

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Bakalářská práce**



**Olomouc 2013**

**Radka Stýblová**

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Molekulární detekce herbicid  
rezistentních plevelů**

Bakalářská práce

**Radka Stýblová**

Studijní program: Matematika

Studijní obor: Matematika-biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

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

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma Molekulární detekce herbicid rezistentních plevelů vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Vladana Ondřeje, Ph.D. a použila pouze uvedených pramenů a literatury.

V Olomouci, dne

Podpis.....

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla. Rovněž děkuji své rodině za psychickou a materiální podporu po celou dobu studia.

## Shrnutí:

Jméno a příjmení autora: Radka Stýblová

Název práce: Molekulární detekce herbicid rezistentních plevelů

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky

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

Rok obhajoby práce: 2013

Shrnutí:

Rezistence plevelů vůči herbicidům je v současné době velmi významný celosvětový problém. Vznikla nezávisle na používání herbicidů jako spontánní mutace, ale jejich velkoplošným dlouhodobým používáním se rozšířila. Způsobila výraznou změnu v druhovém spektru plevelů a také v jejich regulaci. Důležitou součástí této problematiky se stala diagnostika rezistentních jedinců, kteří nejsou na první pohled rozpoznatelní od jedinců citlivých. Tato práce se zabývá shrnutím poznatků o plevelných společenstvech, rezistencí vůči herbicidům a molekulární detekcí rezistentních jedinců.

V praktické části této práce byla metodicky zvládnuta molekulární detekce herbicid rezistentních plevelů. Byly sledovány dva geny ACC1 a ACC2 ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) sbírané na polích kraje Vysočina a Olomouckého kraje, u kterých záměnou aminokyselin může dojít ke vzniku rezistence vůči herbicidům, které inhibují acetylkoenzym A karboxylázu. Také byl sledován gen ITS. Rezistentní jedinci nebyli detekováni.

Klíčová slova: plevel, herbicidy, rezistence plevelů, ježatka kuří noha, molekulární detekce rezistence

Počet stran: 66

Počet příloh: 1

Jazyk práce: Čeština

## Summary:

Autor's first name and surname: Radka Stýblová

Title: Molecular detection of herbicide resistance weeds

Type of thesis: Bachelor's thesis

Department: Department of Botany

Supervisor: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Summary:

Resistance of weeds to herbicides is currently a very significant problem around the world. It developed independently of herbicide usage as a spontaneous mutation, but by the widespread and long term use of herbicides it spread. This resistance caused a notable change in the variety of weed species and their regulation. The important part of this problem is recognizing the resistant specimens that are not noticeable at first glance from the vulnerable specimens. This work summarizes the findings about weed, resistance to herbicides and molecular detection of resistant specimens.

The molecular detection of resistant weed specimens was handled in the practical part of this bachelor thesis. Two genes ACC1 and ACC2 of the *Echinochloa crus-galli* L. P. Beauv. were observed on gathered specimens from Vysočina and Olomouc regions. On these specimens, the exchange of amino acids can cause the development of resistance to herbicides that inhibit the acetyl coenzyme A carboxylase. Also gen ITS was observed. Resistant specimens were not detected.

Keywords: weeds, herbicide, resistance of weeds, common barnyard grass,  
molecular detection of resistance

Number of pages: 66

Number of appendices: 1

Language: Czech

# Obsah

<b>1</b>	<b>Cíl práce .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>2</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>3</b>	<b>Současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>- 11 -</b>
3.1	Herbologie .....	- 11 -
3.2	Definice pojmu „plevel“ .....	- 11 -
3.3	Rostliny plevelné a zaplevelující .....	- 11 -
3.4	Hospodářský význam plevelů .....	- 12 -
3.4.1	Škodlivost plevelů .....	- 13 -
3.4.1.1	Negativní vztah s plodinou .....	- 13 -
3.4.1.2	Snížení kvality produkce .....	- 13 -
3.4.1.3	Hostitelství chorob a škůdců .....	- 14 -
3.4.1.4	Zdravotní rizika .....	- 14 -
3.4.2	Užitečnost plevelů .....	- 14 -
3.5	Klasifikace plevelů .....	- 15 -
3.5.1	Klasifikace podle biologických vlastností .....	- 15 -
3.5.1.1	Plevele jednoleté .....	- 15 -
3.5.1.2	Dvouleté až vytrvalé plevele .....	- 17 -
3.6	Regulace plevelů .....	- 21 -
3.6.1	Metody regulace.....	- 21 -
3.6.1.1	Nepřímá – prevence .....	- 21 -
3.6.1.2	Přímá.....	- 21 -
3.6.2	Klasifikace herbicidů .....	- 23 -
3.6.2.1	Podle selektivity .....	- 23 -
3.6.2.2	Podle doby použití .....	- 24 -
3.6.2.3	Podle způsobu účinku.....	- 24 -
3.6.2.4	Podle doby aplikace s ohledem na vývojovou fázi plevelů ....	- 24 -
3.6.2.5	Podle doby trvání účinku.....	- 25 -
3.6.2.6	Podle mechanismu účinku .....	- 25 -
3.7	Rezistence plevelů vůči herbicidům .....	- 27 -
3.7.1	Pojem rezistence.....	- 28 -
3.7.2	Zvláštní typy rezistencí.....	- 29 -
3.7.3	Vznik rezistence .....	- 29 -
3.7.4	Mechanismy rezistence.....	- 30 -
3.7.5	Rozdíly mezi rezistentními a citlivými plevely .....	- 32 -
3.7.6	Diagnostika pomocí laboratorních metod .....	- 33 -
3.7.7	Strategie minimalizující vznik rezistence k herbicidům .....	- 35 -
3.7.8	Regulace rezistentních plevelů.....	- 36 -
3.7.9	Přehled rezistentních druhů na území ČR .....	- 36 -
3.7.10	Rezistence u vybraných druhů plevelů .....	- 38 -
3.7.10.1	Echinochloa crus-galli (L.) P. Beauv. ....	- 38 -
3.8	Molekulárně-biologické metody.....	- 41 -
3.8.1	Polymerázová řetězová reakce .....	- 41 -
3.8.2	Elektroforéza .....	- 42 -
3.8.3	Sekvenování DNA.....	- 43 -
3.8.4	Bioinformatické zpracování .....	- 43 -
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>- 44 -</b>
4.1.1	Biologický materiál .....	- 44 -
4.1.2	Seznam použitých roztoků a médií.....	- 44 -
4.1.3	Vybavení laboratoře .....	- 44 -
4.1.4	Sběr pokusných rostlin.....	- 45 -

4.1.5	Izolace DNA .....	- 46 -
4.1.6	PCR reakce (polymerázová řetězová reakce) .....	- 47 -
4.1.7	Elektroforéza .....	- 48 -
4.1.8	Purifikace PCR produktů a sekvenace .....	- 48 -
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>- 54 -</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>- 55 -</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>- 55 -</b>
<b>10</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>- 61 -</b>



# 1 Cíl práce

Cílem práce je shromáždit a zpracovat dosavadní literaturu týkající se molekulární detekce rezistentních plevelů. Rešerše se zaměřuje na vymezení pojmu plevel, hospodářský význam, klasifikaci a regulaci plevelů, herbicidy, rezistenci vůči herbicidům, rezistenci u ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv) a metody diagnostiky rezistentních jedinců, převážně molekulární metody.

Praktická část se zabývá metodikou molekulární detekce herbicid rezistentních jedinců, zahrnuje: sběr ježatky kuří nohy, izolaci DNA, metodu PCR, elektroforézu, purifikaci a zpracování bioinformatických dat.

## 2 Úvod

Rezistence plevelů vůči herbicidům nebyla v minulosti na rozdíl od insekticidů, přípravků určených k hubení hmyzu, předpovídána. Vzhledem k jejich pomalé reprodukci (jedna generace za rok), střídání herbicidů a plodin v osevu se vznik rezistence nezdál aktuální (Mikulka *et al.*, 1999). Od počátku 60. let 20. století došlo k nárůstu rezistentních jedinců, v současné době jsou rezistentní populace rozšířeny po celém světě. „Rezistenci plevelů vůči herbicidům lze definovat jako dědičnou schopnost plevelů odolávat takové dávce herbicidů, kterou by za normálních okolností byla populace spolehlivě potlačena.“ (Jursík *et al.*, 2011c). Důležitým faktorem je také vznik křížové rezistence, neboli rezistence k herbicidům se stejným mechanismem účinku (Jursík *et al.*, 2011a). K regulaci plevelů je zapotřebí znát nejen jejich biologické vlastnosti, ale i mechanismy účinku herbicidů. Velmi důležitým problémem je také diagnostika rezistentních jedinců, kteří jsou morfologicky identičtí s citlivými jedinci. Tím se do popředí dostávají diagnostické metody (Jursík *et al.*, 2011c).

## 3 Současný stav řešené problematiky

### 3.1 Herbologie

V současné době je studium problematiky ochrany proti plevelům v ohnisku zájmu pracovníků rostlinné výroby po celém světě (Dvořák *et* Smutný, 2003). Z tohoto důvodu vznikla vědní disciplína zabývající se podrobně teoreticky i prakticky řešením komplexní ochrany proti plevelům (Kohout *et al.*, 1996), nazývajících se herbologie (*herba* = latinsky rostlina) (Dvořák *et* Smutný, 2003).

### 3.2 Definice pojmu plevel

Vytvoření obecné definice pojmu plevel je velmi složité, protože neexistuje ostrá hranice mezi kulturními a planými rostlinami, všechny dnešní kulturní rostliny byly kdysi planými a také můžeme předpokládat, že z některých planých rostlin se do budoucna stanou rostliny kulturní. Záleží především na okolí uvažované rostliny. Stejná rostlina může být považována jak za pěstovanou – např. léčivá rostlina blín černý (*Hyoscyamus niger L.*), tak na jiném stanovišti např. rumišti (člověkem pozměněné, neudržované místo) za neškodnou, ale v porostu máku za nežádoucí plevel. To znamená, že určitý druh se stává plevelem až ve spojení s určitým prostředím (Hron *et* Vodák, 1959).

Nejstarší definice pojmu plevel z roku 1795 dle Mehlera zní: „Slovem plevel rozumí zemědělec ony rostliny, které na újmu jím úmyslně pěstovaným, užitečným, ‚zkroceným‘ proti jeho a bez jeho námahy na polích divoce rostou, bují a do polí se šíří a dobrým rostlinám potravu odnímají a jejichž vyhubení mu způsobuje mnohé obtíže, práce a výlohy.“ Základem současného pojetí plevelů a asi nejužitečnější definicí je : „Plevelem je každá rostlina, která se vyskytuje na poli proti vůli pěstitelově vedle určité pěstované plodiny.“ (Hron *et* Vodák, 1959). Souborným názvem pro plevelné rostliny vyskytující se na obhospodařovaných územích je termín „segetální rostliny“ (Kubát, 1998).

### 3.3 Rostliny plevelné a zaplevelující

Plevelem jsou nejen všechny druhy planých rostlin, které rostou na poli mezi pěstovanými plodinami, ale také všechny ostatní nežádoucí rostliny jiných kulturních

druhů. V praxi to znamená, že například žito je v porostu pšenice plevelem stejně jako oves v ječmeni atd. Za plevel také pokládáme rostlinu téhož druhu, ale jiné odrůdy.

V porostech pěstovaných plodin rozlišujeme rostliny plevelné, tedy rostliny divoce rostoucí, které se na pozemek dostaly nezáměrně a rostliny zaplevelující. Tedy druhy kulturní, které se objevily na pozemku jako nežádoucí příměs (například žito v pšenici) (Hron *et* Vodák, 1959). Tito jedinci jsou převážně označováni jako výdrol (Jursík *et al.*, 2011a) neboli sklizňové ztráty (Kohout *et al.*, 1996). V období zralosti obilnin a také při sklizni se dostávají na povrch půdy obilky z ulomených klasů, plody či hlízy a jsou vpracovány do půdy (Dvořák *et* Smutný, 2003). Mohou vzcházet hned v další sklizni či být zpracováním půdy vpraveny do hlubších vrstev a zaplevelovat plodiny i několik let poté. V dnešní době patří mezi nejvíce problematické obilniny, které zaplevelují ozimé řepky, či samotná řepka v ostatních porostech (Jursík *et al.*, 2011a). Bylo dokázáno, že 83 % semen řepky přežije 18 měsíců a poměrně velké množství přežívá ještě v řádu několika let (Dvořák *et* Smutný, 2003). V České republice bylo pozorováno zaplevelení řepkou i 24 let po jejím posledním pěstování (Fišer, 1997). Snahou zemědělce je před setím následné plodiny odstranit tento výdrol tzv. předset'ovou přípravou (Kohout *et al.*, 1996).

Problémem také mohou být geneticky modifikované plodiny tzv. GMO, které obsahují geny rezistence vůči herbicidům. Regulace plevelů je snadnější, herbicid lze použít na vzešlé rostliny a to i vícekrát po sobě. Tato GMO plodina se může stát dominantní a šířit se jako plevel, či může dojít k přenesení genu do běžného plevele (Mikulka *et* Kneifelová, 2003).

### **3.4 Hospodářský význam plevelů**

Polní plevele představují rostliny s určitými specifickými vlastnostmi, které jim umožňují úspěšně se prosazovat v kulturních plodinách. Mezi tyto vlastnosti u jednoletých druhů patří: rychlý růst, vysoká konkurenceschopnost, tolerance k podmínkám stanoviště, vysoká produkce semen, průběžné dozrávání a rychlý přechod do generativní fáze. U vytrvalých druhů: intenzivní vegetativní šíření, vysoká schopnost regenerace, schopnost zůstat v půdě – vzdorovat mechanickému odstraňování.

Kromě vysloveně škodlivých druhů se v kulturních plodinách vyskytují i takové, které svojí přítomností vyloženě neškodí, jsou součástí rozmanitosti daného

společenstva a plní řadu ekologických funkcí. Hovoříme o takzvaných doprovodných či asociovaných rostlinách (Jursík *et al.*, 2011a).

Dříve se z hlediska hospodářské činnosti posuzoval zejména ekonomický dopad plevelů a cílem byla jejich intenzivní redukce. V dnešní době je nutno hodnotit široký dopad plevelů v ekologickém zemědělství, tzn. nejen jejich škodlivost, ale také i užitečnost (Kohout *et al.*, 1996).

### 3.4.1 Škodlivost plevelů

#### 3.4.1.1 Negativní vztah s plodinou

Společenstvu kulturních rostlin a plevelů rostoucích v určitých podmínkách se říká dle profesora Kozo-Poljanského agrofytocenóza (Dvořák, 1998).

V případě polních plevelů se jedná především o rostliny, které negativně interagují s pěstovanými plodinami. Jde o konkurenci-kompetici, parazitismus či alelopatii (Jursík *et al.*, 2011a).

**Konkurence-kompetice** je soutěž rostlin o využívání stejných zdrojů, např. zdroj energie, půdní vlhkosti (Kohout *et al.*, 1996). Dochází k ní, když v určitém porostu roste více jedinců než je zdrojů pro jejich výživu (Mikulka *et al.*, 1999). Například ozimá řepka je ze začátku vývoje velmi citlivá na zaplevelení, protože její prvotní vývoj je oproti vývoji plevelů pomalý (Jursík *et al.*, 2011a).

**Parazitismus** je vztah mezi hostitelskou rostlinou a parazitem, který hostiteli odebírá látky potřebné pro jeho výživu (vodu, živiny atd.). Jako příklad můžeme uvést rod kokotice (*Cuscuta L.*), který je tzv. pravým parazitem, zcela závislým na hostitelské rostlině. Z čeledi krtičníkovitých například černýš rolní (*Melampyrum arvense L.*), který je poloparazitickým plevellem majícím schopnost fotosyntézy (Jursík *et al.*, 2011a).

**Alelopatie** je specifický vliv jednoho druhu (donora) na klíčení, růst a vývoj druhého druhu (recipienta) (Kohout *et al.*, 1996). Donor, neboli inhibitor, uvolňuje do prostředí látky, které brání růstu recipienta neboli akceptora. Jako příklad inhibitora můžeme uvést pýr plazivý (*Elytrigia repens (L.) Nevski*) (Jursík *et al.*, 2011a).

#### 3.4.1.2 Snížení kvality produkce

Plevelné rostliny:

- odebírají půdní vláhu pěstovaným plodinám

- ochuzují pěstované plodiny o živiny
- zastíňují a potlačují pěstované plodiny, brzdí jejich vývoj
- snižují produktivitu práce (Hron *et* Vodák, 1959)
- snižují výnos sklizně
- znehodnocují zemědělské výrobky
- zhoršují jakost semen u některých plodin (Deyl, 1964)
- zvyšují náklady na sklizeň, posklizňovou úpravu a pěstování
- mohou parazitovat

#### **3.4.1.3 Hostitelství chorob a škůdců**

Plevelné rostliny:

- působí jako hostitelské rostliny a přenašeči patogenů
- poskytují útočiště škůdcům a parazitům (Kalinová *et al.*, 2007)

#### **3.4.1.4 Zdravotní rizika**

Plevelné rostliny:

- mohou způsobovat alergie nebo být toxické (Kalinová *et al.*, 2007)
- mohou způsobit otravy hospodářského zvířectva
- působí obtíže dobytku mechanickým zraňováním (Deyl, 1964)

#### **3.4.2 Užitečnost plevelů**

Plevelné rostliny:

- slouží jako zdroj potravy pro hospodářská zvířata (Kalinová *et al.*, 2007)
- při zaorávání jsou cenným humusotvorným materiálem (Kohout *et al.*, 1996)
- mohou chránit půdu před erozí vodní a větrnou (Deyl, 1964)
- poskytují pastvu včelám (Kohout *et al.*, 1996)
- jsou vhodné pro výživu lidí
- jako léčivé bylinky
- přispívají k udržení biodiverzity a mají ekologickou funkci (Kalinová *et al.*, 2007)
- mohou poskytovat technický olej, kaučuk, barviva apod. (Deyl, 1964)

### 3.5 Klasifikace plevelů

Mezi nejdůležitější kroky při zjišťování zaplevelení patří identifikace a klasifikace plevelů (Kalinová *et al.*, 2007). Při pokusech o zařazování plevelů do určitých větších celků, skupin, v nichž jsou obsaženy rostliny určitým způsobem podobné, můžeme postupovat podle několika hledisek.

Jediná zcela jednoznačná klasifikace je podle botanického systému. Nevýhodou je, že vedle sebe stojí druhy botanicky příbuzné, ale například s rozdílnou škodlivostí. Pro účely regulace by měla být jasná příbuznost z hlediska boje proti jednotlivým druhům (Hron *et Vodák*, 1959).

Existuje mnoho způsobů dělení plevelů, podle výskytu v jednotlivých plodinách, vazby na lokalitu, hlavních biologických vlastností atd. (Kazda *et al.*, 2010).

Dělení podle výskytu v určitých kulturních plodinách se z běžného pohledu zdá být výhodné. Plevelé se často objevují v určitých pro ně typických plodinách, ale stejně tak se vyskytují i v plodinách jiných, které mají odlišný způsob regulace. Jako příklad lze uvést merlík bílý (*Chenopodium album L.*), který je typický pro okopaniny, ovšem roste i v obilí či luskovinách. Proto je klasifikace z tohoto hlediska méně významná a přesná (Hron *et Vodák*, 1959).

Dělení podle vztahu k určitému typu lokality také není zcela výhodné. U nejdůležitějších druhů nelze najít ostrou hranici rozšíření, rostliny často preferují různé typy stanovišť a nelze rozhodnout, které je pro ně typičtější (Hron *et Vodák*, 1959).

Asi nejvýhodnější klasifikací je klasifikace podle hlavních biologických vlastností (délka života, způsob rozmnožování, hloubka zakořenění atd.), podle nichž můžeme zvolit vhodný způsob regulace (Kazda *et al.*, 2010).

#### 3.5.1 Klasifikace podle biologických vlastností

##### 3.5.1.1 Plevelé jednoleté

Tyto druhy se rozmnožují pouze generativně, to znamená prostřednictvím plodů a semen, a to v rámci jedné sezóny. Rostliny vzcházejí, kvetou a plodí v témže roce. Ozimé druhy vzcházejí na podzim a po přezimování pokračují ve vývoji, dozrávají a plodí (Jursík *et al.*, 2011a).

### **a) Efemérní plevelle**

Vyznačují se velmi krátkým životním cyklem, což vysvětluje pojem efemérní plevelle – *efeméra* = obecně rychle pomíjející věc (Dvořák *et al.*, 2003). Vycházejí na podzim, během zimy i velmi časně na jaře (jařiny). Využívají prořídle, prosvětlené porosty plodin (Kohout *et al.*, 1996). Svoji činnost ukončují na jaře. Jedná se o druhy spíše drobného vzrůstu, které plodině příliš nekonkurují. Jako typický příklad můžeme uvést osívku jarní (*Erophila verna* (L.) Cheval.) či rozrazil břechťanolistý (*Veronica hederifolia* L.). Jedná se o málo nebezpečné druhy (Mikulka *et al.*, 1999) a o nejméně početnou skupinu (Kohout *et al.*, 1996). Speciální zákrok proti nim zpravidla nebývá nutný (Jursík *et al.*, 2011a).

### **b) Plevelle časně jarní**

Začínají svůj vývoj velmi časně na jaře, při teplotách mírně nad 0 °C. Řada z nich vychází i později v průběhu vegetace (Kazda *et al.*, 2010). Zaplevelují jarní plodiny (obilniny, luskoviny). Obvykle nejsou schopny přežít zimu (Jursík *et al.*, 2011a). Předset'ovou přípravou jarních plodin bývají značně zničeny (Dvořák *et al.*, 2003). Produkují střední množství semen s dlouhou dormancí (klidové období) a schopností přežít v půdě. Mezi typické příklady patří oves hluchý (*Avena fatua* L.), drchnička rolní (*Anagallis arvensis* L.) (Jursík *et al.*, 2011a), hořčice polní (*Sinapis arvensis* L.) (Mikulka *et al.*, 1999).

### **c) Plevelle pozdně jarní**

Patří sem teplomilnější druhy plevelů (Jursík *et al.*, 2011a), klíčící během jara, léta a teplejšího podzimu při vyšších teplotách půdy (kolem 10 °C) (Mikulka *et al.*, 1999). Hromadně se objevují po zasetí jarních plodin (koncem dubna až začátkem května) (Kalinová *et al.*, 2007). Preferují nezapojené porosty jařin či prořídle porosty ozimů. V zapojených porostech se prosazují obtížně, bývají citlivé na zastínění. Typické jsou pro okopaniny (cukrová řepa, lilek brambor) (Mikulka *et al.*, 1999). Mohou vytvářet mohutné rostliny s bohatou produkcí drobných semen se střední až dlouhou dobou dormance. Období zimy nejsou schopné přežít. Typickými jsou bažanka roční (*Mercurialis annua* L.), ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), merlík bílý (*Chenopodium album* L.), rdesno blešník (*Persicaria lapathifolia* (L.) Delarbre) atd. (Jursík *et al.*, 2011a).



#### **d) Plevelle ozimé (přezimující)**

Do této skupiny patří velmi významné druhy plevelů. Zaplevelují většinu v současné době pěstovaných plodin, jedná se o velmi variabilní druhy (Kazda *et al.*, 2010). Většina vzchází v období podzimu a přezimuje ve formě listových růžic, i když některé druhy jsou schopny za určitých podmínek v zimě i kvést, časně na jaře pokračují ve vývoji. Některé druhy vzcházejí v průběhu celého vegetačního období. Semena mívají kratší až středně dlouhou dormanci. Typické jsou pro ozimé plodiny (Jursík *et al.*, 2011a). Do této skupiny patří chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. Beauv.), kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.), hluchavka objímavá (*Lamium amplexicaule* L.), chrpa polní (*Centaurea cyanus* L.) (Kazda *et al.*, 2010), penízek rolní (*Thlaspi arvense* L.) atd. (Jursík *et al.*, 2011a).

### **3.5.1.2 Dvouleté až vytrvalé plevelle**

#### **a) Dvouleté až vytrvalé plevelle rozmnožující se převážně generativně**

Zaplevelují víceleté plodiny, trvalé kultury (Jursík *et al.*, 2011a) a také neobdělávanou půdu (Kohout *et al.*, 1996), pro jednoleté plodiny nejsou typické (Mikulka *et al.*, 1999). Rozmnožují se převážně generativně, ale většina je schopna se množit i vegetativně pomocí kořenů. Rostlina v prvním roce vytváří listovou růžici a po přezimování kvete a plodí, následně umírá (u dvouletých) nebo pokračuje ve vývoji (u víceletých). Mezi dvouleté druhy patří mrkev obecná (*Daucus carota* L.), škarda dvouletá (*Crepis biennis* L.). Víceleté druhy jsou pampelišky (*Taraxacum Weber ex F.H. Wigg.*), šťovíky (*Rumex* L.), jitrocele (*Plantago* L.) apod. Existují i druhy, které se mohou chovat jako dvouleté i jako ozimé, mezi ně patří například locika kompasová (*Lactuca serriola* L.), bolehlav plamatý (*Conium maculatum* L.) (Jursík *et al.*, 2011a). V jednoletých plodinách nejsou tak nebezpečné, protože jejich listové růžice jsou zpracováním půdy zničeny. Výjimkou jsou plevelle s mohutnějšími a hlouběji pronikajícími kořeny, z jejichž zbytků mohou regenerovat (Kohout *et al.*, 1996).

#### **b) Vytrvalé plevelle rozmnožující se převážně vegetativně**

Rozmnožují se převážně vegetativně pomocí nadzemních či podzemních orgánů, intenzivně se rozrůstají a šíří. Jsou ale schopny i generativního rozmnožování, ke kterému dochází na neobhospodařovaných lokalitách (Kazda *et al.*, 2010). Z toho

vyplývá, že způsob rozmnožování závisí na podmínkách stanoviště. Další klasifikace vychází z hloubky, do které pronikají vegetativní orgány (Mikulka *et al.*, 1999). Patří sem velmi škodlivé a úporné plevely polí a zahrad (Kohout *et al.*, 1996).

#### I. Plevely mělčejí kořenící

Vegetativní orgány se nacházejí buď na povrchu půdy, nebo pronikají do menších hloubek ornice (úrodná vrstva půdy vznikající zemědělskou činností). Díky tomu je možná regulace při zpracování půdy (Jursík *et al.*, 2011a).

##### a) Plevely se šlahouny

Málo významná skupina, jejíž zástupci se vyskytují na okrajích pozemků, v zamokřených oblastech či víceletých pícninách (rostliny pěstované ke krmným účelům) (Jursík *et al.*, 2011a). Rostliny vytvářejí článkované lodyhy, které se nepravidelně rozrůstají od mateřské rostliny všemi směry, v uzlinách lodyh zakořeňují a vytvářejí nové listové růžice. Patří sem mochna husí (*Potentilla anserina* L.), pryskyřník plazivý (*Ranunculus repens* L.) či popenec obecný (*Glechoma hederacea* L.) (Kazda *et al.*, 2010).

##### b) Plevely s tuhými, pevnými oddenky

Jedná se především o trávy, které v ornici vytvářejí kořenový systém složený z horizontálních či šikmě uložených oddenků (Kazda *et al.*, 2010). Ty jsou tuhé, pevné a článkované, každý článek je zakončen uzlinou, která obsahuje pupeny, ze kterých vyrůstají kořeny, oddenky či nadzemní části. Jsou schopny regenerace i z krátkého segmentu oddenku. V nepříznivých podmínkách převažuje generativní rozmnožování. Zaplevelují všechny typy plodin, nejdůležitějším zástupcem je pýr plazivý (*Elytrigia repens* (L.) Nevski), dále medyněk měkký (*Holcus mollis* L.), troskut prstnatý (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.), psineček výběžkatý (*Agrostis stolonifera* L.) (Jursík *et al.*, 2011a).

##### c) Plevely s měkkými, křehkými oddenky

Velmi křehké oddenky prostupují celou vrstvu ornice, snadno se lámou, jejich části jsou roznášeny po poli a dochází k dalšímu zaplevelení (Mikulka *et al.*, 1999). Zpravidla indikují vysokou hladinu podzemní vody. Řadíme sem mátu rolní (*Mentha arvensis* L.), čistic bahenní (*Stachys palustris* L.) (Jursík *et al.*, 2011a).

d) Plevelé vytvářející hlízy, cibule

Jedná se o rozmanitou skupinu, která má zásobní látky uložené ve formě kořenových hlíz, ztlustlých kořenů, cibulí (Jursík *et al.*, 2011a). Vegetativní orgány jsou uloženy v různé hloubce ornice i v podorniční vrstvě. Mohou být rozšiřovány mechanizací, nářadím či půdou (Mikulka *et al.*, 1999). Vegetativní orgány slouží hlavně k udržení na stanovišti, rozmnožování probíhá generativními orgány – semeny (Kohout *et al.*, 1996). Nejsou příliš ovlivňovány nepříznivými klimatickými podmínkami, dlouho vytrvávají ve vlhčích porostech (Mikulka *et al.*, 1999). Jedná se o hrachor hlíznatý (*Lathyrus tuberosus L.*) (hlízy), česnek viničný (*Allium vineale L.*) (cibule) a například rukev obecnou (*Rorippa sylvestris (L.) Besser*) (kořeny) (Jursík *et al.*, 2011a).

## II. Plevelé hlouběji kořenící

Mezi ně řadíme plevele s bohatě větvenými podzemními vegetativními orgány, které vytvářejí systém vodorovných a svislých výběžků. Vodorovné výběžky zasahují do ornice a svislé pronikají hluboko do podorničních vrstev (Mikulka *et al.*, 1999) (až několik metrů) (Kohout *et al.*, 1996). Znemožňuje to mechanickou regulaci, protože část výběžků zůstane v půdě a rostliny mohou opět regenerovat. Většinou se jedná o druhy s vysokou konkurenceschopností vůči plodině. Podle výběžků je dále rozdělujeme na dvě podskupiny: plevele vytvářející oddenky a plevele s kořenovými výběžky (Jursík *et al.*, 2011a).

a) Plevelé bylinné vytvářející oddenky

Oddenky jsou podzemní výběžky stonkového původu (Jursík *et al.*, 2011a). Nesou na svých článcích osní a listové pupeny, které bývají chráněny šupinami. Patří sem bršlice kozí noha (*Aegopodium podagraria L.*), přeslička rolní (*Equisetum arvense L.*), čísteč bahenní (*Stachys palustris L.*) (Kazda *et al.*, 2010).

b) Plevelé bylinné s kořenovými výběžky

Kořenové výběžky nejsou článkované, mají obdobnou anatomickou stavbu jako kořeny (Mikulka *et al.*, 1999). Sahají zpravidla velmi hluboko do půdy, až několik metrů (Kazda *et al.*, 2010). V porovnání s oddenky jsou stonkové a kořenové pupeny rozmístěny nepravidelně po celém obvodu výběžků (Mikulka *et al.*, 1999). Kořenové výběžky jsou snadno lámavé, mohou regenerovat a dále se vegetativně rozmnožovat. Z tohoto důvodu je mechanické odstraňování prakticky nemožné. Příklady zástupců:

pcháč rolní (*Cirsium arvense* (L.) Scop.), mléč rolní (*Sonchus arvensis* L.), svlačec rolní (*Convolvulus arvensis* L.) (Jursík *et al.*, 2011a).

c) Plevelé dřevinné s kořenovými výběžky

Podzemní nečláňkované kořenové výběžky spolu s nadzemními částmi dřevnatí (silně prostoupeny ligninem), jsou pevné a tuhé. Činí potíže při zpracování půdy a mohou zhoršovat sklizeň. Řadíme sem ostružiník ježiník (*Rubus caesius* L.), bez chebdí (*Sambucus ebulus* L.) (Kazda *et al.*, 2010).

### 3.5.1.3 Plevelé poloparazitické a parazitické

Řadíme sem druhy, které jsou různou mírou závislé na hostiteli. Dělíme je na poloparazity a pravé parazity neboli holoparazity (Jursík *et al.*, 2011a).

a) Poloparazité

Zelené druhy s autotrofní výživou (dokáží přeměňovat anorganické látky na organické) (Mikulka *et al.*, 1999), které odebírají hostiteli vodu a minerální látky (Jursík *et al.*, 2011a) pomocí přísavných kořínků tzv. haustorií. Tyto kořínky pronikají do vodivých pletiv kořenů hostitele (Mikulka *et al.*, 1999). Patří sem druhy z čeledi krtičníkovitých (*Scrophulariaceae* Juss.) např. kokrhel luštinec (*Rhinanthus alectorolophus* (Scop.) Pollich). Parazitují na kořenech trav a v minulosti i na kořenech obilnin (Jursík *et al.*, 2011a). V dnešní době je tato skupina na polích vzácná (Kohout *et al.*, 1996).

b) Holoparazité

Jsou zcela závislí na hostiteli, mohou postrádat chlorofyl. Hostitelské rostlině odebírají látky potřebné pro růst. Mohou napadat nadzemní části hostitele (Jursík *et al.*, 2011a) a vytvářet ovíjivé lodyhy bez listů s přísavkami pro přichycení, např. kokotice evropská (*Cuscuta europaea* L.). Mohou také napadat kořeny hostitele, např. záraza žlutá (*Orobancha lutea* Baumg.) (Mikulka *et al.*, 1999). V České republice jsou řazeny mezi karanténní plevele a podle zákona je povinností tyto druhy redukovat. V posledních letech jsou na ústupu, některé jsou ohroženy zánikem, je potřeba přehodnotit jejich hubení (Kohout *et al.*, 1996).

## 3.6 Regulace plevelů

Jednou z nejdůležitějších věcí při pěstování plodin je regulace plevelů. Při výběru vhodného ošetření je důležité řídit se zkušenostmi z předchozích let a současným stavem zaplevelení. Také je důležité uvažovat nad technickými možnostmi zvládnutí aplikace (Štěpánek, 2005a). Pro regulaci plevelů nelze vybrat jednotnou metodu boje, aby byla úspěšná, musí být zapojen celý komplex metod (Hron *et* Vodák, 1959). Ten zahrnuje diagnózu, prognózu a regulaci (Hron, 1969). Diagnóza je klasifikace plevelů ve všech růstových a vývojových fázích (Kohout *et al.*, 1996). Prognóza vývoje je odhad předpokládané škody a ekonomického dopadu (Dvořák, 1998). Poté už můžeme určit komplexní postup hubení plevelů, pro který od roku 1970 používáme pojem regulace (Dvořák *et* Smutný, 2003).

### 3.6.1 Metody regulace

#### 3.6.1.1 Nepřímé – prevence

Mezi metody nepřímé patří: zabránění dozrávání semen plevelů, používání kontrolovaného osiva, kompostu a hnoje bez semen plevelů, zabránění šíření očištěním strojů (Kalinová *et al.*, 2007), střídání plodin, zpracování půdy (Soukup, 2005). Význam těchto preventivních metod spočívá ve vytvoření dlouhodobého příznivého stavu zaplevelení, a tím snazší druhotné přímé regulace (Jursík *et al.*, 2011a). V ekologickém zemědělství je vyloučeno používání herbicidů, takže regulace je možná pouze těmito preventivními metodami (Konvalina *et al.*, 2008).

#### 3.6.1.2 Přímé

##### I. fyzikální

##### a. mechanické

Cílem je odstranění plevelů ještě před jejich dozráním a vysemeněním (Hron *et* Vodák, 1959) a zároveň podpora pěstované plodiny kypřením půdy (Kohout *et al.*, 1996). Před zavedením herbicidů byla tato metoda hlavní metodou boje proti plevelům. Nejjednodušším a velmi účinným opatřením je pletí nebo okopávka, ovšem její celoplošné využití není možné z důvodu časové i finanční náročnosti. Mezi další metody můžeme zařadit vláčení

pomocí prutových bran či mulčování (pokrytí plochy folií, textilií nebo odpadem ze sklizně) (Jursík *et al.*, 2011a).

#### b. termické

Využívá se u pomalu klíčících plodin v období před vzejitím. V důsledku přehřátí rostliny dochází k nevratným změnám a následnému úhynu. Pozemek se ošetřuje po celé ploše, zasaženy jsou již rostoucí plevele, k poškození plodiny nedochází. V praxi se nejvíce používají stroje pracující na bázi účinku plamene vznikajícího spalováním plynu (Soukup, 1999). Tato metoda se také používá v zahradnictví k údržbě komunikací (Vanc, 2001).

### II. biologické

Zahrnují boj využívající patogenů nebo živočišných škůdců. Jsou použitelné pouze pro monokultury (porost tvořený jedním druhem rostliny) a proti malému množství plevelů (Soukup, 1999). Hrozí nebezpečí, že budou napadeny i druhy příbuzné pěstovaným plodinám, škůdců úzce specializovaných je velmi málo (Hron *et Vodák*, 1959). Naopak výhodou je autoregulace – množí-li se plevele, množí se zároveň i jejich škůdci, a tím dochází k redukci (Deyl, 1964). Tyto metody nejsou u nás v praxi běžně využívány (Soukup, 1999). V našich oblastech je nejznámější použití nosatčíka suříkového (*Apion miniatum Germar, 1833*) a mandelinky ředkvičkové (*Gastrophysa viridula De Geer, 1775*) k regulaci šťovíků (Jursík *et al.*, 2011a). Jako příklad mykoherbicidu můžeme uvést Devine na bázi *Phytophthora palmivora E. J. Butler, 1919*, jež je využíván v citrusových sadech proti plevelům čeledi toješťovité (*Asclepiadaceae R. Br.*) (Kohout *et al.*, 1996).

### III. chemické

Zhruba od 50. let 20. století se k regulaci plevelů používají herbicidy (Mikulka *et al.*, 1999), sloučeniny s fytotoxickými účinky (Dvořák *et Smutný*, 2003). Narušením biochemických procesů v plevelné rostlině dochází k jejímu úhynu nebo poškození (Mikulka *et al.*, 1999). Státní rostlinolékařská správa vydává každoročně seznam registrovaných přípravků

na ochranu rostlin, které je dovoleno používat podle zákona č. 147/1996 Sb. o rostlinolékařské péči (Vanc, 2001). Herbicidy mají velmi složité chemické značení, pro zjednodušení se používá název účinné látky ve zkratce dle mezinárodní dohody. V Evropě je používána klasifikace HRAC (Herbicide Resistance Action Committee), která klasifikuje herbicidy do 15 tříd, podle jejich mechanismu účinku, poškození plevelu a chemického složení. Vyskytují se ve formě kapaliny, prášků nebo granulí. V ČR najdeme široký výběr herbicidů, každoročně dochází k řadě změn (Dvořák *et Smutný*, 2003). Proces vývoje herbicidu, ověření účinnosti a zavedení na trh je velmi zdoluhavý a nákladný. Celosvětově najdeme 8–10 výrobců (Mikulka *et al.*, 1999). U nás je používání herbicidů v zemědělství zcela běžné (Dvořák *et Smutný*, 2003), výhodou je nenáročnost z hlediska lidské práce a nízké náklady. Na druhou stranu je jejich používání spojeno s množstvím negativních vlivů. Mohou způsobit poškození kulturní plodiny, negativně ovlivnit obsluhu postřikovačů a ostatních strojů, zatěžovat životní prostředí. Mohou zamořovat podzemní či povrchové vody nebo být obsaženy ve vypěstovaných potravinách (Jursík *et al.*, 2011a). Dalším problémem je ničení nebo oslabení přirozených konkurentů (dravců, škůdců) či vznik rezistentních populací, kterému se budeme věnovat dále (Čača, 1990).

## **3.6.2 Klasifikace herbicidů**

### **3.6.2.1 Podle selektivity**

Selektivita je schopnost účinku na specifické druhy rostlin, aniž by docházelo k poškození jiných druhů (Soukup, 2005).

- a) selektivní – použitím selektivních herbicidů dochází k regulaci plevelů bez poškození pěstované plodiny.
- b) totální – dochází ke zničení jak plevelů, tak všech ostatních rostlin na stanovišti (Nováková, 1986). Herbicidy s dlouhodobými účinky se používají na chodnicích, cestách, výhodou je trvalejší regulace plevelů. Nevýhodou je, že mohou způsobovat velkou ekologickou zátěž (Kohout *et al.*, 1996).

### 3.6.2.2 Podle doby použití

a) před setím – aplikace před setím, nebo sázením. Jedná se o málo používaný způsob (Mikulka *et* Kneifelová, 2003). Vhodná u herbicidů, které jsou potřeba zapracovat do půdy (Kohout *et al.*, 1996).

b) preemergentní – používá se po zasetí plodiny před jejím vzejitím. Může být ještě rozdělena na kontaktní – před setím plodiny ale po vzejití plevelů, a reziduální – ještě před vzejitím plevelů dochází ke zničení „zůstatků“ v půdě (Dvořák *et* Smutný, 2003). Jejich účinek je snížen za sucha, po dešti může být selektivita tohoto herbicidu velmi vysoká (Kudsk, 2002).

c) postemergentní – aplikace po vzejití plodiny. Termín aplikace je dán specificky pro plodinu, záleží na růstové fázi. Výhodou je, že můžeme přesně klasifikovat plevelné druhy a míru zaplevelení a vybrat správné účinné látky. Podle rozsahu můžeme aplikaci rozlišit na plošnou – provádí se po celé ploše, řádkovou – pouze v řádcích, ohniskovou – pouze v ohnisku zaplevelení, využití výpočetní a telekomunikační techniky, podlistovou (u kukuřice) a dělenou – při nerovnoměrném vzcházení rostlin, která je rozdělena na dvě aplikace (Kazda *et al.*, 2010).

### 3.6.2.3 Podle způsobu účinku

a) kontaktní = dotykové – dochází ke zničení pletiva rostliny pouze v místě dotyku (Dvořák *et* Smutný, 2003), nejsou rozváděny v rostlině (Hron *et* Vodák, 1959). Vytrvalé plevele mohou snadno regenerovat (Vanc, 2001). Používají se ve vývojové fázi 2–5 listů (Mikulka *et* Kneifelová, 2003).

b) systémově působící = translokační – dostávají se do cévního systému rostlin a jsou roznášeny buď floémem (z nadzemních částí do kořenů), nebo xylémem (z kořenů do nadzemních částí). Dochází k porušení látkové výměny a úhynu. Vhodné k hubení vytrvalých plevelů (Mikulka *et* Kneifelová, 2003). Jejich účinek je pomalý, ale zato celistvý (Hron *et* Vodák, 1959).

### 3.6.2.4 Podle doby aplikace s ohledem na vývojovou fázi plevelů

a) listové – použití kontaktních a translokačních herbicidů translokovaných floémem během růstu rostlin (Dvořák *et* Smutný, 2003).



b) kořenové – herbicid je aplikován na půdu ve fázi klíčení až dvou děložních listů, přijímán kořenovým vlášením a veden xylémem. Tyto translokační herbicidy bývají také označovány jako půdní sterilizátory (Mikulka *et* Kneifelová, 2003).

c) listové a kořenové – hubí plevely vzešlé i klíčící (Nováková, 1986).

### **3.6.2.5 Podle doby trvání účinku**

a) herbicidy bez reziduí – herbicidy nezůstávají dlouhodobě v půdě, po aplikaci je možné ihned sít.

b) herbicidy s rezidui – sít je možné až po úplném rozložení zbytků herbicidů (za několik dní až roků) (Vanc, 2001).

### **3.6.2.6 Podle mechanismu účinku**

a) syntetické auxiny – jedná se o synteticky vyráběné látky, které fungují stejně jako rostlinné hormony, to znamená stimulují buněčné dělení a růst (Jursík *et al.*, 2011b), který je nekoordinovaný (Dvořák *et* Smutný, 2003). Jsou velmi dobře přijímány listy a rozváděny floémem (Jursík *et al.*, 2011b). Dochází k tvorbě deformací, narušení fytohormonální hladiny a metabolismu (Jursík *et al.*, 2011b). Jsou to chemické látky ze skupiny karboxylových kyselin (Mikulka *et* Kneifelová, 2003). Používají se k regulaci dvouděložných plevelů v porostech obilovin, kukuřici (Jursík *et al.*, 2011b).

b) inhibitory syntézy aminokyselin

Dojde k zastavení syntézy aminokyselin nezbytných pro život rostliny. Jedná se o glutamin syntázu (GS), enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (EPSP), acetolaktát syntázu (ALS) (Jursík *et al.*, 2011a). Druhotně dochází k inhibici syntézy DNA, zastavení meristematického dělení (Jursík *et al.*, 2010), následně zastavení růstu rostliny a úhynu (Mikulka *et* Kneifelová, 2003). Mezi nejdůležitější ALS inhibitory patří sulfonylmočoviny (Jursík *et al.*, 2010), například chlorsulfuron, metsulfuron a také imidazolinony (Kohout *et al.*, 1996).

c) inhibitory fotosyntézy

Působí pouze na procesy primární části fotosyntézy, mezi které patří fotolýza vody, cyklické a necyklické elektrotransportní reakce (systém přenašečů), tvorba NADPH + H<sup>+</sup>, ATP a uvolnění O<sub>2</sub>. Probíhají na thylakoidních membránách chloroplastů. Na nich je

umístěn fotosystém I (PSI) a fotosystém II (PSII). Tyto dvě oblasti přijímají sluneční energii pomocí fotosyntetických barviv, chlorofyl a uvolní vysokoenergetické elektrony a ty se pohybují na systém přenašečů (Jursík *et al.*, 2011a). Podstatou je vazba herbicidu s bílkovinnou částí chloroplastu poblíž fotosystému II (Kohout *et al.*, 1996), což vede k narušení systému přenašečů a také může být narušena syntéza pigmentů, jež se podílí na fotosyntéze (Jursík *et al.*, 2011a). Vzhledem k častému výskytu mutací genů kódujících proteiny ve fotosystému II je častý také výskyt plevelů rezistentních vůči těmto herbicidům (Devine *et al.*, 1993). Mezi herbicidy inhibující PSII patří triazinové herbicidy (atrazine, terbuthylazin, cyanazin), fenyl-karbamáty (phenmedipham, desmedipham) a substituované močoviny (chlortoluron, isoproturon, metobromuron). Herbicidy inhibující PSI jsou diquat a paraquat (Mikulka *et Kneifelová*, 2003).

#### d) inhibitory buněčného dělení

Buněčné dělení a růst je řízeno acetolaktát syntázou, tento enzym inhibují například sulfonylmočoviny, také nárůst biosyntézy ethylenu způsobený například chloracetanilidy brzdí dělení buněk (Dvořák *et Smutný*, 2003). Dinitroaniliny se váží na tubulin, a blokují tak tvorbu mikrotubulů důležitých při buněčném dělení (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013). Jde především o herbicidy působící na klíčící plevely (Mikulka *et Kneifelová*, 2003).

#### e) inhibitory biosyntézy karotenoidů

Tyto herbicidy způsobují narušení pigmentů fotosyntézy, především chlorofylu (Mikulka *et Kneifelová*, 2003). Patří mezi ně amitrol a fluometuron (Kohout *et al.*, 1996), aplikace se projevuje albifikací rostliny (vybělením listů) a jejím následným odumřením (Mikulka *et Kneifelová*, 2003). U přerostlých plevelů může docházet k regeneraci (6 a více listů) (Devine *et al.*, 1993).

#### f) inhibitory acetylkoenzym A karboxylázy (ACC)

Do této skupiny patří herbicidní přípravky ze skupiny aryloxyfenoxypropionátů, cyklohexandionů (Mikulka *et Kneifelová*, 2003) a phenylpyrazolinů (Jursík *et al.*, 2011c), které selektivně inhibují acetylkoenzym A karboxylázu (Déyel *et Michel*, 2005), molekulu metabolismu důležitou především v procesu dýchání (Cremllyn, 1985).

### 3.7 Rezistence plevelů vůči herbicidům

Plevelné rostliny jsou velmi přizpůsobivé k měnícím se podmínkám prostředí (Mikulka *et* Chodová, 1998). V minulosti docházelo k zavedení nových technologií, způsobů zpracování půdy, změny v osivu či dlouhodobému používání herbicidů se stejným mechanismem účinku. Toto vše přispělo ke změnám druhového spektra plevelů. Některé plevele postupem času ustupovaly a jiné je velmi rychle nahrazovaly. Významným problémem se stala rezistence některých plevelů vůči herbicidům (Mikulka *et* Chodová, 2002).

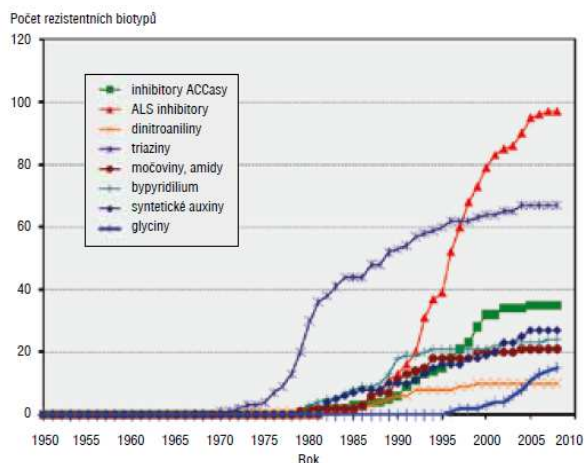
V minulosti nebyl problém vzniku rezistence považován za aktuální z důvodu nepravidelné aplikace herbicidů, střídání plodin či relativně pomalému rozmnožování plevelů (Mikulka, 2003). Ale už v roce 1956 Hasper uvedl, že dlouhodobé používání herbicidů může způsobit vznik rezistentních populací (Kohout *et al.*, 1996). Pozornost tomuto problému se začala věnovat až s nálezy prvních rezistentních jedinců.

Vznik rezistence byl zpočátku v monokulturách kukuřice, sadech a vinicích. V těchto oblastech byly dlouhodobě používány herbicidy se stejným mechanismem účinku – triazinové herbicidy. Patří mezi ně atrazin a simazin. Atrazin se používal k regulaci jedno i dvouděložných plevelů v kukuřici a vytrvalých kulturách, simazin k regulaci jednoletých jednoděložných plevelů a dvouděložných plevelů (Mikulka *et* Chodová, 2002).

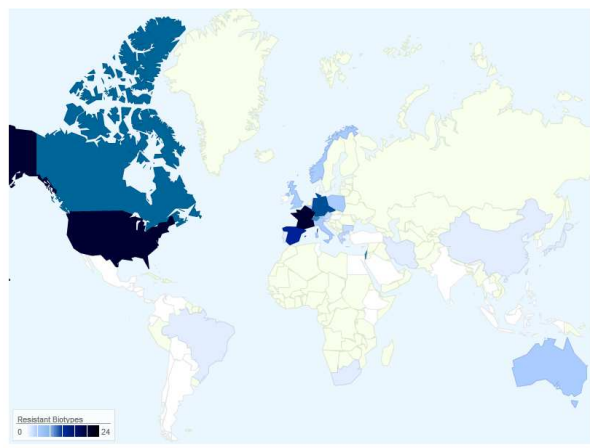
Po víceleté aplikaci herbicidů byl pozorován menší účinek, ani zvyšováním dávek se problém nevyřešil, naopak jedinců stále přibývalo. Citlivé rostliny byly hubeny, zatímco rezistentní zůstávaly nedotčené a zvyšoval se poměr semen rezistentních jedinců v půdě. Po několika letech se výskyt citlivých jedinců redukoval, případně úplně vymizely (Mikulka, 2003) V roce 1983 představovaly plevele rezistentní vůči atrazinu 98 % všech rezistentních druhů ve světě. Později v roce 1999 došlo k útlumu používání těchto herbicidů a k poklesu na 24 %. Ovšem výrazně se zvýšil počet rezistentních plevelů vůči inhibitorům ALS (sulfonylmočoviny, imidazoliny) (Mikulka *et* Chodová, 2002). Také se objevila rezistence vůči inhibitorům ACCasy (Jursík *et al.*, 2011c). Za určitých podmínek může vzniknout rezistence do tří let po uvedení herbicidu na trh (Tardif *et* Powles, 1993). Komplexní historický vývoj počtu plevelných druhů, u nichž byla objevena rezistence, viz obrázek č. 2.

Tyto rezistentní populace komplikují regulaci plevelů na celém světě – viz obrázek č. 3.

V dnešní době existuje 217 druhů rezistentních plevelů odolných vůči 148 různým herbicidům. Byly hlášeny u 63 plodin v 61 zemích (Heap, 2013). Situace je nejvíce zmapovaná v Severní Americe a v Evropě (Jursík *et al.*, 2011c).



**Obrázek č. 2:** Historický vývoj počtu plevelných druhů, u nichž byla popsána rezistence vůči herbicidům s různým mechanismem účinku (Jursík *et al.*, 2011c)



**Obrázek č. 3:** Výskyt rezistentních plevelů ve světě (Heap, 2013)

### 3.7.1 Pojem rezistence

Dle Kohouta (1996) zní definice rezistence plevelů takto: „Rezistence plevelů je absolutní tolerance vůči takové dávce herbicidu, která příslušný druh plevelné rostliny hubí.“ Původně byl určitý druh plevelné rostliny citlivý k herbicidu, ale vlivem

dlouhodobého používání se vůči němu vyvinula rezistence. Naproti tomu tolerance plevelů je „přirozená a normální variabilita vůči herbicidům, která je danému druhu plevelu vlastní“. Určitý druh je k herbicidu tolerantnější než jiný.

### 3.7.2 Zvláštní typy rezistencí

**Křížová rezistence (cross-rezistence)** – rostlina která je rezistentní vůči některému herbicidu je rezistentní k jiným herbicidům se stejným nebo podobným mechanismem účinku (Dvořák *et* Smutný, 2003). Nemusí tak být u všech plevelných druhů a u všech účinných látek (Mikulka *et* Chodová, 1998). V ČR byla zjištěna u řady populací, např. chundelky metlice vůči chlorsulfuronu, jodosulfuronu a sulfosulfuronu. Dále můžeme uvést kříženou rezistenci u ovsa hluchého vůči chlorsulfuronu, diclofop-methylu, fluazifop-butylu, pendimethalinu atd., která byla nalezena v USA (Hamouzková *et al.*, 2011). Komplikuje hubení plevelů a posouvá ho do nové sféry, kdy nestačí znát pouze rostliny a herbicidy, ale také je potřeba znát spektrum rezistence, abychom se nedopustili dalších škod (Kohout *et al.*, 1996).

**Negativní cross-rezistence** – vzniká, když biotyp rezistentní vůči určité skupině účinných látek je hypercitlivý vůči jiné skupině látek (Dvořák *et* Smutný, 2003).

**Vícenásobná rezistence (multiple rezistence)** – mechanismus rezistence vůči určitým herbicidům se rozvinul odděleně. Nejprve vznikl vůči herbicidu A, poté vyvolala aplikace herbicidu B také rezistenci (Gonsolus, 2001). Jedná se o nejnebezpečnější typ rezistence (Jursík *et al.*, 2011a).

### 3.7.3 Vznik rezistence

Rezistence vzniká v oblastech s intenzivní ochranou proti plevelům, především v monokulturách, kde byly pravidelně aplikovány herbicidy se stejným mechanismem účinku. Poté se tyto rezistentní druhy šířily na ostatní stanoviště, například větrem nebo hnojivou (Mikulka *et* Chodová, 2002). Vznikla bez ohledu na aplikaci herbicidů jako spontánní mutace, ale díky nevhodnému dlouhodobému používání herbicidů se rozšířila (Kazda *et al.*, 2010). Tyto mutace vznikají s velmi nízkou frekvencí asi  $10^{-3}$  až  $10^{-10}$

jedinců v populaci. Při vysoké hustotě plevelů na poli je vyšší pravděpodobnost přítomnosti rezistentního jedince (Mikulka *et al.*, 2002).

### 3.7.4 Mechanismy rezistence

Mechanismy rezistence způsobují změny či odlišnosti, které ovlivňují příjem herbicidu rostlinou. Jedná se o biochemické, fyziologické či morfologické odlišnosti (Jursík *et al.*, 2011c).

#### a) target site rezistence = změna místa působení herbicidu v rostlině

Dochází ke změně jednoho nukleotidu v sekvenci genu, která má za následek záměnu aminokyseliny v primární struktuře cílového enzymu, kde se herbicid váže. Díky této změně není už modifikované místo citlivé na herbicid. Rezistence je většinou úplná, několikanásobným zvýšením dávek herbicidů se nic nemění (Jursík *et al.*, 2011a). Ačkoliv je velké množství plevelů odolných vůči stejným herbicidům, nemusí být rezistence způsobena stejnou mutací. Tento mechanismus rezistence byl detekován u herbicidů inhibujících fotosystém II, acetolaktátsyntázu, acetylkoenzym A, enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu a buněčné dělení (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013).

#### Rezistence vůči herbicidům inhibujícím fotosystém II

U různých druhů plevelů není způsobena jedinou stejnou mutací. Rezistence vůči triazinovým herbicidům je až na několik málo výjimek způsobena záměnou 264 aminokyseliny serinu za glycin (Kohout *et al.*, 1996) v genu *psbA*, který kóduje protein D1 (Jursík *et al.*, 2011c). Číslování bylo standardizováno podle huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana L.*). Zajímavé je, že se tato jediná mutace způsobující rezistenci vůči triazinům vyvinula u plevelů nezávisle na sobě po celém světě (Cabrito *et al.*, 2011). Možné jsou také mutace v pozicích 219, 266, 251 a 255 (Jursík *et al.*, 2011c). Například substituce isoleucinu za valin v pozici 219 u lipnice roční (*Poa annua L.*) je zodpovědná za rezistenci vůči diuronu, metribuzinu a substituce serinu za threonin v 264 u šruchy zelné (*Portulaca oleracea L.*) způsobuje rezistenci vůči linuronu (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013). Mutace způsobující rezistenci vůči triazinovým herbicidům ovšem nezpůsobuje rezistenci vůči jiným herbicidům PSII. Ačkoliv se tyto herbicidy váží na stejný protein, neváží se ve stejném místě (Jursík *et al.*, 2011c).

Rezistence vůči herbicidům PSII je kódována chloroplastovou DNA (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013). Jedná se o tzv. mimojadernou dědičnost, která je charakteristická matroklinitou = znaky dědí po matce všichni její potomci (Šafářová, 2011). Šíření této rezistence v populaci je tedy pomalé, protože není šířena pylem (samčí pohlavní buňka) (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013). Ze semen, která vznikla na rezistentní rostlině, vyrostou vždy rezistentní jedinci (Jursík *et al.*, 2011c).

### **Rezistence vůči herbicidům inhibujícím ACC**

Rezistence některých trávovitých plevelů vůči herbicidům inhibujícím ACC je podmíněna mutací genu (chloroplastová DNA), který tento enzym kóduje. Molekulární podstata nebyla ještě zcela objasněna, záleží nejen na záměně aminokyselin, ale také na podílu homozygotů a heterozygotů v populaci, konkrétním herbicidu a použité dávce (Jursík *et al.*, 2011c). Také může být rezistence způsobena zvýšeným metabolismem. Problémem molekulární detekce je značná velikost genu a jeho intron-exonová struktura. Druhým problémem je výskyt dvou velmi podobných forem genu ACC u trav. Zatímco jeden gen kóduje plastidovou ACC a je velmi citlivý k herbicidům, druhý kóduje cytosolovou ACC a je tolerantní k herbicidům (Déyel *et Michel*, 2005). Bodové mutace byly zjištěny u několika rezistentních trav, např. psárky polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.), jílku tuhého (*Lolium rigidum* Gaudin), a bėru zeleného (*Setaria viridis* (L.) P. Beauv.) (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013). U psárky polní byla detekována záměna isoleucinu za leucin v pozici 1781 genu ACC1 a záměna tryptofanu za cystein v 2027, isoleucinu za asparagin v 2041, asparagové kyseliny za glycin v 2078, glycinu za alanin v pozici 2096 genu ACC2. Nejčastěji byla jako příčina rezistence k herbicidům inhibujícím ACCasu detekována záměna aminokyseliny na pozici 1781 genu ACC1 (Déyel *et Michel*, 2005).

### **Rezistence vůči herbicidům inhibujícím mikrotubuly**

Mutace v genu kódujícím mikrotubuly vede k narušení buněčného dělení. Mikrotubuly jsou dvojího typu –  $\alpha$  a  $\beta$ . Byla detekována odolnost vůči dinitroanalinům v genu, který kóduje  $\alpha$ -tubulin. Jedná se o jaderný recesivně podmíněný gen, vzhledem k tomu trvá déle než se tato rezistence v populaci rozšíří. Obvykle jsou geny zodpovědné za rezistenci dominantní či semi-dominantní (částečně dominantní), to

znamená, že dochází k jejich rychlejšímu šíření (Plant & Soil Sciences eKnihovna, 2013).

### **Rezistence vůči herbicidům inhibujícím ALS**

V současné době je vůči těmto herbicidům odolných 129 druhů (Heap, 2013). Rezistence je způsobena mutací genu, který kóduje enzym acetolaktát syntázu a je v dominantní alele (Mikulka *et* Slavíková, 2008). V současné době existuje 21 substitucí aminokyselin (Heap, 2013), podle typu mutace je kódována rezistence vůči určité skupině ALS herbicidů (Jursík *et al.*, 2011c). Například záměna serinu za threonin v poloze 653 způsobí rezistenci laskavce ohnutého (*Amaranthus retroflexus L.*) vůči imidazolinonům, ale ne vůči sulfonylmočovinám (Mikulka *et* Slavíková, 2008). Změny se vyskytují v jedné z osmi aminokyselin v enzymu ALS sekvence: alanin 122, prolin 197, alanin 205, asparagová kyselina 376, arginin 377, tryptofan 574, serin 653, glycin 654 (Heap, 2013). Mezi nejčastěji se vyskytující mutace patří záměna tryptofanu v poloze 574 a záměna prolinu v poloze 197 (Massa *et al.*, 2011).

### **b) non-target site rezistence = nespecifická rezistence (Jursík *et al.*, 2011c) = metabolicky založená rezistence (Jursík *et al.*, 2011a)**

Spočívá v mechanismu, který zabrání herbicidu dostat se v dostatečném množství k cílovému místu účinku. Rezistentní plevele jsou schopny metabolizovat herbicid na netoxický nebo méně toxický, zatímco nerezistentní je metabolizují velmi pomalu. Rozdíl mezi nimi je tedy kvantitativní, a tím se liší od kvalitativního rozdílu u target site rezistence. Molekulární základ je pravděpodobně založený polygenně (Jursík *et al.*, 2011c).

### **c) další mechanismy rezistence**

Patří mezi ně například zabudování herbicidu nebo jeho toxických metabolitů do vakuol, nebo snižování příjmu a přenos herbicidu v rostlině, např. z listů do kořenů (Jursík *et al.*, 2011a).

## **3.7.5 Rozdíly mezi rezistentními a citlivými plevele**

Citliví a odolní jedinci jsou morfologicky naprosto identičtí. Dokázání rezistence je možné pouze laboratorními metodami, jež budou popsány dále. Problémem je jejich



biologická odlišnost, rostliny se chovají poněkud jinak než původní citlivé populace. Vycházejí při jiných teplotách, mají jinou energii klíčení, nižší hodnoty fotosyntézy atd. Mohou odlišně reagovat na regulaci a agrotechniku (Dvořák *et* Smutný, 2003). Tomuto souboru vlastností se říká fitness (Hamouzková *et al.*, 2011).

### 3.7.6 Diagnostika pomocí laboratorních metod

V případě podezření na rezistentní jedince je potřeba diagnostiky buď pomocí metod, které nejsou náročné na vybavení a jsou vhodné i pro samostatné zemědělce, nebo lze odeslat vzorky semen do laboratoře zabývající se rezistencí plevelů (Mikulka *et* Slavíková, 2008). Předpokladem pro úspěšnou diagnostiku je kvalita vzorku, špatná kvalita způsobí nízké procento klíčivosti nebo rozmnožení nekvalitních rostlin s variabilní odezvou na herbicid. Sběr probíhá ve fázi zralých semen a neměl by se provádět za vlhkých podmínek. Následuje sušení teplým vzduchem co nejdříve po sběru (Prokop, 2009). Dále je potřeba roztřídění semen, tzn. oddělení poškozených od zdravých. Také je potřeba nasbírat vzorky z okraje pozemku, který nebyl ošetřován herbicidem a použít je jako příklad citlivých rostlin (Mikulka *et* Chodová, 2002).

#### a) metoda biologického testu

Nejvíce se přibližuje skutečným podmínkám na polích. Umožňuje charakterizovat citlivost a vypočítat rezistenční faktor (Hamouzková *et al.*, 2011). Je to jednoduchá a přesná metoda, vhodná k použití i pro samostatné zemědělce. Spočívá v ošetřování rostlin, u kterých není známá jejich citlivost (vypěstovaných ze semen) různými stupňovanými dávkami herbicidů. Rostliny pěstujeme do fáze 2–4 listů a poté je ošetříme ve třech stupňovaných dávkách. Vhodná je i aplikace několikanásobně vyšších dávek než je doporučováno. Účinek se sleduje po 2–3 týdnech (Mikulka *et* Chodová, 2002). Hodnotíme vizuálně v procentech – (0 % úhyn, 100 % rostliny bez jakéhokoliv poškození) (Hamouzková *et al.*, 2011). Porovnáváme s rostlinami, u kterých známe citlivost. Nevýhodou je značná náročnost na skleníkové plochy, pracnost při sterilizaci substrátu a dormance semen, kvůli níž některá semena můžeme testovat až v příští sezóně (Kohout *et al.*, 1996).

b) stanovení rezistence ze semen z půdní zásoby

Podobná předchozí metodě, vzorky se odebírají z hloubky do 10 cm půdního profilu, alespoň 10–20 vzorků z jedné lokality. Naplní se kontejnery a dále se posupuje jako u metody biologického testu. Výhodou je možnost testování v průběhu celého roku, kromě období, kdy je půda zmrzlá. Nevýhodou je náročnost na plochy a manipulace s velkým množstvím hlíny (Mikulka *et Chodová*, 2002).

c) metoda fluorescenční

Ze střední části listové čepele rostlin se vyříznou terčíky a jsou namočeny v kádinkách s 1% atrazinem, nebo s vodou. Po 1, 2, 3 nebo 4 hodinách se vloží do fluorometru (Hamouzová *et al.*, 2011), například na 2 minuty tmy a 10 sekund osvětlení. Poté zjistíme křivky fluorescenční indukce (Kohout *et al.*, 1996). Plevelé citlivé mají narušenou schopnost fotosyntézy, dochází u nich ke změnám ve fluorescenci, na rozdíl u plevelů odolných (Mikulka, 2003). Tato metoda se používá k určení rezistence vůči inhibitorům fotosystému II (Mikulka *et Chodová*, 2002).

d) metoda aktivity Hillovy reakce

Princip spočívá ve stanovení fotochemické aktivity plevelů neznámé citlivosti, která charakterizuje množství kyslíku tvořeného chloroplasty v definovaných podmínkách poté co došlo k ozáření bílým světlem a přidání uměle vytvořeného akceptoru elektronů (Hamouzová *et al.*, 2011). Plevelé citlivé mají na rozdíl od odolných omezenou fotosyntetickou produkci kyslíku (Mikulka *et Chodová*, 2002). Výhodou je, že tuto metodu můžeme použít kdykoliv během vegetace a je přesná (Kohout *et al.*, 1996).

e) metoda agarových půd

Tato metoda využívá pěstování rostlin na agaru, který je napuštěn herbicidem s přidáním živného roztoku, poté pozorujeme vzcházení rostlin (Mikulka *et Slavíková*, 2008). Citlivé rostliny uhynou, zatímco rezistentní se dále vyvíjejí. Nevýhodou je potřeba sterility a náročnost na čistotu práce (Kohout *et al.*, 1996).

f) metoda vodních kultur

Jedná se o metodu podobnou biologickému testu, narozdíl od ní se rostliny pěstují v živném roztoku. Nevýhodou je náročnost práce s nádobami (Mikulka *et Chodová*, 2002). V jarních měsících lze odebírat rostliny ve fázi 4–6 pravých listů přímo

z půdy (Kohout *et al.*, 1996). Tato metoda je jednoduchá a nenáročná na vybavení, může ji použít každý zemědělec (Mikulka *et Chodová*, 2002).

g) metoda měření rychlosti fotosyntézy

Dobře vyvinutý list vložíme do roztoku herbicidu pod dobu pěti minut, poté vložíme do infračerveného plynového analyzátoru (Kohout *et al.*, 1996). Dále změříme rychlost fotosyntézy spotřebou CO<sub>2</sub> na jednotku plochy za sekundu. Citlivé rostliny mají menší spotřebu (Mikulka *et Chodová*, 2002).

h) metoda stanovení nitrátoreduktázy

Využívá skutečnosti, že při přeměně nitrátu u citlivého biotopu ošetřeného triazinovým herbicidem je ovlivněna aktivita nitrátoreduktázy, enzymu, který se účastní přeměny nitrátu na nitrity, na rozdíl od odolného biotopu (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

i) metoda listových terčů

Ze zdravých listů vyřízneme terče o průměru 0,5 cm, vložíme do Petriho misek s roztokem herbicidu a osvětlíme. Poté pozorujeme počet terčů, které plavou na povrchu (rezistentní – nadlehčovány uvolňovaným kyslíkem) a které klesají (citlivé – neprobíhá fotosyntéza) (Mikulka *et Chodová*, 2002).

j) molekulární metody

viz kapitola 3.8 molekulárně-biologické metody

### 3.7.7 Strategie minimalizující vznik rezistence vůči herbicidům

Existují oblasti, kde se nenacházejí rezistentní jedinci nebo se u plevelů rezistence k herbicidům ještě nevyvinula. Vzniku odolných biotopů je třeba předcházet preventivními opatřeními (Mikulka *et Chodová*, 2002):

- a) pravidelně kontrolovat pole, diagnostikovat plevele a reagovat na změny v populaci
- b) střídát herbicidy s různým mechanismem účinku
- c) používat tzv. tank-mixy (herbicidy s více účinnými látkami) (Štěpánek, 2005b)
- d) dodržovat zásady použití a dávky herbicidů (nezvyšovat) (Mikulka *et Chodová*, 2002)

- e) používat herbicidy, které nebudou dlouhodobě setrvávat v půdě (nezvyšuje se selekční tlak) (Prokop, 2009)
- f) uplatňovat všechny způsoby regulace – mechanické i chemické
- g) dodržovat střídání plodin (Mikulka *et* Chodová, 2002)
- h) dodržovat čistotu nástrojů (zamezit rozšiřování) (Štěpánek, 2005b)

### 3.7.8 Regulace rezistentních plevelů

V případě potvrzení rezistentních jedinců je potřeba dodržovat určité zásady, aby nedocházelo k dalšímu vysemeňování:

- a) vyloučit herbicidy, vůči kterým byla potvrzena rezistence
- b) střídat plodiny
- c) používat široké spektrum herbicidů
- d) pravidelně mapovat výskyt rezistentních rostlin (Kazda *et al.*, 2010)
- e) likvidovat zbylé plevele, aby došlo k redukci půdních zásob semen
- f) zamezit rozšiřování na další pozemky
- g) zvážit zaorání pěstované plodiny nebo použití ke krmným účelům
- h) vyřadit pozemek z osevu na další sezónu (Prokop, 2009)

### 3.7.9 Přehled rezistentních druhů na území ČR

Česká republika není země s rozsáhlými kukuřičnými poli pěstovanými mnoho let či s porosty trvalých monokultur. Navzdory těmto výhodným podmínkám se u nás rezistence vůči herbicidům objevila (Prokop, 2009). V druhé polovině sedmdesátých let se začalo s výzkumem rezistentních jedinců ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni (Kazda *et al.*, 2010). V osmdesátých letech bylo popsáno 9 rezistentních druhů plevelů: laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus* L.), laskavec Powellův (*Amaranthus powellii* S. Watson), merlík bílý (*Chenopodium album* L.), merlík tuhý (*Chenopodium strictum* Roth), rdesno blešník (*Persicaria lapathifolia* (L.) Delarbre), rdesno červivec (*Persicaria maculosa* S. F. Gray), turanka kanadská (*Conyza canadensis* (L.) Cronquist), lipnice roční (*Poa annua* L.), starček obecný (*Senecio vulgaris* L.) (Mikulka, 2003).

Na zemědělské půdě je vážným problémem rezistence chundelky metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. Beauv.), která byla poprvé zdokumentována v roce 2005 v populaci polí západní a severní části ČR, kde byl dlouhodobě aplikován chlorsulfuron. Tento druh je rezistentní vůči ALS herbicidům (Hamouzová *et al.*, 2011). V současné době se vyskytuje na 80 % všech sledovaných lokalit, zvýšená škodlivost byla zaznamenána u 30 % dotázaných zemědělců a u 20 % byla uvedena nižší účinnost herbicidů (Hamouzová *et al.*, 2011). Dalším problémem je rezistence ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), která patří mezi nejnebezpečnější plevele na světě (Mikulka *et al.*, 1999). Řada dalších druhů je také podezřelá z rezistence. Většina je odolná vůči herbicidům inhibujícím fotosystém II, objevují se i plevele odolné vůči herbicidům inhibujícím acetolaktátsyntázu (Mikulka *et Slavíková*, 2008). Nejčastěji byly rezistentní druhy objeveny v okolí železnic, na nezemědělské půdě, v ovocných sadech a v zemědělských oblastech – převážně v obilí a cukrové řepě (Chodová *et Mikulka*, 2002). V současné době je v ČR 15 rezistentních biotopů – viz obrázek č. 4 (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

Výskyt rezistentních plevelných populací na území ČR		
Druh účinku	Rok nálezu	systém
<i>Amaranthus chlorostachys</i> – laskavec zelenoklasý	1989	inhibitor PSII
<i>Amaranthus retroflexus</i> – laskavec ohnutý	1985	inhibitor PSII
<i>Alopecurus myosuroides</i> – psárka polní	2008	ALS
<i>Apera spica-venti</i> – chundelka metlice	2005	inhibitor PSII
<i>Chenopodium album</i> – merlík bílý	1986	inhibitor PSII
<i>Chenopodium strictum</i> – merlík tuhý	1989	inhibitor PSII
<i>Conyza canadensis</i> – turanka kanadská	1987	inhibitor PSII
<i>Digitaria sanguinalis</i> – rosička krvavá	2005	inhibitor PSII
<i>Echinochloa crus-galli</i> – ježatka kuří noha	1994	inhibitor PSII
<i>Kochia scoparia</i> – bytel metlatý	1996	inhibitor PSII, ALS
<i>Poa annua</i> – lipnice roční	1988	inhibitor PSII
<i>Polygonum lapathifolium</i> – rdesno blešník	1989	inhibitor PSII
<i>Polygonum persicaria</i> – rdesno červivec	1989	inhibitor PSII
<i>Senecio vulgaris</i> – starček obecný	1988	inhibitor PSII
<i>Solanum nigrum</i> – lilék černý	1999	inhibitor PSII

**Obrázek č. 4:** Výskyt rezistentních plevelů v ČR (převzato z Mikulka *et Slavíková*, 2008)

### 3.7.10 Rezistence u vybraných druhů plevelů

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

**Botanické zařazení:** čeleď lipnicovité (*Poaceae* Barnhart)

**Původ:** Jursík *et al.* (2011a) uvádí, že dle většiny autorů je ježatka kuří noha původní evropský druh, někteří se domnívají, že pochází z tropických oblastí Indie. Slavíková-Holcová *et* Mikulka (2009) uvádějí, že pochází ze střední a východní Asie.

**Biologie:** Jednoletý pozdně jarní plevel s bohatě svazčitými kořeny, poléhavý s 4–20 odnožemi. Stéblo je přímé až vystoupavé, lysé, na kolénkách s chomáčky chlupů. Listy lysé, na okrajích drsné chlupaté, bez oušek. Květenstvím je lata tvořená hroznovitě uspořádanými lichoklasy, může být přímá nebo převislá (Kazda *et al.*, 2010). Průměrně je v latě 1500 klásků (Mikulka *et al.*, 1999). Klásky jsou světle zelené, často nafialovělé (Deyl, 1964). Jsou jednokvěté s třemi nestejně dlouhými štětinatými plevami, z nichž jedna vybíhá v osinu. Kvete od července do října (Kazda *et al.*, 2010). Obilky jsou lesklé, pluchaté, vypouklé na hřbetní straně, vejčité a zašpičatělé (Pikulka *et al.*, 1997). Jeden jedinec vyprodukuje až několik tisíc obilek (Kazda *et al.*, 2010). Klíčení probíhá v raném létě, vyžaduje vyšší teplotu. Vzchází i z hloubky 10 cm. Období dormance trvá 3–6 měsíců. Má velmi dlouhou dobu klíčivosti 2–6 let (Pikulka *et al.*, 1997). Rozšiřuje se na další lokality vodou, osivem, chlévským hnojem, kompostem či stroji (Kazda *et al.*, 2010).

**Výskyt:** Dává přednost vlhkým výživným půdám, roste v příkopech, rumišťích, podél cest, na břehů vod a na nezemědělské půdě. Postupem času se přizpůsobila podmínkám a lze ji nalézt i v chladnějších oblastech, na suchých a nevýživných lokalitách (Slavíková-Holcová *et* Mikulka, 2009). Dobře snáší zaplavování, z toho důvodu se stala obávaným plevellem rýžovišť, je rýži ekologicky podobná a v raných stádiích ji nelze od rýže rozeznat (Juliano *et al.*, 2010). Vykytuje se především v místech vyššího výskytu okopanin a zelenin v osevním sledu (Jursík *et al.*, 2011a). Její výskyt není typický pro bramborářské oblasti ve vyšších polohách (Mikulka *et al.*, 1999).

**Konkurenční schopnost:** Je ovlivněna délkou dne, během krátkých dní vytváří nízké rostliny s mnoha odnožemi, naopak během dlouhých dní vysoké rostliny s mohutnými latami a velkým množstvím obilek. Nevýhodou oproti ostatním plevelům je pozdní vzcházení. V případě, že dojde k aplikaci herbicidů a potlačení primárních plevelů,

dokáže konkurovat kulturní plodině. V suchých obdobích je méně schopná (Jursík *et al.*, 2011a).

**Hospodářský význam:** Od konce šedesátých let, kdy se pěstovaly několikaleté monokultury kukuřice ošetřované triazinovými herbicidy je považována za významný plevel. V současné době patří mezi nejškodlivější plevele světa (Mikulka *et al.*, 1999).

**Metody regulace:** Důležité je střídání plodin, pokud je výskyt ježatky hojný, je vhodné přerušit nebo zredukovat pěstování okopanin a zvýšit podíl ozimů v osevním sledu (Jursík *et al.*, 2011a). Také je vhodné přidat letní směsky a víceleté pícniny, které ježatku potlačí redukcí světla (Slavíková-Holcová *et* Mikulka, 2009). Je potřeba používat vyzrálé hnojivo, protože po projití trávícím traktem zvířata obilky přežívají a zamořují čisté osivo (Jursík *et al.*, 2011a). Vhodné je plečkování s následnou podmínkou a s orbou v červenci a srpnu (Kazda *et al.*, 2010). Problémem je mohutný kořenový systém, který plečkování ztěžuje a který má regenerační schopnosti (Jursík *et al.*, 2011a). Také je problémem periodické vzcházení zvláště ve vlhkých podmínkách, kde je třeba metody regulace opakovat (Kazda *et al.*, 2010). Z chemické ochrany můžeme aplikovat postemergentní graminicidy (herbicidy potlačující růst jednoděložných trav v porostech dvouděložných rostlin) (Jursík *et al.*, 2011a).

**Výskyt rezistentních populací:** V ČR se vyskytují rostliny rezistentní k herbicidům inhibujícím fotosystém II. Konkrétně se jedná o atrazin s možností cross rezistence vůči jiným herbicidům ze skupiny s podobným mechanismem účinku. Tyto rezistentní druhy byly nalezeny převážně v cukrovce a kukuřici (Hamouzová *et al.*, 2011). Jedná se o target-site rezistenci, konkrétní mutace nebyla v ČR detekována (Heap, 2013). Poprvé se rezistence objevila v roce 1978 v USA (Slavíková-Holcová *et* Mikulka, 2009) vůči inhibitorům fotosystému II (konkrétně vůči atrazinu, cyanazinu a simazinu) (Heap, 2013). Dále se vyskytuje rezistence v Thajsku, Srí-Lance, na Filipínách, v Brazílii, Kanadě, Číně, Itálii, Řecku, Francii, Polsku, Španělsku, Bulharsku a bývalé Jugoslávii (Slavíková-Holcová *et* Mikulka, 2009); Severní Koreji a Turecku vůči ureázám, amidům, syntetickým auxinům, ALS a ACC inhibujícím herbicidům a dalším (Heap, 2013).







**Obrázek č. 5:** *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.

(převzato z <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=546>)

### **3.8 Molekulárně-biologické metody**

Tyto metody se v dnešní době hojně využívají. Jedná se o genotypové metody, rezistence je dána geneticky – mutací. Vzorky se odebírají přímo na stanovišti, mohou se ihned použít nebo zmrazit či usušit a použít za delší dobu. Izoluje se rostlinná DNA a amplifikuje gen, který je zodpovědný za rezistenci metodou PCR = polymerázová řetězová reakce. K ověření amplifikace se používá elektroforéza. Místo mutace se určí analýzou sekvence genomu bioinformatickými metodami (Mikulka *et* Slavíková, 2008). Před odesláním do sekvenační laboratoře je potřeba nukleové kyseliny purifikovat chromatografií. (Šmarda *et al.*, 2005) Místo mutace se také může určit pomocí restrikční analýzy (Mikulka *et* Slavíková, 2008).

#### **3.8.1 Polymerázová řetězová reakce**

PCR probíhá *in vitro*, tzn. bez použití buněk. Sekvence DNA mohou být během pár hodin mnohokrát amplifikovány, a to bez použití klonovacích vektorů. Tuto metodu lze provádět, pouze známe-li sekvenci ohraničující naši zkoumanou sekvenci (Snustands *et* Simmons, 2009), tedy můžeme nasynthetizovat dva oligonukleotidy, které slouží jako

primery pro syntézu DNA (Alberts *et al.*, 1998). Principem PCR je tedy replikace nukleových kyselin, cyklicky se opakující syntéza nových řetězců předem vybraného označeného úseku DNA (primery) ve směru 5'→3' pomocí DNA-polymerázy. Používají se termostabilní DNA-polymerázy, které odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje (Šmarda *et al.*, 2005). DNA je v mikrokumavce s DNA-polymerázou, nukleotidy a specifickými primery (Campell *et al.*, 2006). V zařízení zvaném termocykler dochází v naprogramovaných intervalech k automatické změně teploty, opakovaním procesu dochází k exponenciální amplifikaci sekvence genu (Šmarda *et al.*, 2005) a to ve třech krocích: 1. krátkým zahřátím je DNA denaturována, dochází k oddělení řetězců DNA. 2. následuje ochlazení a navázání primerů na obě komplementární sekvence DNA. 3. nastává syntéza řetězců DNA za přítomnosti enzymu DNA-polymerázy a všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů. Další cyklus začíná opět prvním krokem. Obvykle se používá 20–30 cyklů, přičemž jeden cyklus trvá přibližně 5 minut (Alberts *et al.*, 1998). Tato metoda je velmi přesná, primárním materiálem nemusí být purifikovaná DNA a stačí velmi malé množství i v částečně porušeném stavu. (Campell *et al.*, 2006).

### 3.8.2 Elektroforéza

Principem této metody je pohyb molekul v elektrickém poli. Fosfátové skupiny nukleových kyselin nesou záporný náboj tudíž, jsou tyto makromolekuly přitahovány ke kladně nabitě anodě (Šmarda *et al.*, 2005). Fragmenty DNA jsou nanášeny do žlábků v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, který tvoří pórovitou síť. Menší molekula snadněji projde gelem a tím pádem se rychleji pohybuje (Brown, 2007). Dochází k rozdělení fragmentů DNA za vzniku „žebříku“ složeného z proužků obsahujících molekuly DNA o stejné velikosti. Abychom tyto fragmenty mohli pozorovat, obarvíme DNA látkou, která po navázání fluoreskuje v ultrafialovém světle (Alberts *et al.*, 1998). Velikost molekuly nebo jejího fragmentu můžeme stanovit srovnáním s takzvanými hmotnostními neboli velikostními standardy, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvenováním (Šmarda *et al.*, 2005).

### 3.8.3 Sekvenování DNA

Sekvenováním DNA získáme informaci o primární struktuře DNA neboli přesném pořadí nukleotidů. Znalost této sekvence je používána k odvození sekvence aminokyselin (Šmarda *et al.*, 2005). Téměř ve stejné době byly vynalezeny dvě metody, metoda terminace řetězců autorů F. Sangera a A. R. Coulsona a metoda specifické chemické degradace A. Maxama a W. Gilberta (Brown, 2007). Metoda terminace řetězců je založena na použití DNA, která má být sekvenována, jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky pomocí DNA-polymerázy. Oproti tomu metoda chemické degradace je založena na specifickém štěpení molekuly DNA chemickými látkami v místech báze určitého typu (Rosypal, 2002). V dnešní době převažuje metoda terminace řetězců, která je jednodušší a může být zautomatizována (Brown, 2007). Výchozím materiálem pro sekvenaci bývají fragmenty získané metodou PCR nebo fragmenty naklonované ve vhodném klonovacím vektoru (Šmarda *et al.*, 2005).

### 3.8.4 Bioinformatické zpracování

Bioinformatika je věda na rozhraní biologie a informatiky, která se zabývá hlavně zpracováním, prohledáváním a analýzou dat o sekvenci makromolekul, ovšem může být chápána i v širším slova smyslu. Sekvencí rozumíme jakoukoliv formu zápisu monomerů v makromolekule nejčastěji DNA nebo proteinu (Cvrčková, 2006). K nejdůležitějším institucím zabývajícím se správou bioinformatických dat patří Evropský institut pro bioinformatiku, Národní centrum pro biotechnologické informace a Národní genetický institut. Každá obsahuje genomovou databázi sekvencí nukleových kyselin, např. GenBank v rámci institutu NCBI. Vznikly v době jejich aktuální potřeby na jednotlivých kontinentech, kdy nebyly zcela rozvinuty vysokorychlostní komunikační sítě. V současné době sdílejí a neustále si předávají data (Šmarda *et al.*, 2005). Na stránkách Národního centra pro biotechnologické informace vznikl systém vyhledávání ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>), který vyhledává ve všech databázích současně (Snustands *et Simmons*, 2009) a je uživatelsky nejjednodušší. Umožňuje vyhledávání podobnosti sekvencí nukleotidů v nukleových kyselinách a aminokyselin v proteinech, vyhledávání genů a funkčních oblastí a klasifikaci proteinů na základě aminokyselinových sekvencí (Šmarda *et al.*, 2005).

## 4 Materiál a metody

### 4.1.1 Biologický materiál

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

### 4.1.2 Seznam použitých roztoků a médií

**2% CTAB:** 2 g CTAB; 4 ml 0,5 mol/dm<sup>3</sup> EDTA (disodná sůl ethylendiamineteraoctové kyseliny); 10 ml 1 mol/dm<sup>3</sup> TRIS; 28 ml 5 mol/dm<sup>3</sup> NaCl doplněno destilovanou vodou do objemu 100 ml a sterilizováno filtrací

**5x TBE:** 54 g Tris-HCl; 27,5 g HBO<sub>2</sub>; 20 ml 0,5 mol/dm<sup>3</sup> EDTA (disodná sůl ethylendiamineteraoctové kyseliny); 1 l destilované vody; pH 8

**Ostatní chemikálie:** chloroform : izoamylalkohol (poměr 24 : 1); 3 mol/dm<sup>3</sup> octan sodný; izopropanol; agaróza (elektroforetická); EDTA; 70% ethanol; 2-merkptoethanol; destilovaná voda; Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA); primery pro PCR viz tabulka č. 3 (Generi-biotech, ČR); sterilní voda

**Komerční kity:** Fast Start PCR Master (Roche, Německo); 6xLoading Buffer (Takara, Japonsko); DNA Molecular Weight Marker III 0,12–21,2 kbp (Roche, Německo); GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma, USA)

### 4.1.3 Vybavení laboratoře

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf), centrifuga 5415D (Eppendorf), centrifuga 5415R (Eppendorf), minicentrifuga MCF 2360 (LMS), Termocycler TCXP, XP (Bioer), Transilluminátor UVT-20M (Herolab) s digitálním fotoaparátem (Kodak EDAS 290), termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer), NanoDrop ND-1000 V3.7.0, digestoř, elektroforetická aparatura, mikrovlnná trouba, mrazicí box, lednička, analytické váhy, magnetické míchadlo, odměrné válce, kádinky, centrifugační mikrozkuhavky, PCR mikrozkuhavky, dávkovací mikropipety, sterilní špičky, ochranné rukavice, pinzeta, třecí miska s tloučkem, chladicí stojánky, parafilm, výrobník na ledovou tříšť.

#### 4.1.4 Sběr pokusných rostlin

Rostliny *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. byly sbírány v období července až září 2012 v Olomouckém kraji a kraji Vysočina – viz tabulka č. 1. Jednotliví jedinci byli sbíráni na polích (kromě okrajů pole) převážně s kukuřicí a cukrovou řepou a uchováni ve formě herbářových položek.

**Tabulka č. 1:** Seznam herbářových položek *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.

Vzorek:	nejbližší obec	GPS	datum
J01	Olomouc-Holice	49°34'29.056"N, 17°16'55.926"E	20.9.2012
J02	Olomouc-Holice	49°34'31.804"N, 17°17'0.269"E	20.9.2012
J03	Čelechovice	49°30'14.097"N, 17°21'56.949"E	6.9.2012
J04	Krčmaň	49°31'41.934"N, 17°20'27.453"E	5.9.2012
J05	Dolní Krupá	49°39'52.085"N, 15°36'59.345"E	15.8.2012
J06	Křelov	49°36'39.359"N, 17°11'14.578"E	5.9.2012
J07	Křelov	49°36'57.481"N, 17°11'27.539"E	5.9.2012
J08	Olomouc-Řepčín	49°36'58.799"N, 17°13'21.602"E	5.9.2012
J09	Horka nad Moravou	49°37'55.020"N, 17°12'30.420"E	6.9.2012
J10	Břuchotín	49°37'34.320"N, 17°9'44.759"E	6.9.2012
J11	Příkazy	49°38'39.058"N, 17°8'8.941"E	6.9.2012
J12	Náklo	49°39'43.801"N, 17°7'55.140"E	5.9.2012
J13	Novoveská	49°41'41.640"N, 17°10'59.818"E	5.9.2012
J14	Štěpánov	49°40'58.620"N, 17°11'50.939"E	5.9.2012
J15	Chomoutov	49°39'12.719"N, 17°13'45.661"E	6.9.2012
J16	Olomouc-Lazce	49°36'3.645"N, 17°15'19.479"E	3.9.2012
J17	Chomoutov	49°39'31.741"N, 17°13'13.739"E	14.9.2012
J18	Topolany	49°34'54.239"N, 17°10'54.001"E	20.9.2012
J19	Olomouc-Hněvotín	49°34'24.780"N, 17°10'24.601"E	20.9.2012
J20	Okrouhličtí Dvořáci	49°35'7.552"N, 15°34'43.050"E	20.8.2012
J21	Šmolovy	49°35'14.162"N, 15°33'24.719"E	14.7.2012
J22	Havlíčkův Brod	49°37'14.678"N,	15.8.2012

		15°34'23.983"E	
J23	Havlíčkův Brod	49°35'41.114"N, 15°33'29.111"E	15.8.2012
J24	Papšíkov	49°36'15.276"N, 15°33'20.732"E	10.8.2012
J25	Kozlov	49°24'48.990"N, 15°42'11.401"E	17.8.2012
J26	Dolní Krupá	49°39'15.599"N, 15°35'31.199"E	15.8.2012
J27	Český Dvůr	49°38'12.599"N, 15°35'15.601"E	10.8.2012
J28	Havlíčkův Brod	49°37'18.025"N, 15°34'15.076"E	15.8.2012
J29	Rozňák	49°38'21.447"N, 15°33'46.125"E	10.8.2012
J30	Věž	49°33'54.056"N, 15°28'11.507"E	14.7.2012
J31	Svitálka	49°36'31.931"N, 15°26'49.398"E	14.7.2012
J32	Lipnice nad Sázavou	49°36'28.986"N, 15°25'9.378"E	14.7.2012
J33	Pohledští Dvořáci	49°36'24.405"N, 15°36'41.951"E	10.8.2012

#### 4.1.5 Izolace DNA

V třetí misce byly na prach rozdrčeny dva středně velké listy *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. Do mikroskopické pipety byl pipetou nanesen 1 ml 2% CTAB a 2 µl 2-merkaptoethanolu a zahřát na 65 °C. Zahřátým roztokem byl spláchnut prach v třetí misce zpět do mikroskopické pipety. Následovala inkubace 1,5 hodiny při 65 °C v termobloku. K zahřátému roztoku bylo přidáno 600 µl směsi chloroformu a izoamylalkoholu (v poměru 24 : 1), směs byla promíchána protřepáním a nechali jsme ji 5 minut stát. Následovala centrifugace v centrifuze chlazené na 4 °C při 11 000 otáčkách/min po dobu 15 min. Horní vrstva roztoku byla odebrána pipetou do nové mikroskopické pipety a krok se zopakoval. Po centrifugaci bylo k roztoku přidáno 60 µl 3 mol/dm<sup>3</sup> octanu sodného a 500 µl izopropanolu a směs promíchána převrácením mikroskopické pipety. Roztok byl přes noc inkubován v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Druhý den byl roztok centrifugován 30 min v centrifuze chlazené na 4 °C při 11 000 otáčkách/min. Jedním tahem byl slit chloroform a izoamylalkohol. Následně bylo přidáno 200 µl 70% ethanolu z mrazicího boxu a bez promíchání centrifugováno v centrifuze chlazené na 4 °C při 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci byl ethanol opět slit a ke sražené DNA bylo přidáno 200 µl sterilní destilované vody. Koncentrace DNA

byla změřena pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (V3.7.0). Vzorek byl uchován v mrazicím boxu při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.6 PCR reakce (polymerázová řetězová reakce)

Izolovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR = polymerázové řetězové reakce. Připravili jsme si roztok  $12,5\text{ }\mu\text{l}$  Fast Start PCR Master (Roche, Německo) +  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  reverse primeru +  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  forward primeru +  $10,5\text{ }\mu\text{l}$  sterilní destilované vody, dále jsme do mikrozkušavky pipetou nanесли  $1\text{ }\mu\text{l}$  DNA a lehce stočili na minicentrifuze. Následně jsme mikrozkušavky s reakční směsí vložili do termocykleru a nastavili PCR po dobu 1 h 20 min, jejíž teplotní a časový profil je uveden v tabulce č. 1. K PCR reakci byly použity specifické primery uvedené v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2:** Teplotní a časový profil reakce PCR

(dostupné z: <http://www.roche-applied-science.com> )

cykly	kroky	stanovená teplota	čas
1 cyklus	počáteční denaturace	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	4 min
35 cyklů	denaturace	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s
	nasednutí primerů	$40 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 s
	prodlužování	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	45 s – 3 min
1 cyklus	konečné prodloužení	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	7 min

**Tabulka č. 3:** Primery

(dostupné z <http://nature.berkeley.edu/brunslab/tour/primers.html>, Délye *et* Michel, 2005)

primer	sekvence (5'→3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ACCp1	CAACTCTGGTGCTIGGATIGGCA
ACCp1R	GAACATAICTGAGCCACCTIAATATATT
ACCp4	CAGCITGATTCCCAIGAGCGITC
ACCp2R	CCATGCAITCTTIGAGITCCTCTGA

#### 4.1.7 Elektroforéza

Úspěšnost amplifikace byla detekována pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu. K 80 ml TBE pufru bylo přidáno 0,8 g agarózy, výsledný roztok se postupně zahříval v mikrovlnné troubě, dokud nebyl průhledný bez kousků agarózy. Po krátkém vychladnutí (na dotek ruky) bylo pipetou naneseno do roztoku 6,4 µl Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA) promícháno a následně vylito do připravené elektroforetické vany s hřebínkem. Po ztuhnutí gelu (cca 20 min) byl hřebínek vytažen a vana přenesena do elektroforetické komůrky s TBE puftrem, tak aby gel byl ponořen. Do první jamky bylo pipetou naneseno 5 µl DNA Molecular Weight Marker III 0,12–21,2 kbp (Roche, Německo) + 1 µl 6xLoading Buffer (Takara, Japonsko). Do dalších jamek 1 µl Loading Buffer + 1 µl DNA + 4 µl destilované vody. Následně byla aparatura připojena ke zdroji, elektroforéza probíhala 45 min při stejnosměrném napětí 100 V. Po odpojení a osušení byl gel přenesen do Transilluminátoru UVT-20M (Herolab) s Kodak EDAS 290 pomocí, kterého byl vyfotografován pod UV světlem.

#### 4.1.8 Purifikace PCR produktů a sekvenace

K odstranění chemických nečistot a kratších nedosyntetizovaných řetězců byl použit GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma, USA).

1. Do mikrozkušavky bylo pipetou naneseno 500 µl Column Preparation Solution. Následovala centrifugace 1 min při 12 000 otáčkách/min. Poté byl eluát slit. Tímto krokem se zvýšilo navázání DNA na křemičitou membránu na kolonce.
2. Do mikrozkušavky s PCR produktem bylo pipetou naneseno 100 µl Binding solution (5x objem PCR produktu), promícháno tak, aby roztok byl homogenní. Výsledný 125 µl roztok byl pipetou nanesen do středu kolonky a centrifugován 1 min při 12 000 otáčkách/min. Eluát byl opět slit.
3. Do kolonky bylo naneseno 500 µl Wash Solution a následovala centrifugace 1 min při 12 000 otáčkách/min. Eluát byl slit a opět centrifugován, tentokrát bez jakéhokoliv roztoku 2 min při 12 000 otáčkách/min. Došlo k odstranění přebytečného ethanolu.
4. Kolonky byly přeneseny do nových mikrozkušavek a bylo pipetou naneseno 50 µl Elution Solution do centra kolonek. Vyčkalo se 1 min a poté opět proběhla centrifugace 1 min při 12 000 otáčkách/min. Kolonka byla odstraněna. Byla změřena koncentrace

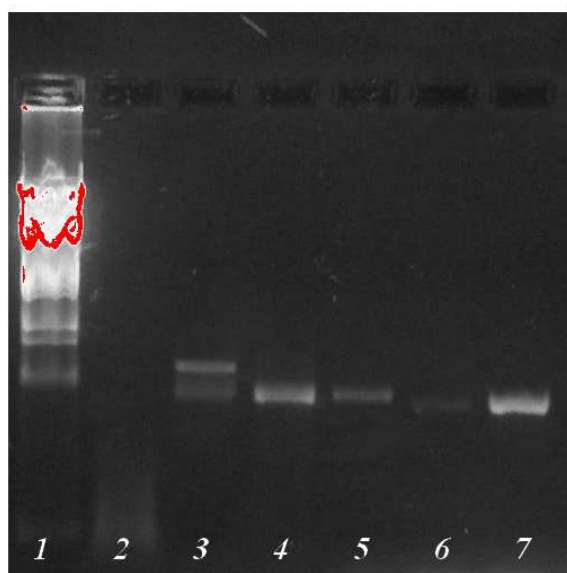


DNA pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (V3.7.0). Výsledný eluát byl připraven k sekvenaci (skladování možné v mrazicím boxu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Sekvenování bylo provedeno firmou SEQme s.r.o. v Dobříši (<http://www.seqme.eu/>).

## 5 Výsledky

K analýze bylo použito 33 vzorků *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. nasbíraných na polích kraje Vysočina a Olomouckého kraje. Byla provedena izolace DNA, měření koncentrace, PCR genu ACC1, ACC2, ITS a následně ověření PCR elektroforézou – viz obrázek č. 6, purifikace a opět měření koncentrace. PCR amplifikace všech tří genů se zdařila u jedenácti vzorků viz tabulka č. 4 (uvedeno i s koncentrací DNA po purifikaci), u ostatních se nezdařila pravděpodobně díky nečistotám ze vzorků, které mohou inhibovat DNA-polymerázu. Výsledky sekvenace – viz příloha – získané firmou SEQme s.r.o. byly bioinformaticky zpracovány.



1) DNA marker, 2) ITSJ23, 3) ACC1J23,  
4) ACC2J23, 5) ITSJ22, 6) ACC1J22, 7) ACC2J22

**Obrázek č. 6:** Ověření PCR elektroforézou

**Tabulka č. 4:** Vzorky po PCR ověřené elektroforézou + koncentrace DNA

vzorek	vzorek + oblast genu	koncentrace DNA v ng/ $\mu$ l
	ITSJ2	11,2
J2	ACC1J2	17,5
	ACC2J2	16,4
	ITSJ5	12,2
J5	ACC1J5	12,5
	ACC2J5	17,7
	ITSJ6	10,2

J6	ACC1J6	8,8
	ACC2J6	13
	ITSJ7	10,4
J7	ACC1J7	10,1
	ACC2J7	8,9
	ITSJ8	12
J8	ACC1J8	10
	ACC2J8	8,8
	ITSJ9	11,9
J9	ACC1J9	11,4
	ACC2J9	12
	ITSJ13	9
J13	ACC1J13	10,4
	ACC2J13	7,5
	ITSJ15	11,3
J15	ACC1J15	9
	ACC2J15	11,1
	ITSJ20	21,5
J20	ACC1J20	23,7
	ACC2J20	24,2
	ITSJ21	12,1
J21	ACC1J21	24
	ACC2J21	19,6
	ITSJ22	16,7
J22	ACC1J22	15,9
	ACC2J22	18

Region genu ACC1 byl porovnán u všech vzorků pomocí algoritmu ClustalW2 na webových stránkách <http://www.ebi.ac.uk/> viz obrázek č. 7 a č. 8. Sekvence byly velmi homogenní, nalezena byla pouze jedna mutace u vzorku č. J2. Dále jsme pomocí algoritmu BLAST dostupného na webových stránkách <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> převedli sekvenci nukleotidů na sekvenci aminokyselin a porovnali ji se vzorkem z genové banky ADR32359.1 viz obrázek č. 9. Ke vzniku rezistence vůči herbicidu u genu ACC1 vede záměna isoleucinu = I za leucin = L na pozici 1781 dle autorů Déyelea a Michela (2005). U žádného ze vzorků nedošlo k této rezistenci vůči herbicidům inhibujícím ACCasu podmiňující záměně. Srovnáním sekvencí ACC2 bylo nalezeno několik mutací, žádná z nich nevedla k záměně podmiňující rezistenci vůči herbicidu inhibujícího ACCasu. Konkrétně by dle autorů Déyelea a Michela (2005) muselo dojít k záměně tryptofanu za cystein na pozici 2027 nebo isoleucinu za asparagin na 2041, asparagové kyseliny za glycin na 2078 nebo glycinu za alanin na pozici 2096. Sekvence genu ITS byly amplifikovány k ověření správného botanického zařazení pokusných

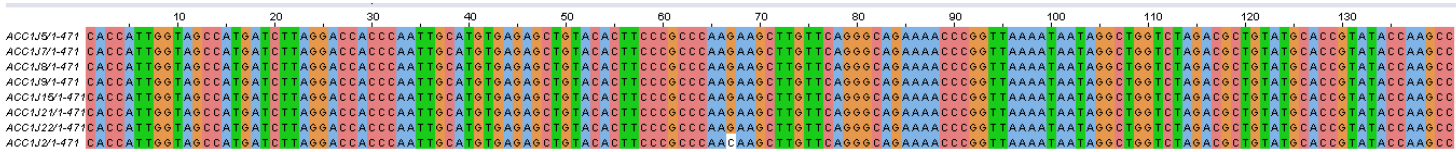
rostlin a případně analýze jejich fylogenetického vývoje, ale nebylo je možné bioinformaticky zpracovat z důvodu nekvalitních sekvenčních dat.

```

ACC1J21      GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J22      GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J15      GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J9       GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J8       GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J7       GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J5       GCCCAAGAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
ACC1J2       GCCCAACAAGCTTGTTCAGGGCAGAAAACCCGGTTAAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCT 120
*****

```

Obrázek č. 7: Sekvence nukleotidů ACC1 – vybraný úsek



Obrázek č. 8: Sekvence nukleotidů ACC1 – celá

Download ▾ GenPept Graphics

acetyl-CoA carboxylase [Echinochloa crus-galli]  
Sequence ID: [gb|ADR32359.1](#) Length: 2316 Number of Matches: 1

Range 1: 1703 to 1857 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
291 bits(745)	9e-88	Compositional matrix adjust.	152/155(98%)	155/155(100%)	0/155(0%)	-3
Query 466	MGIADKSKCFRVGWSDEGSPERGFQYIYLTEEDYDRISSSVIAHKLQLDSGEVRWIIDS				287	
Sbjct 1703	IGIADKSKCFRVGWSDEGSPERGFQYIYLTEEDYDRISSSVIAHKLQLDSGEVRWIIDS				1762	
Query 286	VVGKEDGLGVENIHGSAASASAYSRAEETFTLTFVTGRTVIGAYLARLGIRCIQRDQ				107	
Sbjct 1763	VVGKEDGLGVENLHGSAAIASAYSRAEETFTLTFVTGRTVIGAYLARLGIRCIQRDQ				1822	
Query 106	PIILTGFSALNKLGVREYVSSHMLGGPKIMATNG		2			
Sbjct 1823	PIILTGFSALNKL+GREVYSSHMLGGPKIMATNG		1857			

Obrázek č. 9: Sekvence aminokyselin ACC1 – porovnání vzorku J2 se vzorkem z genové banky ADR32359.1

## 6 Diskuse

V této bakalářské práci byl metodicky zvládnut postup molekulární detekce rezistence ježatky kuří nohy vůči herbicidům inhibujícím acetyl koenzym A karboxylázu. Dle autorů Mikulky *et* Slavíkové (2008) je v současné době aktuální riziko vzniku rezistence ježatky kuří nohy vůči herbicidům inhibujícím ACCasu. Detekcí mutací sekvenovaných úseků genů ACC1 a ACC2 u nasbíraných vzorků a porovnáním mutací způsobujících rezistenci u psárky polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.) dle autorů Déyelea *et* Michela (2005) jsme zjistili, že žádný z našich vzorků nebyl k tomuto herbicidu rezistentní. Jedinci byli sbíráni na polích (vyjma okrajů), kde byl vzhledem k malému výskytu plevelů pravděpodobně herbicidní přípravek použit. V ČR je dosud známá pouze rezistence ježatky kuří nohy k herbicidům inhibujícím fotosystém II, vůči herbicidům inhibujícím ACCasu se vyvinula rezistence v USA, Itálii, Thajsku, S Koreji, Turecku a Číně (Heap, 2013). Nasbírání jedinci mohli být rezistentní (target-site) vůči jinému herbicidu nebo u nich mohla být vyvinuta metabolická rezistence. Ve světě se vyvinula rezistence vůči herbicidům inhibujícím fotosystém II, syntetické auxiny, ALS, ACC, chloracetamidům, thikarbamátům, triazolům, močovinám (Heap, 2013). Vzorky byly po sekvenování porovnány s rezistentním a citlivým jedincem z genové banky č. ADR32359.1 autorů Huana, Jina, Thanga a Wanga, byla nalezena 99% homologie, z toho vyplývá, že variabilita genu je nízká. Geny ITS nebylo možné z důvodu nekvalitních sekvenačních dat analyzovat.

## 7 Závěr

V této práci byla metodicky zvládnuta molekulární detekce rezistence ježatky kuří nohy vůči herbicidům inhibujícím acetyl koenzym A karboxylázu. Na základě sekvenčních dat genů ACC1 a ACC2 byly zkoumány mutace, které způsobují vznik rezistence. Jedinci s rezistentním genotypem vůči herbicidům inhibujícím ACCasu nebyli detekováni. Geny ITS, potvrzující fylogenetickou příbuznost, nebylo možné analyzovat z důvodu nekvalitních sekvenačních dat. Ověření metodiky v praxi poskytuje možnost budoucího výzkumu rezistence ježatky kuří nohy.

## 8 Seznam použitých zkratk

ACC	acetyl koenzym A karboxyláza
ALS	acetolaktát syntáza
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II

## 9 Seznam použité literatury

- 1 ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. *Základy buněčné biologie–úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero publishing, 1998, 630 s.
- 2 BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: Úvod*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 389 s.
- 3 CABRITO T. R., REMY E., TEIXEIRA M. C., DUQUE P., SÁ-CORREIA I. Resistance to Herbicides in the Model Organisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: the Involvement of Multidrug Resistance Transporters. In: *Herbicides and Environment*. Rijeka: 2011, s. 623–639
- 4 CAMPBELL, N. A. a REECE, J. B. *Biologie*. Brno: Computer Press s.r.o., 2006, 1332 s.
- 5 CREMLYN, R. *Pesticidy*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1985, 244 s.
- 6 CVRČKOVÁ, F. *Úvod do praktické bioinformatiky*. Praha: Academia, 2006, 138 s.
- 7 ČAČA, Z. *Ochrana polních a zahradních plodin*. Vydání druhé. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990, 368 s.
- 8 DEVINE M. D., DUKE S. O., FEDTKE C. *Physiology of Herbicide Action*. New Jersey: Prentice Hall, 1993
- 9 DEYL, M. *Plevelé polí a zahrad*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1964, 392 s.
- 10 DÉYELE, C. a MICHEL, S. Universal primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Research*. 2005, s. 323–330
- 11 DVOŘÁK, J. *Praktikum z herbologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998, 87 s.
- 12 DVOŘÁK, J. a SMUTNÝ, V. *Herbologie – Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 186 s.
- 13 FIŠER, F. Hubení plevelů v porostech řepy. *Obilnářské listy*. 1997, č. 2, s. 3–5



- 14 GONSOLUS, J. L. *Herbicide resistant weeds*. Regents of the University of Minnesota, 2001
- 15 HAMOUZOVÁ K., SALAVA J., SOUKUP J., CHODOVÁ D., KOŠNAROVÁ P. Weed resistance to herbicides in the Czech Republic: History, occurrence, detection and management. *Herbicides – Mechanisms and mode of action*. Rijeka: InTech – Open Access Publisher, 2011, s. 83–102
- 16 HEAP, I. *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. [online]. [cit. 2013-03-13]. Dostupné z: [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)
- 17 HRON, F. Teoretické principy studia škodlivosti, biologie a komplexního hubení jednotlivých druhů plevelů. In: *Komplexní hubení plevelů v ČSSR: 1. vědecká konference*. Praha, 1969, s. 5–20
- 18 HRON, F. a VODÁK, A. *Polní plevelé a boj proti nim*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1959, 373 s.
- 19 CHODOVÁ, D. a MIKULKA, J. *Herbicide-resistant weeds – present state of research*. [online]. 2002 [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: [http://konference.agrobiologie.cz/2002-09-25/052\\_Chodova-Mikulka.pdf](http://konference.agrobiologie.cz/2002-09-25/052_Chodova-Mikulka.pdf)
- 20 JULIANO L. M., CASIMERO M. C., LLEWELLYN R. Multiple herbicide resistance in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in direct-seeded rice in the Philippines. *International Journal of Pest Management*. 2010, roč. 56, č. 4, s. 299–307
- 21 JURŠÍK M., HAMOUZKOVÁ K., SOUKUP J., HOLEC J. Důležité aspekty herbicidní ochrany: Rezistence plevelů vůči herbicidům a problémy s rezistentními populacemi v ČR. *Listy cukrovarnické a řepařské*. [online]. 2011c, roč. 127, č. 4 [cit. 2013-01-02]. Dostupné z: [http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2011/PDF/123-129.pdf](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2011/PDF/123-129.pdf)
- 22 JURŠÍK M., SOUKUP J., HOLEC J., ANDR J. Inhibitory acetolaktát syntázy (ALS inhibitory). *Listy cukrovarnické a řepařské*. [online]. 2010, roč. 126, č. 11, s. 376–379 [cit. 2013-01-02]. Dostupné z: [http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2010/PDF/376-379.PDF](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/376-379.PDF)
- 23 JURŠÍK M., SOUKUP J., HOLEC J., ANDR J. Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Růstové herbicidy (syntetické auxiny). *Listy*

- cukrovarnické a řepařské*. [online]. 2011b, roč. 127, č. 1 [cit. 2013-01-02].  
Dostupné z: [http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2011/PDF/88-92.pdf](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2011/PDF/88-92.pdf)
- 24 JURŠÍK M., SOUKUP J., HOLEC J., HAMOUZ P. *Plevelé: biologie a regulace*. České Budějovice: Kurent, 2011a, 232 s.
- 25 KALINOVÁ J., MOUDRÝ J., KOVALINA P. *Ochrana rostlin v ekologickém zemědělství*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2007, 43 s.
- 26 KAZDA J., MIKULKA J., PROKINOVÁ E. *Encyklopedie ochrany rostlin – polní plodiny*. Praha: Profi Press s.r.o., 2010, 399 s.
- 27 KOHOUT, V. *Herbologie: plevelé a jejich regulace*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 1996, 116 s.
- 28 KONVALINA P., MOUDRÝ J., KALINOVÁ J., CAPOUCHOVÁ I., STEHNO Z. *Pěstování obilnin a pseudoobilnin v ekologickém zemědělství*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2008, 62 s.
- 29 KUBÁT, J. *Podmínky udržování vyrovnané bilance organické hmoty v půdě: Metodika pro zemědělskou praxi*. Praha: ÚZPI/UVTIZ, 1998, 27 s.
- 30 KUDSK, P. Optimising Herbicide Performance. In: NAYLOR, R. E. L. *Weed Management Handbook*. Oxford: British Crop Protection Council, 2002
- 31 MASSA D., KRENZ B., GERHARDS R. Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed research*. 2011, č. 51, s. 294–303
- 32 MIKULKA, J. Problematika vzniku rezistence plevelů vůči herbicidům. In: KNEIFELOVÁ, M. *Biologie a regulace plevelů: Sborník ze semináře*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003, s. 5–10
- 33 MIKULKA, J. a CHODOVÁ, D. *Rezistence plevelů vůči herbicidům*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998, 45 s.
- 34 MIKULKA, J. a CHODOVÁ, D. *Hubení plevelů odolných vůči herbicidům*. Třetí upravené vydání. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2002, 54 s.

- 35 MIKULKA J., CHODOVÁ D., KOHOUT V., MARTINKOVÁ Z., SOUKUP J., UHLÍK J. Plevelné rostliny polí, luk a zahrad. *Farmář – zemědělské listy*, 1999, 151 s.
- 36 MIKULKA, J. a KNEIFELOVÁ, M. *Rizika kontaminace potravin a pitné vody herbicidy*. [online]. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003, s. 10 [cit. 2013-01-02]. Dostupné z: <http://www.phytopsanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>
- 37 MIKULKA, J. a SLAVÍKOVÁ, L. *Metody diagnostiky a regulace rezistentních plevelů vůči herbicidům*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008, 40 s.
- 38 NOVÁKOVÁ, V. *Herbicidy pro okrasné rostliny a dřeviny*. Průhonice: VŠÚÓZ, 1986, 128 s.
- 39 PIKULKA J., OBDRŽÁLKOVÁ D., ZAPLETAL M. *Polní zahradní a lesní plevele ČR*. Praha: Peres, 1997, 256 s.
- 40 PROKOP, M. Riziko vzniku rezistence plevelů vůči herbicidům a opatření, jak vzniku předcházet. *Rostlinolékař: časopis specializovaný na ochranu rostlin*. 2009, roč. 20, č. 6, s. 24–26
- 41 ROSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., 2002, 1200 s.
- 42 SLAVÍKOVÁ-HOLCOVÁ, L. a MIKULKA, J. Rezistentní plevele v České republice ježatka kuří noha – *Echinochloa crus-galli*. *Agromanuál*. 2009, roč. 4, č. 9–10, s. 22
- 43 SNUSTAND, D. P. a SIMMONS, M. J. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 871 s.
- 44 SOUKUP, J. Metody regulace plevelů. In: MIKULKA, J. *Plevelné rostliny polí, luk a zahrad*. Praha: Farmář – zemědělské listy, 1999, s. 36–51
- 45 SOUKUP, J. Metody regulace zaplevelení. In: MIKULKA, J. a KNEIFELOVÁ, M. *Plevelné rostliny*. Praha: Profi Press s.r.o., 2005, s. 39–58
- 46 ŠAFÁŘOVÁ, D. *Kapitoly z obecné genetiky*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 111 s.
- 47 ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTŮČEK R., RŮŽIČKOVÁ V., KOPTÍKOVÁ J. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s.

- 48 ŠTĚPÁNEK, P. *Podzimní odplevelení ozimých obilnin je základ*. [online]. 25.08.2005a [cit. 2012-12-27]. Dostupné z: <http://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/plevele/podzimni-odpleveleni-ozimych-obilnin-je-zaklad-2.html>
- 49 ŠTĚPÁNEK, P. *Strategie minimalizující rezistenci plevelů k herbicidům*. [online]. 17.06. 2005b [cit. 2013-01-02]. Dostupné z: <http://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/plevele/strategie-minimalizujici-rezistenci-plevelu-k-herbicidum.html>
- 50 TARDIF, F. J. a POWLES, S. B. Target site-based resistance to herbicides inhibiting acetylCoAcaroxylase. In: *Brighton Crop Protection Conference – Weeds*. Brighton: 1993, s. 533–539
- 51 VANC, P. *Zahrada bez plevelu*. Praha: Grada Publishing spol. s.r.o., 2001, 72 s.

#### **Internetové zdroje**

- 1 *Basic Local Alignment Search Tool* [online]. [cit. 2013-02-03]. Dostupné z: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 2 *College of Natural Resources University of California, Berkeley* [online]. [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: <http://nature.berkeley.edu/site/index.php>
- 3 *Květena ČR* [online]. [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/>
- 4 *Plant & Soil Sciences eLibrary* [online]. 2013 [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: <http://passel.unl.edu/pages/>
- 5 *Roche Applied Science* [online]. [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: <https://www.roche-applied-science.com>
- 6 *The European Bioinformatics Institute* [online]. [cit. 2013-02-03]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/>
- 7 *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. [online]. [cit. 2013-03-13]. Dostupné z: [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com)

# 10 Přílohy

## Sekvence genu ACC1:

>ACC1J2\_F04.ab1

```
CACCATTTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAACAAG
CTTGTTTCAGGG
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC
CTCCTTGCCCAACAACAGAGTCAATAATCCACCTAACTTCACCACTATCCA
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG
```

>ACC1J5\_G04.ab1

```
CACCATTTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG
CTTGTTTCAGGG
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC
CTCCTTGCCCAACAACAGAGTCAATAATCCACCTAACTTCACCACTATCCA
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG
```

>ACC1J7\_A05.ab1

```
CACCATTTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG
CTTGTTTCAGGG
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC
CTCCTTGCCCAACAACAGAGTCAATAATCCACCTAACTTCACCACTATCCA
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG
```

>ACC1J8\_B05.ab1

```
CACCATTTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG
CTTGTTTCAGGG
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC
CTCCTTGCCCAACAACAGAGTCAATAATCCACCTAACTTCACCACTATCCA
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG
```

>ACC1J9\_C05.ab1

```
CACCATTTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG
CTTGTTTCAGGG
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC
CTCCTTGCCCAACAACAGAGTCAATAATCCACCTAACTTCACCACTATCCA
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG
```

>ACC1J15\_E05.ab1

CACCATTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG  
CTTGTTTCAGGG  
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA  
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT  
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC  
CTCCTTGCCCAACAGAGTCAATAATCCACCTAECTTACCACACTATCCA  
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG  
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG  
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG

>ACC1J21\_G05.ab1

CACCATTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG  
CTTGTTTCAGGG  
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA  
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT  
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC  
CTCCTTGCCCAACAGAGTCAATAATCCACCTAECTTACCACACTATCCA  
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG  
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG  
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG

>ACC1J22\_H05.ab1

CACCATTGGTAGCCATGATCTTAGGACCACCCAATTGCATGTGAGAGCTGTACACTTCCCGCCCAAGAAG  
CTTGTTTCAGGG  
CAGAAAACCCGGTTAAAATAATAGGCTGGTCTAGACGCTGTATGCACCGTATACCAAGCCGAGCAAGATA  
AGCTCCTATTTCCTACAGTCCGCCCAGTCACGAATGTAAGTGTAATGTCT  
CCTCATATGCCCTAGAATAAGCACTGGCAATAGCAGCACTTCCATGTATATTCTCAACACCAAGACCATC  
CTCCTTGCCCAACAGAGTCAATAATCCACCTAECTTACCACACTATCCA  
GCTGCAGCTTGTGTGCTATAACAGAAGAGCTAATACGATCATAGTCTTCTTCAGTCAAATAAATGTACTG  
AAACCCACGTTTCAGGGCTGCCTTCATCAGACCACCCAACACGGAAGCAAG  
ATTTCACTTCATCGGCTATGCCCATCCCAG

## Sekvence genu ACC2:

>ACC2J5\_B06.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAGGAATGTAGACAAATGCAGGYTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAYGC  
CCGAGCTGTCTTGTTGCAGAATCTGGGAACCACACTTGTCCAGCACGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J6\_C06.ab1

CCCTTGAGGTTCCAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAKGAATGTAGACAAATGCASGSTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAYGC  
CCGAGCTGTCTTGTTGCAGAATCTGGGAACCACACTTGTCCAGCCCCGAKGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J7\_D06.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAGGAATGTAGACAAATGCAGGSTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC

AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCCCCGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J8\_E06.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAGGAATGTAGACAAATGCAGGYTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCACGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J9\_F06.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAGGAATGTAGACAAATGCAGGYTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCACGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J15\_H06.ab1

CCCTTGAGGTTCCAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAKGAATGTAGACAAATGCAGGSTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCACGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J20\_A07.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAGGAATGTAGACAAATGCAGGYTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCACGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J21\_B07.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAKGAATGTAGACAAATGCAGGYTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCACGAKGAACAGACCG  
CTCCTG

>ACC2J22\_C07.ab1

CCCTTGAGGTTCAAGAACATTTCTTTAGCAGTCCTCTCAGC  
ATAAACTCAATGCGGTCTGGATTTATTTTGCTATCAACCACAACCCAAGCTCCTCCACG  
CAGCTCTCCAGCCATAGGAATGTAGACAAATGCAGGYTGATTGTATGTCCTAAGATTCTC  
AACAATTGTTGACCCAGCCTGAAGAATTCCTTCAAACAGATCTCTTTGYCCACCGGAAAA  
ACCTCTCCAGTTAGCAAGGATGAAYAGAGGCAATCCTTCACGGTTGAAATCCAAYAAYGC  
CCGAGCTGTCTTGGTTGCAGAATCTGGGAACACACTTGTCCAGCACGAGGAACAGACCG  
CTCCTG

## Sekvence genu ITS:

>13\_127\_001\_ITSJ2\_C03.ab1

GYKGGKRARRTTACAAAAACRRACSGCGAACGTGTCTCMATGCTGSCGGGCTTCGGKCCGGKAAAGGCTC  
CCGACCTTCRTTTCGAGGGGGAGGAGCCGCAAAGAACCACGGCGCCGAAGGCGTCAAGGAACACTAAT  
ATTGCCTTGCTCGGGACCGTGGCTGGCTTGCCAGCCACTGCCCCTGCAGCGATGCTATACTAATSCACAC  
SACTCTCGGCAACRGATATCTCGGCTCTCGCATCKATGAAGAACGTASCAAAATGCGATACTGGTGTGA  
ATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTTCTGGCCGAGGGCAC  
SCCTGCSTGGGCGTCACGCCAACAGACTCCCAMCCCATCATCGGGTGWARGATGTGSGTTTTGGCTCC  
CCGTGCCTGAAGGTGCGGTGGGCCGAARTTGGGGCTGCCGGCATAACCGTGKCGGGCACAGRCGTGGTGG  
GCGACTACAAGTTGTTCTCGGTGCAGCGTCCCGGCACGCAGCTAGCTTGATGGCCCTAAGGACCCATGWA  
CAACCGAAGCGCACTGTCTCGCTCGGACCGCGACCCCAGGTGAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATA  
TCAATAAGCGGAGGAAA

>13\_127\_002\_ITSJ5\_D03.ab1

ATAAWWAGACCCTTGCCAACCGRACRGCGAACGKGTCTCAATGCTGCCGGGCTTYCGTCCCKGGAAGGCT  
CCCACCTTCGATTTCGAGGGGGAGGAGCCGCAAAGAACCACGGMGCCGAAGGCTTCGAGGATCACTAA  
TATTGCCCTTGMTCGGGACCGTGGCTGGCTTGCCMGCCWGTGACCGKGTGGCGATGCTATACTAAACCACA  
CSACTCTCGTGAACGGATATCTCGGCTCTCGCAACKATGAAGAACGTACCAAAMTGTGATACCTGGTGTG  
AATTGCAGAATCCCSRAACCATCGAGTTTTTGAACGCMAGTTGCRCCCKAGGCCTTCTGGYCGAGGGCA  
CSCCTGCCTGGCWGTCTTGCCWACAGACTCCCACCCCATCATCGGGYGTAGGATGTGGCGTTTTGGCT  
CCCCGTGCCTGAAGGTGCGGTGGGCCGAAATTGGGGCTGCCRGCTTACCGTGTGTTTGCACASTTCGTGGT  
GGGCAACTACAAGTTGTTCTCGGTGAAMCGTCCCGGCWCRCWACTAGCTTGATGGCCCTAAGGACCCATG  
TACAACCGAAGCGCACTGTCTCGCTCGGACCGCGACCCCAGGTGAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCA  
TATCAATAAGCGGAGGAATT

>13\_127\_003\_ITSJ6\_E03.ab1

CAAAAAAAAAATGAWTGCATTCCTGGAGGTCTCGCGATCATGCTTGTGTAATCTTCACCCTTGTCGGTTG  
CGCTTTAAGGGCCTTGGTGGGTTCGCCAACAGTAGGAGAAAGCTAAATCTTTTGWAAATGCTACTCRTC  
TKTAECTTATTAATAACACAACCTTTCRACAACGGATCTCTTGGWCTTGGCACGATGAAAAAGTGRATWAA  
ATGCGATAATTTGTGTAATTGCARAATTCAGTGAATCATCCAATCTTTGAACCCCGTTGCGCCCTTTGGW  
ATTCCAATGTATGCTGTTTTCCGCCATTTGTACCCTCTTGCTTTGCTTGTGTTGGTGMWCTTGTCT  
CAYMATTTGCTGGAGACTCSKATAAAGTAATTGGCASC CGSCTACTGGTTTTCTGARCGCAGYACAAGA  
SGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTTTTCATACGTTAAACCTTTTTTTCAACTTTTGACCCCKKATCAMGTA  
GGGATACCCGATGSACTTRAACATATC

>13\_127\_004\_ITSJ7\_F03.ab1

AAAACAAAGAACTCGWGCCTACKGCCACGTTGCTCTGACACKTTTTTTTTTGAATTTTTTTKCCCTCKCGG  
SGGCCCCGCTCCGGGAGGAGAGGGGGAGGAACCAGTAAMACATTCRAGCCTTTTGAATGAATTAAMT  
TTAATTATAAAYTAAAAATTTCAACACTCTCKCCTTGGGTCCGGCGGCTAGAAWAAAATGACAAAGTGMA  
TTAAAAAAGGTAATTTGCCAAATTCGCGGAACACCCAAATTTGAACCTTTTTTTGCCCCCTGGRAGTCC  
GGGGGGGCTGCATTTTTTTGACGGTCTTTMCCCCGTTGGCCCTGTTTCTATSGGGGGTGS GGKCGWCCCG  
CCTCCCYAAAATCGGGAGACGGGTCCCTCCGGTCCCTAGCAMWTTMCCAACCGTTTTCCGAACGGRRGACA  
GGTCGCWCACYCSATAAACAACGCCTTTCTACGTTAAACCTSGKTTWCGMWGTGAAACCCCGCATAACC  
GTASGGATACCGAAAGAARRGAAC

>13\_127\_005\_ITSJ8\_G03.ab1

AYAAAAAAAAATTTGGGSACTTCGGYCTGCTCCTCTTACCCATGTCTTTTGARTACCTTCGYTTCTCCTCGG  
CGGSYCCGTAASAATTTGGACRASATTCARCCCTTTGCAGKTGCAAKCACCGTCTGAAAAACATAATA  
RTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAKAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA  
TGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCKAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGG  
CATGYCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCGCTGCTT  
G



>13\_127\_006\_ITSJ9\_H03.ab1

TAAATTTTWTGCCGTCGCCAGGCTATCCCAACCCTGCTTTTTGAATTCMTTCGCTTCCKCGGCGGCCCTG  
CCTTCCGATGGGAGCTATTGGWGCACMTAGCAGKACAAYCKKACCTGAAAAAATGASTAAATTTAATTT  
TTAAATTAMGACTTTCTTGATTTTTCTCTTGTAATAGCGCCKARAAATGAGACAACCTAAKGGGAATTGC  
AAATGTGAATGGAACAACCTCATCGTTGCACCCACATTGCGCCCCMATTGTCCCTGGGGGATGTCCGGTC  
GACCSTCATGTGCKACCTGCATTTCTCCTTGTGTTGGTGGTTCYCCGCTGYTWGTAGACCCGCC  
TTAAAAAATTTGGCAGCCGGGTCATTTGTTTCTTAGRCRACCTGCATCCCCTTTTGAACCTCAGTTTCGAC  
GACCTCCCTCGAACATTTTTGCCTTTTGACCTTGAACCTTGTTCWCATATTGATACACCTTAAMCTTATC  
GRTAACCGGAAGSASATGAAC

>13\_127\_007\_ITSJ13\_A04.ab1

CAAATCCAKAAATTTGGAGGCYTTTTYCTGCCTCTCTTACCCATGTCTTTGTGTGTACCTTCGTTTCMTCKG  
YGGGTCCRCCTTTTTAAAAGGATGKTGAAAYCATTTGCAGTTGSRATCARCGTCTGACAAAAGTAWTGCAT  
ACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTCTTGGTTTTCRATGAAGAACGCTTGGAAATGCGATAAATAATGA  
GAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCRAATCTTTTAACTCACATTGCGCCCCCTTGTCAATTCCATGGGCAWT  
GCCTGTTCKAGCGTCTTTGTGCCTTTCMAKCTCTGATTGKCGTTTTGGWGYTTGKCTCKCTGCTGCGCGTW  
GAGCKCCTCACTCCAATTGGGATCCGGAGTATTGATTTTCGGARTTGACWACATCTCKCCTTTTGTCTC  
ATACAGACCACGTCCAACCTCTCTATTTTTTACACTCTTGACCTCCGATCAGGCATGGATAACGCTTAACC  
TACGCATATCGWTRGGCGAACGAATGAACCTAARCATATCAATRACKCSGAGGAAYT

>13\_127\_008\_ITSJ15\_B04.ab1

AATYMRAAAACYSWGCGTCTGYCTGGTTCTCTTACCCCTGTTSTTTTSCGAATYTGTTYTTTCCKCGGCG  
ACCCTGKTTGCCTTACGAGATTATRAGTGGATTGTTSTTGTCTTTCCKAATGAAAAACWTAATAATAAC  
TTCTTTTATAAACTGAAACCTTGGTTCTGGATCTCTTGGWAACGGCMTCAAATAAGAAARSWACTGAGAG  
TTGTAAATTTTGTGAATGMTCAAATCTTTGAAACMTCAATGCTTTGAAACGGTATTTGAKGCCCTGGCA  
TTCCGGGGGGYCWTTTGGACCTACCGGCTCTTCTTGGTGTGGGCGTTTTGTGGCATTGGGGKGGYCGGAC  
TCCCCTTAWCCTCATTTGGCAGCCGCTGGGTCTTCTGTCCCCTGCCGTTGTGGAAACTATTTGCTAAAGGG  
TGKACGACATCCTACCCCTTTTTTTCCCATTTGACCACGTTTTCCCCTAGGTATACCCGCTGAACTTCK  
CAATCAAYAAKYRCARGKAGMRGAKGAA

>13\_127\_009\_ITSJ20\_C04.ab1

CWWATTCCATTGCAWCCWCCCCGTTTTCGTGTCTCWWTGCTGCCGGGCTTCYTCCCKGKRGGGCTCCCSACC  
TTCTTTTCGAGGGGGAGGAGKGGAAAATAACCCACGGCGCCAAAKGCGTCRAGGATCACTACTATTGCCT  
TGATCTGGACCGTGGCTGGCTTGATCKCCTGTGCCCGGGCWCCGATGCTATACTAATCCACACGACTCTC  
GGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCCATGAAAAACGTACCAAATGTGATACCTGGTGTGAATTGCWG  
AATCCCGCTGTTTTCMSCTTTTTCGAACGYRAGTTGCGCCCGAGGCCTTCTGGCCGAGGGCACKCTTGCT  
GGGCGTCTCGCCAACAGACACTCCCACCCTATCATCGGGTGTATGATGTGGTTCTTGGCTCCCCGMCCT  
GAAGGTGCGGTGGGTGCAAKTTGGCTTTGCCGGGTTACCCTGTCTTTCACASTTTTTACTGCGCAACTAC  
TAGTTGTTCTCGGTGCAGCGTCCCGGCTCGCARCTAGCTTGATGGCCCTAAGGACCCATGTACAACCGAA  
GCGCACTGTGCTCGGACCGCGACCCCAAGGTGAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAG  
CGGARGAATWTTGTGCTGACCCCTTAAAYCAAAACAGACCGCGAWMGTGTCTCCAATGCTGCCGGGCTTCRG  
TCCGGTAAAGGCTCCCGACCTTCGTTTTCKAGGGGGTAGTAGCCGCAWAGAACCYACGGGGCGCAAAGCGT  
CARGGAWCWCTAATATTGTCTTGCTCGGGACCGTGKCTGGCTTGCCRKCCACTGCCGTGCAGCGATGCTA  
TACTACTCACACGACTCTGGCACGGATATCTSGCTCTCGCAWYCAKAAGAACGTACMAATGCGATACTGG  
AGTGAATKCAAGATCCGCGAACATCGAGTTTTGAACGCARATGCGCMCSAGCCTTTCKGCGAGGGYMGYC  
KACTGGGGSATCMCGCCACGAMCTCMCCCATCATCGGAGTAGAGTKGCGTTTTGGCTYCCAGCCTGAAGG  
TGCGGKGACAAATGGGCGTCCGCTACGGTCCGCGAGCMGGKTGGCATCATGTYCGGTACGTTCCGGCCASCA  
CTAGCTGGRTGTC

>13\_127\_010\_ITSJ21\_D04.ab1

GATTCAKAAAGTTCWGGGCCTTCGGCCCCGTTCCGGTTACCTTTGTTTTTCAATTATGTTGRTTGCTCGG  
CGACCCCTTTTAGGATAGGAGCGGGGGWGGAAAAGAGGARAAAYATTAATCAAAAAATGATAAWTTAAAT  
AATAAATTACAACCTTCAACTTATACTTGGTACTGATGCTTCTGGYAARGCASCTASAGTGGATTGGT  
GTGTGKATGGCGAAATTTGTTTAACTCCSTAACCTTTCCCCCTTTTATTAGTTTTGGWTTTTTGGGTTTG  
CCTGTTTTWACCTGTTTTTACCWCGCMGWACTCTCTTGGTMTSCYGGSTGTYGTCCTCCCCYCGCCYTA  
ACTGCCAGCKGGGTCTCTGTCCCCTGGCGTTTTYGGTAACTGKTTTTCTGAACGCAGKTCGAGAGGCTCTCY  
CKATMAAMAACCTCTTTCTTMCCTTGAACCTTTTTTWCCTMTTGATAACCCCTAAAMTTAASGRTTACC  
SGAAGAASATAAA

>13\_127\_011\_ITSJ22\_E04.ab1

GTTGGAAWTMRAGCGGGCTCTGGGCTCACCTCCCATCCGTGTCTATYTGACCCCTGTTGCTTCGGCGTGG  
CCACSSCCSSCCSAARACTARSATTTGAACACTGYCTGAAGTTTGCAKTCTGAGTTTTTAGTTAAACAAT  
AATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTA  
ATGTGAATTGCAGAATTCARTGAATCATCKAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG  
GCATGCCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGWAACG  
GGGACGGGCCCAAAGGCARTGGCGGCACCATGTCTGGTCCTCSAGMGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTC  
CCGKAGGTCCAGCTGGCARCTAGCCTCRCAACCAATCTTTTTAACCWGGWTGACCTCGGATCAGGTARGG  
ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATARGCGGAAGAAATTACCGAGTGCGGGCCCTCTGGGTCAACCTC  
CCATCCGTGTCTATCTGTACCCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCACGGCCCGMCGARACTAACATTTGAACACT  
GTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTAAACAATAAATAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC  
GCATCGATGAAGAACGCAKCGAAATGCGATAATKAATGTGAATKAGAAATCARTGAATCATCGRGTCTTT  
GAACGCACRTTGCGCCCKGGTATTCGGGGGCATGCTGTGAGCGTYWTGCTGCCCTMARCMGGSTKKG  
TGTKKGGCTYCSGTCCTGTAACGGGACAGGACYCAAAGGCAGKGGCGCACCATGYTGGTCTYCRMGTATG  
GGYTTTTKTYACCSSYCCGTAGTCAGCATGCRCTAGCTCGACATCWTTTTATCGTGACCTCGATCAGTAG  
GTACTSCKGACTTACAATCAAAGCSGAGRAAAT