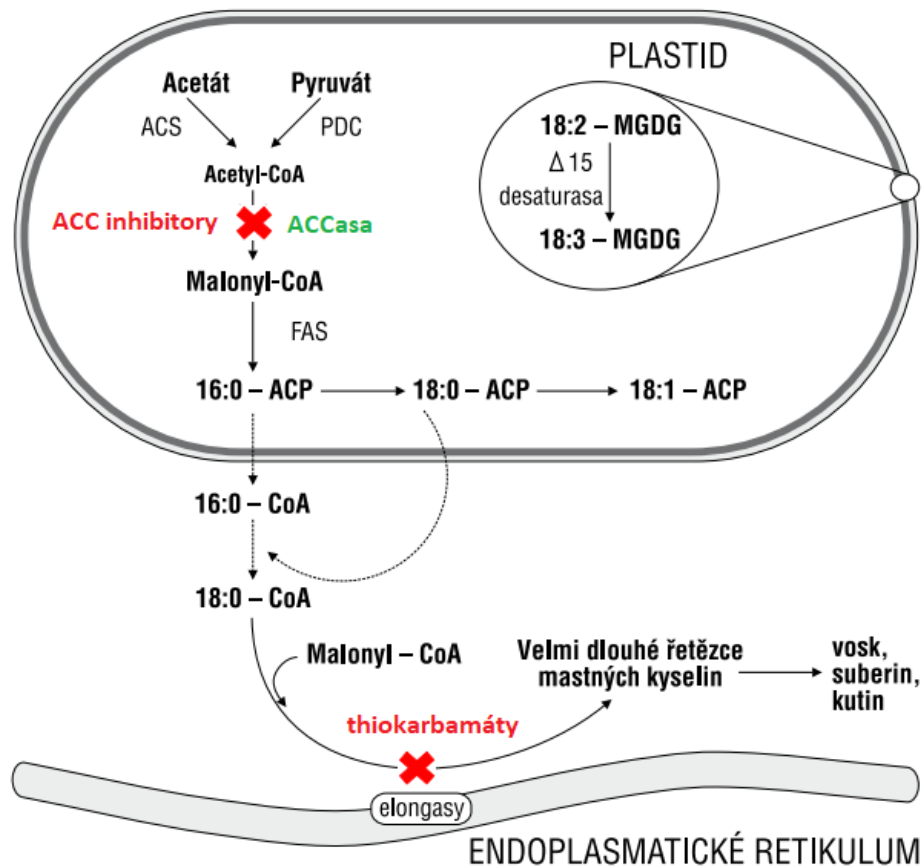
ACCasa hraje klíčovou roli v karboxylaci acetyl-CoA na malonyl-CoA, což je reverzibilní reakce odehrávající se ve dvou krocích. Pro uskutečnění této reakce je nutná energie ATP, a také biotin, který funguje jako kofaktor ACCasy (Délye, 2005; Tong, 2013). Přítomnost malonylu-CoA je nutná v plastidech pro *de novo* biosyntézu mastných kyselin, ale i v cytosolu, kde se podílí na prodlužování velmi dlouhých řetězců mastných kyselin a tvorbě sekundárních metabolitů jako jsou flavonoidy, antokyany a suberiny (Nikolau *et al.*, 2003; Délye, 2005; Tong, 2013). U většiny rostlin se vyskytují dvě strukturně odlišné izoformy ACCasy, a to homomerní a heteromerní (Nikolau *et al.*, 2003, Sasaki a Nagano, 2004). Heteromerní izoforma ACCasy je většinou lokalizována v plastidech, zatímco homomerní izoforma ACCasy se nachází v cytosolu (viz Obrázek č. 3). Výjimkou je právě čeleď *Poaceae*, u níž se nachází homomerní izoforma ACCas v plastidech i v cytosolu (Sasaki a Nagano, 2004).



Obrázek č. 3: Lokalizace izoforem ACCasy v rostlinné buňce, vyjma čeledi *Poaceae* (upraveno dle Sasaki a Nagano, 2004).

Původ rostlinných acetyl-CoA karboxyláz byl odvozen ze struktury jednotlivých podjednotek a srovnáním sekvencí aminokyselin (Huang *et al.*, 2002). Plastidová izoforma ACCasy u většiny dvouděložných rostlin je kódována čtyřmi různými geny, z nichž tři jsou lokalizovány v jádře (BCCP, BC a α -CT) a čtvrtý v genomu chloroplastu (β -CT). Oproti tomu plastidová izoforma ACCasy trávovitých plevelů a některých dvouděložných rostlin, je kódována *Acc-1* jaderným genem, zatímco *Acc-2* jaderný gen kóduje cytosolovou izofomu ACCasy (Huang *et al.*, 2002; Délye, 2005).

Inhibitory ACCasy, tedy inhibitory biosyntézy lipidů, jsou chemické sloučeniny, které jsou významnými herbicidy zejména v regulaci trávovitých plevelů (Délye, 2005). Inhibitory ACCasy se rozdělují do tří hlavních skupin: aryloxy-fenoxypropionáty (fopy či FOPs), cyklohexandiony (dimy či DIMs) a phenylpyrazoliny (deny či DENs). Zatímco fopy a dimy byly uvedeny na trh už před 45 lety, phenylpyrazoliny jsou známy až od roku 2006, přičemž je do této skupiny řazen pouze pinoxaden (Délye, 2005; Takano *et al.*, 2021). Většina FOPs je formulována jako estery (methyl, butyl, ethyl apod.), což poskytuje větší lipofilitu a zvýšenou schopnost procházet skrz membrány (Takano *et al.*, 2021). Fopy jsou po příjmu rostlinou rozváděny cévními svazky po celé rostlině a používají se k postemergentnímu hubení trávovitých plevelů (Jursík *et al.*, 2010). Na základě molekulárních dat bylo prokázáno, že vazebným místem pro fopy, dimy a deny je právě CT doména homomerní ACCasy, čímž je blokována karboxylace acetylu-CoA na malonyl-CoA (viz Obrázek č. 4) (Délye, 2005).



Obrázek č. 4: Schéma biosyntézy mastných kyselin, místo působení inhibitorů ACCasy a thiokarbamátů (ACS - Acetyl-CoA syntetáza, PDC - komplex enzymů pyruvát dehydrogenáz, FAS - syntáza mastných kyselin, ACP - proteinový nosič acylu, MGDG - monogalaktosyldiacyl glycerol) (upraveno dle Jursík *et al.*, 2010).

Příznaky poškození herbicidem se dostávají relativně pomalu. Rostlina zakrsává a přestává tvořit nové listy v důsledku ireverzibilního poškození buněčných membrán (Jursík *et al.* 2010; Takano *et al.*, 2021). Prvním viditelným symptomem je žloutnutí mladých listů, u kterých je vysoká koncentrace meristémových buněk. Mladé listy následně nekrotizují, což se děje cca týden po aplikaci herbicidu (Jursík *et al.*, 2018; Takano *et al.*, 2021). U některých trav se může vyskytovat antokyanové zbarvení listů s následnou nekrotizací. Starší listy mohou dlouhou dobu vypadat nezasažené, nicméně po delší době i tyto listy žloutnou a usychají (Jursík *et al.*, 2010). Zda byla herbicidní aplikace celkově účinná, se projeví až po 2–3 týdnech, přičemž záleží na růstové fázi rostliny, a také na podmínkách počasí (Jursík *et al.*, 2010; Takano *et al.*, 2021).

3.6 Definice a vývoj herbicidní rezistence

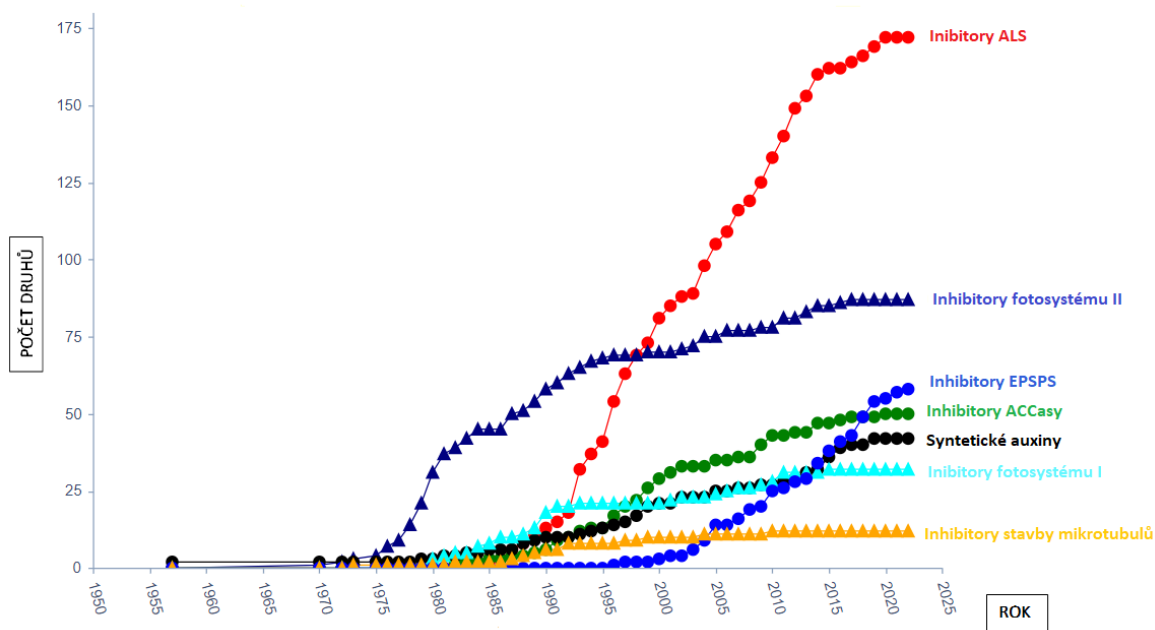
Rezistence rostlin k herbicidům je popisována jako získaná schopnost plevelů přežít a dále se reprodukovat i po jejich vystavení určité dávce herbicidu, při níž by za normálních okolností byly účinně regulovány (WSSA, 1998). Rezistentní plevelné rostliny se vyskytují jak v geneticky upravených plodinách, u nichž je navozena odolnost k určitému herbicidu, tak také v geneticky nemodifikovaných polních porostech (Vencill *et al.*, 2012). Opakované užívání konkrétního herbicidu či skupiny herbicidů

se shodným MoA selektuje pouze určité biotypy plevelů (Norsworthy *et al.*, 2012). Rezistence prakticky vzniká ve chvíli, kdy jsou v důsledku dlouhodobého jednosměrného selekčního tlaku náchylní jedinci v rámci populace plevelů eliminováni, zatímco odolní jedinci jsou díky přirozeně vznikajícím genetickým změnám zvýhodněni, a tak jsou schopni přežít a rozmnožit se. Probíhá-li selekční tlak konstantně, dochází ke zvýšení počtu rezistentních populací až do doby, kdy již není možné tyto populace žádným způsobem chemicky regulovat (Norsworthy *et al.*, 2012; Vencill *et al.*, 2012). Proto je cílem v rámci integrovaného managementu plevelů (viz Kapitola 3.4) snížení množství používaných herbicidů a využití spíše preventivních zásahů a nechemických metod ochrany rostlin (Scavo a Mauromicale, 2020).

První případy rezistentních plevelů jsou datovány do roku 1957, kdy se vyskytla rezistence v Kanadě u divoké mrkve k analogům auxinu (2,4-D). Avšak až do roku 1965 nebyly popsány žádné další případy (Norsworthy *et al.*, 2012; Shaner, 2014). Rapidní nárůst výskytu rezistentních biotypů plevelů pak nastal od roku 1968, kdy byl popsán rezistentní starček obecný k simazinům a atrazinům v USA (Shaner, 2014). Jelikož byly v těch letech ve velké míře používány triazinové herbicidy téměř po celém světě, přibývalo v důsledku toho i mnoho dalších rezistentních druhů plevelů např. v Kanadě, Austrálii, Izraeli na Novém Zélandu a mnoha státech Evropy (Norsworthy *et al.*, 2012, Kolářová *et al.*, 2023). Od konce 70. let minulého století se výzkum zaměřil na vývoj dalších typů herbicidů s novými mechanismy účinku, což se týkalo zejména přípravků na bázi inhibitorů ALS a ACCasy (Kraehmer, 2014). V důsledku nárůstu používání těchto přípravků, došlo také ke zvýšení popsáných rezistentních populací. Od roku 1980 až do roku 1995 se výskyt rezistentních druhů plevelů k ALS a ACCase zvýšil téměř pětkrát (Shaner, 2014). V roce 1996 se v Severní a Jižní Americe začaly poprvé pěstovat glyfosát tolerantní odrůdy plodin (kukuřice, bavlník, sója), jakožto součást nového managementu v zemědělství (Shaner, 2014). Tento fakt se nicméně opět projevil na vzniku rezistence u plevelných rostlin, tentokrát ke glyfosátu (Jursík *et al.*, 2018).

Obecně vzato se rezistence častěji projevuje u plevelů, které rostou v monokulturních porostech např. kukuřici, rýži nebo pšenici. Odolné plevele jsou však běžně nacházeny i na jiných stanovištích jako jsou vinice, sady nebo školky, tzv. v trvalých kulturách. Nemálo případů bylo zachyceno i na nezemědělských lokalitách např. podél cest či železnic (Jursík *et al.*, 2011; Jursík *et al.*, 2018). Do dnešního data je potvrzen výskyt rezistence u 268 druhů plevelů (154 druhů dvouděložných a 114 jednoděložných druhů). Nejvyšší procento rezistentních druhů spadá do čeledi *Poaceae*, následovanou čeledí *Asteraceae* a *Brassicaceae*. Rezistence je vyvinuta k 165 různým typům herbicidů a 21 skupinám s odlišným MoA. Celosvětově je hlášena rezistence u 98 druhů plodin v 72 zemích, přičemž se předpokládá, že se počet rezistentních populací plevelů bude stále zvyšovat (viz Obrázek č. 5) (Heap, 2023). V České republice bylo prozatím popsáno 18 rezistentních druhů plevelů, z nichž 13 bylo nalezeno na zemědělské půdě, a to především v obilninách a sadech. První hlášené případy rezistentních plevelů byly již v 80. a 90. letech minulého století, přičemž se jednalo zejména o plevele rezistentní k triazinovým herbicidům (např. rdesno blešník, laskavec ohnutý, merlík bílý aj.) (Jursík *et al.*, 2018;

Heap, 2023). Kolářová *et al.* (2023) uvádí, že rezistentní plevelné druhy k inhibitorům fotosystému II, se vyskytují zpravidla v nižších nadmořských výškách, především v řepných polích (např. laskavec ohnutý, merlík bílý, ježatka kuří noha, lilek černý). Naopak rezistentní druhy k inhibitorům ACCasy nebo ALS, nejsou vázány na konkrétní oblast či region. Potvrzený výskyt rezistentních populací k inhibitorům ALS je např. u chundelky metlice či sveřepu jalového. Nově byl také popsán výskyt rezistentní populace heřmánkovce nevonného (Heap, 2023, Šuk *et al.*, 2023).



Obrázek č. 5: Globální nárůst rezistentních plevelů k herbicidům s různým MoA v průběhu let (upraveno dle Heap, 2023).

3.7 Mechanismus rezistence

Herbicidní rezistence je evolučním procesem, který je ovlivňován mnoha faktory. Zásadní je **genetická podstata** rezistence, což zahrnuje počet rezistentních genů, jejich frekvenci, dominanci, dědičnost a fitness rostliny ve vztahu k výskytu rezistentních genů. Podstatná je ale i **biologie plevelného druhu** např. výskyt autogamie versus alogamie, množství produkovaných semen, životnost semen v semenné bance, dormanci a schopnost rozšiřování semen. Velkou roli hraje rovněž typ použitého **herbicidu**, jeho MoA, koncentrace, a také způsob a termín jeho aplikace (Powles a Yu, 2010; Vencill *et al.*, 2012). Vzhledem ke zmíněným aspektům je rezistence nejčastěji autory rozdělována na target-site rezistenci (změna místa působení herbicidu v rostlině) a non-target-site rezistenci (metabolicky založená rezistence) (Powles a Yu, 2010).

3.7.1 Target-site rezistence (TSR)

Tento typ rezistence je zpravidla způsoben mutací genu, což vede k záměně aminokyselin v primární struktuře cílového enzymu, kam se herbicid není schopen posláze navázat (Powles a Yu, 2010; Délye *et al.*, 2013). TSR však může být způsobena i zvýšenou expresí genu, kdy dochází k nadprodukci cílového

enzymu, přičemž herbicid není schopen takovouto nadprodukcí enzymu účinně inhibovat. Zvýšená genová exprese může plynout z regulačních změn ovlivňujících rychlejší transkripci, ale také z možné existence více kopií genu, které kódují cílový enzym, což se opět odráží na zvýšené transkripci (Powles a Yu, 2010; Gaines *et al.*, 2020).

V případě TSR se často jedná o bodové mutace, kdy dochází k záměně pouze jednoho nukleotidu v tripletu. Tato substituce však nemusí automaticky znamenat rezistenci, jelikož může dojít k tzv. tiché mutaci, při níž se nemění aminokyselina zařazovaná do proteinového řetězce. Mimo bodové mutace může být rezistence způsobena i delecí celého tripletu (Gaines *et al.*, 2020). Target-site rezistence byla potvrzena již u mnoha druhů plevelů, přičemž se jedná o inhibitory devíti cílových míst působení herbicidů. Konkrétně se jedná o skupiny inhibitorů syntézy porfyrinů (PPO), ALS, ACCasy, fotosystému II (D1 protein), EPSPS (5-enolpyruvylšikimát-3fosfát syntáza), fytoendesaturázy (PDS), glutamin syntetázy (GS), inhibitorům stavby mikrotubulů a syntetickým auxinům (Murphy a Tranel, 2019). Nejvíce zkoumanými skupinami jsou stále inhibitory ACCasy, ALS a fotosystému II (Délye *et al.*, 2013; Bo *et al.*, 2017). TSR je založena monogenně, tedy na jednom jaderném genu, jehož alely jsou zpravidla dominantní. Aktuální výzkumy nicméně potvrzují, že dědičnost rezistence může být založena úplnou dominancí alel, neúplnou dominancí a v některých případech i recesivně (Délye *et al.*, 2013; Mithila a Godar, 2013). Je-li rezistence u cizosprašných druhů podmíněna recesivními alelami, trvá delší dobu, než se rezistence v populaci plevelů projeví. Pokud je však podmíněna alelami dominantními, je šíření rezistence mnohem rychlejší (Mithila a Godar, 2013). Jelikož je TSR založena kvalitativně, nelze plevele eliminovat ani při zvýšení dávky nebo častější aplikaci herbicidu (Jursík *et al.*, 2018). V případě herbicidů inhibujících fotosystém I a II je rezistence kódována nejadernou DNA, která se nachází v chloroplastech mateřské rostliny. To znamená, že se gen rezistence nepřenáší pylem, ale rezistentní mateřská rostlina produkuje vždy rezistentní jedince (Mithila a Godar, 2013; Jursík *et al.*, 2018).

3.7.2 Non-target-site rezistence (NTSR)

NTSR je považována za poměrně problematický a komplexní mechanismus, na němž se podílí velké množství reakcí a o jeho genetickém základu není příliš mnoho známo (Délye, 2012). NTSR může být způsobena sníženým příjmem herbicidu, jeho pomalou translokací v rostlině, ale také schopností metabolizovat herbicid z toxické formy na netoxickou či méně toxickou (Powles a Yu, 2010, Bo *et al.*, 2017). Ačkoliv jsou informace o NTSR stále poměrně omezené, je potvrzeno, že právě tento typ rezistence může způsobit odolnost u mnoha trávovitých plevelů, u kterých není prokázána TSR. Podílí se také na rezistenci proti třem hlavním skupinám herbicidů (inhibitorům ACCasy, ALS a glyfosátu). Nejnegativnějším důsledkem non-target-rezistence je s ní související tvorba křížové rezistence (cross-rezistence), ale také nepředvídatelnost jejího vzniku a nemožnost NTSR diagnostikovat již před aplikací herbicidu (Délye, 2012; Lan *et al.*, 2022). Snížený příjem herbicidu rostlinami není považován za nejobvyklejší mechanismus NTSR, ačkoliv byl u některých rostlinných druhů prokázán. Nedostačující (zpomalená) translokace herbicidu v rostlině je způsobena ve chvíli, kdy foliárně

aplikované herbicidy zůstávají ve zdrojových listech a nejsou transportovány do floému, skrz který by se dostaly do meristémových buněk. Také mohou být herbicidy uloženy do míst, odkud je jejich účinnost vyloučena např. do vakuol (Kaundun, 2014; Gaines *et al.*, 2020). Stěžejním procesem v případě NTSR je detoxikace herbicidu na méně toxické formy pomocí zrychleného metabolismu rostliny. Proces detoxikace lze shrnout do tří kroků, zahrnující souhrn několika typů enzymů (Délye, 2012). V rámci NTSR a detoxikace se považují za významné cytochrom P450 monooxygenázy, které se v první fázi podílí na oxidaci, redukci nebo hydrolyze herbicidů (Yuan *et al.*, 2006; Powles a Yu, 2010). Cytochrom P450 monooxygenázy jsou membránové proteiny lokalizované v endoplasmatickém retikulu, podílejí se na biosyntéze mnoha esenciálních molekul jako jsou rostlinné hormony, steroly nebo sekundární metabolity (Powles a Yu, 2010; Gaines *et al.*, 2020). Rezistence podmíněná činností cytochrom P450 monooxygenáz je zásadním problémem v rámci NTSR, jelikož jsou tyto enzymy schopny metabolizovat širokou škálu herbicidů s různými mechanismy účinku (Bo *et al.*, 2017). V druhé fázi detoxikačního procesu je zapojen enzym glutathion-S-transferáza (GST), katalyzující konjugaci glutathionu s různými substráty např. molekulou herbicidu, čímž je tato molekula převedena na netoxickou formu (Yuan *et al.*, 2006; Gaines *et al.*, 2020). Ve třetím kroku dochází k transportu konjugovaných sloučenin do vakuol či mezibuněčných prostor, na čemž se podílejí ve velké míře ABC přenašeče. Následující fáze detoxikace zahrnují již čistě procesy odbourávání molekul (Yuan *et al.*, 2006; Powles a Yu, 2010, Bo *et al.*, 2017).

3.7.3 Rezistence křížová (cross-rezistence) a mnohonásobná (multiple rezistence)

Další dva typy obrany proti herbicidům, které si může rostlina vyvinout, je křížová a mnohonásobná rezistence. Oba tyto typy rezistence jsou považovány za velký problém v rámci regulace plevelných rostlin (Powles a Yu, 2010; Délye *et al.*, 2013).

Křížová rezistence: Jedná se o rezistenci, kdy dochází k vytvoření odolnosti k více skupinám herbicidů. Tento typ rezistence je podmíněn jedním genem a jediným mechanismem (Délye *et al.*, 2013). Cross-rezistence může být způsobena jak změnou místa působení herbicidu v rostlině (target-site mechanismus), tak také na základě zrychlených metabolických procesů nebo nedostačující translokací herbicidu v rostlině (non-target-site mechanismus). V případě target-site cross-rezistence dochází k vytvoření odolnosti v rámci jednoho či více skupin herbicidů se shodným MoA. Naopak non-target site křížová rezistence je komplikovanější, jelikož mohou být rostliny odolné i vůči herbicidům s různým MoA (Beckie a Tardif, 2012; Jursík *et al.*, 2018).

Mnohonásobná rezistence: Tato rezistence je považována za nejvíce závažný problém. Narozdíl od cross-rezistence je totiž mnohonásobná rezistence podmíněna více mechanismy (obvykle více než dvěma), což pak vede k odolnosti vůči celým třídám herbicidů (Beckie a Tardif, 2012). Mnoho různých mechanismů rezistence (target-site i non-target-site) se pak může akumulovat v rámci jedinců až celých populací plevelů, které pak není možno chemicky eliminovat (Powles a Yu, 2010). Typickým příkladem plevele s mnohonásobnou rezistencí je jílek tuhý (rozšířen téměř po celé Austrálii), ale také psárka polní (zejména v západní Evropě) nebo různé druhy rodu laskavec (Powles a Yu, 2010; Beckie

a Tardif, 2012). V České republice se mnohonásobná rezistence prokázala u chundelky metlice a bytlu metlatého (Heap, 2023).

3.7.4 Rezistence k inhibitorům ACCasy

Inhibitory ACCasy jsou uživatelsky široce rozšířenými herbicidy, uplatňujícími se především v postemergentní regulaci trávovitých plevelů (Délye, 2005; Takano *et al.*, 2021). Jako první byla rezistence k inhibitorům ACCasy popsána u druhu *Lolium rigidum* v roce 1982. A od té doby byla potvrzena u dalších 50 druhů trávovitých plevelů na celém světě (viz Obrázek č. 5), přičemž zvláště problematická je u rodů *Alopecurus*, *Lolium* a *Avena* (Kaundun, 2014; Lan *et al.*, 2022). V Evropě je prozatím potvrzeno 15 rezistentních druhů trávovitých plevelů: *Alopecurus myosuroides*, *Apera spica-venti*, *Avena fatua*, *Avena sterilis*, *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana*, *Bromus sterilis*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*, *Lolium perenne*, *Lolium perenne* ssp. *multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Phalaris brachystachys*, *Phalaris paradoxa*, *Sorghum halapense* a *Zea mays* ssp. *mexicana*. V České republice není situace ohledně rezistence k inhibitorům ACCasy příliš zmapována, a proto zatím nejsou uvedeny v databázi žádné záznamy, které by tento typ rezistence potvrzovaly. Výzkum v ČR se zaměřuje především na rezistenci plevelů k inhibitorům ALS nebo fotosystému II (Heap, 2023). Target-site rezistence je i v tomto případě nejčastěji spjata s mutacemi genu, což se projevuje na změně primární struktury enzymu, na který jsou inhibitory ACCasy zacíleny (Délye, 2005; Takano *et al.*, 2021). U jednoděložných plevelů se vyskytuje homomerní plastidová izoforma ACCasy (viz Kapitola 3.5.2), která je cílem působení tří skupin herbicidů (fopy, dimy, deny) (Powles a Yu, 2010). Většina dvouděložných plevelů obsahuje naopak heteromerní plastidovou izoformu ACCasy, z čehož vyplývá, že jsou k herbicidům rostliny často tolerantní. Výjimku tvoří pouze některé druhy rostlin z čeledi *Geraniaceae* a pouze málo druhů rostlin z rodu *Brassica* a *Arabidopsis*, které rovněž exprimují ve svých chloroplastech homomerní izoformu ACCasy (Powles a Yu, 2010; Takano *et al.*, 2021). V případě TSR bylo detekováno osm zásadních bodových mutací, které přímo souvisejí s rezistencí: Ile-1781-Leu, Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn, Ile-2041-Val, Asp-2078-Gly, Cys-2088-Arg, Gly-2096-Ala) (Kaundun, 2014; Murphy a Tranel, 2019; Gaines *et al.*, 2020). U některých plevelů je navíc již prokázána i target-site cross-rezistence k různým skupinám herbicidů. Chen *et al.* (2017) potvrdili křížovou rezistenci u *Alopecurus japonicus* ke třem testovaným herbicidům, každému z jiné chemické skupiny. Křížová rezistence byla v tomto případě podmíněna mutacemi na pozici Ile-1781-Leu, Ile-2041-Asn, Asp-2078-Gly. Podobné výsledky byly publikovány již dříve autory Yu *et al.* (2007a), kteří prokázali cross-rezistenci u *Lolium rigidum* proti několika druhům herbicidů. V tomto případě se vyskytovaly mutace na pozici 2078 a 2088. Úroveň rezistence nicméně nezáleží pouze na detekci známých mutací, ale zásadním faktorem je i frekvence výskytu rezistentních alel, vztah mezi dominancí a recesivitou, růstová fáze rostliny, koncentrace opakovaně používaného herbicidu a termín jeho aplikace (Kaundun, 2014; Takano *et al.*, 2021). Druhým mechanismem, který je také řazen mezi TSR, je zvýšená genová exprese, což vede k nadprodukci cílového enzymu (ACCasy). Herbicid

není schopen inhibovat nadměrné množství enzymu, a proto vypadají rezistentní jedinci vizuálně zdravě a nepoškozeně. V rámci genové exprese hraje roli i počet kopií cílového genu, které se na zvýšené genové expresi přímo podílejí (Iwakami *et al.*, 2012; Takano *et al.*, 2021).

NTSR nabírá několik posledních let na důležitosti, a to zejména proto, že se po celém světě objevují rezistentní rostliny, u nichž nebyla detekována žádná ze známých mutací (Kaundun, 2014; Jugulam a Shyam, 2019). Non-target-site rezistence byla již potvrzena u různých druhů trávovitých plevelů např. u *Echinochloa crus-galli* (Huan *et al.*, 2011), *Alopecurus myosuroides* (Délye *et al.*, 2011), *Lolium multiflorum* (Kaundun, 2010) nebo *Alopecurus japonicus* (Feng *et al.*, 2016). Jedná se však o velice komplexní mechanismus, na němž se podílí značné množství enzymů. NTSR může fungovat i jako přidružená obranná reakce k TSR, a proto není často jednoznačné, který z principů je skutečným původcem rezistence (Jugulam a Shyam, 2019; Takano *et al.*, 2021; Gaines *et al.*, 2020).

3.8 Ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.)

Rod *Echinochloa* zahrnuje velké množství druhů rozšířených po celém světě, z nichž značná část je považována za plevelné rostliny. Nejzávažnější škody působící druhy ježatek jsou *Echinochloa colona*, *E. oryzicola*, *E. oryzoides*, *E. muricata*, *E. phyllopogon* a *Echinochloa crus-galli* (Bajwa *et al.*, 2015). Ježatka kuří noha je popisována jako jeden z nejproblematičtějších plevelů současné doby, konkrétně je označována za třetí neškodlivější plevel světa (Štrobach a Mikulka, 2020; Royo-Esnal *et al.*, 2022). Taxonomie ježatky kuří nohy je uvedena v Tabulce č. 1 (Rojas-Sandoval a Acevedo-Rodríguez, 2014).

Tabulka č. 1: Taxonomie ježatky kuří nohy

Říše	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	Cévnaté (<i>Tracheophyta</i>)
Oddělení	Krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	Jednoděložné (<i>Liliopsida</i>)
Řád	Lipnicotvaré (<i>Poales</i>)
Čeleď	Lipnicovité (<i>Poaceae</i>)
Rod	Ježatka (<i>Echinochloa</i>)
Druh	Ježatka kuří noha (<i>Echinochloa crus-galli</i>)

3.8.1 Biologie a ekologie ježatky kuří nohy

Ježatka kuří noha je jednoletý, pozdně jarní plevel. Preferuje vlhčí humózní půdy s vysokým obsahem živin, avšak je to rostlina velice adaptibilní, a proto ji dnes můžeme nalézt i na suchých stanovištích chudých na živiny. Navíc snáší dobře zaplavování, což vede k jejímu rozšiřování hlavně v rýžových polích (Bajwa *et al.*, 2015; Jursík *et al.*, 2018; Štrobach a Mikulka, 2020). Místa jejího výskytu jsou variabilní. Mimo zaplevelování polí s pěstovanými plodinami, bychom ji mohli najít na úhorech, skládkách a rumištích, podél cest, železnic, v příkopech, březích vodních toků či hnojističích (Martinková

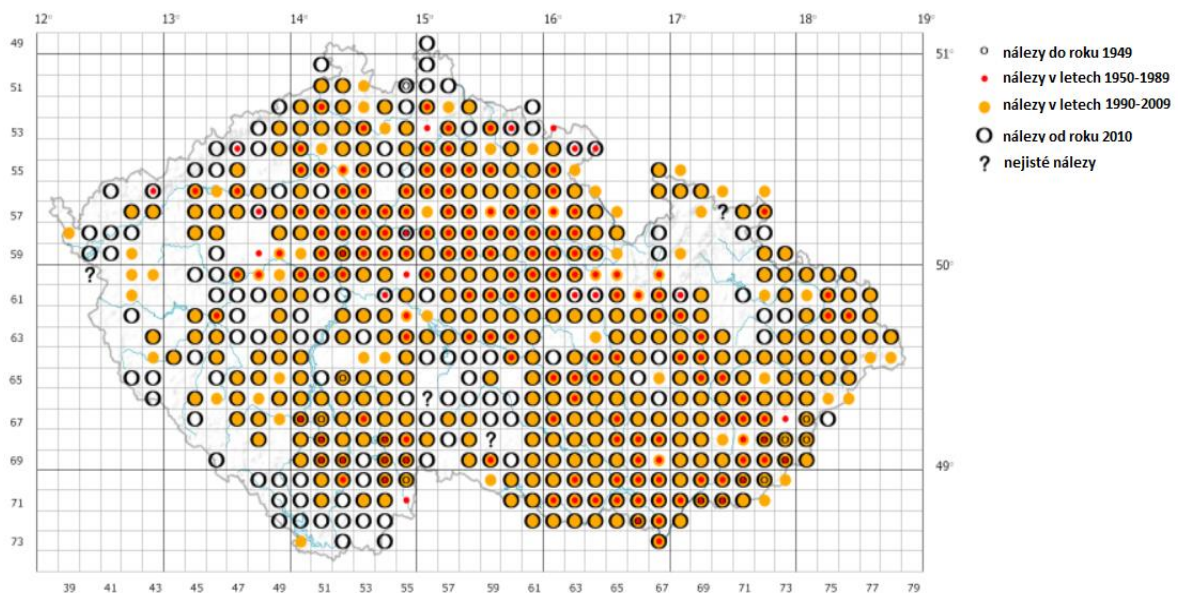
et al., 2021; Štrobach a Mikulka, 2021). Ačkoliv je to druh teplomilný, jemuž vyhovují spíše nížinné oblasti, jeho přizpůsobivost mu umožňuje rozšíření i do chladnějších oblastí či vyšších nadmořských výšek. Příkladem může být její potvrzený výskyt v Norsku (Bajwa *et al.*, 2015; Royo-Esnaol *et al.*, 2022). V ideálních podmínkách tvoří ježatka kuří noha statné rostliny, které snadno konkurují pěstovaným plodinám. Je to plevel značně agresivní, což plyne právě z její schopnosti se adaptovat na různé podmínky. V České republice zapleveluje zejména okopaniny (brambory), kukuřici a zeleninu. V porostech obilnin znesnadňuje jejich sklizeň, jelikož je dlouho vegetačně aktivní (Martinková *et al.*, 2021; Štrobach a Mikulka, 2020). Její rozšíření je ovlivňováno také používáním statkových hnojiv (kejdy), kdy dojde ke sklizení obilnin určených k siláži společně s obilkami ježatky. Sklizené obilky přežívají silážní procesy i následné trávicí procesy při zkrmování skotu, dokonce jsou schopny si udržet klíčivost i při uskladňování kejdy, která je následně využita jako organické hnojivo (Štrobach a Mikulka, 2020; Štrobach a Mikulka, 2021).

Rostlina je nejčastěji zbarvena šedozeleně, běžně i do fialova. Její výška se dle Mikulky *et al.* (2015) pohybuje mezi 30–100 cm, Jursík *et al.* (2018) uvádí, že může dorůst až 1,5 metru. Je to tráva rostoucí zpočátku poléhavě, později vystoupavě, která tvoří 4–20 odnoží. Její kořenový systém je mohutný, kořeny jsou bohatě svazčité. Stébla jsou lysá, na kolénkách řídce chlupatá. Mladé listy jsou nejprve svinuté a hladké, starší listy jsou pak lysé, s okraji drsnými a na líci je ve středu listu viditelná bílá žilka. Jazyček ani ouška nejsou přítomna. Jazyček nahrazují bílé chloupky rostoucí v řadě (Bajwa *et al.*, 2015; Mikulka *et al.*, 2015; Štrobach a Mikulka, 2020). Několik lichoklasů vytváří lavy (květenství), které jsou přímé nebo převislé. Jednokvěté klásky jsou zbarveny do hnědo-fialova nebo žluto-zelena a mají tři různě dlouhé štětinaté plevy, kdy jedna z nich vybíhá v osinu (Mikulka *et al.*, 2015; Jursík *et al.*, 2018).

Metabolismus ježatky kuří nohy odpovídá C4 rostlinám. Je tedy přizpůsobena i kratší fotoperiodě (9–13 hodin), což jí poskytuje reprodukční výhodu nad některými tuzemskými rostlinami (Bajwa *et al.*, 2015; Royo-Esnaol *et al.*, 2022). Je to hexaploidní druh ($2n = 54$), rozmnožující se pouze generativně. V závislosti na stanovišti, je jedna rostlina schopna vyprodukovat několik desítek až několik tisíc obilek, které pak na rostlině dozrávají, nikoliv však všechny současně (Bajwa *et al.*, 2015; Jursík *et al.*, 2018). Obilky z rostliny snadno vypadávají do okolí mateřské rostliny, čímž se dostanou do půdní semenné banky. Pro jejich úspěšné vzházení je nutná hloubka maximálně 12–16 cm, přičemž jsou schopny klíčit při vyšších teplotách (ideálně 25–27 °C). V našich podmínkách běžně klíčí při teplotě 10–15 °C (Mikulka *et al.*, 2015; Štrobach a Mikulka, 2020). Problematickým jevem u ježatky kuří nohy je, že její obilky jsou schopny upadat do dormance na různě dlouhou dobu (v extrémních případech až několik desítek let). V běžných podmínkách si zachovávají klíčivost 8–10 let (Mikulka *et al.*, 2015; Martinková *et al.*, 2021).

3.8.2 Původ a současné rozšíření ježatky kuří nohy

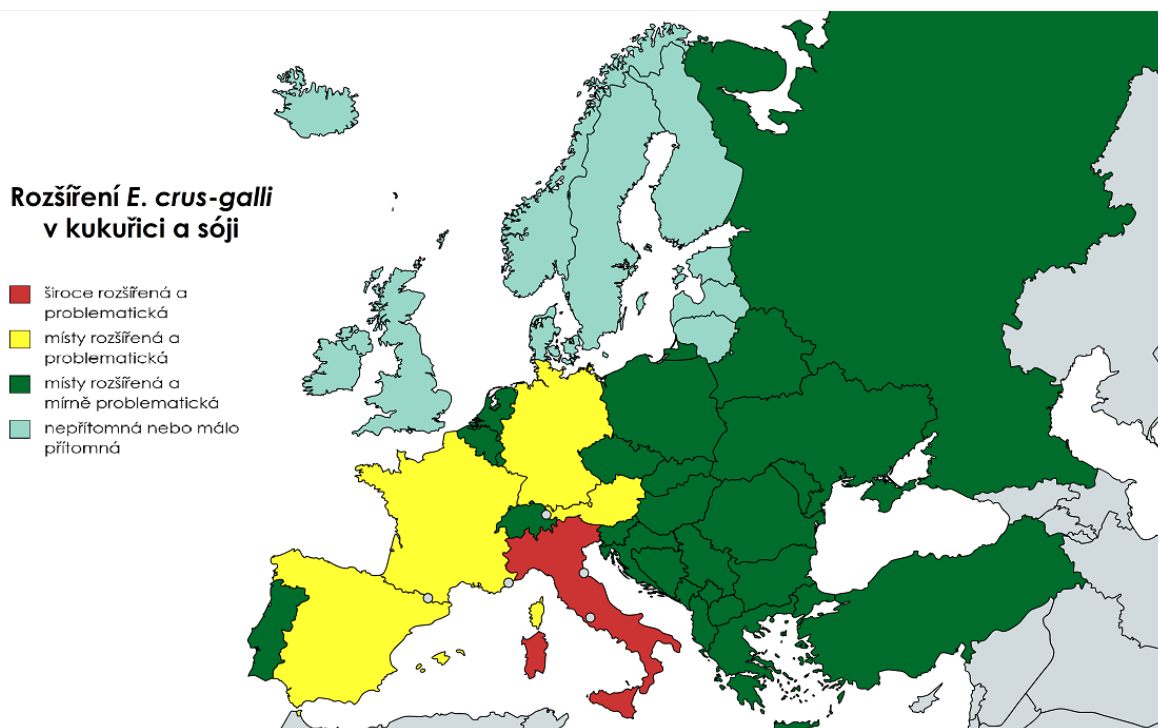
Původní areál rozšíření ježatky kuří nohy je nejasný. Zatímco někteří autoři předpokládají místo jejího původu v Evropě, jiní autoři tvrdí, že pochází z tropických oblastí východní a střední Asie (Rojas-Sandoval a Acevedo-Rodríguez, 2014; Bajwa *et al.*, 2015). Stejně jako není známo místo jejího původu, je složité určit i dobu, ve které se začala rozšiřovat. Předpokládá se však, že do Severní Ameriky byla zavlečena v 1. polovině 19. století z Evropy (Rojas-Sandoval a Acevedo-Rodríguez, 2014). V současné době je *E. crus-galli* rozšířena od regionů zahrnujících severní Evropu, až do subtropů a tropů, a to kosmopolitně mezi 50 ° severní šířky a 40 ° jižní šířky. Zasahuje do oblastí Asie, Evropy, Ameriky, Austrálie, avšak v Africe je její výskyt prozatím vzácný (Rojas-Sandoval a Acevedo-Rodríguez, 2014; Martinková *et al.*, 2021). Pokorná *et al.* (2018) ve své studii popisují, že se ježatka kuří noha na našem území vyskytovala již v raném až pozdním neolitu, tj. 5600–4200 let před naším letopočtem. Tento druh rostl zejména na často narušovaných půdách, bohatých na živiny. Mimo ježatku kuří nohu se v té době na území České republiky vyskytovala i rosička lysá nebo bér zelený, které mají stejný typ metabolismu. V dnešní době je ježatka kuří noha i rosička lysá invazním plevelem, rozšířeným téměř po celé České republice (viz Obrázek č. 6). K nejvýznamnějšímu šíření ježatky kuří nohy došlo na našem území v 60. letech minulého století v souvislosti s monokulturním pěstováním kukuřice a používáním triazinových herbicidů (Štrobach a Mikulka, 2020).



Obrázek č. 6: Rozšíření ježatky kuří nohy v České republice od roku 1949 až do současnosti (upraveno dle AOPK, 2023).

3.8.3 Rezistence ježatky kuří nohy

Ačkoliv je ježatka kuří noha plevelný druh, který se primárně vyskytuje v rýžových polích, první případ rezistentní populace byl detekován již v roce 1981 v poli kukuřičném na území Kanady, přičemž byla potvrzena rezistence k atrazinu (inhibitor fotosystému II) (Heap, 2023). Další dva případy z roku 1982 a 1986 pak pocházejí z Evropských zemích (Francie a Řecko). V obou případech byla opět potvrzena rezistence proti inhibitorům fotosystému II, kdy byly rezistentní populace diagnostikovány v poli kukuřičném (Francie) a poli rýžovém (Řecko). V 90. letech 20. století případů rezistence přibývalo po celém světě. Jednalo se zejména o rezistenci k inhibitorům fotosystému II, ale také syntetickým auxinům nebo inhibitorům biosyntézy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem. Většina případů byla nalezena v rýžových polích, případně kukuřici (Heap, 2023; Damalas a Koutroubas, 2023). Velký rozmach výskytu rezistentních populací ježatky nastal od roku 2000 a pokračuje až do současnosti. Nejvíce přibývá rezistentních populací k inhibitorům ALS a ACCasy, ale objevují se i případy rezistence k syntetickým auxinům, EPSPS a fotosystému II, a to v rámci Evropy i jiných kontinentů (Heap, 2023; Damalas a Koutroubas, 2023). Současné rozšíření *E. crus-galli* zaplevelující kukuřici a sóju v Evropě je zobrazeno na Obrázku č. 7. V České republice byla diagnostikována rezistentní populace ježatky kuří nohy v roce 1994 v kukuřičném poli, a to proti inhibitorům fotosystému II (atrazinu) (Heap, 2023). Přírůstek rezistentních jedinců *Echinochloa crus-galli* k inhibitorům ACCasy není v porovnání s jinými skupinami herbicidů prozatím tolik rapidní. Předpokládá se však, že odolných populací tohoto druhu bude přibývat, jelikož celkově narůstá počet rezistentů v rámci jiných trávovitých plevelů z čeledi lipnicovitých (Shaner, 2014; Heap, 2023).



Obrázek č. 7: Stav rozšíření *E. crus-galli* v polích kukuřice a sóji v Evropě (upraveno dle HRAC, 2021).

4. Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

- Obilky ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.) pocházejících ze tří polních lokalit Olomouckého kraje

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Chemikálie

- Agaróza SERVA (Serva, Německo)
- Deoxynucleotide Mix (Roche, Švýcarsko)
- DNase/RNase free voda
- GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Biotium, USA)
- GoTaq® G2 DNA Polymerase (PROMEGA, USA)
- HyperLadder 50bp (MeridianBIOSCIENCE®, USA)
- PCR Nucleotide Mix (Roche, Švýcarsko)
- Primery (Generi Biotech, Česká republika)
- Propaquizafop (Sigma-Aldrich, USA)
- RNA loading Dye (2X) (New England BioLabs® Inc., USA)
- 5x Colorless GoTaq Reaction Buffer (PROMEGA, USA)
- 5x DNA loading Dye (MeridianBIOSCIENCE®, USA)
- 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

Soupravy

- DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich, USA)
- GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, USA)
- SensiFAST cDNA Synthesis Kit (MeridianBIOSCIENCE®, USA)
- SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (MeridianBIOSCIENCE®, USA)
- Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA)

Roztoky a jejich příprava

- **0,5M EDTA (pH 8):** V 800 ml dH₂O rozmíchat 186,1 g N₂EDTA·2H₂O, upravit pH na hodnotu 8,0 přidáním NaOH (18–20 g), doplnit do 1000 ml destilovanou vodou, sterilizovat filtrací.
- **10x TBE pufr:** 108 g Tris báze, 55 g kyseliny borité rozpustit v 800 ml dH₂O, následně přidat 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8) a doplnit do 1000 ml dH₂O, sterilizovat filtrací.
- **0,5x TBE pufr:** 250 ml 10x TBE pufru doplnit do 5000 ml dH₂O.

4.3 Použitá zařízení a přístroje

- Analytická váha HR-120-EC (A&D Instruments, Nový Zéland)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5415 D (Eppendorf, Německo)
- Digestor (MERCIO®, Česká republika)
- Digitální předvážky (KERN, Německo)
- Dokumentační systém (UVITEC Cambridge, Velká Británie)
- Elektroforetický systém Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetický systém Owl™ EasyCast™ B1 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Mikrocentrifuga Micro Star 17 R (VWR, USA)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR, USA)
- Mikrovlnná trouba ETA 3020 (ETA, Česká republika)
- Real-Time PCR detekční systém CFX Connect™ (Bio-Rad, USA)
- Spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Stripy (Bio-Rad, USA)
- Termoblok Mixing block MB-102 (Bioer, Čína)
- Termocyklér Vapo.Protect Mastercycler® Pro (Eppendorf, Německo)
- UV transiluminátor UVT-20 M (Herolab, Německo)
- Zdroj stejnosměrného napětí EPS-601 (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- Zdroj stejnosměrného napětí Minis 300 VP (Major Science, Taiwan)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

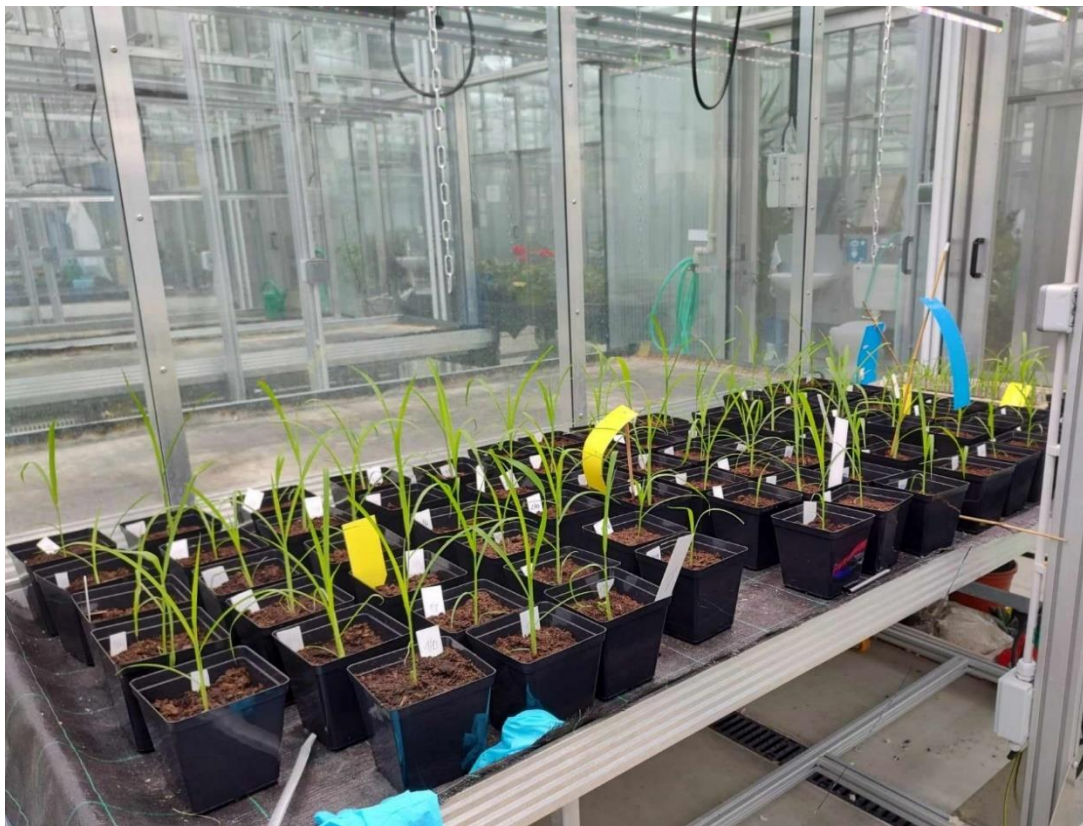
4.4.1 Pěstování experimentálních rostlin

Jako experimentální rostlinný materiál v praktické části této diplomové práce byly použity obilky ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), které byly sbírány v roce 2021 na třech lokalitách Olomouckého kraje. V případě lokalit Olomouc 1 a Olomouc 2 se jednalo o pole s kukuřicí, kde dochází k opakovaným herbicidním zásahům v regulaci plevelů. Lokalita Loučná nad Desnou měla charakter menšího polička s bramborami, na němž není chemická regulace využívána (viz Tab. č. 2).

Tabulka č. 2: Lokality a souřadnice sběru obilek *Echinochloa crus-galli*

Lokalita	GPS	Plodina
Olomouc 1	49°32'43.514"N, 17°16'47.928"E	Kukuřice
Olomouc 2	49°33'49.762"N, 17°16'3.356"E	Kukuřice
Loučná nad Desnou	50°4'0.137"N, 17°5'34.628"E	Brambory

Ve skleníkových podmínkách byly obilky vysety na Petriho misky vystlanými buničitou vatou a pěti vrstvami filtračního papíru zvlhčeného destilovanou vodou. Každé Petriho misce byla přidělena jedna z lokalit, kam se vyselo přibližně 50 obilek, které se nechaly klíčit po dobu přibližně jednoho týdne při skleníkových podmínkách. Některé dostatečně naklíčené obilky byly přesazeny do plastových sadbovačů s hlinitým substrátem a byly zde pěstovány až do fáze 2 listů. Následně bylo připraveno celkem 74 plastových kontejnerů, které byly naplněny hlinitým substrátem (shodným jako v předešlé fázi pěstování). Do těchto kontejnerů pak byly rostliny přesazeny. Dohromady bylo vybráno 23 rostlin z lokality 1., 27 rostlin z lokality 2. a 24 rostlin z lokality 3. Rostliny byly vybírány na základě vizuálního posouzení. Například byly vyloučeny takové, které uvadaly nebo byly poškozeny jiným způsobem. V rámci pěstovaných rostlin z každé lokality, bylo určeno vždy 5 rostlin, na které nebyl později aplikován herbicid a sloužily tak jako rostliny kontrolní. Celkem tedy bylo z celkového počtu 74 rostlin, určeno 15 kontrolních rostlin (5 z každé lokality). K jednotlivým plastovým kontejnerům s rostlinami byl přiřazen štítek, který byl označen číslem rostliny a číslem lokality např. rostlina 1/1 (rostlina první, z lokality první). Uspořádání rostlin ve skleníku je zachyceno na Obrázku č. 8. Veškeré rostliny byly po přesazení zality vodou, přičemž byly zalévány dle potřeby každý týden. Po celou dobu byla teplota ve skleníku nastavena na 21 °C přes den a 18 °C v noci. Rostlinám se svítilo v 12/12 intervalu.



Obrázek č. 8: Uspořádání pokusných rostlin ve skleníku. Na fotografii jsou zachyceny rostliny ve fázi 3–4 listů těsně před herbicidním ošetřením. (Foto: Bc. Anna Ryšková, 2022).

Po 35 dnech od vysetí byly rostliny již ve fázi 3–4 listů, což je fáze ideální pro aplikaci postemergentního herbicidu. Nejcitlivější jsou jednoleté trávy právě od fáze 3. listu až do fáze prvního odnožování (BBCH 13–29). Pro účely tohoto experimentu byl vybrán herbicid fungující jako inhibitor acetyl-CoA karboxylázy, konkrétně propaquizafop (Sigma-Aldrich, USA). Na každou rostlinu bylo pomocí skleněné pipety aplikováno vždy 5 ml roztoku herbicidu o koncentraci $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Tak bylo dosaženo literaturou doporučené dávky $100 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$. Aplikace byla zaměřena na střed rostliny a částečně i listy. Po aplikaci se herbicid nechal působit více než 2 týdny. Cílem tohoto kroku skleníkového experimentu bylo zhodnocení účinnosti použitého herbicidu na rostliny ježatky kuří nohy a následné vytipování rezistentních a senzitivních jedinců, kteří byli porovnáváni s kontrolami. Náchylnost a odolnost byla hodnocena kvalitativně způsobem přežil (rezistent) či nepřežil (senzitiv).

4.4.2 Odběr listů *Echinochloa crus-galli* pro následné laboratorní analýzy

Další fází, která byla provedena při skleníkovém pokusu, bylo odebírání listových vzorků pro následnou extrakci RNA. Z každé rostliny byl odebrán vždy přibližně pětcentimetrový kousek listu, který byl vložen do mikrozkuřavky popsané shodným způsobem jako štítky. Jednotlivé vzorky byly umístovány na led, a poté byly uloženy do mrazáku s teplotou $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. První odběr listů probíhal 24 hodin po aplikaci přípravku, další odběry pak 48 hodin po aplikaci, 7 dní po aplikaci, 15 dní po aplikaci a konečný odběr byl učiněn 16 dní po aplikaci herbicidu. V rámci posledního odběrového času byly odebírány vzorky pouze z rostlin kontrolních a rezistentních, jelikož zbývající rostliny byly kompletně poškozeny. Jako poslední krok skleníkového pokusu byly po dvou měsících od založení experimentu odebrány obilky z rostlin rezistentních a kontrolních, které byly uchovány v chladničce.

4.4.3 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí soupravy SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA), přičemž byl dodržen postup stanovený výrobcem. RNA byla izolována z listů, které byly odebrány v pěti různých časech po aplikaci herbicidu (24 h, 48 h, 7 dní, 15 dní a 16 dní). Pro izolaci RNA z listů se využívá protokolu B.

Postup podle výrobce komerčního kitu byl následující:

1. Dle izolovaného počtu vzorků byly do 2 ml mikrozkuřavek vloženy filtrační kolonky a totéž bylo provedeno v případě vazebných kolonek. Veškeré mikrozkuřavky byly řádně popsány.
2. Vzorky byly homogenizovány v třecí misce s tloučkem za použití tekutého dusíku. K cca 100 mg ($\pm 10 \%$) rostlinného homogenátu se přidalo 500 μl předem připraveného Lysis Solution s přídavkem 2-merkptoethanolu (na 1 ml Lysis Solution je potřeba 10 μl 2-ME).
3. Vzorky byly vortexovány minimálně 30 sekund, a poté se nechaly inkubovat 3–5 minut v termobloku při $56 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. Po inkubaci se vzorky centrifugovaly při maximální rychlosti (13 000 rpm) po dobu 3 minut.

5. Vzniklý supernatant byl přepipetován na filtrační kolonku a centrifugován 1 minutu při maximální rychlosti (13 000 rpm).
6. K filtrátu bylo přidáno 250 μ l Binding Solution a směs se lehce promíchala pipetováním.
7. Směs byla přepipetována na vazebnou kolonku a centrifugována po dobu 1 minuty při 13 000 rpm. Přebytečný roztok, který protekl přes kolonku, byl vylit do odpadu.
8. Na vazebnou kolonku bylo pipetováno 500 μ l Wash Solution 1, centrifugováno 1 minutu při 13 000 rpm a přebytečný roztok, který protekl přes kolonku, byl vylit do odpadu.
9. Na vazebnou kolonku bylo pipetováno 500 μ l Wash Solution 2, centrifugováno 30 sekund při 13 000 rpm, přebytečný roztok, který protekl přes kolonku, byl vylit do odpadu. Tento krok se ještě jednou zopakoval.
10. 2 ml mikrozkuřavky s vazebnými kolonkami bylo nutno centrifugovat na sucho po dobu 1 minuty při 13 000 rpm.
11. Vazebné kolonky byly přeneseny z původních 2 ml mikrozkuřavek do nových popsáných 2 ml mikrozkuřavek. Následně bylo pipetováno 50 μ l Elution Solution do středu vazebných kolonek. Mikrozkuřavky se nechaly stát 1 minutu při pokojové teplotě. Poté byly 1 minutu centrifugovány při maximální rychlosti (13 000 rpm).
12. RNA se nacházela v eluátu, který protekl přes kolonku a bylo možno s ní ihned pracovat nebo nechat eluát zamrazit při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pro dlouhodobější uchování) či při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pro krátkodobější zamražení).

Pro kontrolu kvality vyizolované RNA byla využita elektroforetická separace v 1,5% agarózovém gelu s přísávkem interkalačního barviva (GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Biotium, USA), které slouží k navázání na nukleové kyseliny a jejich následné vizualizaci. Před nanášením vzorků byly vždy smíchány 3 μ l RNA a 1 μ l nanášecího pufru s denaturačními vlastnostmi (RNA loading Dye (2X) (New England BioLabs[®] Inc., USA). HyperLadder 50 bp (MeridianBIOSCIENCE[®], USA) s rozsahem 50–2000 bp, sloužil jako standard molekulové hmotnosti. Elektroforetická separace vzorků probíhala v 0,5x TBE pufru při napětí 100 V po dobu 35 minut.

U všech vzorků byla po izolaci rovněž změřena koncentrace RNA na spektrofotometru NanoDrop 2000 a následně byly vzorky uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.4 Ošetření RNA DNázou

Pomocí DNázy bylo nutno ze vzorků odstranit nežádoucí vysokomolekulární DNA, která byla detekována gelovou elektroforézou. V tomto případě byl používán komerční kit DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich, USA), přičemž byl upraven postup doporučován výrobcem (viz Tabulka č. 3). Následná inkubace vzorků při pokojové teplotě probíhala po dobu 5 minut, namísto 15 minut doporučených výrobcem. Po uplynulé době byl ke vzorkům přidán 1 μ l Stop Solution a následovala inkubace vzorků při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut, namísto doporučených 10 minut. Vzorky byly po uplynutí doby inkubace chlazeny na ledu.

Tabulka č. 3: Doporučované a upravené složení reakční směsi pro použití DNázy.

Reagencie	Objemy dle výrobce [μl]	Upravené objemy [μl]
Vzorek RNA	8	9
10x Reaction Buffer	1	1
DNáza I	1	0,5
Stop Solution	1	1

Po ošetření vzorků DNázou následovala opět kontrola kvality RNA pomocí gelové elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu (podmínky byly shodné jako v Kap. 4.4.3). Taktéž byla změřena koncentrace RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 a vzorky byly uloženy do mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.5 Reverzní transkripce

K přepisu RNA do komplementární DNA (cDNA) byl použit komerční kit SensiFAST cDNA Synthesis Kit (MeridianBIOSCIENCE®, USA), s tím, že bylo postupováno dle protokolu výrobce. Podle spektrofotometricky stanovených koncentrací RNA jednotlivých vzorků, bylo nutné vypočíst odebírané objemy tak, aby byl obsah RNA v každé reakční směsi $1\text{ }\mu\text{g}$. Každá reakce byla nadále složena ze $4\text{ }\mu\text{l}$ 5x TransAmp pufru a $1\text{ }\mu\text{l}$ reverzní transkriptázy. K doplnění jednotlivých vzorků na konečný požadovaný objem $20\text{ }\mu\text{l}$, byla použita DNase/RNase free voda. Připravené vzorky byly vloženy do termocykléru, na němž byly nastaveny podmínky pro přepis z RNA do cDNA (viz Tabulka č. 4).

K ověření kvality cDNA byla provedena elektroforetická separace v 1,5% agarózovém gelu (viz Kap. 4.4.3). Následně byly vzorky uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazáku.

Tabulka č. 4: Podmínky pro reverzní transkripci

Fáze	Teplota	Čas [min]
Nasednutí primerů	$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	10
Reverzní transkripce	$42\text{ }^{\circ}\text{C}$	15
Inaktivace RT	$85\text{ }^{\circ}\text{C}$	5
Udržování	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$	∞

4.4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR reakce byla využita pro amplifikaci cDNA za pomoci specifických primerů převzatých z literatury (viz Tabulka č. 5). Použité primery byly nejprve ředěny DNase/RNase free vodou na výslednou koncentraci $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následovala příprava reakčního mixu v celkovém objemu $25\text{ }\mu\text{l}$, jehož konkrétní složení je uvedeno v Tabulce č. 6. Po proběhnutí PCR reakce bylo nutno optimalizovat teplotu nasednutí primerů a ředění cDNA, jelikož po provedení gelové elektroforézy (se stejnými podmínkami jako v Kap. 4.4.3) byly znatelné dimery primerů. cDNA byla ředěna v poměru 1:4 DNase/RNase free vodou. Již optimalizované podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce č. 7. PCR reakce byla

provedena u vzorků určených k následné sekvenaci (14 vzorků rezistentů a 3 vzorky senzitivů), ale také k ověření funkčnosti primerů, s nimiž bylo pracováno v rámci kvantitativní RT-PCR. Primery ACcp1 a ACcp1R byly navrženy tak, aby byl amplifikován úsek zahrnující kodon 1781 související se vznikem TSR. Stejně tak primery ACcp4 a ACcp2R měly amplifikovat úseky zahrnující kodony 1999, 2027, 2041, 2078, 2088 a 2096 rovněž související se vznikem rezistence. Primery QACCcase F a R byly navrženy pro RT-qPCR a β -actin F a R byl použit v RT-qPCR jako referenční gen.

Tabulka č. 5: Primery použité pro PCR a RT-qPCR

Sledovaný gen	Primer	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost produktu	Zdroj	
<i>Acc-1</i>	ACcp1	F: CAACTCTGGTCTIGGATIGGCA	551 bp	Délye a Michel, (2005)	
	ACcp1R	R: GAACATAICTGAGCCACCTIAATATATT			
	ACcp4	F: CAGCITGATTCCCAIGAGCGITC	406 bp		
	ACcp2R	R: CCATGCAITCTTIGAGITCCTCTGA			
	QACCcase	F: CAAGGGAAATGGTTGGGTGG	186 bp		Fang <i>et al.</i> , (2020)
	QACCcase	R: CTCATGGGAATCAAGCTGGC			
<i>Actin</i>	<i>Echinochloa crus-galli</i> β -actin	F: GTGCTGTTCCAGCCATCGTTCAT R: CTCCTTGCTCATAACGGTCAGCAATA	171 bp		

Tabulka č. 6: Přehled složek použitých pro PCR reakci

Reagencie	Objem [μ l]
5x Colorless GoTaq Reaction Buffer (1x 1,5 mmol \cdot l ⁻¹ MgCl ₂) ²	5
Forward primer (10 μ mol \cdot l ⁻¹)	2
Reverse primer (10 μ mol \cdot l ⁻¹)	2
DNase/RNase free voda	12,875
PCR Nucleotide Mix (10 mmol \cdot l ⁻¹)	0,5
Templátová cDNA	2,5
GoTaq® G2 DNA Polymerase (1,25 U/ μ l)	0,125

Tabulka č. 7: Optimalizované podmínky PCR reakce

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	2 min	1
Denaturace	94	15 s	30
Nasednutí primerů	56	15 s	
Elongace	72	30 s	
Finální elongace	72	5 min	1
Udržování	4	∞	-

4.4.7 Purifikace produktů PCR a příprava vzorků na sekvenaci

K přečištění amplifikovaných PCR produktů byl použit komerčně dostupný GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) a byl dodržen postup stanovený výrobcem.

Purifikace probíhala v několika po sobě jdoucích krocích:

1. Do 2 ml mikrozkušavky byla vložena GenElute vazebná kolonka a do jejího středu bylo pipetováno 500 µl Column Preparation Solution. Následovala centrifugace při 13 000 rpm po dobu 30 sekund. Eluát byl po centrifugaci odstraněn.
2. Do mikrozkušavky s obsahem 25 µl PCR produktu bylo pipetováno 125 µl Binding Solution (pětinásobek objemu PCR produktu) a oba roztoky byly lehce promíchány pipetou. Následně byl obsah mikrozkušavky přenesen na vazebnou kolonku a byl centrifugován při maximální rychlosti (13 000 rpm) 1 minutu. Eluát byl odstraněn.
3. Na vazebnou kolonku bylo napipetováno 500 µl Wash Solution s následnou centrifugací při 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Eluát byl opět odstraněn a vazebná kolonka byla vložena zpět do mikrozkušavky.
4. Mikrozkušavka s vazebnou kolonkou byla centrifugována při 13 000 rpm po dobu 2 minut na sucho, bez přídavku Wash Solution, aby došlo k odstranění přebytečného ethanolu. Eluát i s mikrozkušavkou byl odstraněn.
5. Kolonka byla přenesena do nové 2 ml mikrozkušavky a do středu kolonky bylo pipetováno 50 µl Elution Solution, přičemž následovala inkubace při pokojové teplotě 1 minutu. Po uplynutí doby inkubace byla mikrozkušavka centrifugována 1 minutu při maximální rychlosti. Přečištěný PCR amplifikační produkt se nacházel v eluátu, který mohl být zmražen při -20 °C nebo se s ním mohlo pracovat dále ihned.

Koncentrace purifikovaných vzorků byla změřena na spektrofotometru Nanodrop2000. Jednotlivé přečištěné vzorky byly pipetovány do 96 jamkových PCR desek, a to v poměru 5 µl purifikovaného PCR produktu a 5 µl reverse primeru. Nachystané PCR desky byly odeslány na

sekvenaci, kterou poskytla firma MacroGen (Amsterdam, Nizozemsko). Výsledné sekvence byly zpracovávány v programu Geneious Prime 2023.1.2.

4.4.8 Kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR)

Genová exprese *Acc-1* genů byla analyzována pomocí metody RT-qPCR, přičemž byl použit komerční kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Meridian_{BIOSCIENCE}). Pro relativní kvantifikaci byl autory Fang *et al.* (2020) navržen jeden pár primerů na základě vysoce konzervovaných oblastí genů *Acc-1* (viz Tabulka č. 5). Reakční směs byla připravována dle protokolu výrobce (viz Tabulka č. 8). Na jeden vzorek vyžadovala reakce smíchání 4,4 µl DNase/RNase free vody a 10 µl 2x SensiFAST SYBR® No-ROX mixu. Vzniklý roztok byl vortexován a centrifugován na stolní centrifuze. Premix byl posléze napipetován ve stejném objemu do dvou zkumavek, kam se přidalo 0,8 µl forward primeru (10 µmol·l⁻¹) a 0,8 µl reverse primeru (10 µmol·l⁻¹). Jako referenční gen, jehož míra exprese byla využita jako standard, byl vybrán *Echinochloa crus-galli* β-actin (Fang *et al.*, 2020) a jako negativní kontrola DNase/RNase free voda.

Tabulka č. 8: Složení reakčního mixu

Reagencie	Objem [µl]
2x SensiFAST SYBR® No-ROX mix	10
Forward primer (10 µmol·l ⁻¹)	0,8
Reverse primer (10 µmol·l ⁻¹)	0,8
DNase/RNase free voda	4,4
Templátová cDNA	4

Následně byla nachystána PCR destička, do jejíchž jamek byly vloženy stripky. Do každé jamky bylo pipetováno 16 µl premixu a 4 µl cDNA vzorků. Do jamky s negativní kontrolou bylo pipetováno 16 µl premixu a 4 µl DNase/RNase free vody. Vzorky bylo nutno před zahájením reakce řádně centrifugovat na stolní centrifuze, a poté byly vloženy do Real-Time PCR cykléru. Jednotlivé analyzované vzorky byly připraveny vždy v duplikátu a měření probíhalo ve 2 technických opakováních. Podmínky, při kterých reakce probíhala, jsou uvedeny níže v Tab. č. 9. Relativní genová exprese byla měřena ve třech odběrových časech (24 hodin po aplikaci, 6 dní po aplikaci a 15 dní po aplikaci herbicidu). Druhý a poslední odběrový čas byl z důvodu nekvalitně vyizolované RNA nebo malého počtu vzorků vyřazen.

Tabulka č. 9: Reakční podmínky RT-qPCR

Fáze	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	5 s	39
Nasednutí primerů	56	10 s	
Elongace	72	20 s	
Analýza teploty tání	65 → 95 (0,5 °C·s ⁻¹)	35 s	1

Jelikož se v rámci RT-qPCR používalo interkalační barvivo SyberGreen, bylo nutno ověřit, zda nevznikají nespecifické produkty nebo dimery primerů. K tomuto zjištění sloužila analýza křivky tání tzv. melting curve. Po skončení RT-qPCR byly zaznamenány primární hodnoty Ct (Cycle of threshold, cyklus prahu) v programu CFX Manager 3.0 a k následné analýze změn genové exprese byla zvolena metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak a Schmittgen, 2001). V rámci této metody byla srovnána relativní změna genové exprese ve vzorcích rezistentních a senzitivních rostlin (herbicidně ošetřených) vůči kontrolním rostlinám (bez aplikace herbicidu).

Vzorce použité pro výpočet relativní kvantifikace:

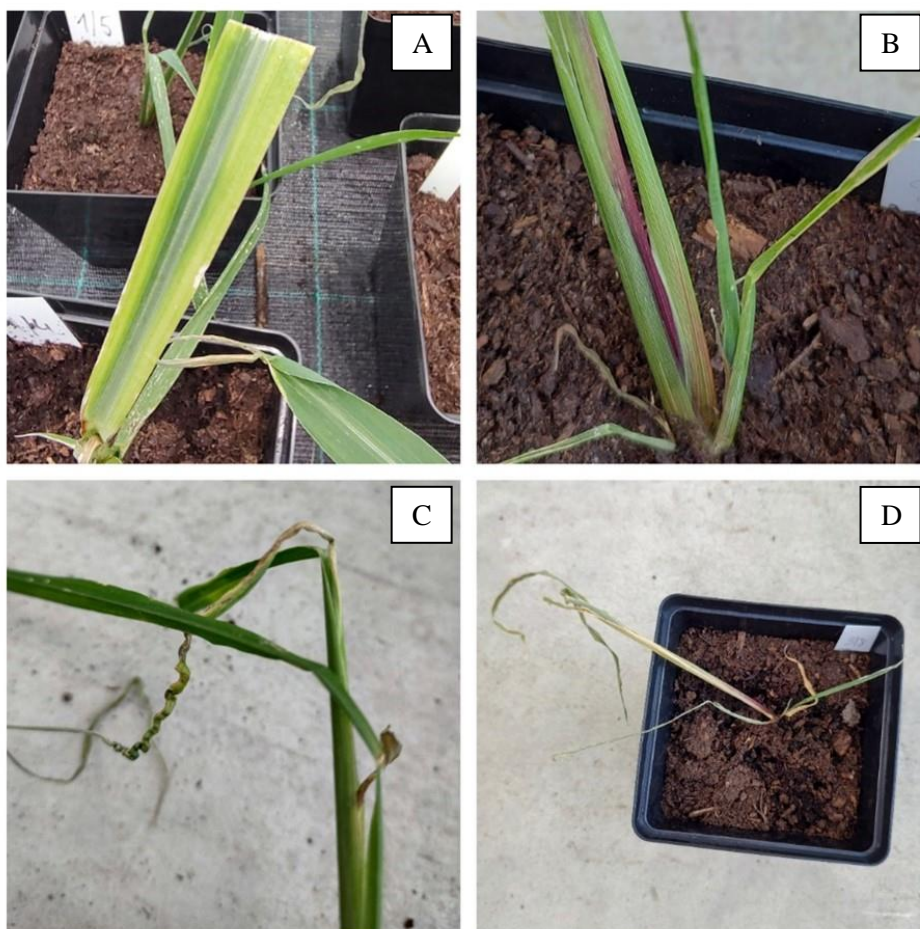
- Normalizace Ct hodnot
 - ΔCt (vzorek) = Ct (cílový gen) – Ct (referenční gen)
 - ΔCt (kalibrátor) = Ct (cílový gen) – Ct (referenční gen)
- Normalizace ΔCt testovaného genu k ΔCt kalibrátoru
 - $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (vzorek) – ΔCt (kalibrátor)
- Výpočet relativní kvantifikace (exprese)
 - Relativní kvantifikace = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Změny hladin relativní kvantifikace *Acc-1* genů byly testovány pro jejich statistickou významnost v programu RStudio 1.4.1106 pomocí jednosměrného testu ANOVA a výsledné hodnoty byly normalizovány Tukeyho porovnávacím testem ($P < 0,05$). Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 9.5.1 (733). Signifikantní změny v genové expresi ošetřených rostlin vůči kontrolním rostlinám jsou v grafech označeny symbolem hvězdičky.

5. Výsledky

5.1 Zhodnocení rezistence a náchylnosti rostlin při skleníkovém pokusu

Herbicidní poškození rostlin bylo hodnoceno vizuálním posouzením pravidelně každý týden 2x. Srovnávány byly vždy příznaky poškození u 59 testovaných rostlin oproti 15 kontrolním rostlinám. U senzitivních rostlin byly symptomy značně variabilní. První lehké příznaky poškození se začaly projevovat na listech rostlin již po dvou dnech od aplikace herbicidu. V tomto případě se jednalo o lehce chlorotické nepravidelné skvrny. Týden po aplikaci propaquizafopu chlorotických skvrn na starších listech přibývalo. Chlorózy měly tvar buď nepravidelný nebo docházelo k tvorbě proužkovitostí. Mnoho rostlin zcela přestalo růst a došlo k zastavení tvorby nových listů. Některé starší listy se začaly kroutit a usychat. 14 dní po ošetření testovaných rostlin herbicidem, bylo již možno fenotypově potvrdit, které z rostlin jsou náchylné, a které naopak rezistentní. Senzitivní rostliny byly po 16 dnech působení herbicidu poškozeny natolik, že zcela přestaly růst, vyskytovalo se u nich antokyanové zbarvení, četné listové nekrózy s následnou desikací a mnoho z nich zcela odumřelo. Typické příklady poškození senzitivních rostlin je znázorněno na Obr. č. 9.



Obrázek č. 9: Typické příznaky poškození u senzitivních rostlin 16 dní po aplikaci propaquizafopu (A – chlorózy listů; B – antokyanizace; C – desikace a kroucení listů; D – zastavení růstu) (Foto: Bc. A. Ryšková, 2022).

Rezistentní jedinci naopak nevykazovali žádný z výše popisovaných příznaků poškození. Nedocházelo u nich k poškození listů, zastavení růstu, ani výskytu nekrotických a usychání. V porovnání s rostlinami kontrolními byly rostliny rezistentní téměř identické. Z celkového počtu 59 testovaných rostlin bylo na rezistenci usouzeno u 14 z nich (24 %). Z první lokality přežili aplikaci herbicidu 4 jedinci, z druhé lokality pouze 3 jedinci a z třetí lokality dokonce 7 jedinců. Účinnost herbicidu byla naopak potvrzena u 45 rostlin z 59 testovaných (76 %), které byly označeny jako senzitivní. Příklad srovnání kontrolního, senzitivního a rezistentního jedince z první lokality je na Obrázku č. 10.



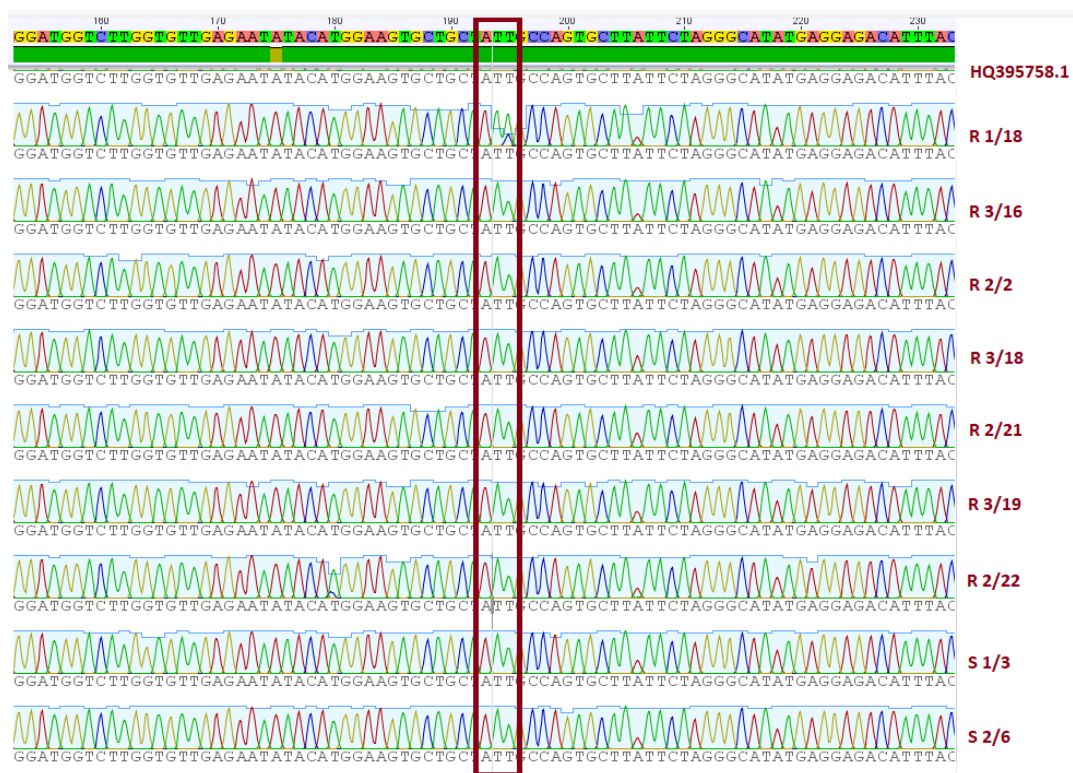
Obrázek č. 10: Srovnání kontrolní (vlevo), senzitivní (uprostřed) a rezistentní (vpravo) rostliny *E. crus-galli* 16 dní od aplikace herbicidu. Na obrázku je vyfocen kontrolní jedinec označen 1/K2, senzitivní jedinec 1/3 a rezistentní jedinec 1/18 z lokality první. Rostlina kontrolní a rezistentní jsou vizuálně téměř identické (Foto: Bc. A. Ryšková, 2022).

5.2 Sekvence *Acc-1* genů

Komplementární DNA (cDNA) byla získána prepisem z RNA (viz Kap. 4.4.5). Pro detekci mutací, které mohou souviset s target-site rezistencí byla využita polymerázová řetězová reakce s primery uvedenými v Tabulce č. 5. Primery ACcp1 a ACcp1R, ACcp4 a ACcp2R byly navrženy tak, aby byla amplifikována konkrétní oblast *Acc-1* genů, které kódují plastidovou izoformu ACCasy (nikoliv izoformu cytosolovou). PCR reakce byla provedena vždy u všech 14 vzorků, jejichž cDNA byla získána z rezistentních jedinců a tří vzorků, jejichž cDNA byla získána z jedinců senzitivních. Úspěšnost amplifikace cílových fragmentů byla vždy ověřena gelovou elektroforézou. Ve většině případů se podařilo získat kvalitní PCR produkt, který mohl být využit pro následnou sekvenaci.

Pro sekvenační analýzu bylo vybráno 10–14 vzorků rezistentních rostlin *E. crus-galli* a pro porovnání tři vzorky rostlin senzitivních. Sekvence byla provedena firmou MacroGen (Amsterdam, Nizozemsko). Získané sekvence byly zpracovávány a editovány v programu Geneious Prime 2023.1.2., přičemž byly do tohoto programu vkládány ve formátu ab1. Jednotlivé sekvence rezistentních a senzitivních rostlin byly srovnány s referenční sekvencí získanou z databáze GenBank (accesion number HQ395758.1). Tato sekvence publikována autory Huan *et al.* (2011) je kompletní sekvencí genu *Acc-1*, kódující plastidovou izoformu ACCasy u *Echinochloa crus-galli*.

Pár primerů ACcp1 a ACcp1R byl navržen tak, aby byla amplifikována oblast genů *Acc-1*, obsahující kodon 1781, který přímo souvisí se vznikem TSR. V tomto případě existují pouze dvě možné substituce (A za T a A za C na pozici prvního nukleotidu), které jsou zodpovědné za kódování leucinu namísto isoleucinu. Pomocí funkce „Multiple Align“ byly srovnány získané sekvence rezistentních a senzitivních rostlin s referenční sekvencí (accesion number HQ395758.1), přičemž nebyl detekován žádný jednonukleotidový polymorfismus, který by prokazoval target-site rezistenci. Příklad srovnání jednotlivých sekvencí s referenční sekvencí, je na Obr. č. 11. Na obrázku č. 12 je poté srovnání proteinových sekvencí testovaných rostlin s referenční sekvencí.

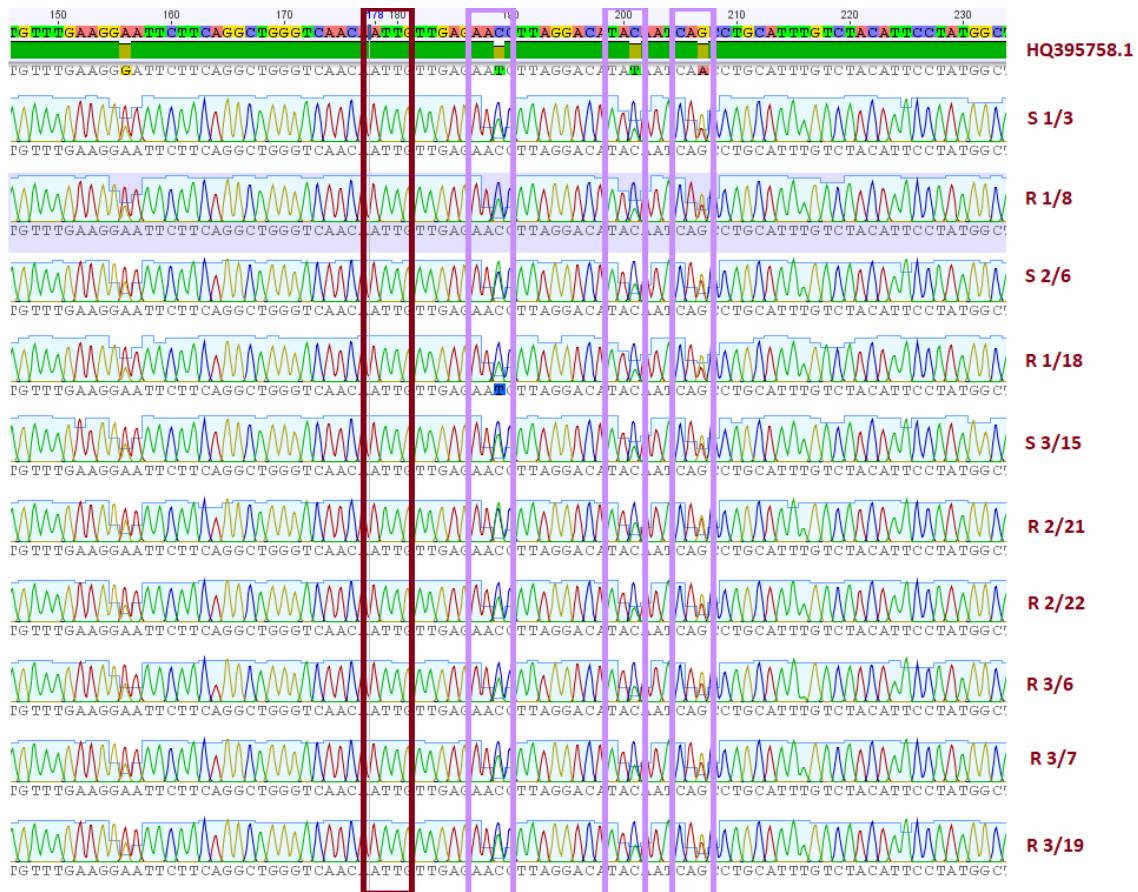


Obrázek č. 11: Srovnání sekvencí cDNA genu *Acc-1* ježatky kuří nohy pomocí funkce „Multiple Align“ v programu Geneious Prime 2023.1.2. **R** – vzorky rezistentních rostlin (1/18, 3/16, 2/2, 3/18, 2/21, 3/19, 2/22), **S** – vzorky senzitivních rostlin (1/3, 2/6). Sekvence HQ395758.1 sloužila jako referenční sekvence. Červeným rámečkem je označen triplet aminokyseliny isoleucin 1781 (ATT), jehož substituce za leucin souvisí s rezistencí. Sekvence rezistentních a senzitivních rostlin jsou totožné a jednonukleotidový polymorfismus nebyl prokázán.

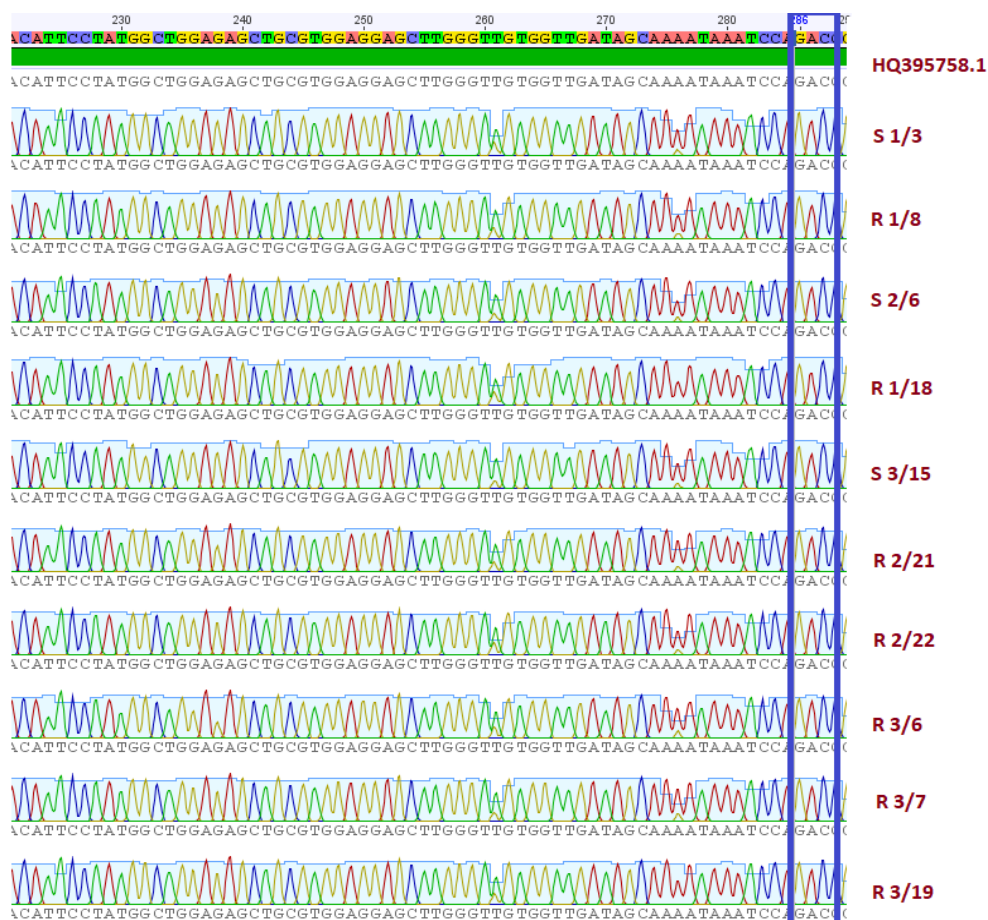


Obrázek č. 12: Srovnání proteinových sekvencí testovaných vzorků s referenční sekvencí (HQ395758.1). Sekvence byly vytvořeny pomocí funkce „Translate“ v programu Geneious Prime 2023.1.2. **R** – vzorky rezistentních rostlin (3/2, 1/8, 3/6, 1/14, 3/7, 1/18, 3/16, 2/2, 3/18, 2/21, 3/19, 2/22), **S** – vzorky senzitivních rostlin (1/3, 2/6, 3/15). Červeným rámečkem je označena aminokyselina isoleucin (I), jejíž záměna za leucin vede k rezistenci. Ani v jedné sekvenci nebyla tato změna zachycena.

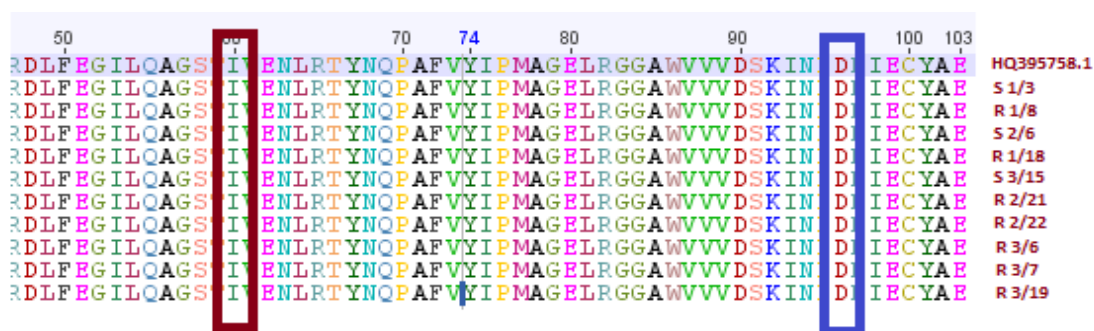
Primery ACcp4 a ACcp2R byly navrženy tak, aby byla amplifikována oblast genů *Acc-I*, obsahující kodony 1999, 2027, 2041, 2078, 2088 a 2096, jejichž polymorfismus souvisí se vznikem TSR. Na rozdíl od předešlého případu však bylo s referenční sekvencí (accession number HQ395758.1) porovnáváno pouze 10 vybraných rezistentů a 3 senzitivní vzorky, jelikož u některých z rezistentních vzorků byly elektroforeticky detekovány po provedení PCR nespecifické bandy, a proto byly tyto PCR produkty vyřazeny a k sekvenaci nebyly odeslány. Po provedení alignmentu nebyly v sekvencích stejně jako v předešlém případě zaznamenány žádné ze zásadních mutací, které by souvisely se vznikem rezistence k inhibitorům ACCasy u rostlin *E. crus-galli*. Detekovány byly pouze mutace, které však nemění kódovanou aminokyselinu a nemají tak podstatný význam (viz Obr. č. 13, 14 a 15).



Obrázek č. 13: Srovnání sekvencí cDNA genu *Acc-1* ježatky kuří nohy pomocí funkce „Multiple Align“ v programu Geneious Prime 2023.1.2. **R** – vzorky rezistentních rostlin (1/8, 1/18, 2/21, 2/22, 3/6, 3/7, 3/19), **S** – vzorky senzitivních rostlin (1/3, 2/6, 3/15). Sekvence HQ395758.1 sloužila jako referenční sekvence. Červeným rámečkem je označen triplet aminokyseliny isoleucin 2041 (ATT), jehož substituce za asparagin nebo valin souvisí s rezistencí. Fialovými rámečky jsou zvýrazněny kodony, u kterých došlo k jednonukleotidové záměně na třetí pozici v tripletu. Ani jedna z těchto mutací však není významná, protože nemění kódovanou aminokyselinu. Záměna AAT za AAC v obou případech kóduje asparagin, kodony TAT i TAC kódují tyrosin a záměna CAA za CAG také nemění kódovanou aminokyselinou, kterou je glutamin.



Obrázek č. 14: Srovnání sekvencí cDNA genu *Acc-1* ježatky kuří nohy pomocí funkce „Multiple Align“ v programu Geneious Prime 2023.1.2. **R** – vzorky rezistentních rostlin (1/8, 1/18, 2/21, 2/22, 3/6, 3/7, 3/19), **S** – vzorky senzitivních rostlin (1/3, 2/6, 3/15). Sekvence HQ395758.1 sloužila jako referenční sekvence. Modrým rámečkem je označen triplet kyseliny asparagové 2078 (GAC), jejíž substituce za glycin vede k rezistenci. Ani v jednom případě k této záměně nedošlo.



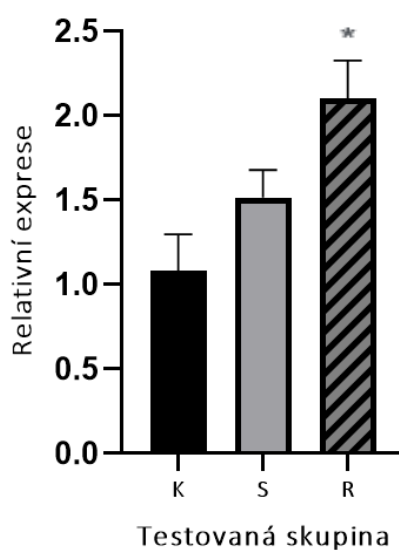
Obrázek č. 15: Srovnání proteinových sekvencí testovaných vzorků s referenční sekvencí (HQ395758.1). Sekvence byly vytvořeny pomocí funkce „Translate“ v programu Geneious Prime 2023.1.2. **R** – vzorky rezistentních rostlin (1/8, 1/18, 2/21, 2/22, 3/6, 3/7, 3/19), **S** – vzorky senzitivních rostlin (1/3, 2/6, 3/15). Červeným rámečkem je označena aminokyselina isoleucin 2041 (I), jehož záměna za valin nebo asparagin vede k rezistenci. Modrým rámečkem je označena kyselina asparagová 2078 (D), jejíž záměna za glycin taktéž může vést k rezistenci. Ani v jednom případě nebyly zásadní substituce detekovány.

5.3 Analýza genové exprese

Pomocí metody RT-qPCR byly vyhodnocovány změny v expresi *Acc-1* genů, jejichž zvýšená exprese souvisí s obrannou reakcí rostlin na herbicidy a je řazena mezi tzv. target-site rezistenci. Pro tuto metodu byla použita cDNA, která byla získána přepisem z RNA (viz Kap. 4.4.5). Hodnoceny byly pomocí RT-qPCR 3 vybrané odběrové časy, a to 24 hodin po aplikaci herbicidu, 7 dní po aplikaci a 15 dní po aplikaci. Primery, které byly využity v rámci kvantitativní RT-PCR byly navrženy tak, aby byla hodnocena celková úroveň exprese *Acc-1* genů. Relativní změny v genové expresi nebyly tedy měřeny zvláště pro jednotlivé kopie *Acc-1* genů. Exprese *Acc-1*-genů byla vztažena k referenčnímu genu, kterým byl *Echinochloa crus-galli* β -actin. Porovnávány byly vždy hladiny genové exprese dvou skupin ošetřených rostlin (rezistentních a senzitivních) vůči rostlinám neošetřeným (kontrolním).

5.3.1 Exprese *Acc-1* genů po 24 hodinách od aplikace herbicidu

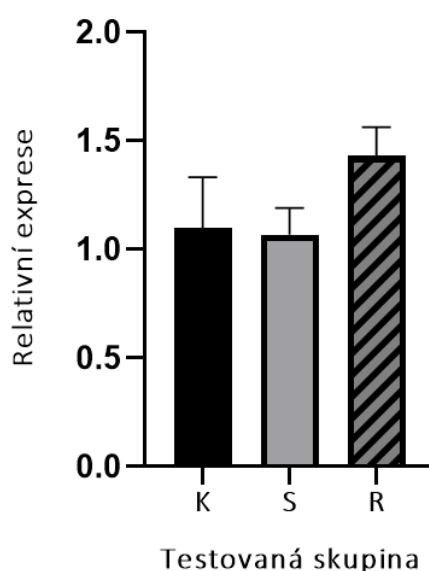
V případě rezistentních rostlin *E. crus-galli* došlo po 24 hodinách od aplikace inhibitoru ACCasy k signifikantnímu nárůstu exprese (p-value = 0,0142). Oproti kontrolním rostlinám byl nárůst exprese o 94,59 %. U skupiny senzitivních rostlin byl nárůst exprese 1,39x vyšší nežli u herbicidně neošetřené varianty. Zvýšení exprese u skupiny senzitivních rostlin nicméně bylo po statistickém otestování nesignifikantní (Obr. č. 16).



Obrázek č. 16: Změna genové exprese *Acc-1* genů u dvou herbicidně ošetřených a jedné neošetřené skupiny rostlin po 24 hodinách od aplikace inhibitoru ACCasy. **K** – kontrolní skupina rostlin herbicidně ošetřená, **S** – senzitivní skupina rostlin herbicidně ošetřená, **R** – rezistentní skupina rostlin herbicidně neošetřená. Data byla normalizována referenčním genem *E. crus-galli* β -actin. Jednotlivé sloupce znázorňují průměry ze dvou biologických a dvou technických opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

5.3.2 Exprese *Acc-1* genů po 7 dnech od aplikace herbicidu

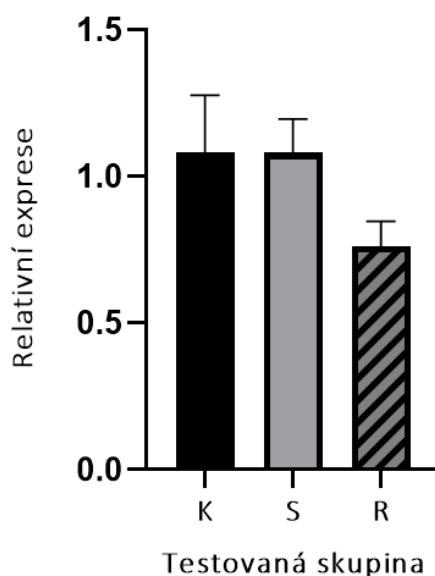
Během měření změn relativní genové exprese *Acc-1* genů po sedmi dnech od aplikace propaquizafopu, byl prokázán nárůst genové exprese u rezistentní varianty rostlin 1,3x oproti skupině kontrolní, kde byla úroveň genové exprese 1,1. Naopak byl zaznamenán pokles exprese u varianty senzitivních rostlin, kde došlo k poklesu o 3 % oproti herbicidně neošetřené variantě (Obr. č. 17).



Obrázek č. 17: Změna genové exprese *Acc-1* genů u dvou herbicidně ošetřených a jedné neošetřené skupiny rostlin po 7 dnech od aplikace inhibitoru ACCasy. **K** – kontrolní skupina rostlin herbicidně neošetřená, **S** – senzitivní skupina rostlin herbicidně ošetřená, **R** – rezistentní skupina rostlin herbicidně ošetřená. Data byla normalizovaná referenčním genem *E. crus-galli* β -actin. Jednotlivé sloupce znázorňují průměry ze dvou biologických a dvou technických opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

5.3.3 Expresa *Acc-1* genů po 15 dnech od aplikace herbicidu

Po patnácti dnech působení propaquizafopu byl při měření genové exprese u rezistentní skupiny rostlin při srovnání se skupinou kontrolní zaznamenán pokles o 29,72 %. Naopak senzitivní skupina rostlin vykazovala téměř totožnou úroveň genové exprese jako neošetřená varianta rostlin. Hodnota genové exprese u kontrolní skupiny rostlin byla 1,084 a u senzitivní skupiny rostlin 1,082 (Obr. č. 18).



Obrázek č. 18: Změna genové exprese *Acc-1* genů u dvou herbicidně ošetřených a jedné neošetřené skupiny rostlin po 15 dnech od aplikace inhibitoru ACCasy. **K** – kontrolní skupina rostlin herbicidně neošetřená, **S** – senzitivní skupina rostlin herbicidně ošetřená, **R** – rezistentní skupina rostlin herbicidně ošetřená. Data byla normalizovaná referenčním genem *E. crus-galli* β -actin. Jednotlivé sloupce znázorňují průměry ze dvou biologických a dvou technických opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

6. Diskuse

Globálním problémem, kterému v dnešní době lidstvo čelí, je konstantní nárůst rezistentních populací plevelných rostlin k různým skupinám herbicidů. Tento již dlouhou dobu diskutovaný fakt souvisí s nadměrným a opakovaným užíváním chemické ochrany plodin, namísto regulace nechemické (Norsworthy *et al.*, 2012; Heap, 2023). Mezi hlavní problematické plevelné druhy je řazena i *Echinochloa crus-galli* a další druhy rodu *Echinochloa*, které jsou rozšířeny téměř na všech kontinentech (Rojas-Sandoval a Acevedo-Rodríguez, 2014; Bajwa *et al.*, 2015). V České republice je dokumentována rezistence ježatky kuří nohy pouze k inhibitorům fotosystému II (atrazinu), avšak rezistence k inhibitorům ACCasy nebyla prozatím prokázána. Z Evropských států, ve kterých byla diagnostikována rezistence ježatky kuří nohy, lze jmenovat pouze Itálii. Zde byla potvrzena mnohonásobná rezistence v roce 2009 ke skupině inhibitorů ACCasy (cyhalofop-butyl a profoxydim) a inhibitorům ALS (azimsulfuron, bispyribac-sodná sůl, imazamox, penoxsulam). Ke stejným chemickým skupinám inhibitorů ACCasy byla rezistence opět potvrzena v roce 2011, přičemž se předpokládá i křížová rezistence k dalším chemickým skupinám z této kategorie (Heap, 2023). Většina publikovaných studií věnovaných rezistenci *E. crus-galli* k inhibitorům ACCasy je nicméně soustředěna na asijský kontinent, pravděpodobně proto, že je tento plevel problematický především v rýžových polích a asijské státy (např. Čína, Jižní Korea, Thajsko) jsou v celosvětovém měřítku hlavními producenty rýže (39,3 %). Značné množství dostupných publikací však pochází i z herbologických výzkumů z USA, kde se rýže také poměrně hodně pěstuje (22,6 %). Z Evropy je nejvíce prozkoumána oblast již zmíněné Itálie (Damalas a Koutroubas, 2023).

Předložená diplomová práce byla zaměřena na detekci rezistence u ježatky kuří nohy, jejíž obilky byly sbírány na třech lokalitách Olomouckého kraje. Řada studií se již detekci rezistence u ježatky kuří nohy věnovala. Ve většině případů jsou testovány rostliny sbírané na lokalitách, o nichž je již prokázáno, že se na nich vyskytují rezistentní nebo náchylné biotypy, které jsou následovně mezi sebou srovnávány (Huan *et al.*, 2011; Iwakami *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 2022). Tímto se mnou prováděný experiment odlišuje, jelikož byly obilky sbírány na lokalitách, kde o rezistenci či náchylnosti rostlin *E. crus-galli* není nic známo. Proto byl k testování rezistence nejprve založen skleníkový experiment, jehož cílem bylo zhodnotit citlivost pěstovaných rostlin k herbicidu ze skupiny inhibitorů ACCasy. Vzhledem k tomu, že bylo nutné si nejprve vytipovat na základě vizuálního posouzení potenciální rezistentní a senzitivní jedince, byl nejprve proveden biologický test s nádobovými pokusy, jehož cílem bylo kvalitativní (přežil/nepřežil) zhodnocení odolnosti. Na rozdíl od jiných studií nebyl prováděn dose-response test, kdy se aplikuje účinná látka ve stupňovaných dávkách, čímž se získá přehled o účinnosti herbicidu při jednotlivých koncentracích (Yu *et al.*, 2007a; Zhang a Kim, 2016; Yang *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). Všechny testované rostliny byly v mém případě ošetřeny herbicidem se shodnou koncentrací (5 mg·l⁻¹). K tomuto účelu byl vybrán propaquizafop, což je herbicid, postemergentně regulující široké spektrum

trávovitých plevelů včetně ježatky kuří nohy. I když je propaquizafop v chemické ochraně rostlin používán, nejsou prakticky dostupné žádné studie, ve kterých by byl testován samostatně konkrétně na *E. crus-galli*. Rezistence k propaquizafopu nebyla dle databáze WSSA detekována ani u jiných druhů z rodu *Echinochloa*. Mimo propaquizafop jsou v chemické ochraně používány další dva jemu chemicky příbuzné herbicidy, které jsou stejně jako propaquizafop esterovými variantami quizalofopu-P. Jedná se o quizalofop-P-ethyl a quizalofop-P-tefuryl. V případě quizalofopu-P-ethylu byla rezistence u *Echinochloa crus-galli* potvrzena v roce 2001 v Thajsku, a poté v roce 2010 v Číně (Heap, 2023). Rozsáhlou studii provedli v roce 2011 autoři Huan *et al.*, kterým se opět podařilo potvrdit výskyt odolných populací ježatky kuří nohy v jedné z čínských provincií (Heilongjiang). V rámci testování rezistence jsou také často prováděny experimenty k odhalení křížové nebo mnohonásobné rezistence, kdy se současně kombinuje více inhibitorů ACCasy nebo celých kategorií herbicidů s různým MoA. Tímto způsobem byla detekována v roce 2009 křížová rezistence k propaquizafopu a quizalofopu u čiroku halabského (*Sorghum halepense*) v severním Řecku autory Kaloumenos a Eleftherohorinos. Podobné výsledky u čiroku halabského uvádějí i Scarabel *et al.* (2014), kteří potvrdili cross-rezistenci k propaquizafopu, quizalofopu a haloxyfopu na území severní Itálie. Z novějších případů lze jmenovat cross-rezistenci u ovsa hluchého (*Avena fatua*), která byla diagnostikována v roce 2020 autory Vijayarajan *et al.* v Irsku. Mnohonásobná rezistence byla potvrzena na území Irska u psárky polní (*Alopecurus myosuroides*) k pěti chemickým skupinám z kategorie inhibitorů ACCasy (pinoxaden, cycloxydim a propaquizafop) a ALS (iodosulfuron-methyl-Na, mesosulfuron-methyl) (Vijayarajan *et al.*, 2021). Autoři Yu *et al.* (2007b) tento typ rezistence potvrdili u jílku tuhého (*Lolium rigidum*) ke glyfosátu, paraquat a současně propaquizafopu v Jihoafrické republice. Z výše zmíněných studií jednoznačně vyplývá, že rezistence k propaquizafopu není u travovitých plevelů výjimkou, prozatím pouze nejsou dostupné záznamy, které by odolnost potvrzovaly i v případě *E. crus-galli*. V mnou prováděném experimentu bylo na určitý mechanismus rezistence usouzeno u 14 rostlin z 59 testovaných, jelikož tyto rostliny nevykazovaly žádné známky poškození herbicidem a ve srovnání s kontrolní variantou rostlin byly téměř identické. Toto zjištění je v souladu s tvrzením Jursíka *et al.* (2011), kdy autoři poukazují na problematičnost odlišení rezistentních a senzitivních populací plevelů, které jsou morfologicky velice podobné až totožné. V zemědělství je tento aspekt velkou komplikací, poněvadž před aplikací herbicidu nelze rezistenci prokázat, a proto je nutné provést laboratorní testy, které jsou jedinou možností, jak skutečně rezistenci plevelů odhalit.

Následující experimentální část, která probíhala v návaznosti na skleníkový pokus, byla věnována potvrzení mechanismu rezistence u přeživších rostlin. Na základě literatury byly vybrány dvě laboratorní metody, které měly k potvrzení rezistence přispět. Vzhledem k tomu, že byl mechanismus TSR detailně popsán a prokázán u značného množství plevelných rostlin, byly i metody používané v rámci této diplomové práce zaměřeny pouze na tento typ rezistence (Kukorelli *et al.*, 2013; Kaundun, 2014).

K detekci jednonukleotidových polymorfismů v rámci osmi známých kodonů, byly autory Délye a Michel (2005) navrženy dva univerzální páry primerů, specificky amplifikující během PCR dva úseky genu, kódující plastidovou izoformu ACCasy. Jelikož byly tyto primery navrženy primárně pro amplifikaci specifických úseků genomické DNA, byly testovány i primery navrženy autory Fang *et al.* (2020), které měly amplifikovat přímo cDNA získanou přepisem z RNA. Délka výsledného PCR produktu pak měla být 993 bp a výsledný fragment měl obsahovat všechny kodony, u nichž dochází k bodovým mutacím. Ani po mnoha pokusech o optimalizaci primerů však nebyl získán kvalitní PCR produkt. Ve valné většině případů docházelo k tvorbě nespecifických bandů. Domnívám se, že tato nezdárná PCR reakce mohla být způsobena nekvalitním navržením primerů. Z tohoto důvodu byly optimalizovány primery autorů Délye a Michel (2005), pomocí kterých již byly kvalitní PCR produkty o délce 551 bp (ACc1 a ACc1R) a 406 bp (ACc4 a ACc2R) získány a následně sekvenovány.

Získané sekvence byly bioinformaticky editovány a vyhodnocovány v programu Geneious Prime 2023.1.2, přičemž nebyla detekována ani jedna ze zásadních mutací souvisejících s TSR. Nalezeny byly v srovnávaných sekvencích pouze tři jednonukleotidové substituce na třetí pozici v tripletu, které nemění kódovanou aminokyselinu. V případě TSR je podstatným faktorem počet kopií cílového genu. U rostlin, které nesou více než dvě kopie cílového genu, nemusí k projevení rezistence vůbec dojít, i když je jeden z cílových genů mutován (Yu *et al.*, 2013; Iwakami *et al.*, 2015). V případě polyploidních rostlin může dojít k tzv. zředovacímu efektu, kdy je množství ACCasy odpovídající za rezistenci ředěno větším množstvím ACCasy kódované nemutovanými geny, a proto herbicid ACCasu účinně inhibuje (Yu *et al.*, 2013; Iwakami *et al.*, 2015). To může být také důvodem, proč jsou často k TSR přidruženy i mechanismy NTSR, které sníženou úroveň rezistence svým působením kompenzují. Zředovací efekt byl potvrzen např. u *E. phyllopon*, což je příbuzný druh ježatky kuří nohy, nesoucí 4 kopie *Acc-1* genu (Iwakami *et al.*, 2012). Ježatka kuří noha je hexaploidní druh (6n), který vznikl interspecifickým zkřížením tetraploidního *Echinochloa phyllopon* (4n) a doposud neznámého diploidního druhu rodu *Echinochloa* sp. (2n). I tento rostlinný druh nese tedy více kopií cílového genu, předpokládá se, že šest. Tuto tezi potvrdili Iwakami *et al.* (2015), kteří u ježatky kuří nohy detekovali přesně 6 kopií cílového genu, a také Fang *et al.* (2020), kteří zjistili pouze 4 kopie cílového genu, avšak předpokládají existenci vyššího počtu kopií. Po srovnání mých sekvenačních dat s několika dalšími studiemi bylo zjištěno, že jsou ve shodě např. s výsledky Iwakami *et al.* (2015), kteří se pokusili objasnit mnohonásobnou rezistenci k cyhalofop-butyly a penoxsulamu u dvou linií *E. crus-galli* var. *formosensis* v Japonsku. Sekvenační analýzou šesti kopií *Acc-1* genu nebyla žádná z významných mutací detekována. Obdobné výsledky poskytli také Yang *et al.* (2022), kteří zkoumali 4 rezistentní populace *E. crus-galli* v Číně. V případě autorů Laforest *et al.* (2017), kteří se zabírali rezistencí u hexaploidní rosičky krvavé (*Digitaria sanguinalis*), byly využity stejné univerzální primery, které jsem ke své práci používala i já. Stejně jako v mém případě však nebyly detekovány žádné významné bodové mutace, potvrzující TSR. Jelikož nejsou tyto primery navrženy pro amplifikaci každé genové kopie zvlášť, mohlo se během sekvenace stát, že nebyla mutace související s rezistencí detekována, vyskytla-li se

pouze jednou v rámci šesti kopií cílového genu. Navzdory výše diskutovaným publikacím však převažují odborné články, v nichž je jednoznačně target-site rezistence potvrzena, a to v rámci širokého druhového spektra plevelů (Délye, 2005, Amaro-Blanco *et al.*, 2021). Nejčastěji se vyskytující mutací je záměna isoleucinu na pozici 1781 za leucin. Výskyt této mutace potvrdili i Amaro-Blanco *et al.* (2021), kteří testovali na TSR několik druhů rodu *Echinochloa* v západním Španělsku. Výskyt mutace na téže pozici, avšak u jiných plevelných rostlin, potvrdili také Deng *et al.* (2019) u *Leptochloa chinensis* či Marshall *et al.* (2013) u *Alopecurus myosuroides*. V případě *Lolium rigidum* byla rezistence potvrzena autory Zhang a Powles (2006) nebo Vázquez-García *et al.* (2022). V rámci odborných publikací jsou zmiňovány i další jednonukleotidové substituce související s TSR, které však nejsou zdaleka tak obvyklé jako Ile-1781-Leu (Huan *et al.*, 2011). Ačkoliv bylo do dnešní doby detekováno 8 bodových mutací, které přímo souvisí s TSR, výzkum by v této oblasti měl pokračovat, jelikož se dá předpokládat, že nejsou zdaleka odhaleny veškeré pozice kodonů, které mohou mutacím podléhat. Opakovaným a nadměrným užíváním herbicidů je vytvářen selekční tlak na plevelné populace, což může být reflektováno vznikem mutací *de novo*.

Působí-li inhibitory ACCasy na rostlinu, může docházet k obranným reakcím ve smyslu zvýšené úrovně exprese genů kódujících příslušný enzym. Tento mechanismus byl již několikrát potvrzen v případě glyfosát rezistentních rostlin. Inhibitorům EPSPS je v tomto ohledu věnována značná pozornost, protože jsou v zemědělství jedněmi z nejvíce užívaných herbicidů (Baerson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2018, Gaines *et al.*, 2020). Některé studie jsou již zaměřeny i na studium genové exprese v případě inhibitorů ACCasy, avšak stále jich není mnoho (Laforest *et al.*, 2017; González-Torralva a Norsworthy, 2023). Jako druhá experimentální metoda byla z toho důvodu vybrána kvantitativní RT-PCR, sloužící k analýze genové exprese *Acc-1* genů ježatky kuří nohy. Cílem této metody bylo vyhodnotit, zda se úroveň exprese po aplikaci herbicidu u rezistentních jedinců zvyšuje, a to v porovnání s herbicidně neošetřenou variantou rostlin. Srovnávány byly s kontrolou i rostliny označené jako senzitivní (herbicidně poškozené). V dostupných studiích je většinou porovnávána genová exprese u předem potvrzených rezistentních biotypů, oproti biotypům náchylným, které jsou stanoveny jako kontrola (Huan *et al.*, 2013; Iwakami *et al.*, 2015; Laforest *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2020). V mém případě byly srovnány dvě skupiny herbicidně ošetřených rostlin, klasifikovaných jako rezistentní a senzitivní, oproti variantě kontrolní. Tímto se také můj přístup odlišuje od jiných prací, které ošetřenou, senzitivní variantu rostlin často opomíjejí. Genová exprese byla navíc měřena ve třech různých odběrových časech, a protože byly mezi jednotlivými měřeními časy několikadenní rozdíly (24 hodin, 7 dní a 15 dní), mohl být sledován celkový trend genové exprese v poměrně dlouhém časovém horizontu. Domnívám se, že by tyto poznatky ohledně změn genové exprese, mohly lépe demonstrovat situaci, která může nastat i v přírodních podmínkách, jelikož byly zahrnuty v rámci analýz všechny tři skupiny rostlin (dvě ošetřené varianty a jedna neošetřená varianta).

V případě exprese, která byla měřena u tří testovaných skupin rostlin po 24 hodinách, se potvrdila stanovená hypotéza, že rané fáze po herbicidní aplikaci (do 24 hodin) jsou klíčovými v tom

smyslu, zda se rostlina herbicidní dávce ubrání a přežije, nebo nikoliv. U rezistentních rostlin byla genová exprese signifikantně vyšší nežli u kontrolní skupiny (o 94,59 %). Senzitivní rostliny měly 1,39x vyšší expresi než herbicidně neošetřená varianta, z čehož vyplývá, že tento mírný nárůst genové exprese nebyl dostatečný k získání odolnosti. Moje výsledky se shodují také s publikací autorů González-Torralva a Norsworthy (2023), kteří po 24 hodinách od aplikace herbicidů naměřili signifikantně vyšší genovou expresi u skupiny rezistentních rostlin ježatky kuří nohy ve srovnání s rostlinami kontrolními. V jejich studii byl tento nárůst přibližně 2x vyšší, což jsou téměř shodné výsledky jako v mém případě. Statisticky signifikantní výsledky uveřejnili také autoři Xia *et al.* (2016), kteří zaznamenali pík genové exprese taktéž po 24 hodinách od aplikace herbicidu na rostliny *E. crus-galli*. Stejně jako ve studii autorů González-Torralva a Norsworthy (2023) i mnou prováděném experimentu, byla tato exprese 2x vyšší u rezistentů oproti kontrolní skupině. V dostupné literatuře jsou také uváděny výsledky z RT-qPCR po 6 hodinách od aplikace herbicidu, což je stále bráno jako raná fáze po aplikaci herbicidu. Fang *et al.* (2020) naměřili po 6 hodinách od aplikace čtyř testovaných herbicidů 2,5x až 3,3x signifikantně vyšší genovou expresi u rezistentů v porovnání s rostlinami senzitivními, přičemž s postupem času genová exprese klesala až byla u obou srovnávaných variant téměř shodná. To potvrzují také González-Torralva a Norsworthy (2023), kteří po 6 hodinách po aplikaci herbicidu zaznamenali 3,3x vyšší úroveň exprese u rezistentních rostlin ve srovnání s kontrolou.

Další dva časy, kdy byla měřena úroveň genové exprese, byly po 7 dnech a 15 dnech, přičemž neexistuje mnoho studií, které by se v takto dlouhém časovém horizontu genovou expresí zabíraly. V případě změn genové exprese po sedmi dnech bylo zaznamenáno zvýšení pouze o 30 % oproti kontrolní skupině. U senzitivní varianty rostlin byl vůči kontrole detekován pokles pouze o 3 %. Ani jeden z těchto výsledků se po statistickém otestování neprojevil jako signifikantní. González-Torralva a Norsworthy (2023) rovněž zaznamenali výrazný pokles exprese v případě senzitivních rostlin ježatky kuří nohy, jejichž exprese se po 8 dnech se blížila 0. Jedinou dostupnou publikací, která se věnovala analýze genové exprese u *E. crus-galli* po více než 10 dnech, byla studie autorů Xia *et al.* (2016), přičemž stejně jako v mém případě nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v expresi genů ve srovnání skupiny rezistentní a kontrolní. Genová exprese byla v tomto případě extrémně nízká. V mých datech byl zaznamenán pokles exprese u rezistentů oproti kontrole 0,7x, zatímco senzitivní varianta rostlin měla téměř shodnou úroveň exprese jako kontrolní skupina.

Z naměřených dat vyplývá, že trend genové exprese *Acc-1* genů v případě rezistentní skupiny rostlin byl klesající. To si lze vysvětlit jejich schopností over-exprimovat ACCasu v raných fázích, jakožto zásadního obranného kroku proti působení inhibitoru. S pokročilejší růstovou fází rostliny tak exprese, a s tím i množství produkovaného enzymu může klesat, jelikož již není potřeba se inhibitoru bránit a investovat do tohoto procesu velké množství energie (Iwakami *et al.*, 2012, Xia *et al.*, 2016). Naopak exprese u senzitivních rostlin byla v rámci všech tří časů téměř neměnná. Mírné navýšení se vyskytlo pouze po 15 dnech od aplikace propaquizafopu, avšak ani lehké zvýšení exprese se neprojeвило jako statisticky signifikantní, a proto není považováno za významný nále. Úroveň genové exprese,

kteřá je po ošetřeni herbicidem v rámci delšího časového horizontu stále konstantní, tak může být pro rostlinu fatální, jelikož rostlina není schopna nadprodukce cílového enzymu, kterým by se herbicidnímu poškození ubránila (Laforest *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2020).

V dalším experimentu zaměřeném na tuto problematiku, by bylo vhodné provést skleníkový pokus s dose-response testem, který by přinesl přehled o účinnosti jednotlivých koncentrací herbicidů. Taktéž by mohlo být otestováno větší množství dostupných herbicidů k případnému prokázání křížové či mnohonásobné rezistence. V případě laboratorních metod by mohlo být otestováno a sekvenováno větší množství jedinců sbíraných na různých lokalitách, což by poskytlo lepší obrázek o stavu TSR rezistence u tohoto plevelného druhu. Taktéž by bylo vhodné provést kvantitativní RT-PCR pro jednotlivé rostlinné orgány, jak bylo uvedeno např. autory Iwakami *et al.* (2012). Vzhledem k tomu, že je ježatka kuří noha hexaploidní druh a je u ní prokázáno 6 kopií cílového genu, by mohly být navrženy primery konkrétně pro amplifikaci DNA jednotlivých kopií, namísto univerzálních primerů, a to jak v případě PCR, tak i RT-qPCR. Jednotlivé kopie mohou v rostlinném organismu plnit různé funkce a doposud není známo, jaký konkrétní význam tyto kopie mají. V neposlední řadě by měly být v rámci skleníkového experimentu naklíčeny a testovány obilky, které byly sbírány po 16 dnech z rezistentních rostlin, čímž by se dalo zjistit, zdali se rezistence vyskytuje i u nové generace *E. crus-galli*. Tento pokus by bylo možné provést metodou agarových půd nebo vodních kultur. U rezistentních rostlin by dále mohla být sledována aktivita enzymu ACCasy k detailnějšímu objasnění mechanismů rezistence. Tato diplomová práce byla zaměřena pouze na molekulární detekci target-site rezistence, přičemž mechanismy non-target-site rezistence nebyly zkoumány. U polyploidních trav je nicméně obvyklé, že dochází ke kombinacím mezi TSR a NTSR, jakožto pomocnému mechanismu k získání odolnosti proti herbicidnímu působení, a proto by bylo zajímavé do dalšího výzkumu zahrnout i tento typ rezistence.

7. Závěr

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše, která byla zaměřena nejprve obecně na plevelné rostliny, jejich historii a současnost, ale také na negativní i pozitivní interakce plevelů s pěstovanými plodinami. Popsány byly různé možnosti regulace plevelných rostlin, přičemž největší důraz byl kladen na vysvětlení chemické ochrany plodin. Důkladněji byla rozepsána kapitola ohledně inhibitorů ACCasy, a také kapitoly popisující mechanismy rezistence. Poslední kapitola teoretické části byla věnována ježatce kuří noze, jakožto vybranému plevelnému druhu, který byl v další části práce testován.

Experimentální část byla zacílená na potvrzení rezistence u ježatky kuří nohy. Prvním krokem bylo založení skleníkového pokusu, kdy bylo nutné napěstovat rostliny *E. crus-galli* z obilek, které byly sbírány na třech polních lokalitách Olomouckého kraje. Jakmile byly rostliny ve fázi 3–4 listů, následovala aplikace herbicidu ze skupiny inhibitorů ACCasy. Na základě vizuálního posouzení, během něhož byly srovnávány příznaky herbicidního poškození u herbicidně ošetřených rostlin a rostlin kontrolních (neošetřených), byly vytipovány rostliny rezistentní a senzitivní. Příslušné rostliny byly dále analyzovány v laboratoři molekulárními metodami.

Pomocí metody PCR bylo získáno několik kvalitních PCR produktů, které bylo možné odeslat na sekvenaci. Získané sekvence byly následně bioinformaticky editovány. Porovnávány byly vždy sekvence rostlin klasifikovaných jako rezistentní s rostlinami senzitivními, a také referenční sekvencí. Po důkladném prozkoumání všech sekvencí však nebyla nalezena žádná mutace v příslušných kodonech, která by za rezistenci odpovídala. Metodou RT-qPCR byla změřena úroveň genové exprese *Acc-1* genů ve třech časech (24 hodin, 7 dní a 15 dní po aplikaci herbicidu). Nadměrná exprese cílových genů, a tím i ACCasy, je dalším mechanismem, který rezistenci navozuje. Touto metodou se podařilo potvrdit stanovenou hypotézu, kdy byla předpokládána zvýšená exprese v časně fázi po aplikaci herbicidu, jakožto důležitému obrannému kroku proti působení příslušného inhibitoru. Nejvyšší úroveň exprese tak byla naměřena u rezistentních rostlin ve srovnání s rostlinami kontrolními po 24 hodinách od aplikace propaquizafopu. Z těchto výsledků lze usoudit, že zvýšená genová exprese byla v tomto případě zásadním mechanismem, který se na získání rezistence u rostlin *Echinochloa crus-galli* podílel.

Vzhledem k tomu, že jsou poznatky ohledně detekce rezistence ježatky kuří nohy k inhibitorům ACCasy na území ČR stále limitované, by tato diplomová práce a zde diskutované výsledky, mohly alespoň z části přispět k objasnění některých podstatných mechanismů.

8. Literatura

- Amaro-Blanco, I., Romano, Y., Palmerin, J. A., Gordo, R., Palma-Bautista, C., De Prado, R., Osuna, M. D. (2021): Different Mutations Providing Target Site Resistance to ALS- and ACCase-Inhibiting Herbicides in *Echinochloa* spp. from Rice Field. *Agriculture* 11, 1–12.
- Andrew, I. K. S., Storkey, J., Sparkes, D. L. (2014): A review of the potential for competitive cultivars as a tool in integrated weed management. *Weed Research* 55, 239–248.
- AOPK (2023): *Echinochloa crus-galli* (Linnaeus) P. B. - ježatka kuří noha. [online] [cit-2023-06-27] Dostupné z: https://portal.nature.cz/publik_syst/nd_nalez-public.php?idTaxon=36660
- Baerson, S. R., Rodriguez, D. J., Biest, N. A., Tran, M., You, J., Kreuger, R. W., Dill, G. M., Pratley, J. E., Gruys, K. J. (2002): Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*). *Weed Science* 50, 721–730.
- Bajwa, A. A., Jabran, K., Shahid, M., Ali, H. H., Chauhan, B. S., Ehsanullah (2015): Eco-biology and management of *Echinochloa crus-galli*. *Crop Protection* 75, 151–162.
- Beckie, H. J., Tardif, F. J. (2012): Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection* 35, 15–28.
- Blaix, C., Moonen, A. C., Dostatny, D. F., Izquierdo J., Le Corff J., Morrison J., Von Redwitz C., Schumacher, M., Westerman, P. R. (2018): Quantification of regulating ecosystem services provided by weeds in annual cropping systems using a systematic map approach. *Weed Research* 58, 151–164.
- Bo, A. B., Won, O. J., Sin, H. T., Lee, J. J., Park, K. W. (2017): Mechanisms of herbicide resistance in weeds. *Korean Journal of Agricultural Science* 44, 1–15.
- Capinera, J. L. (2005): Relationships between insect pests and weeds: an evolutionary perspective. *Weed Science* 53, 892–901.
- Carvalho, S. J. P. D., Nicolai, M., Ferreira, R. R., Figueira, A. V. D. O., Christoffoleti, P. J. (2009): Herbicide Selectivity by Differential Metabolism: Considerations for Reducing Crop Damages. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 66, 136–142.
- Clements, D. V., Jones V. L. (2021a): Ten Ways That Weed Evolution Defies Human Management Efforts Amidst a Changing Climate. *Agronomy* 11, 1–20.
- Clements, D. V., Jones V. L. (2021b): Rapid Evolution of Invasive Weeds Under Climate Change: Present Evidence and Future Research Needs. *Frontiers in Agronomy* 3, 1–16.
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, Ch., Guillemin, J. P. (2016): Bioherbicides: Dead in water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection* 87, 44–49.

- Damalas, Ch. A., Koutroubas, S. D. (2023): Herbicide-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in global rice production. *Weed Biology and Management* 23, 23–33.
- Délye, Ch. (2005): Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Science* 53, 728–746.
- Délye, Ch., Michel, S. (2005): ‘Universal’ primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Research* 45, 323–330
- Délye, Ch., Gardin, J. A. C., Boucansaud, K., Chauvel, B., Petit, C. (2011): Non-target-site-based resistance should be the centre of attention for herbicide resistance research: *Alopecurus myosuroides* as an illustration. *Weed Research* 51, 433–437.
- Délye, Ch. (2012): Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Management Science* 69, 176–187.
- Délye, Ch., Jasieniuk, M., Le Corre, V. (2013): Deciphering the evolution of herbicide resistance in weed. *Trends in Genetics* 29, 649–658.
- Deng, W., Cai, J., Zhang, J., Chen, Y., Chen, Y., Di, Y., Yuan, S. (2019): Molecular basis of resistance to ACCase-inhibiting herbicide cyhalofop-butyl in Chinese sprangletop (*Leptochloa chinensis* (L.) Nees) from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 158, 143–148.
- Ekwealor, K. U., Echereme, C. B., Ofobeze, T. N., Okereke, C. N. (2019): Economic Importance of Weeds: A Review. *Asian Plant Research Journal* 3, 1–11.
- Ellstrand, N. C., Heredia, S. M., Leak-Garcia J. A., Heraty J. M., Burger J. C., Yao L., Nohzadeh-Malakshah S., Ridley C., E. (2010): Crops gone wild: evolution of weeds and invasives from domesticated ancestors. *Evolutionary Applications* 3, 494–504.
- EWRS (2022): *The five Weed Research Themes*. [online] [cit-2023-05-10] Dostupné z: <https://www.ewrs.org/en/pages/Weed-Research-Themes>
- Fang, J., He, Z., Liu, T., Li, J., Dong, L. (2020): A novel mutation Asp-2078-Glu in ACCase confers resistance to ACCase herbicides in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 168, 1–8.
- Feng, Y., Gao, Y., Zhang, Y., Dong, L., Li, J. (2016): Mechanism of Resistance to Pyroxsulam and ACCase Inhibitors in Japanese Foxtail (*Alopecurus japonicus*). *Weed Science* 64, 695–704.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A. G., Tranel, P. J., Küpper, A., Dayan, F. E. (2020): Mechanisms of evolved herbicide resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 24, 10307–10330.

- González-Torralva, F., Norsworthy, J. K. (2023): Overexpression of *Acetyl CoA Carboxylase 1* and *3* (*ACCase1* and *ACCase3*), and CYP81A21 were related to cyhalofop resistance in a barnyardgrass accession from Arkansas. *Plant Signaling & Behavior* 18, 1–10.
- Green, J. M. (2014): Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Management Science* 70, 1351–1357.
- He, B., Hu, Y., Wang, W., Yan, W., Ye, Y. (2022): The Progress towards Novel Herbicide Modes of Action and Targeted Herbicide Development. *Agronomy* 12, 1–15.
- Heap, I. (2023): *The International Herbicide-Resistant Weed Database*. [online] [cit-2023-06-27]
Dostupné z: weeds.ces.ncsu.edu/Pages/filter.aspx
- Heap, I. (2023): *The International Herbicide-Resistant Weed Database*. [online] [cit-2023-06-29]
Dostupné z: weeds.ces.ncsu.edu/Pages/filter.aspx
- Heap, I. (2023): *The International Herbicide-Resistant Weed Database*. [online] [cit-2023-07-05]
Dostupné z: weeds.ces.ncsu.edu/Pages/filter.aspx
- HRAC (2021): *Weed Fact Sheet Echinochloa crus-galli*. [online] [cit-2023-06-29] Dostupné z: [Weed Fact Sheet Echinochloa crus-galli \(hracglobal.com\)](https://hracglobal.com/weed-fact-sheet/echinochloa-crus-galli/)
- HRAC (2022): *HRAC Mode of Action Classification 2022 Map*. [online] [cit-2023-06-22] Dostupné z: <https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2022-map>
- Huan, Z. B., Zhang, H. J., Hou, Z., Zhang, S. Y., Zhang, Y., Liu, W. T., Bi, Y. L., Wang, J. X. (2011): Resistance Level and Metabolism of Barnyard-Grass (*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.) Populations to Quizalofop-p-ethyl in Heilongjiang Province China. *Agricultural Sciences in China* 10, 1914–1922.
- Huan, Z., Xu, Z., Lv, D., Wang, J. (2013): Determination of ACCase Sensitivity and Gene Expression in Quizalofop-Ethyl- Resistant and -Susceptible Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) Biotypes. *Weed Science* 61, 537–542.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Faris, J. D., Su, X., Gill, B. S., Haselkorn, R., Gornicki, P. (2002): Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology* 48, 805–820.
- Hwang, J., Norsworthy, J. K., González-Torralva, Piveta, L. B., Barber, L. T., Butts, T. R. (2022): Cross-resistance of barnyardgrass [*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.] to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 184, 1–8.
- Chen, G., Wang, L., Xu, H., Wu, X., Pan, L., Dong, L. (2017): Cross-resistance Patterns to Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors Associated with Different Mutations in Japanese Foxtail (*Alopecurus japonicus*). *Weed Science* 65, 444–451.

- Iwakami, S., Uchino, A., Watanabe, H., Yamasue, Y., Inamura, T. (2012): Isolation and expression of genes for acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase in *Echinochloa phyllopogon*, a polyploid weed species. *Pest Management Science* 68, 1098–1106.
- Iwakami, S., Hashimoto, M., Matsushima, K., Watanabe, H., Hamamura, K., Uchino, A. (2015): Multiple-herbicide resistance in *Echinochloa crus-galli* var. *formoensis*, an allohexaploid weed species, in dry-seeded rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 119, 1–8.
- Jabran, K., Chauhan, B. (2018): *Non-Chemical Weed Control*. 1. vydání. USA: Elsevier, Academic Press, 172. ISBN: 978-0-12-809881-3
- Jugulam, M., Shyam, Ch. (2019): Non-Target-Site Resistance to Herbicides: Recent Developments. *Plants* 8, 1–16.
- Jursík, M., Soukup, J., Holec, J., Venclová, V. (2010): Inhibitory biosyntézy lipidů – Inhibitory ACCasy (listové graminicidy). *Listy cukrovarnické a řepařské* 12, 445–448.
- Jursík, M., Hamouzová, K., Soukup, J., Holec, J. (2011): Rezistence plevelů vůči herbicidům a problémy s rezistentními populacemi v ČR. *Listy cukrovarnické a řepařské* 4, 123–129.
- Jursík, M., Holec, J., Hamouz, P., Soukup, J. (2018): *Biologie a regulace plevelů*. 1. vydání. České Budějovice: Kurent, s.r.o., 360. ISBN: 978-80-87111-71-0.
- Kaloumenos, N. S., Eleftherohorinos, I. G. (2009): Identification of a Johnsongrass (*Sorghum halepense*) Biotype Resistant to ACCase-Inhibiting Herbicides in Northern Greece. *Weed Technology* 23, 470–476.
- Kaundun, S. S. (2010): An aspartate to glycine change in the carboxyl transferase domain of acetyl CoA carboxylase and non-target-site mechanism (s) confer resistance to ACCase inhibitor herbicides in a *Lolium multiflorum* population. *Pest Management Science* 66, 1249–1256.
- Kaundun, S. S. (2014): Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. *Pest Management Science* 70, 1405–1417.
- Kolářová, M., Reinhardt Piskáčková, T. A., Tyšer, L., Hoová, T. T. (2023): Characterisation of Czech arable weed communities according to management and production area considering the prevalence of herbicide-resistant species. *Weed Research* 63, 57–67.
- Kraehmer, H. (2012): Innovation: Changing Trends in Herbicide Discovery. *Outlooks on Pest Management* 23, 115–118.
- Kraehmer, H., Laber, B., Rosinger, Ch., Schulz, A. (2014): Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. *Plant Physiology* 166, 1119–1131.

- Kraehmer, H., Walter, H., Jeschke, P., Haaf, K., Baur, P., Evans, R. (2021): What makes a molecule a pre- or a post-herbicide – how valuable are physicochemical parameters for their design? *Pest Management Science* 77, 4863–4873.
- Kukorelli, G., Reisinger, P., Pinke, G. (2013): ACCase inhibitor herbicides – selectivity, weed resistance and fitness cost: a review. *International Journal of Pest Management* 59, 165–173.
- Laforest, M., Soufiane, B., Simard, M. J., Obeid, K., Page, E., Nurse, R. E. (2017): Acetyl-CoA carboxylase overexpression in herbicide resistant large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Management Science* 73, 2227–2235.
- Lamichhane, J. R., Devos, Y., Beckie, H. J., Owen, M. D. K., Tillie, P., Messéan, A., Kudsk, P. (2016): Integrated weed management systems with herbicide-tolerant crops in the European Union: lessons learnt from home and abroad. *Critical Reviews in Biotechnology* 37, 459–475.
- Lan, Y., Li, W., Wei, S., Huang, H., Liu, Z., Huang, Z. (2022): Multiple resistance to ACCase- and ALS- inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 184, 1–6.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Marshall, R., Hanley, S. J., Hull, R., Moss, S. R. (2013): The presence of two different target-site resistance mechanisms in individual plants of *Alopecurus myosuroides* Huds., identified using a quick molecular test for the characterisation of six ALS and seven ACCase SNPs. *Pest Management Science* 69, 727–737.
- Martinková, Z., Honěk, A., Pekár, S., Leišova-Svobodová, L. (2021): Geographic differentiation of adaptive phenological traits of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) populations. *Weed Science* 69, 353–361.
- Merfield, Ch. N. (2022): Redefining weeds for the post-herbicide era. *Weed Research* 62, 263–267.
- Mikulka, J., Štrobach, J., Andr, J. (2015): Regulace prosovitých trav v cukrové řepě. *Listy cukrovarnické a řepářské* 3, 86–94.
- Mithila, J., Godar, A. S. (2013): Understanding Genetics of Herbicide Resistance in Weeds: Implications for Weed Management. *Advances in Crop Science and Technology* 1, 1–4.
- Murphy, B. P., Tranel, P. J. (2019): Target-site Mutations Conferring Herbicide Resistance. *Plants* 8, 1–16.
- Navas, M. L. (2012): Trait-based approaches to unravelling the assembly of weed communities and their agro-ecosystem functioning. *Weed Research* 52, 479–488.

- Nikolau, B. J., Ohlrogge, J. B., Wurtele, E. S. (2003): Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, 211–222.
- Norsworthy, J. K., Ward, S. M., Shaw, D. R., Llewellyn, R. S., Nichols, R. L., Webster, T. M., Bradley, K. W., Frisvold, G., Powles, S. B., Burgos, N. R., Witt, W. W., Barrett, M. (2012): Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science* 60, 31–62.
- Pavlović, D., Vrbničanin, S., Anđelković, A., Božić, D., Rajković, M., Malidža, G. (2022): Non-Chemical Weed Control for Plant Health and Environment: Ecological Integrated Weed Management (EIWM). *Agronomy* 12, 1–11.
- Pokorná, A., Kočár, P., Novák, J., Šálková, T., Žáčková, P., Komárková, V., Vaněček, Z., Sádlo, J. (2018): Ancient and Early Medieval man-made habitats in the Czech Republic: colonization history and vegetation changes. *Preslia* 90, 171–193.
- Powles, S. B., Yu, Q. (2010): Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *The Annual Review of Plant Biology* 61, 317–347.
- Rask, A. M., Kristoffersen, P. (2007): A review of non-chemical weed control on hard surfaces. *Weed Research* 4, 370–380.
- Reddy, K. N., Nandula, V. K. (2012): Herbicide resistant crops: History, development and current technologies. *Indian Journal of Agronomy* 57, 1–7.
- Rojas-Sandoval, J., Acevedo-Rodriguez, P. (2014): *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass). [online] [cit-2023-06-29]. Dostupné z: [Echinochloa crus-galli \(barnyard grass\) | CABI Compendium \(cabidigitallibrary.org\)](https://compendium.cabi.org/cabicompentry.do?entry=Echinochloa%20crus-galli)
- Royo-Esnal, A., Onofri, A., Taab, A., Loddo, D., Necajeva, J., Uludag, A., Synowiec, A., Calha, I. M., Lars, A., Jensen, P. K., Uremis, I., Economou, G., Murdoch, A. J., Tøressen, S. (2022): Comparing the emergence of *Echinochloa crus-galli* populations in different locations. Part II: similarities and threshold parameters. *Weed Research* 62, 203–2014.
- Sasaki, Y., Nagano, Y. (2004): Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure, Biosynthesis, Regulation, and Gene Manipulation for Plant Breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68, 1175–1184.
- Scarabel, L., Panozzo, S., Savoia, W., Sattin, M. (2014): Target-Site ACCase-Resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) Selected in Summer Dicot Crops. *Weed Technology* 28, 307–315.

- Scavo, A., Restuccia, A., Abbate C., Mauromicale, G. (2019): Seeming field allelopathic activity of *Cynara cardunculus* L. reduces the soil weed seed bank. *Agronomy for Sustainable Development* 39, 39–41.
- Scavo, A., Mauromicale, G. (2020): Integrated Weed Management in Herbaceous Field Crops. *Agronomy* 10, 2–26.
- Scavo, A., Restuccia, A., Lombardo, S., Fontanazza, S., Abbate, C., Pandino, G., Anastasi, U., Onorfi, A., Mauromicale, G. (2020): Improving soil health, weed management and nitrogen dynamics by *Trifolium subterraneum* cover cropping. *Agronomy for Sustainable Development* 40, 1–12.
- Shaner, D. L. (2014): Lessons Learned From the History of Herbicide Resistance. *Weed Science* 62, 427–431.
- Storkey, J., Neve, P. (2018): What good is weed diversity? *Weed Research* 58, 239–243.
- Štrobach, J., Mikulka, J. (2020): *Biologie a regulace jednoděložných plevelů*. 1. vydání. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 49. ISBN: 978-80-7427-341-4.
- Štrobach, J., Mikulka, J. (2021): *Faktory ovlivňující dlouhodobé změny plevelových společenstev*. 1. vydání. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 61. ISBN: 978-80-7427-364-3.
- Štefánek, M. (2018): Stále mizející polní plevel. *Ochrana přírody* 4, 2–4.
- Šuk, J., Mikulka, J., Sen, M. K., Košnarová, P., Hamouzová, K., Soukup, J. (2023): First cases of herbicide resistance of *Tripleurospermum inodorum* in the Czech Republic. *Plant, Soil and Environment* 69, 81–87.
- Takano, H. K., Ovejero, R. F. L., Belchior, G. G., Maymone, G. P. L., Dayan, F. E. (2021): ACCase-inhibiting herbicides: mechanism of action, resistance evolution and stewardship. *Sci. Agric.* 78, 1–11.
- Tong, L. (2013): Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 863–891.
- Vázquez-García, J., De Portugal, J., Torra, J., Osuna, M. D., Palma-Bautista, C., Cruz-Hipólito, H. E., De Prado, R. (2022): Comparison between the mechanism of Clearfield® wheat and *Lolium rigidum* multiple resistant to acetyl CoA carboxylase and acetolactate synthase inhibitors. *Environmental Pollution* 306, 1–10.
- Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteris, J. K., Mallory-Smith, C., Burgos, N. R., Johnson, W. G., McClelland, M. R. (2012): Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops. *Weed Science* 60, 2–30.

- Vijayarajan, V. B. A., Forristal, P. D., Cook, S. K., Staples, J., Schilder, D., Hennessy, M., Barth, S. (2020): First report on Assessing the Severity of Herbicide Resistance to ACCase Inhibitors Pinoxaden, Propaquizafop and Cycloxydim in Six *Avena fatua* Populations in Ireland. *Agronomy* 10, 1–13.
- Vijayarajan, V. B. A., Forristal, P. D., Cook, S. K., Staples, J., Schilder, D., Staples, J., Hennessy, M., Barth, S. (2021): First Detection and Characterization of Cross- and Multiple Resistance to Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase)- and Acetolactate Synthase (ALS)-Inhibiting Herbicides in Black-Grass (*Alopecurus myosuroides*) and Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) Populations from Ireland. *Agriculture* 11, 1–15.
- WSSA (1998): Resistance and tolerance definitions. *Weed Technology* 12, 789.
- WSSA (2021): *Herbicides*. [online] [cit-2023-06-22] Dostupné z: <https://wssa.net/wssa/weed/herbicides/>
- WSSA (2023): *WSSA Glossary*. [online] [cit-2023-05-10] Dostupné z: <https://wssa.net/wssa/wssa-glossary/>
- Xia, X., Tang, W., He, S., Kang, J., Ma, H., Li, J. (2016): Mechanism of metamifop inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase in *Echinochloa crus-galli*. *Scientific Reports* 6, 1–10.
- Yang, X., Han, H., Cao, J., Li, Y., Yu, Q., Powles, S. B. (2020): Exploring quinclorac resistance mechanism in *Echinochloa crus-pavonis* from China. *Pesticide Management Science* 77, 194–201.
- Yang, Q., Yang, X., Zhu, J., Wei, T., Lv, M., Li, Y. (2022): Metabolic resistance to Acetyl-CoA Carboxylase-Inhibiting Herbicide Cyhalofop-Butyl in a Chinese *Echinochloa crus-galli* population. *Agronomy* 12, 1–9.
- Yu, Q., Collavo, A., Zheng, M. Q., Owen, M., Sattin, M., Powles, S. B. (2007a): Diversity of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Mutations in Resistant *Lolium* Populations: Evaluation Using Clethodim. *Plant Physiology* 145, 547–558.
- Yu, Q., Cairns, A., Powles, S. (2007b): Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 255, 499–513.
- Yu, Q., Ahmad-Hamdani, M. S., Han, H., Christoffers, M. J., Powles, S. B. (2013): Herbicide resistance-endowing ACCase gene mutations in hexaploid wild oat (*Avena fatua*): insight into resistance evolution in a hexaploid species. *Heredity* 110, 220–231.
- Yuan, J. S., Tranel, P. J., Stewart Jr, C. N. (2006): Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science* 12, 6–13.

Zhang, X. Q., Powles, S. B. (2006): Six amino acid substitutions in the carboxyl-transferase domain of the plastidic acetyl-CoA carboxylase gene are linked with resistance to herbicides in a *Lolium rigidum* populations. *New Phytologist* 172, 636–645.

Zhang, C. J., Kim, D. S. (2016): Diagnosis ACCase inhibitor-cyhalofop-butyl resistance in *Echinochloa crus-galli* at various growth stages. *Canadian Journal of Plant Science* 97, 286–297.

Zhang, Ch., Feng, L., Tian, X. (2018): Alternations in the 5' untranslated region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*) gene influence *EPSPS* overexpression in glyphosate-resistant *Elusine indica*. *Pest Management Science* 74, 2561–2568.

Zimdahl, R. L. (2007): *Fundamentals of Weed Science*. 3. vydání. USA: Elsevier, Academic Press, 688. ISBN: 978-0-12-372518-9.

9. Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-HPPD	4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza
2-ME	2-merkapt ethanol
ABC	ATP Binding Cassette
ACCasa	acetylkoenzym A karboxyláza
ALS	acetolaktát syntáza
BC	biotin karboxyláza
BCCP	biotin karboxylový proteinový nosič
CT	acetyl-CoA transkarboxyláza
DENs	phenylpyrazoliny
DIMs	cyklohexandiony
EPSPS	5-enolpyruvylšikimát-3fosfát syntáza
EWRS	The European Weed Science Society
FOPs	aryloxy-fenoxypropionáty
GS	glutamin syntetáza
GTS	glutathion-S-transferáza
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
MoA	Mode of Action (mechanismus působení)
NTSR	Non-target-site resistance
PDS	fytoendesaturáza
PPO	inhibitory syntézy porfyrinů
TSR	Target-site resistance
WSSA	Weed Science Society of America