

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

**Detekce herbicid rezistentních plevelů pomocí
molekulárně-biologických metod**

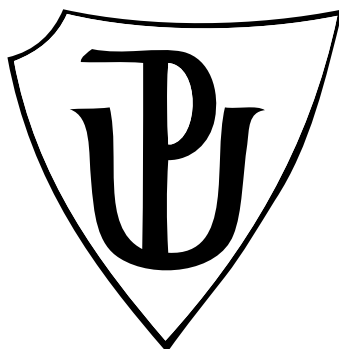
Olomouc 2016

Alžběta Hamplová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Detekce herbicid rezistentních plevelů pomocí
molekulárně-biologických metod**

Bakalářská práce

Alžběta Hamplová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

Prohlášení o samostatné práci

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci na téma Detekce herbicid rezistentních plevelů pomocí molekulárně-biologických metod vypracovala samostatně pod vedením doc. Vladana Ondřeje, a že jsem použila pouze zdroje uvedené v přehledu použité literatury a internetových zdrojů.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Vladanovi Ondřejovi za odborné vedení a ostatním členům z Katedry botaniky za rady a připomínky k mé práci.

Shrnutí

Jméno a příjmení autora: Alžběta Hamplová

Název práce: Detekce herbicid rezistentních plevelů pomocí molekulárně-biologických metod

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky

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

Rok obhajoby práce: 2016

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou plevelů spolu se způsoby jejich regulace, zejména pomocí herbicidů, a molekulární detekcí rezistentních jedinců. V praktické části této práce byla provedena molekulární detekce rezistentních plevelů.

Celkem byly sledovány tři geny. Dva z těchto genů, *ALS* a *ACC2* byly sledovány u ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), u kterých substitucí určitých aminokyselin může dojít ke vzniku rezistence vůči herbicidům inhibujícím acetolaktátsynthasu nebo acetylkoenzymkarboxylasu. Dva z těchto genů, *ALS* a *EPSPS1* u turanky kanadské (*Conyza canadensis* L. Cronquist), u kterých substitucí určitých aminokyselin může dojít ke vzniku rezistence vůči herbicidům inhibujícím acetolaktátsynthasu nebo 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasu. Mutace, souvisejících přímo se vznikem rezistence rostlin vůči herbicidům inhibujícím ALS, ACC nebo EPSPS, nebyly detekovány.

Klíčová slova: plevel, herbicid, rezistence plevelů vůči herbicidům, ježatka kuří noha, turanka kanadská, molekulární detekce rezistence

Počet stran: 61

Počet příloh: 1

Jazyk práce: Čeština

Summary

Autor's first name and surname: Alžběta Hamplová

Title: Detection of herbicide resistant weeds using techniques of molecular biology

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Botany

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

The year of presentation: 2016

This bachelor thesis is concerned with the characterization of weeds together with methods of their regulation using various herbicides; and with molecular detection of resistant specimens. In the practical part of this thesis, a molecular detection of resistant weeds was performed.

In total, three genes were observed. Two of these genes, *ALS* and *ACC2* from barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), might undergo the substitution of specific amino acids which can cause development of resistance to herbicides that inhibit acetolactate synthase or acetyl coenzyme A carboxylase. In other two genes, *ALS* and *EPSPS1* from horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronquist), the substitution of specific amino acids can cause the development of resistance to herbicides that inhibit acetolactate synthase or 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Mutations related to development of resistance in plants, which might be connected with herbicides inhibiting *ALS*, *ACC* or *EPSPS*, were not detected.

Keywords: weed, herbicide, herbicide resistant weeds, barnyard grass, horseweed, molecular detection of resistance

Number of pages: 61

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

1	Cíle práce	8
2	Úvod	9
3	Současný stav řešené problematiky	10
3.1	CHARAKTERISTIKA PLEVELŮ	10
3.2	REGULACE PLEVELŮ	11
3.2.1	Herbicidy	11
3.2.1.1	Selektivita herbicidů	12
3.2.1.2	Degradace herbicidů	12
3.2.1.3	Klasifikace herbicidů	12
3.2.1.4	Vybrané inhibitory a jejich použití	15
3.2.1.4.1	ALS inhibitory	15
3.2.1.4.2	Inhibitory ACCasy.....	15
3.2.1.4.3	EPSPS inhibitory	16
3.3	REZISTENCE PLEVELŮ VŮČI HERBICIDŮM.....	17
3.3.1	Mechanismus rezistence	20
3.3.1.1	Rezistence plevelů vůči ALS inhibitorům	20
3.3.1.2	Rezistence plevelů vůči inhibitorům ACCasy	21
3.3.1.3	Mechanismus rezistence plevelů vůči EPSPS inhibitoru	21
3.3.2	Molekulárně-biologické metody detekce rezistence	22
3.4	PLEVELE VYBRANÉ K DETEKCI REZISTENCE.....	23
3.4.1	Ježatka kuří noha (<i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P. Beauv.)	23
3.4.2	Turanka kanadská (<i>Conyza canadensis</i> L. Cronquist)	25
4	Materiál a metody	27
4.1	Biologický materiál.....	27
4.2	Použité roztoky a chemikálie	27

4.3	Vybavení laboratoře.....	27
4.4	Sběr a pěstování pokusných rostlin	28
4.5	Metody	29
4.5.1	Izolace DNA	29
4.5.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
4.5.3	Elektroforetická separace	31
4.5.4	Purifikace PCR produktů a sekvenace.....	31
5	Výsledky	33
6	Diskuse	39
7	Závěr	41
8	Seznam použité literatury	42
9	Seznam internetových zdrojů	47
10	Seznam použitých zkratk	48
11	Přílohy	49

1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je nastudování literatury a vypracování rešerše zabývající se regulací plevelů, zejména herbicidy, a dále rezistencí plevelů vůči herbicidům, rezistencí ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.), turanky kanadské (*Conyza canadensis* L. Cronquist), a molekulárními metodami diagnostiky rezistence. Dalším cílem je po nasbírání rostlin prakticky zvládnout metodiku molekulární detekce herbicid rezistentních jedinců zahrnující izolaci DNA, metodu PCR, elektroforetickou separaci, purifikaci PCR produktů a zpracování bioinformatických dat ze sekvenace.

2 Úvod

Rezistence plevelů vůči herbicidům, chemickým látkám používaným k hubení plevelných rostlin, je v současné době velkým celosvětovým problémem negativně ovlivňujícím produkci plodin. Z dříve citlivých plevelů se po delším používání a opakovaných aplikacích vysokých dávek herbicidu může stát rezistentní, který aplikaci přežívá, a navíc je schopen se reprodukovat. Vznik rezistence je selekční proces, ve kterém se populace plevelného druhu postupně přizpůsobuje působení herbicidů. Dochází k mutaci genetické informace, jejímž následkem je substituce určité aminokyseliny. V této práci byly sledovány celkem 3 geny, *ALS*, *ACC2* a *EPSPS1*, u 2 druhů plevelů, u ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) a u turanky kanadské (*Conyza canadensis* L. Cronquist), u kterých substitucí určitých aminokyselin může dojít ke vzniku rezistence vůči herbicidům inhibujícím acetolaktátsynthasu (*ALS*), acetyl-CoA-karboxylasu (*ACC*) nebo 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasu (*EPSPS*). Jedinci citliví i rezistentní jsou morfologicky identičtí, proto je diagnostika rezistentních jedinců molekulárně-biologickými metodami velmi důležitá.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 CHARAKTERISTIKA PLEVELŮ

Jako plevel označujeme planou rostlinu, která na určitém stanovišti roste proti vůli člověka (Hron *et* Vodák, 1959). Stanovištěm může být pole, sad, zahrada či komunikace. Plevelné rostliny negativně, ale i pozitivně interagují se svým okolím (Jursík *et al.*, 2011). Avšak svým negativním působením způsobují škody v rostlinné produkci a proto je snaha od počátku rozvoje zemědělství tyto rostliny eliminovat (Mikulka *et* Štrobach, 2008). Z ekologického hlediska jsou plevele důležitou součástí biologické rozmanitosti rostlinných společenstev. Charakteristickými vlastnostmi plevelů jsou: rychlý růst, vysoká produkce semen, vytváření půdní zásoby semen, tolerance k širokému rozpětí podmínek stanoviště a celkově velká konkurenceschopnost (Vencill *et al.*, 2012). Plodiny a plevele spolu vytváří společenstva rostlin na orné půdě, působí na sebe navzájem i na okolní ekosystém (Jursík *et al.*, 2011).

Negativními interakcemi nazýváme vztahy plodiny a plevele, kdy alespoň jeden ze zúčastněných strádá (Mikulka *et* Štrobach, 2008b). Příkladem antagonismu je konkurence plevelů a plodin o zdroje vody, živin, slunečního záření a prostoru, dále parazitismus, kdy parazit obírá hostitele o životně důležité látky, a popřípadě alelopatie, kdy dochází k vyměšování inhibičně působících látek na růst jiné rostliny (Jursík *et al.*, 2011). Reakcí na tyto interakce jsou regulační zásahy člověka, kdy je cílem zabránit snižování výnosu plodin eliminací nežádoucích rostlin (Soukup, 2005). Plevle škodlivě působí i jinými způsoby- snižují kvalitu produkce plodin (menší plody), fungují jako rezervoáry a přenašeči chorob a škůdců (Vencill *et al.*, 2012), jejich šťávy mohou být toxické, způsobují alergie a znesnadňují zemědělské práce (Jursík *et al.*, 2011). Jako protiklad jsou uváděny pozitivní vlivy plevelů na orné půdě (Kohout, 1996). Rostlinný pokryv obecně chrání půdu před erozí či nadměrným výparem. Některé plevele jsou schopny fixovat dusík, který je následně využíván i plodinami, a další jsou používány jako potrava pro dobytek. Udržování biodiverzity, poskytnutí potravy opylovačům a úkrytu živočichům je dalším pozitivním vlivem plevelných rostlin (Jursík *et al.*, 2011).

3.2 REGULACE PLEVELŮ

Regulaci nazýváme komplexní postup hubení plevelů (Dvořák *et al.*, 2003). Až do 19. století lidé využívali ruční odstraňování plevelů, ale se zvyšující se intenzitou zemědělství byly pro regulaci plevelů zaváděny chemické látky- nejdříve anorganické sloučeniny jako síran měďnatý nebo kyselina sírová a ve 40. letech 20. století byly objeveny herbicidní účinky syntetických auxinů (Jursík *et al.*, 2011). Zavedením selektivních herbicidů do praxe začaly být jiné způsoby regulace (nechemické a nepřímé metody) zanedbávány (Mikulka *et al.*, 2008).

Mezi **nepřímé metody** regulace patří pracovní postupy, které mají omezovat výskyt plevelů v budoucích porostech plodin- patří sem používání čistých osiv, volba vhodných osevních postupů (střídání plodin), zpracování půdy (orba, kypření půdy) (Norsworthy *et al.*, 2012). Jako **přímé metody** označujeme pracovní postupy, které mají za cíl regulovat zaplevelení plodin- řadíme zde metody mechanické (okopávka plodin, ruční pletí, vláčení, plečkování a sečení okolních ploch) (Mikulka *et al.*, 2008), fyzikální (termické metody, solarizace půdy), biologické (introdukce nebo posílení vlivu přirozených nepřátel cílového plevele či používání mykoherbicidů) a chemické (využití herbicidů) (Jursík *et al.*, 2011).

3.2.1 Herbicidy

Herbicidy jsou chemické látky, které zpomalí nebo přeruší růst a vývoj rostliny (Mikulka *et al.*, 1999). K regulaci plevelů v zemědělství jsou široce využívány, protože jsou méně náročné na lidskou práci a často i méně nákladné, než jiné metody regulace. Jejich používání však přináší rizika- velmi významné je zatěžování a znečišťování životního prostředí (Kohout, 1996), dále mohou negativně ovlivňovat osoby v kontaktu s těmito chemikáliemi a také mohou při nevhodném použití způsobit poškození pěstované plodiny (fytotoxicitu). Herbicidní látky jsou schopny přetrvávat v půdě, mohou být vyplavovány do podzemních vod, případně mohou jejich rezidua zůstat na potravinách (Jursík *et al.*, 2011). Plevelé mohou reagovat na aplikaci herbicidních látek vznikem rezistence v důsledku víceletého opakovaného používání herbicidů se stejným mechanismem účinku (Mikulka *et al.*, 2008).

3.2.1.1 Selektivita herbicidů

Herbicidey používané v zemědělství jsou dnes převážně selektivní. Tuto vlastnost můžeme charakterizovat jako schopnost herbicidů poškozovat určité druhy rostlin, aniž by poškozovaly jiné. Selektivita je relativní, závislá na podmínkách prostředí, dávce herbicidu a termínu aplikace a je založena na různě kombinovaných mechanismech (Soukup, 2005). Látky přidávané k méně selektivním herbicidům nazýváme safenery. Jejich úkolem je zvýšit selektivitu k plodině při zachování vysoké účinnosti na cílové plevely. Adjuvans přidávané k herbicidům je určeno k zefektivnění ošetření pole herbicidem. Mezi tzv. surfaktanty neboli smáčedla zvyšující pokrytí povrchu listu herbicidem, prodlužující dobu vysychání herbicidu, zvyšující odolnost proti smytí apod. patří například neionogenní přípravky nebo rostlinné oleje (Jursík *et al.*, 2011).

3.2.1.2 Degradace herbicidů

Účelem aplikace herbicidů je příjem účinné látky rostlinou a následné poškození buněčných procesů či metabolických drah v buňce (Mikulka *et Slavíková*, 2008). Perzistence je schopnost herbicidů zůstat v aktivní formě v půdním prostředí pro určitou dobu. Tuto vlastnost je důležité zohledňovat při volbě herbicidu, protože následující plodiny mohou být rezidui v půdě poškozovány. Degradace herbicidů v půdě probíhá biotickou transformací činností mikroorganismů. Na degradaci se podílejí plevely i plodiny, které jsou schopné účinnou látku přijímat a metabolizovat nebo ukládat do vakuol. Abiotická transformace probíhá jako hydrolýza a oxidačně redukční reakce, při níž dochází k postupnému odbourávání molekul (Jursík *et al.*, 2011).

3.2.1.3 Klasifikace herbicidů

Principem působení herbicidů je narušení některé fyziologické dráhy metabolismu rostliny (Mikulka *et Slavíková*, 2008). Může se jednat například o inhibici enzymu nezbytného pro určitou reakci. Cílová rostlina musí být pro správnou účinnost zasažena herbicidem, látka musí být rostlinou dostatečně přijímána a transportována na místo účinku a musí se zde akumulovat (Jursík *et al.*, 2011). Klasifikace herbicidů zavedená v Evropě se nazývá HRAC (Herbicide Resistance Action Comitee) a rozděluje herbicidey do 25 skupin (označené A-P, Z), podle místa působení chemické látky (HRAC, 2015; Heap, 2015).

Herbicidy můžeme v základním rozdělení klasifikovat jako *inhibitory fotosyntézy* (inhibitory PS II a I), *inhibitory syntézy rostlinných pigmentů*- porfyrinů (PPO inhibitory) a karotenoidů (HPPD inhibitory, PDS inhibitory, inhibitory diterpenů), *inhibitory syntézy aminokyselin* (GS inhibitory, EPSPS inhibitory a ALS inhibitory), *inhibitory syntézy lipidů* (inhibitory ACCázy- listové graminicidy, inhibitory prodlužování řetězců mastných kyselin, inhibitory syntézy mastných kyselin s dlouhým řetězcem), *inhibitory syntézy mikrotubulů* a *růstové herbicidy* (syntetické auxiny) (Jursík *et al.*, 2011; Duke, 1990).

Herbicidy *inhibující fotosyntézu* působí na jeden z fotosystémů (PS) umístěný na tylakoidní membráně chloroplastu. Mezi **inhibitory PS II** řadíme triaziny (v ČR registrován pouze terbuthylazine) (Jursík *et al.*, 2011), triazinony, substituované močoviny, pyridazinony, fenykarbaniláty, nitrily a benzothiadioly (Heap, 2015). Tyto chemické látky jsou poměrně perzistentní v půdě nebo způsobují naprostou desikaci (uschnutí) rostlin (Jursík *et al.*, 2011). **Inhibitorem PS I** mohou být bipyridyly (paraquat a diquat), které také způsobují rychlou desikaci (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

Inhibitory biosyntézy rostlinných pigmentů (barviv) působí škody především v procesu fotosyntézy. **PPO inhibitory** inhibují komplex protoporfyrinogen-oxidasy. Důsledkem inhibice je peroxidace lipidů buněčných membrán a hromadění stresových plynů. Podle chemické struktury zde řadíme například difenylethery nebo aryltriazoliny (Duke *et al.*, 1991). **HPPD inhibitory** (isoxazoly, triketony) způsobují inhibici enzymu p-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy, jejímž následkem je zastavení tvorby asimilátů a ztráta ochranné funkce karotenoidů, což vyústí v rozpad chlorofylu a tzv. albikaci listů. **Inhibitory PDS** narušují mevalonátový cyklus inhibicí fytoendesaturasy, která se podílí na syntéze karotenoidů (Heap, 2015). Následkem absence ochranných pigmentů dojde k albikaci a rostliny vyhladoví. **Inhibitory diterpenů** označujeme isoxazolidinony. Způsobují rovněž narušení mevalonátového cyklu syntézy karotenoidů.

Zablokováním enzymů syntézy různých organických sloučenin při buněčném dělení v meristematických pletivech a následné omezení transportu asimilátů a zastavení růstu rostliny způsobují *inhibitory syntézy aminokyselin* (Jursík *et al.*, 2011). Do této skupiny herbicidů patří **inhibitory GS** (glutaminsyntetasy), které blokací enzymu narušují metabolismus dusíku (Duke, 1990), v buňce se hromadí amoniak, který poškozují membrány, následkem čehož se rozpadají chloroplasty (Jursík *et al.*, 2011). Chemicky jsou to deriváty aminokyselin (glufosinate-NH₄) (Duke, 1990). **EPSPS inhibitory** blokují syntézu

aromatických aminokyselin v chloroplastech za přítomnosti enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasy (Powles, 2008). Řadíme zde opět deriváty aminokyselin (glyfosát). Způsobují pomalé vadnutí rostliny a následné odumírání (Jursík *et al.*, 2011). **ALS inhibitory** jsou cíleny na inhibici acetolaktátsynthasy, enzymu biosyntézy esenciálních rozvětvených aminokyselin (Ray, 1984). Důsledkem je zastavení tvorby aminokyselin, následně inhibice syntézy DNA, zástava buněčného dělení, transportu asimilátů a zastavení růstu (Mikulka *et Kneifelová*, 2003). Řadíme zde sulfonylmočoviny, imidazolinony, triazolové pyrimidiny a triazolony (Heap, 2015).

Mezi *inhibitory syntézy lipidů* patří **inhibitory ACCázy**, které blokují acetyl-CoA-karboxylasu (Secor *et Cseke*, 1988), což způsobí narušení tvorby buněčných membrán nejpatrnější na mladých listech (Jursík *et al.*, 2011). Součástí jsou například chemické skupiny aryloxy-fenoxy propionátů a cyklohexandionů (Duke, 1990; Mikulka *et Kneifelová*, 2003). Zasažené rostliny přestávají růst a následně dochází k nekróze od nejmladších listů. **Inhibitory prodlužování mastných řetězců** inhibují komplex acylkoenzymAelongasy v endoplazmatickém retikulu a zamezují tak syntéze dlouhých mastných kyselin, které jsou součástí vosků a kutinu. Narušením voskové vrstvy nastává retardace růstu (Jursík *et al.*, 2011). Patří sem benzofurany a thiokarbamáty. Poslední skupinou herbicidů jsou **inhibitory syntézy mastných kyselin s dlouhým řetězcem**, mezi něž patří acetamidy (Heap, 2015), které působí především na klíčící rostliny a způsobují nedostatečnou tvorbu ochranných kutikulárních vosků.

Herbicidey klasifikované jako *inhibitory stavby mikrotubulů* (nitroderiváty anilinu, benzamidy) narušují polymerizaci jednotek tubulinu a tím dělení buněk. Zasahují proto především dělivá pletiva v apikální části a kořenových špičkách, takže jsou používány pouze na klíčící rostliny (Vaughn *et Lehnen*, 1991).

Růstové herbicidey jsou syntetizované látky působící jako rostlinné hormony auxiny-dělíme je na fenoxkykyseliny, deriváty kyseliny benzoové, pyridin-karboxylové a kyseliny chinolin-karboxylové (Heap, 2015; Mikulka *et Kneifelová*, 2003). Přirozená koncentrace auxinů je přidáním herbicidu narušena. Důsledkem jsou poruchy metabolismu a růstu rostliny (deformace listů, tvorba nádorů a následně vadnutí a nekrózy).

Mezi nejvíce celosvětově využívané herbicidey patří inhibitory PSII, ALS inhibitory a inhibitory ACCázy (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

3.2.1.4 Vybrané inhibitory a jejich použití

3.2.1.4.1 ALS inhibitory

Blokací funkce acetolaktátsynthasy je zamezeno biosyntéze esenciálních rozvětvených aminokyselin valinu, leucinu a izoleucinu (Ray, 1984) a následně produkci proteinů, je inhibována syntéza DNA, meristematické buňky se nedělí, transport asimilátů vodivými pletivy je omezen, což vyúsťuje v zastavení růstu rostliny (Heap, 2015). Zastavení růstu rostliny je téměř okamžité, ale viditelné důsledky aplikace herbicidu jsou pozorovatelné až po několika dnech (z důvodu zásoby AMK v buňkách)- žloutnutí listů, antokyanové zbarvení trávovitých plevelů, schnutí vegetačního vrcholu. Herbicidy této skupiny jsou často perzistentní v půdě a mohou tak poškozovat následné plodiny (Jursík *et al.*, 2011). Nejvíce používanou skupinou herbicidů jsou sulfonylmočoviny (Ray, 1984), z důvodu velkého zastoupení účinných látek. Časté jsou i přípravky s kombinací 2 účinných látek ze skupiny sulfonylmočovín. Používají se na regulaci plevelů v porostech obilnin (chlorsulfuron- obchodní název *Glean*, sulfosulfuron- *Monitor*), v kukuřici (rimsulfuron- *Titus*, kombinace foramsulfuronu a iodosulfuronu- *MaisTer*), popřípadě v bramborách nebo cukrovce (Jursík *et al.*, 2011). Z důvodu opakovaného a intenzivního postřiku polí jsou dnes nacházeny rezistentní populace některých plevelů, například u chundelky metlice (*Apera spica-venti* L. P. Beauv.). Mimo sulfonylmočoviny jsou inhibitory stejného enzymu imidazolinu (Duke, 1990) (imazamox- *Escort*), které působí na široké spektrum plevelů, ale jsou kvůli poměrně dlouhé době reziduálního působení postupně v EU zakazovány. V ČR jsou používány na regulaci plevelů v hrachu, v zahraničí například do porostů sóji a vojtěšky (Jursík *et al.*, 2011). Dalšími ALS inhibitory jsou triazolopyrimidiny (Duke, 1990) (florasulam- *Kantor* a pyroxulam- *Corello*), které jsou aplikovány v obilninách proti dvouděložným plevelům. Do prosulfonylaminokarbonyltriazolinonů (Ray, 1984) patří propoxycarbazone (*Atribut*), využívaný proti problematickým plevelům, jako pýr plazivý (*Elytrigia repens* L. Nevski). Poslední chemickou skupinou jsou triazolony (Duke, 1990), pod které spadá účinná látka thiencarbazone jako součást herbicidu *Adengo* používaným v kukuřici.

3.2.1.4.2 Inhibitory ACCasy

Inhibicí enzymu acetyl-CoA-karboxylasy je narušen proces transkarboxylace acetyl-CoA a malonyl-CoA, což je první krok biosyntézy lipidů v rostlině (Secor *et Cseke*, 1988). Enzym je lokalizovaný v chloroplastech, kde je většinou blokován, a cytoplazmě buněk meristematických pletiv. ACC inhibitory jsou rostlinou přijímány hlavně listy. Příjem je

rychlý, ale následný transport rostlinou je pomalý. Po aplikaci herbicidu dochází k poruchám tvorby buněčných membrán thylakoidů zejména v mladých listech. Zasažené rostliny pár dnů po aplikaci přestávají růst a nevytvářejí nové listy, následuje žloutnutí a nekrózy nejmladších listů. Perzistence i pohyblivost herbicidů v půdě je minimální a neohrožují tak výrazně životní prostředí (Jursík *et al.*, 2011). Podle chemického členění zde patří aryloxy-fenoxypropionáty nazývané FOPs, cyklohexandiony neboli DIMs (Heap, 2015; Mikulka *et Slavíková*, 2008) a phenylpyrazoliny neboli deny. Tyto herbicidy se používají výhradně k regulaci trávovitých plevelů. Například proapaquizafof (*Garland, Agil*) nebo fluazifop (*Fusilade*) jsou používány v dvouděložných plodinách. V obilninách působí například pinoxaden (*Axial*). Díky schopnosti rychleji metabolizovat účinnou látku herbicidu jsou některé trávy, například lipnice (*Poa sp.*), odolné (Jursík *et al.*, 2011).

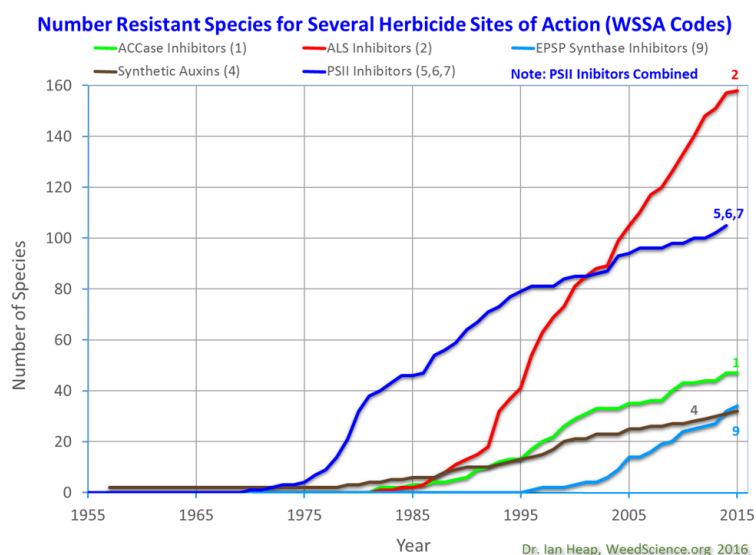
3.2.1.4.3 EPSPS inhibitory

EPSPS inhibitory jsou herbicidy působící na enzym 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasu, který podmiňuje syntézu aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyrosin, tryptofan) (Powles, 2008) a dalších látek (auxiny, ligniny, alkaloidy, antokyaniny) esenciálních pro rostlinu. Herbicid je prodáván pod komerčními názvy *Roundup, Dominator, TouchDown, Glyfos* (Jursík *et al.*, 2011). Glyfosát je v půdě rychle degradován, takže je přijímán výhradně listy a dále rozveden floémem po celé rostlině. Ekotoxikologicky se jedná o výhodný herbicid, v půdě je silně vázán koloidy a rychle rozkládán mikroorganismy (Duke *et al.*, 2012). Je využíván jako neselektivní herbicid na orné půdě v meziorostovém období (Powles, 2008), k ošetření nezemědělské půdy, jako příkmený herbicid na vinicích a v sadech, k předsklizňovému ošetření obilnin (desikace) a jako selektivní herbicid v geneticky modifikovaných tolerantních plodinách (například Roundup Ready plodiny) (Powles, 2008). Účinná látka herbicidu zasahuje široké spektrum plevelů. Jednotlivé plevele jsou však ke glyfosátu různě citlivé (Duke *et al.*, 2012). Největší citlivost vykazuje například penízeck rolní (*Thlaspi arvense* L.) nebo laskavec (*Amaranthus sp.*), které jsou potlačeny již nízkými dávkami herbicidu (1l/ha). Pcháč (*Cirsium sp.*), kakosty (*Geranium sp.*) a ve vyšší růstové fázi i ježatka (*Echinochloa sp.*) a merlík (*Chenopodium sp.*) nemusí být eliminovány ani dávkou 3 l/ha. Nejdolnější je svlačec rolní (*Convolvulus arvensis* L.) nebo přeslička (*Equisetum sp.*) (Jursík *et al.*, 2011). Rostliny zasažené látkou glyfosát velmi brzy zastaví svůj růst, ale až po několika dnech nastupuje chloróza listů a vadnutí. Do jednoho až tří týdnů celá rostlina nekrotizuje a odumírá (Duke *et al.*, 2012).

3.3 REZISTENCE PLEVELŮ VŮČI HERBICIDŮM

Rezistence plevelů vůči herbicidům je dědičná schopnost plevelů odolávat dávkám herbicidů, které by populaci jinak potlačily. U některých rostlin došlo k fyziologickým změnám a ony tak nereagují na herbicidní přípravky, na které dříve reagovaly (Mikulka *et* Slavíková., 2008). Selekční tlak působení herbicidů na plevelné rostliny vyústil ve vývoj rezistence (Powles, 2008). Z citlivých populací se tak staly populace rezistentní.

Rezistence je vyvolána dlouhodobým opakovaným působením herbicidu na dané plevelné rostliny, společně s monokulturním způsobem zemědělství a minimalizací zpracování půdy. Mezi účinné regulační zásahy vůči vyvíjení rezistence plevelů patří střídání různých herbicidů, střídání plodin, zpracování půdy, mechanické odstraňování plevelů či regulace plevelů v období mezi produkcí plodin (Norsworthy *et al.*, 2012). Populace rezistentních plevelů jsou dnes rozšířeny téměř po celém světě. Nejvíce je situace sledována v Evropě a Severní Americe (Heap, 2015). V České republice se rezistence stala problémem až v 80. letech (Jursík *et al.*, 2011). K šíření rezistentních populací přispívalo velkoplošné pěstování kukuřice, které mohlo být opakováno několik let po sobě, díky použití herbicidu atrazinu patřícího do skupiny triazinů. Dále k šíření přispívalo více než dvacetileté používání atrazinu pro odplevelování kolejíšť a semena rezistentních plevelů se mohla navíc šířit železniční dopravou. Plevel se postupně dostával i na ornou půdu, kde se stal obtížně hubitelným (Mikulka *et* Slavíková, 2008). Dnes se podobně velkoplošně a opakovaně používá herbicid glyfosát, vůči kterému byla například v roce 2000 v USA potvrzena rezistence u turanky kanadské (*Conyza canadensis* L. Cronquist), nebo v roce 2003 v jižní Africe u jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata* L.) (Heap, 2015). Dále jsou rozšířeny plevele, například různé druhy laskavců- laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus* L.), rezistentní vůči herbicidům ze skupiny inhibitorů ALS (sulfonylmočoviny, imazapyr) nebo rezistentní vůči inhibitorům ACCasy- například, v našich podmínkách, ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) (Mikulka *et* Slavíková., 2008). Celosvětově je nejvíce druhů rostlin rezistentních vůči inhibitorům ALS (Heap, 2016)- viz obr. 1.



Obr. 1: Chronologický nárůst druhů rostlin rezistentních vůči herbicidům s různým mechanismem účinku (Heap, 2016)

Za problémové můžeme označit **křížové (cross) rezistence** pozorované u rostlin, u kterých byla rezistence vyvolána jedním herbicidem a je rezistentní vůči dalším herbicidům se stejným mechanismem účinku (HRAC, 2015). V České republice byla křížová rezistence prokázána například u laskavce ohnutého (*Amaranthus retroflexus* L.), merlíku bílého (*Chenopodium album* L.) nebo bytele metlatého (*Kochia scoparia* (L.) Schrader), většinou vůči triazinům (Mikulka *et* Slavíková., 2008). Nejhorším typem rezistence je tzv. **mnohonásobná (multiple) rezistence** rostlin, které jsou odolné vůči více herbicidům s různými mechanismy účinku (HRAC, 2015). V podmínkách České republiky se jedná o bytel metlatý (*Kochia scoparia* (L.) Schrader), u kterého byla prokázána rezistence vůči inhibitorům PSII a inhibitorům ALS, a o chundelku metlici (*Apera spica-venti* (L.) P. Beauv.), u které byla prokázána rezistence také vůči inhibitorům PSII a inhibitorům ALS. Ve světě dále psárka polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.) nebo oves hluchý (*Avena fatua* L.) (Heap, 2015). Rezistentní populace jsou vázány k určitým skupinám účinku herbicidů. Je to kvůli rozdílnému mechanismu účinku, který spočívá v genetické mutaci příslušného genu, který kóduje daný mechanismus (Mikulka *et* Slavíková., 2008). Kvůli naprosté morfologické identitě citlivých a rezistentních populací je jedinou metodou detekce rezistence laboratorními metodami (Jursík *et al.*, 2011).

V ČR je v současné době popsáno 15 rezistentních druhů plevelů, většinou vůči inhibitorům PSII (Heap, 2015). Ale řada dalších plevelů je kvůli podezření na rezistenci vůči

herbicidům, i ze skupiny ALS inhibitorů a inhibitorů ACCasy, zkoumána (Mikulka *et* Slavíková., 2008)- viz tab. I.

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> – lilek černý	1999	inhibitor PSII

Tab. I: Výskyt rezistentních plevelů v ČR (Mikulka *et* Slavíková, 2008)

3.3.1 Mechanismus rezistence

Biochemické nebo fyziologické změny či morfologické odlišnosti způsobují rezistenci plevelů vůči herbicidům. Mohou ovlivnit příjem herbicidu rostlinou, degradaci herbicidu v rostlině, měnit jeho funkci nebo pozměňují místo, kde působí (Vencill *et al.*, 2012).

Při tzv. **target-site rezistenci** dochází k záměně aminokyselin v primární struktuře cílového enzymu v místě vazby herbicidu- je mu tímto znemožněno blokovat danou biosyntetickou dráhu (Powles *et* Preston, 2006). Změny místa působení herbicidu v rostlině jsou rozšířeným obranným mechanismem- například u resistantních populací vůči triazinům, ALS inhibitorům, ACC inhibitorům a dinitroanilinům (Plant & Soil Sciences eLibrary, 2015). Tato rezistence je úplná, takže ani zvyšování dávek herbicidu není efektivní.

Druhým mechanismem je rezistence metabolicky založená neboli **nontarget-site rezistence**, což znamená, že plevele jsou schopny aplikovaný herbicid rychle metabolizovat na méně toxické nebo netoxické látky (Cummins *et* Edwards, 2010). Tato schopnost je způsobena zvýšenou aktivitou enzymů ze skupiny cytochrom P450 mono-oxygenáz a glutation S-transferáz. Citlivé populace herbicid také metabolizují, ale mnohem pomaleji (Jursík *et al.*, 2011). Dalšími a méně častým mechanismem rezistence je zabudování herbicidů nebo toxických metabolitů do vakuol, kde nemohou působit na cílová místa, zjištěno například u turanky kanadské (*Conyza canadensis* L. Cronquist) (Ge *et al.*, 2010), dále nedostatečná aktivace herbicidů v rostlině nebo snižování příjmu a translokace herbicidu k cílovému místu.

3.3.1.1 Rezistence plevelů vůči ALS inhibitorům

Rezistentní populace plevelů ve většině případů odolávají herbicidům ze skupiny ALS inhibitorů změnou v enzymu acetolaktátsynthasy (Powles *et* Yu, 2010). Výskyt rezistentních plevelů je připisován velkoplošné aplikaci, používání vysokých dávek, vysokým selekčním tlakem a mechanismům účinku herbicidů. Rezistence byla dodnes zaznamenána u 96 plevelných druhů.

Enzym ALS je kódovaný jaderným genem a mutace v genu prokazující rezistenci jsou utvořeny v dominantní alele (Tranel *et* Wright, 2002). Mutace způsobí, že se nemůže zpomalit působení enzymu a buňky se dělí dál a díky tomu rostliny po aplikaci přípravku neodumírají. Existuje více možností mutací v genu a podle typu mutací se kóduje rezistence k určité

skupině herbicidů (Mikulka *et* Slavíková, 2008). V současné době existuje 21 substitucí aminokyselin. Mutace se vyskytují v jedné z osmi aminokyselin v *ALS* sekvenci: alanin 122, prolin 197, alanin 205, asparagová kyselina 376, arginin 377, tryptofan 574, serin 653, glycin 654 (Heap, 2015). Například mutace serinu na pozici 653 za treonin u laskavce ohnutého (*Amaranthus retroflexus* L.) odpovídá za rezistenci vůči imidazolinonům (Mikulka *et* Slavíková, 2008). Mezi nejčastější mutace patří záměna tryptofanu v poloze 574 a záměna prolinu v poloze 197 (Massa *et al.*, 2011).

3.3.1.2 Rezistence plevelů vůči inhibitorům ACCasy

Rezistence plevelů vůči herbicidům ze skupiny ACC inhibitorů je podmíněna mutací genu, který kóduje enzym acetyl-CoA-karboxylasu (Powles *et* Yu, 2010). Molekulární podstata mutace není zcela objasněna. Rezistence může být i důsledkem zvýšeného metabolismu rostliny. Bodové mutace byly zjištěny například u psárky polní (*Alopecurus myosuroides* Huds.) nebo jílku tuhého (*Lolium rigidum* Gaud.) (Plant & Soil Sciences eLibrary, 2015). Nejčastější mutací vedoucí k rezistenci je záměna leucinu za izoleucin na pozici 1781 genu ACC1 (Vencill *et al.*, 2012). Dalšími mutacemi jsou substituce tryptofanu 2027, izoleucinu 2041, asparagové kyseliny 2078 a glycinu 2096 genu ACC2 (Délye *et* Wright, 2005). Celosvětově je doposud zjištěno 35 rezistentních druhů plevelů (Mikulka *et* Slavíková, 2008).

3.3.1.3 Mechanismus rezistence plevelů vůči EPSPS inhibitoru

Toxicita glyfosátu v rostlině je způsobena inhibicí enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasy (EPSPS) (Powles, 2008). Glyfosátu rezistentní plevely mají mutace v genu *EPSPS* (Powles *et* Preston, 2006)- záměna treoninu v pozici 102 (Yu *et al.*, 2015) nebo prolinu v pozici 106 (Baerson *et al.*, 2002). Některé druhy plevelů vyvinuly rezistenci k aplikovanému herbicidu glyfosátu i díky genové amplifikaci, nebo mají schopnost redukovat příjem a rozvod účinné látky herbicidu rostlinou (Powles *et* Preston, 2006). Antropogenní selekční tlak na rostliny způsobil masivní nadprodukcí (až dvacetinásobnou) EPSPS způsobenou genovými kopiemi *EPSPS*, která umožňuje rostlině přežít i v přítomnosti aplikovaného glyfosátu. Tato genová amplifikace může být způsobena i mobilními genetickými elementy, takže se kopie genu objevuje na téměř každém chromozómu v genomu (Flagel *et* Wendel, 2009; Gaines *et al.*, 2010).

V posledním desetiletí se v USA rozšířilo pěstování transgenních plodin- sóji, kukuřice a bavlny (Dill *et al.*, 2008). Transgenní plodiny jsou vybaveny rezistencí vůči glyfosátu (mechanismem nadprodukce EPSPS), takže při aplikaci herbicidu je potlačen výskyt plevelu bez škody na plodině. Široké a dlouhodobé používání glyfosátu selektovalo rezistentní populace. Geny podílející se na rezistenci ke glyfosátu jsou v rostlině vzácné, ale opakovaným používáním herbicidu byly tyto geny selektovány. Dalším problémem je vývoj rezistence ve více důležitých druzích plevelů (Powles, 2008). Dosud bylo popsáno 14 rezistentních plevelných druhů vyskytujících se především v USA a Austrálii, kde je glyfosátu již dlouhodobě používáný (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

3.3.2 Molekulárně-biologické metody detekce rezistence

Genotypové moderní metody, které jsou schopny odhalit mutaci, která určuje rezistenci rostliny, se provádí ze zelené rostlinné hmoty. Po odběru vzorků následuje izolace genomické DNA. Gen odpovídající za rezistenci k dané skupině herbicidů je následně amplifikován metodou PCR. K ověření amplifikace se používá elektroforéza. Identifikace místa mutace je určena restrikční analýzou nebo analýzou sekvence genomu. (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

3.4 PLEVELE VYBRANÉ K DETEKCI REZISTENCE

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

Ježatka kuří noha je taxonomicky řazena do třídy jednoděložných (*Liliopsida*) a čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) (Kubát *et al.*, 2002). Tato prosovitá tráva patří do skupiny jednoletých pozdně jarních plevelů. Dosahuje středně vysokého vzrůstu, ale může být vysoká až 1,5 m (Jursík *et al.*, 2011). Rostliny světle až tmavě zelenošedé barvy bohatě odnožují a z původně poléhavé růžice (viz obr. 2) se při růstu napřimují. Listy jsou ploché a jejich okraj může být načervenalý. Rostliny jsou téměř lysé. Květenstvím jsou laty tvořené lichoklasy (Kazda *et al.*, 2010). Plodem jsou postupně dozrávající zelenožluté až hnědofialové obilky (Kubát *et al.*, 2002). Kořenový systém je mohutný a svazčitý. Jde ovšem o variabilní druh, jehož populace se mohou lišit.



Obr. 2: Ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.)

Ježatka je celosvětově rozšířena, ale pochází původně ze střední a východní Asie, kde je nejvýznamnějším plevelem rýže (Mikulka *et Slavíková*, 2008). Na území České republiky se vyskytuje již od neolitu (7-7,5 tisíce let), takže ji označujeme jako archeofyt (Jursík *et al.*, 2011). Rostlina je teplomilná, patří mezi C4 rostliny, a proto ji najdeme hlavně v nížinách, ale dnes se rozšiřuje i do vyšších poloh v důsledku vyšších teplot. Vyhovují jí vlhké půdy, snáší i zaplavování. Na suchých půdách je menšího vzrůstu a vytváří méně obilek (Mikulka *et Slavíková*, 2008).

Způsob rozmnožování této trávy je, jako u jiných jednoletých rostlin, generativní. Na jedné rostlině dozrávají i tisíce obilek, které při zralosti opadávají (Kazda *et al.*, 2010). Jejich produkce závisí na plodině, kterou ježatka zapleveluje. Mezi vysoce konkurujícími plodinami (kukuřice), nebo i plevely, jich produkuje mnohem méně, než v málo konkurenčních plodinách (řepa) a plevelch. Optimální teplota pro klíčení obilek je 20-25 °C. Optimální hloubka pro vzcházení je do 4 cm a je potřebná vysoká půdní vlhkost. Obilky jsou součástí půdní zásoby semen přibližně 2-6 let (Pikulka *et al.*, 1997). Konkurenční schopnost ježatky závisí na vlhkosti půdy a délce dne. Při dlouhém dni vytváří ježatka vysoké rostliny s mohutnými latami a velkým množstvím obilek, naopak menší porosty vytváří při krátkém dni. Optimální teplota pro růst je 25-30 °C (Mikulka *et Slavíková*, 2008), pod 5 °C se růst zastavuje (Jursík *et al.*, 2011).

Ježatka se hojně vyskytuje na polích. Pro regulaci růstu ježatky je důležité střídání plodin, při zaplevelení je vhodné přerušit pěstování okopanin. Kořenový systém ježatky komplikuje mechanické odstraňování porostů na polích a navíc dobře regeneruje. Například v porostu kukuřice, k jejímž nejvýznamnějším plevelům ježatka patří, je možné používat velké množství přípravků, například acetamidy (inhibitory syntézy lipidů), pyrolidin (inhibitor syntézy karotenoidů), nitroderiváty anilinu (inhibitor mikrotubulů), triketony (HPPD inhibitory), sulfonylmočoviny (ALS inhibitory). V porostu brambor může být porost ježatky eliminován substituovanými močoviny (PS II inhibitory), dále chloracetamidy (inhibitory syntézy lipidů) a glyfosátem (EPSPS inhibitor) (Jursík *et al.*, 2011).

V současné době je považována za třetí nejškodlivější plevel světa (Mikulka *et al.*, 1999). Na území České republiky byly nalezeny v porostech kukuřice biotypy rezistentní vůči přípravkům ze skupiny inhibitorů PSII (atrazinu) (Mikulka *et Slavíková*, 2008). Jde o target-site rezistenci, ale konkrétní mutace zatím nebyla v ČR detekována (Heap, 2015). Poprvé se rezistence objevila v roce 1978 v USA (Slavíková-Holcová *et Mikulka*, 2009; Heap, 2015) vůči inhibitorům fotosystému II.

3.4.2 Turanka kanadská (*Conyza canadensis* L. Cronquist)

Turanka neboli turan kanadský (*Erigeron canadensis*) je jednoletý ozimý plevel, který řadíme do třídy vyšších dvouděložných (*Rosopsida*), do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*). Turanka má drobné klíčící rostliny s vejčitými děložními listy. Právě listy jsou střídavé čárkovitě kopinaté (Kubát *et al.*, 2002). Dolní lodyžní listy jsou obkopinaté, dlouhé a úzké, v průběhu vegetace zasychají. Horní listy jsou úzce kopinaté a přisedlé (Jursík *et al.*, 2011). Velikost chlupaté přímé lodyhy je 10-180 cm (Frankton *et al.*, 1987, cit. Weaver, 2011), je v dolní části hustě olistěná a v horní bohatě větvená. Květenství je tvořené latou složenou z drobných úborů (viz obr. 3). Plodem jsou velmi lehké nažky s paprčitým chmýrem, který je dvakrát delší než semeno a umožňuje dobré rozšiřování větrem nebo vodou (Frankton *et al.*, 1987, cit. Weaver, 2011). Kořenový systém je vretenovitý s tenkými postranními kořeny.

Turanka je dnes celosvětově rozšířená, ale pochází původně z jižní Kanady a USA. Je považována za nejvíce zdomácnělou rostlinu amerického původu v Evropě (Frankton *et al.*, 1987, cit. Weaver, 2011). V České republice se turanka vyskytuje od poloviny 18. století, takže ji můžeme označovat jako neofyt (Jursík *et al.*, 2011). Nalezneme ji v nížinách i ve vyšších polohách. Preferuje sušší stanoviště a lehčí půdy. Její výskyt je hojný na narušených půdách společně s kokoškou pastuší tobolkou (*Capsella bursa-pastoris* L.), locikou kompasovou (*Lactuca serriola* L.) a hluchavkou objímavou (*Lamium amplexicaule* L.) (Buhler *et Owen*, 1997). Je velmi odolná a nenáročná na půdu (Hanf, 1983, cit. Weaver, 2011). Na chudých stanovištích vytváří rostliny malého vzrůstu a s minimálním květenstvím. Typickými stanovišti jsou okraje komunikací, na rumišťích, ale i na vinicích a sadech (Wiese *et al.*, 1995)- zde se stává škodlivou kvůli získané rezistenci vůči triazinovým herbicidům. Jako s polním plevem se s turankou setkáváme vzácněji, například mezi ozimou zeleninou. Na půdách ladem v teplejších oblastech je její výskyt hojný (Jursík *et al.*, 2011).

Rostlina se rozmnožuje pouze generativně semeny a je samosprašná (Mulligan *et Findlay*, 1970, cit. Weaver, 2011). V jednom z úborů zraje 45-70 nažek. Lata se skládá z mnoha úborů. Jedna rostlina vyššího vzrůstu je schopna vyprodukovat více než 200 000 semen (Bhowmik *et Bekech*, 1993). S výškou rostliny roste její generativní potenciál (Regehr *et Bazzaz*, 1979, cit. Weaver, 2011). Optimální teplotou pro klíčení nažek je 15-20 °C. Nažky pro vzcházení nepotřebují půdu relativně vlhkou. Vzcházejí z hloubky do 10 mm (jsou pozitivně fotoblastické) během celé vegetace, ale většina v jedné, ze dvou hlavních vln

(duben-květen, srpen-září). Jejich životnost je dlouhá (Jursík *et al.*, 2011). Rostliny vzrostlé na jaře ukončí svůj vývoj v tomtéž roce. Rostliny vzrostlé na podzim přezimují ve formě přizemní růžice a další rok pokračují v růstu. Čím větší a dobře prokořeněné jsou přizemní růžice, tím je větší pravděpodobnost, že přežijí zimu (Regehr *et Bazzaz*, 1979, cit. Weaver, 2011).

Regulace porostu turanky může být úspěšně prováděna orbou půdy na jaře a na podzim (Brown *et Whitwell*, 1988), popřípadě sečením před vysemeněním. Turanka je citlivá k většině herbicidů, ovšem na opakovanou regulaci porostu herbicidy se stejným mechanismem působení turanka často reaguje vytvořením populací rezistentních díky své vysoké reprodukční schopnosti (Bhowmik *et Bekech*, 1993). U populací turanky je pozorována vyvíjející se rezistence vůči účinné látce paraquat (PS I inhibitor), triazin (PS II inhibitor), chlorsulfuron (ALS inhibitor) a glyfosát (EPSPS inhibitor) (Heap, 2015). Aplikace herbicidů je nejlepší na jaře, kdy je turanka ve stádiu malých aktivně rostoucích pozemních růžic.



Obr. 3: Turanka kanadská (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.)

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

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

Turanka kanadská (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.)

4.2 Použité roztoky a chemikálie

2% CTAB (extrakční pufr): 2 g CTAB, 10 ml TRIS (1M, pH 8), 4 ml EDTA (0,5M, pH 8), 8,18 g NaCl, doplnit destilovanou vodou do objemu 100 ml

5x TBE: 54 g Tris-HCl, 27,5 g HBO₂, 20 ml EDTA (0,5M), 1 l destilované vody, pH 8

Chemikálie: chloroform:izoamylalkohol (poměr 24:1), 3M octan sodný, izopropanol, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), 70% ethanol, 2-merkaptoethanol, hexadecyltrimethylamonium bromid (CTAB), chlorid sodný (NaCl), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), agaróza (elektroforetická), primery (Generi Biotech), GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), HyperLadder 1 kb (Bioline), 5x DNA Loading Buffer Blue (Bioline), destilovaná voda, sterilní voda

Komerční kity: Fast Start PCR Master (Roche), GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma)

4.3 Vybavení laboratoře

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf), centrifuga 5415 R (Eppendorf), centrifuga 5415 D (Eppendorf), minicentrifuga MCF 2360 (LMS), termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer), Termocycler XP (Bioer), Mastercycler proS (Eppendorf); transiluminátor UVT-20M (Herolab) s digitálním fotoaparátem (Kodak EDAS 290), transiluminátor UVITEC Cambridge, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), předvážky (Kern), digestoř, laminární flowbox Telstar H-100 (Telstar Group), výrobek na ledovou tříšť, mikrovlnná trouba, mrazicí box, lednička, magnetické míchadlo, elektroforetická aparatura, odměrné válce, kádinky, třecí miska s tloučkem, dávkovací mikropipety, centrifugační mikrozukumavky, PCR mikrozukumavky, sterilní špičky, chladičí stojánky, pinzeta, parafilm, ochranné rukavice.

4.4 Sběr a pěstování pokusných rostlin

Jedinci ježatky (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.) byli sbíráni v průběhu roku 2013 až do října 2014 v Olomouckém a v Moravskoslezském kraji (tab. II). Jedinci turanky (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.) (C1- C6) byli sbíráni v průběhu září až října 2014 (tab. III). Rostliny byly sbírány na polích, u kolejí a cest. Po usušení byly rostliny využity k molekulární detekci rezistence vůči inhibitorům ALS, ACC nebo EPSPS. Vybrané rostliny turanky (C7-C19) byly pěstovány ze semínek, nasbíraných v areálu PřF UPOL v Holicích, ve skleníkových podmínkách a byl na ně aplikován herbicid s účinnou látkou glyfosát. Přeživší jedinci byli molekulárně zkoumáni.

Vzorek	Lokalita	Souřadnice
E1-E3	Šternberk, Zahradní ulice	49°43'51.34"N, 17°18'8.86"E
E4-E5	Štěpánov- Březce, koleje	49°39'43.56"N, 17°14'25.65"E
E6-E9	Dlouhá Loučka, pole	49°48'56.76"N, 17°10'14.06"E
E10	Mohelnice, pole	49°48'18.0"N, 16°54'24.7"E
E11	Štěpánov, pole	49°39'50.3"N, 17°13'28.3"E
E12	Šternberk, pole	49°42'05.5"N, 17°17'27.3"E
E13	Velké Heraltice, pole	49°56'38.4"N, 17°42'43.8"E
E14	Opava- Milostovice, pole	49°57'04.9"N, 17°48'22.1"E
E15	Opava- Milostovice, pole	49°56'45.4"N, 17°50'26.5"E

Tab. II: Lokality sběru ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.)

Vzorek	Lokalita	Souřadnice
C1-C3	Štěpánov- Březce, koleje	49°39'43.56"N, 17°14'25.65"E
C4-C6	Benátky, pole	49°40'29.19"N, 17°14'42.28"E
C7-C19	Olomouc, Holice	49°34'30.9"N, 17°16'51.8"E

Tab. III: Lokality sběru turanky kanadské (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.)

4.5 Metody

4.5.1 Izolace DNA

Výchozím materiálem byly usušené listy ježatky (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.) a turanky (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.). Rostlinný materiál byl rozetřen v třecí misce. K rozetřenému materiálu byl přidán 1 ml extrakčního pufru CTAB předem zahřátého na 69 °C s obsahem 2 µl 2-merkaptoethanolu. Vzorky byly přeneseny do termobloku nastaveného na 65 °C na 1,5 hodiny. Poté bylo k materiálu přidáno 600 µl roztoku chloroformu s izoamylalkoholem (v poměru 24:1). Směs byla protřepána a následně centrifugována 15 min při 13 000 rpm a 4 °C. Do čisté mikrozkušavky byla odpipetována vrstva čirého supernatantu, ke které bylo opět přidáno 600 µl roztoku chloroformu s izoamylalkoholem (v poměru 24:1). Směs byla protřepána a následně centrifugována 15 min při 13 000 rpm a 4 °C. Do čisté mikrozkušavky byla napipetována horní fáze, ke které bylo přidáno 60 µl octanu sodného (3M), promícháno převrácením a následně bylo přidáno 500 µl vychlazeného izopropanolu. Směs byla promíchána převrácením a přes noc uložena v mrazáku (-20 °C). Další den byla směs 30 min centrifugována při 13 000 rpm a 4 °C. Supernatant byl odstraněn tak, aby na dně mikrozkušavky zůstal usazený pelet. Poté bylo přidáno 500 µl 70% vychlazeného ethanolu, protřepáno. Směs byla centrifugována 15 min při 13 000 rpm při 4 °C. Ethanol byl odstraněn a vzorek se nechal 2 min volně vyschnout. K peletu obsahujícím DNA bylo přidáno 50-100 µl sterilní vody. Roztok byl mírně protřepáván v termomixeru při 37 °C do rozpuštění peletu. Vzorek byl uchováván v mrazáku (-20 °C).

4.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Izolovaná DNA byla amplifikována pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce). Byl připraven premix (tab. IV) napipetováním 10 µl Fast Start PCR Master, 8 µl sterilní vody, 0,5 µl reverse primeru, 0,5 µl forward primeru (primery specifikovány v tab. VI). Dále byl napipetován 1 µl DNA (vzorky E1-E15 naředěné na 50 ng/µl, vzorky C1-C19 naředěné na 25 ng/µl) daného vzorku. Reakční směs byla krátce stočena na minicentrifuze. Následně byly mikrozkušavky vloženy do termocykleru a byla provedena PCR, jejíž teplotní a časový profil je uveden v tab. V. Pro genově specifické primery ALS EGG byla jako optimální teplota pro nasednutí stanovena 56 °C, pro primery ACcp2 52 °C, pro primery ALS CC 58 °C a pro primery EPSPS1 53 °C. Primery byly navrženy v programu Primer3 podle sekvencí genu *ALS* ježatky nebo turanky a sekvencí genu *EPSPS1* turanky vyhledaného v GenBank, mimo

primery ACCp2 převzaté z literatury (Délye *et* Michel, 2005). Jejich syntéza byla provedena firmou Generi Biotech.

Reakční složky	Objem [μ l]
Fast Start PCR Master	10
Sterilní destilovaná voda	8
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Genomická DNA	1
Celkový reakční objem	20

Tab. IV: Složení PCR premixu

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	35
Nasednutí primerů	52-58 °C	30 s	
Elongace	72 °C	30 s	
Finální extenze	72 °C	5 min	1
Konec	4 °C	∞	

Tab. V: Teplotní a časový profil PCR reakce

Gen	Primer	Směr	Sekvence	Velikost produktu
ALS	ALS EGG	R	5'-ACGAGGTAGTTGTGCTTGGT-3'	180 bp
		F	5'-GCGCCACCAACCTCGTCTC-3'	
ACC2	ACcp2	R	5'-CCATGCAITCTTIGAGITCCTCTGA-3'	500 bp
		F	5'-CAGCITGATTCCCAIGAGCGITC-3'	
ALS	ALS CC	R	5'-ATCCCATTAGGCACACATA-3'	350 bp
		F	5'-GGCGTCTGTATAGCCACTT-3'	
EPSPS1	EPSPS1	R	5'-AGGAGGATGTTGCAATTA-3'	200 bp
		F	5'-TCAATGACAACGTCCAAATA-3'	

Tab. VI: Primery použité pro amplifikaci a sekvenaci daných genů

4.5.3 Elektroforetická separace

Produkty získané PCR reakcí byly detekovány gelovou elektroforézou v 2 % agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru. Do gelu byly před nalitím do elektroforetické vany napipetovány 4 µl GelRed Nucleic Acid Stain. Po ztuhnutí gelu byl do jamek aplikován vzorek po provedené PCR a 5x DNA Loading Buffer Blue. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder 1 kb. Elektroforéza probíhala při stejnosměrném napětí 100 V po dobu 30 min. Poté byl gel přenesen do transiluminátoru a snímán pod UV světlem.

4.5.4 Purifikace PCR produktů a sekvenace

K přečištění amplifikovaných produktů PCR byl použit GenElute PCR Clean-up Kit. Purifikace proběhla v těchto krocích:

1. Do středu GenElute kolonky bylo pipetou naneseno 500 µl přípravného roztoku *Column Preparation Solution* a centrifugováno při 12 000 rpm po dobu 30 s. Eluát byl odstraněn.
2. Do zkumavky s 20 µl PCR produktu bylo pipetou naneseno 100 µl roztoku pro navázání *DNA Binding solution*, roztok byl přenesen na GenElute kolonku a centrifugován při 12 000 rpm po dobu 1 min. Eluát byl odstraněn.

3. Do kolonky bylo naneseno 500 μ l promývacího roztoku *Wash Solution* a následovala centrifugace po dobu 1 min při 12 000 rpm. Eluát byl odstraněn. Pro odstranění přebytečného ethanolu byla kolonka centrifugována bez roztoku při 12 000 rpm po dobu 2 min. Eluát včetně zkumavky byl odstraněn.

4. Kolonka byla přenesena do nové 2ml zkumavky. Do centra kolonky bylo naneseno 50 μ l elučního roztoku *Elution Solution*. Následovala inkubace po dobu 1 min při pokojové teplotě. Pro získání eluátu obsahujícího přečištěnou DNA byla kolonka centrifugována při 12 000 rpm po dobu 1 min.

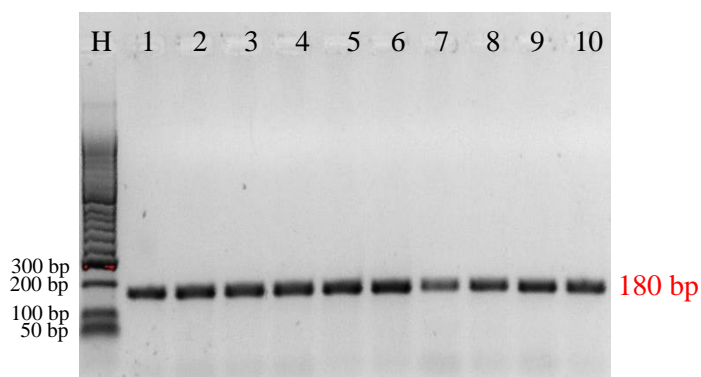
U přečištěných produktů PCR amplifikace byla změřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop 2000. Vzorky byly připraveny pro sekvencování smícháním purifikovaného PCR produktu společně se sekvenačním primerem (viz tab. VII). Každému amplifikovanému přečištěnému PCR produktu tak odpovídají dvě mikrozkušavky- jedna s primerem F (forward) a druhá s primerem R (reverse). Vzorky byly odeslány k sekvenaci firmě SEQme s.r.o. v Dobříši a následně bioinformaticky zpracovány a vyhodnoceny v programu Geneious 9.1.2.

Templát	Primer	Celkový objem
5 μ l PCR produkt < 500 bp 50 ng	5 μ l 5 μ M roztoku primeru	10 μ l

Tab. VII: Příprava vzorků pro sekvencování

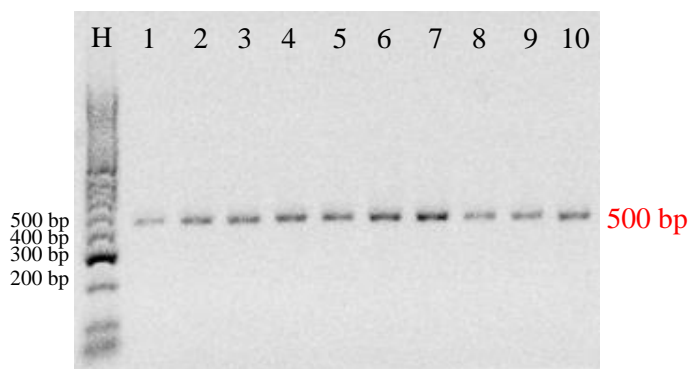
5 Výsledky

K molekulární detekci rezistence ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.) vůči ALS a ACCasu inhibujícím herbicidům bylo použito 15 jedinců z 9 lokalit Olomouckého a Moravskoslezského kraje a k detekci rezistence turanky kanadské (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.) vůči ALS a EPSPS inhibujícím herbicidům bylo použito 19 jedinců ze 3 lokalit v Olomouckém kraji. Ověření úspěšnosti amplifikace PCR produktů elektroforetickou separací je dokumentováno na obr. 4-7.



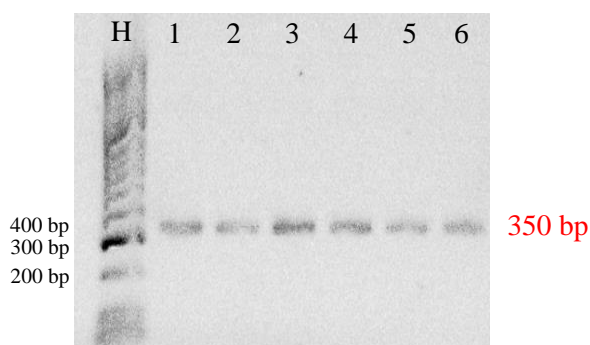
(H...HyperLadder, 1-10...E1-E10)

Obr. 4: Ověření amplifikace PCR produktů (primery **ALS EGG**) elektroforetickou separací



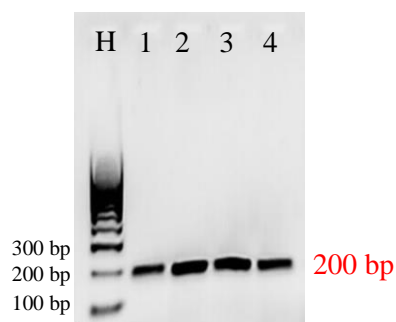
(H...HyperLadder, 1-10...E1-E10)

Obr. 5: Ověření amplifikace PCR produktů (primery **ACep2**) elektroforetickou separací



(H...HyperLadder, 1-6...C1-C6)

Obr. 6: Ověření amplifikace PCR produktů (primery **ALS CC**) elektroforetickou separací



(H...HyperLadder, 1...C19, 2...C18, 3...C17, 4...C16)

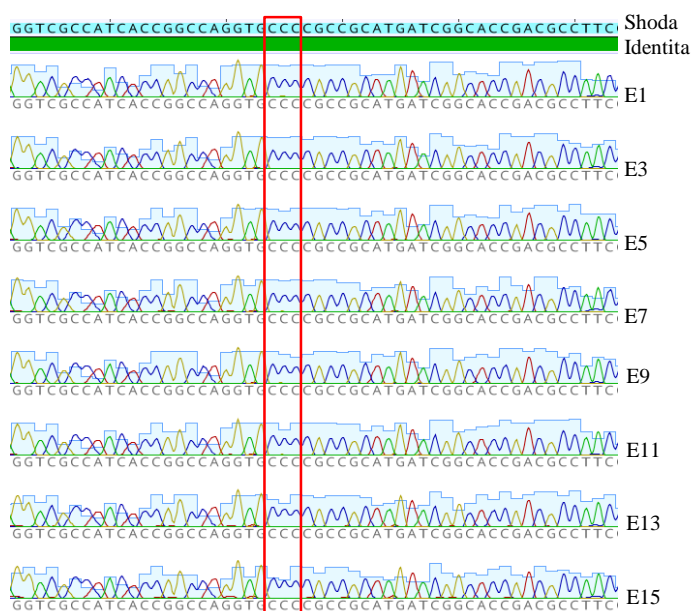
Obr. 7: Ověření amplifikace PCR produktů (primery **EPSPS1**) elektroforetickou separací

Amplifikovaná DNA byla sekvencována firmou SEQme s.r.o. a sekvence byly bioinformaticky zpracovány a vyhodnoceny v programu Geneious 9.1.2. Jednotlivé sekvence byly do programu vloženy ve formátu ab1, byly porovnány navzájem a dále porovnány se sekvencemi z GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), ze kterých byl odvozen čtecí rámec a pořadí aminokyselin. Sekvencovaná oblast genu *ALS* u ježatky kuří nohy byla porovnána se sekvencemi KJ638690.1 a KJ638689.1 (publikovány ve článku Matzenbacher *et al.*, 2014). Zmíněné KJ638690.1 a KJ638689.1 jsou částečnými sekvencemi genu *ALS* u ježatky- sekvence KJ638689.1 (viz přílohy) byla označena jako herbicid-senzitivní a sekvence KJ638690.1 byla označena jako rezistentní, u které došlo k záměně serinu 653 za kyselinu asparagovou. Sekvencovaná oblast genu *ALS* u turanky kanadské byla porovnána se sekvencemi JF719124.1 a JF719123.1 (publikovány ve článku Zheng *et al.*, 2010) (viz obr. 10). JF719124.1 a JF719123.1 jsou částečnými sekvencemi genu *ALS* u turanky, v obou sekvencích byly nalezeny mutace související se vznikem rezistence- v sekvenci JF719124.1 (viz přílohy) byla detekována záměna prolinu 197 za alanin a v sekvenci JF719123.1 byla detekována záměna prolinu 197 za serin. Sekvencovaná oblast genu *ACC2* u ježatky byla porovnána se sekvencemi HQ395759.1 a HQ395758.1 (publikovány ve článku Huan *et al.*,

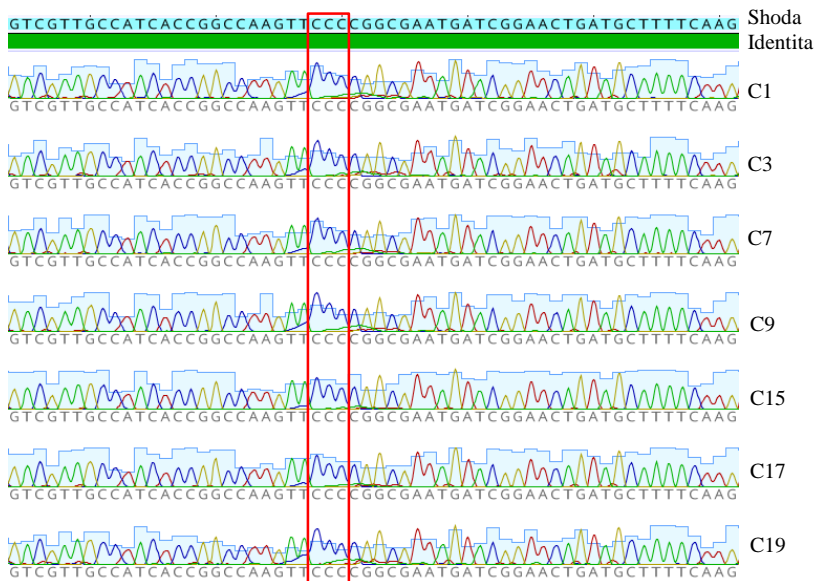
2011) (viz obr. 11). HQ395759.1 a HQ395758.1 jsou kompletními sekvencemi genu *ACC* u ježatky- sekvence HQ395758.1 (viz přílohy) byla označena jako herbicid-senzitivní a u sekvence HQ395759.1 došlo k záměně izoleucinu 1781 za leucin, což je mutace související se vznikem rezistence rostliny vůči herbicidům. Sekvencovaná oblast genu *EPSPSI* u turanky byla porovnána se sekvencí AY545666.1 (publikovány ve článku Feng *et al.*, 2004). AY545666.1 je kompletní sekvencí genu *EPSP1* u ježatky (viz přílohy).

Primery ALS EGG a ALS CC byly navrženy tak, aby byla amplifikována a sekvencována oblast genu *ALS*, ve které se nachází prolin 197, jehož substituce je jednou z nejčastějších mutací souvisejících se vznikem rezistence rostliny vůči herbicidům inhibujícím ALS (Massa *et al.*, 2011). Mutace prolinu 197 nebyla u jedinců ježatky kuří nohy (E1-E15) ani turanky kanadské (C1-C19) nalezena, tzn., že se zde vyskytoval kodon CCC kódující prolin (viz obr. 8 a 9).

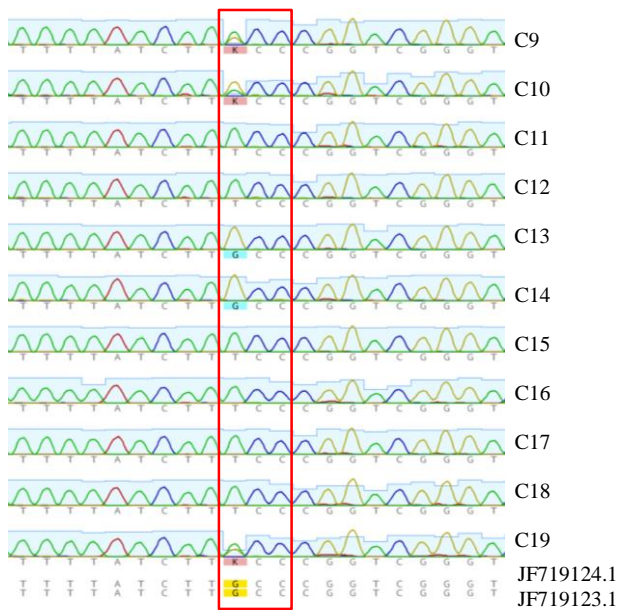
U vzorků turanky C1, C3-C7, C11, C12, C15-C18 byla nalezena záměna aminokyseliny alanin 242 (kodon GCC) za serin (kodon TCC) a u vzorků C8-C10 a C19 označil sekvenátor první nukleotid téhož kodonu jako smíšenou bázi K (T/G), což znamená, že vzorky jsou v tomto lokusu heterozygotní (viz obr. 10). Tato mutace nepatří mezi mutace související se vznikem rezistence vůči ALS inhibujícím herbicidům.



Obr. 8: Srovnání sekvencí DNA genu *ALS* vzorků ježatky (E1, E3, E5, E7, E9, E11, E13, E15) pomocí funkce „Align“ v programu Geneious (vybraný úsek sekvencí)- červeně označený je kodon CCC aminokyseliny prolin 197

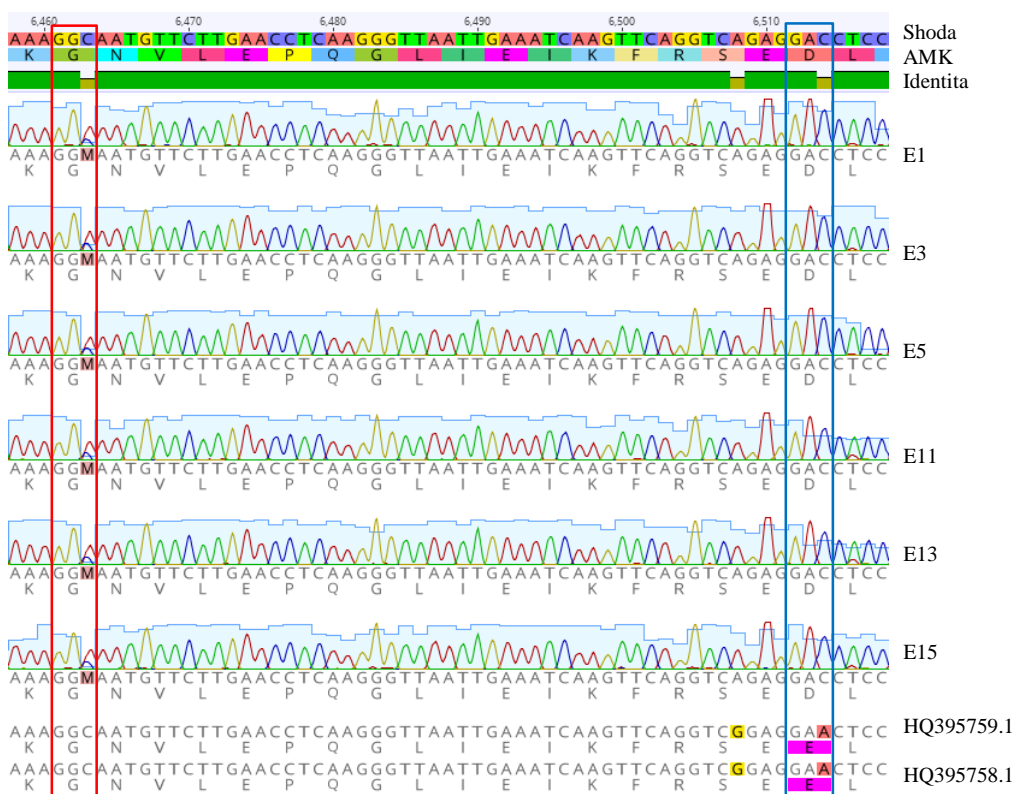


Obr. 9: Srovnání sekvencí DNA genu *ALS* vzorků turanky (C1, C3, C7, C9, C15, C17, C19) pomocí funkce „Align“ v programu Geneious (vybraný úsek sekvencí)- červeně označený je kodon CCC aminokyseliny prolin 197



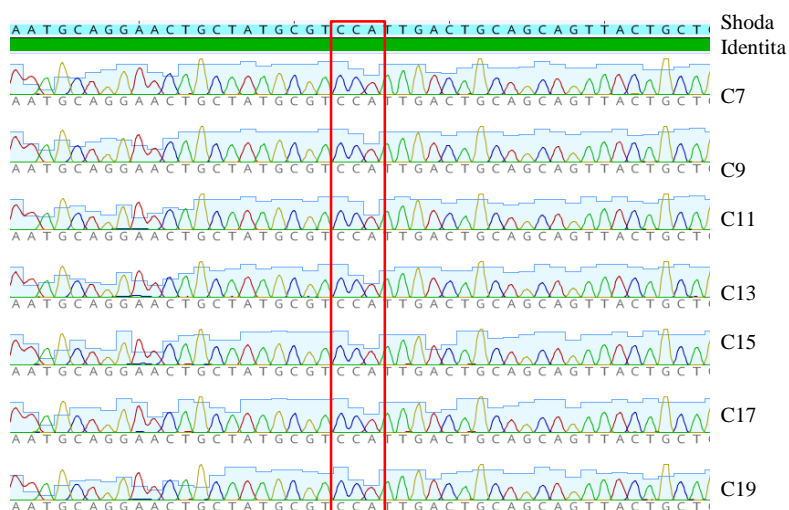
Obr. 10: Srovnání sekvencí DNA genu *ALS* vzorků turanky (C9-C19) se sekvencemi z genové banky JF719124.1 a JF719123.1 (Zheng *et al.*, 2010) pomocí funkce „Align“ v programu Geneious (vybraný úsek)- červeně označený je kodon GCC aminokyseliny alanin 242 u vzorků C11, C12, C15-C18 substituovaný serinem (TCC) a u vzorků C9, C10 a C19 označený smíšenou bází K

Primery ACcp2 byly navrženy tak, aby byla amplifikována a sekvencována oblast genu *ACC2*, ve které se nachází tryptofanu v poloze 2027, izoleucin v poloze 2041, asparagová kyselina v poloze 2078 a glycin v poloze 2096, jejichž substituce souvisí se vznikem rezistence rostliny vůči herbicidům inhibujícím ACCasu (Délye *et* Wright, 2005). Mutace související se vznikem rezistence nebyla u jedinců ježatky (E1-E15) nalezena (viz obr. 11- glycin v poloze 2096 bez mutace, protože kodon GGM může znamenat GGA i GGC, které však oba kódují glycin). U všech vzorků ježatky byla v poloze 2113 zjištěna aminokyselina kyselina asparagová (GAC) namísto aminokyseliny kyseliny glutamové (GAA) nalezené v sekvencích z genové banky HQ395759.1 a HQ395758.1 (Huan *et al.*, 2011)- tato mutace však nepatří mezi mutace související se vznikem rezistence vůči ACC inhibujícím herbicidům (viz obr. 11).



Obr. 11: Srovnání sekvencí DNA genu *ACC2* vzorků ježatky (E1, E3, E4, E11, E13, E15) se sekvencemi z genové banky HQ395759.1 a HQ395758.1 (Huan *et al.*, 2011) pomocí funkce „Align“ v programu Geneious (vybraný úsek)- červeně označený je kodon aminokyseliny glycin 2096 (GGC) a modře označený je kodon kyseliny asparagové (GAA), která je u sekvencí ježatky (E1, E3, E4, E11, E13, E15) substituována kyselinou glutamovou (GAC)

Primery EPSPS1 byly navrženy tak, aby byla amplifikována a sekvencována oblast genu *EPSPS1*, ve které se nachází prolin v pozici 106, jehož substituce souvisí se vznikem rezistence rostliny vůči herbicidům inhibujícím EPSPS (Baerson *et al.*, 2002). Mutace nebyla u jedinců turanky kanadské (C7-C19) nalezena. Vyskytoval se zde kodon CCA kódující prolin (viz obr. 12).



Obr. 12: Srovnání sekvencí DNA genu *EPSPS1* vzorků turanky (C7, C9, C11, C13, C15, C17, C19) pomocí funkce „Align“ v programu Geneious- červeně označený je kodon CCA aminokyseliny prolin 106

6 Diskuse

V České republice je dosud zaznamenán výskyt 15 rezistentních druhů plevelů, mezi něž patří ježatka kuří noha (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.) a turanka kanadská (*Conyza canadensis* (L.) Cronq.) (Heap, 2016). V současnosti v ČR hrozí riziko vzniku rezistence ježatky kuří nohy vůči herbicidům inhibujícím ACCasu a problémové jsou i ALS inhibitory a EPSPS inhibitor (glyfosát), který je aktuálně velkoplošně a opakovaně užíván (Mikulka *et* Slavíková, 2008). Ve světě byla rezistence ježatky vůči ALS inhibitorům zaznamenána poprvé v Srbsku roku 2002 a rezistence vůči inhibitorům ACCasy byla zaznamenána poprvé v USA v roce 2000. Rezistence turanky vůči ALS inhibitorům byla zaznamenána poprvé v Izraeli roku 1995 a rezistence vůči inhibitoru EPSPS byla zaznamenána poprvé v USA v roce 2000 (Heap, 2016).

V této bakalářské práci byl metodicky zvládnut postup molekulární detekce rezistence ježatky a turanky vůči herbicidům inhibujícím ALS, ACC a EPSPS. Při snaze o amplifikaci genu *EPSPS* jsme vyzkoušeli více primerů, jejichž sekvence byly získány z prací (Nol *et al.*, 2012; Chodová *et al.*, 2009). S těmito primery jsme však nebyli schopni úsek genu amplifikovat. Až s primery EPSPS1, navrženými v programu Primer3, byla amplifikace úspěšná. Se vzorky s primery ACCp2 převzatými z literatury (Délye *et* Michel, 2005) byla provedena teplotní gradientová PCR a optimální teplota pro nasednutí primerů byla stanovena na 52 °C, jelikož s teplotou nasednutí primerů, v literatuře uvedenou jako 61 °C, nebyla DNA úspěšně amplifikována. Podmínky PCR se všemi použitými primery byly optimalizovány a je možné je dále využít k monitoringu přítomnosti rezistentních jedinců na polích a také k dalšímu studiu sekvencí citlivých i rezistentních jedinců.

V sekvencovaných úsecích genů ježatky a turanky jsme po srovnání se sekvencemi z genové databáze od autorů Matzenbachera *et al.* (2014), Zhenga *et al.* (2010), Huana *et al.* (2011) a Fenga *et al.* (2004) nenašli substituce aminokyselin související se vznikem rezistence rostlin vůči inhibitorům ALS (Massa *et al.*, 2011), ACCasy (Délye *et* Wright, 2005) ani EPSPS (Baerson *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2015). Mutace nebyly detekovány ani u jedinců turanky, kteří byli pěstováni ve skleníkových podmínkách a i přes aplikaci herbicidu s účinnou látkou glyfosát neuhynuli. Zkoumaní jedinci mohli mít mutaci související s rezistencí v jiném, než zkoumaném úseku sekvence, dále mohli být například rezistentní vůči herbicidu s jiným mechanismem účinku (target-site rezistence) (Powles *et* Preston,

2006), mohla u nich být vyvinuta metabolická rezistence, mohlo docházet k nadprodukci daného enzymu, nebo, v případě působení EPSPS inhibitoru, mohlo docházet ke genové amplifikaci (nontarget-site rezistence) (Flagel *et* Wendel, 2009; Gaines *et al.*, 2010).

7 Závěr

V této bakalářské práci bylo v rešerši shrnuto téma plevelů, herbicidů a rezistence vůči herbicidům. V praktické části byla zvládnuta molekulární detekce rezistence ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv.) vůči herbicidům inhibujícím acetolaktátsynthasu nebo acetyl-CoA-karboxylasu a detekce rezistence turanky kanadské (*Conyza canadensis* L. Cronquist) vůči herbicidům inhibujícím acetolaktátsynthasu nebo 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasu. Na základě porovnání sekvencí úseků genů *ALS*, *ACC* a *EPSPS* vzorků ježatky a turanky nebyli nalezeni jedinci se substitucemi aminokyselin souvisejícími se vznikem rezistence rostlin vůči herbicidům. Ve spojitosti s rozšiřováním rezistentních populací plevelů, a nutností tuto situaci monitorovat a aplikovat účinná opatření, by bylo do budoucna prospěšné rozšířit nebo změnit zkoumanou sekvenci, která by mohla zahrnovat více míst, nebo jiná místa, na kterých dochází k mutacím souvisejícím se vznikem rezistence.

8 Seznam použité literatury

- BAERSON, S.; RODRIGUEZ, D.; TRAN, M.; FENG, Y.; BIEST, N.; DILL, G. (2002): Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase. *Plant Physiology* 129: 1265–1275.
- BHOWMIK, P.; BEKECH, M. (1993): Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn (*Zea mays*). *Agronomy (Trends in Agric. Sci.)* 1: 67–71.
- BROWN, S.; WHITWELL, T. (1988): Influence of tillage on horseweed, *Conyza canadensis*. *Weed Technol.* 2: 269–270.
- BUHLER, D.; OWEN, M. (1997): Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.* 45: 98–101.
- CUMMINS, I.; EDWARDS, R. (2010): The biochemistry of herbicide-resistance in weeds. *Outlooks Pest Manag.* 21: 73–77.
- DÉLYE, C.; MICHEL, S. Universal primers for PCR-sequencing of grass chloroplastic acetyl-CoA carboxylase domains involved in resistance to herbicides. *Weed Research* 45. 2005, s. 323–330.
- DILL, G.; CAJACOB, C.; PADGETTE, S. (2008): Glyphosate resistant crops: Adoption, use and future considerations. *Pest Manag Sci* 64: 326–331.
- DUKE, S. (1990): Overview of Herbicide Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspectives* 87: 263–271.
- DUKE, S.; LYDON, J.; BECERRIL, J.; SHERMAN, T.; LEHNEN, L.; MATSUMOTO, H. (1991): Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides. *Weed Science* 39: 465–473.
- DUKE, S.; LYDON, J.; MOORMAN, T.; CHANEY, R.; HAMMERSCHMIDT, R. (2012): Glyphosate Effects on Plant Mineral Nutrition, Crop Rhizosphere Microbiota, and Plant Disease in Glyphosate-Resistant Crops. *J. Agric. Food Chem.* 60: 10375–10397.
- DVOŘÁK, J.; SMUTNÝ, V. (2003): *Herbologie - Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 186 s.

- FENG, P.; TRAN, M.; CHIU, T.; SAMMONS, D.; HECK, G.; CAJACOB, C. (2004): Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science* 52: 498–505.
- FLAGEL, L.; WENDEL J. (2009): Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol* 183: 557–564.
- GAINES, T.; ZHANG, W.; WANG, D.; BUKUN, B.; CHISHOLM, S.; SHANER, D.; NISSEN, S.; PATZOLDT, W.; TRANEL, P.; CULPEPPER, A.; GREY, T.; WEBSTER, T.; VENCILL, W.; SAMMONS, R.; JIANG, J.; PRESTON, C.; LEACH, J.; WESTRA, P. (2010): Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 1029–1034.
- GE, X.; D'AVIGNON, D.; ACKERMAN, J.; SAMMONS, R. (2010): Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest. Manag. Sci.* 66: 345–348.
- HEAP, I. (2015): The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [online] [cit. 2015-07-17]. Dostupné z: www.weedscience.com
- HEAP, I. (2016): The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [online] [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: www.weedscience.com
- HRON, F.; VODÁK, A. (1959): Polní plevelé a boj proti nim. Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 373 s.
- HUAN, Z.; JIN, T.; ZHANG, S.; WANG, J. (2011): Cloning and sequence analysis of plastid acetyl-CoA carboxylase cDNA from two *Echinochloa crus-galli* biotypes. *J. Pestic. Sci.* 36, 461–466.
- CHODOVÁ, D.; SALAVA, J.; MARTINCOVÁ, O.; CVIKROVÁ, M. (2009): Horseweed with Reduced Susceptibility to Glyphosate Found in the Czech Republic. *Agric. Food Chem.* 57: 6957–6961.
- JURSÍK, M.; HOLEC, J.; HAMOUZ, P.; SOUKUP, J. (2011): Plevelé: Biologie a regulace. České Budějovice, Kurent, s. 24–50 a 90–93.

- KAZDA, J.; MIKULKA, J.; PROKINOVÁ, E. (2010): Encyklopedie ochrany rostlin - polní plodiny. Praha, Profi Press s.r.o., 399 s.
- KOHOUT, V. (1996): Herbologie - plevelé a jejich regulace. Praha, Česká zemědělská univerzita, 116 s.
- KUBÁT, K.; HROUDA, J.; CHRTEK, J.; KAPLAN, Z.; KIRSCHNER, J.; ŠTĚPÁNEK, J. (2002): Klíč ke květeně České Republiky. Praha, Academia, s. 630 a 871.
- MASSA, D.; KRENZ, B.; GERHARDS, R. (2011): Target-site resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Apera spica-venti* populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Research* 51: 294–303.
- MATZENBACHER, F.; BORTOLY, E.; KALSING, A.; MEROTTO, A. (2015): Distribution and analysis of the mechanisms of resistance of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) to imidazolinone and quinclorac herbicides. *Journal of Agricultural Science* 153: 1044–1058.
- MIKULKA, J.; CHODOVÁ, D.; KOHOUT, V.; MARTINKOVÁ, Z.; SOUKUP, J.; UHLÍK, J. (1999): Plevelné rostliny polí, luk a zahrad. *Farmář - zemědělské listy*, 151 s.
- MIKULKA, J.; KNEIFELOVÁ, M. (2003): Rizika kontaminace potravin a pitné vody herbicidy. [online] [cit. 2015-07-13]. Praha, Výzkumný ústav rostlinné výroby, 10 s. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-12-03.pdf>
- MIKULKA, J.; SLAVÍKOVÁ, L. (2008): Metody diagnostiky a regulace rezistentních plevelů vůči herbicidům. Praha, Výzkumný ústav rostlinné výroby, 40 s.
- MIKULKA, J.; ŠTROBACH, J. (2008): Metody regulace vytrvalých plevelů na zemědělské půdě šetrné k životnímu prostředí. Praha, Výzkumný ústav rostlinné výroby, 48 s.
- NOL, N.; TSIKOU, D.; EID, M.; LIVIERATOS, I. C.; GIANNOPOLITIS, C. N. (2012): Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research* 52: 233–241.
- NORSWORTHY, J.; WARD, S.; SHAW, D.; LLEWELLYN, R.; NICHOLS, R.; WEBSTER, T.; BRADLEY, K.; FRISVOLD, G.; POWLES, S.; BURGOS, N.; WITT, W.; BARRETT,

- M. (2012): Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science Special Issue*: 31–62.
- PIKULKA, J.; OBDRŽÁLKOVÁ, D.; ZAPLETAL, M. (1997): *Polní zahradní a lesní plevel*. ČR. Praha, Peres, 1997, 256 s.
- POWLES, S. (2008): Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: Lessons to be learnt. *Pest Manag Sci* 64: 360–365.
- POWLES, S.; PRESTON C. (2006): Evolved glyphosate resistance in plants: Biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technol* 20: 282–289.
- POWLES, S.; YU, Q. (2010): Evolution in action: Plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol* 61: 317–347.
- RAY, T. (1984): Site of action of chlorsulfuron: Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis of plants. *Plant Physiol* 75: 827–831.
- SECOR, J.; CSEKE, C. (1988): Inhibition of acetyl-CoA carboxylase activity by haloxyfop and tralkoxydim. *Plant Physiol*. 86: 10–12.
- SLAVÍKOVÁ-HOLCOVÁ, L.; MIKULKA, J. (2008): Rezistentní plevel v České republice: Ježatka kuří noha - *Echinochloa crus-galli*. *Agromanuál*, roč. 4, č. 9–10, 22 s.
- SOUKUP, J.: *Metody regulace zaplevelení*. In: MIKULKA, J.; KNEIFELOVÁ, M. (2005): *Plevelné rostliny*. Praha, Profi Press s.r.o.
- TRANEL, P.; WRIGHT, T. (2002): Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science*, 50: 700–712.
- VAUGHN, K.; LEHNEN, L. (1991): Mitotic Disrupter Herbicides. *Weed Science*, 39: 450–457.
- VENCILL, W.; NICHOLS, R.; WEBSTER, T.; SOTERES, J.; MALLORY-SMITH, C.; BURGOS, N.; JOHNSON, W.; MCCLELLAND, M. (2012): Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops. *Weed Science Special Issue* 2–30.

WEAVER, S. E. (2001): The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. Canadian Journal of Plant Science 81: 867–875.

WIESE, A.; SALISBURY, C.; BEAN, B. (1995): Downy brome (*Bromus tectorum*), jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) and horseweed (*Conyza canadensis*) control in fallow. Weed Technol. 9: 249–254.

YU, Q.; JALALUDIN, A.; HAN, H.; CHEN, M.; SAMMONS, D.; POWLES, S. (2015): Evolution of a Double Amino Acid Substitution in the 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase in *Eleusine indica* Conferring High-Level Glyphosate Resistance. Plant Physiology 167: 1440–1447.

ZHENG, D.; KRUGER, G.; SINGH, S.; DAVIS, V.; TRANEL, P.; WELLERT, S.; JOHNSON, W. (2011): Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. Pest Management Science 67: 1486–1492.

9 Seznam internetových zdrojů

HRAC- Herbicide Resistance Action Committee. [online] [cit. 2015-07-14]. Dostupné z: www.hracglobal.com

Plant & Soil Sciences eLibrary. [online] [cit. 2015-07-10]. Dostupné z: <http://passel.unl.edu/pages/>

The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [online] [cit. 2015-07-12] a [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: www.weedscience.com

10 Seznam použitých zkratek

ACC	acetylkoenzymAkarboxylasa
AMK	aminokyselina
ALS	acetolaktátsynthasa
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPSPS	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsynthasa
GS	glutaminsyntethasa
HPPD	p-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasa
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDS	fytoendesaturasa
PPO	protoporfyrinogen-oxidasa
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

11 Přílohy

Sekvence genu *ALS* (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.)

15_0550_023_1F_A01.ab1

CSCGKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCCG
CATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACCC
GCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGTA

15_0550_024_2F_B01.ab1

CKASGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCAC
CCGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_025_3F_C01.ab1

AKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
GCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACC
CGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_026_4F_D01.ab1

GSTASGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
GCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACC
CGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGTA

15_0550_027_5F_E01.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACCC
GCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGTKA

15_0550_028_6F_F01.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
GCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACC
CGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_029_7F_G01.ab1

AKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACCC
GCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_030_8F_H01.ab1

AKACGCKCYGACTCMTCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCAC
CCGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_031_9F_A02.ab1

CSCGKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCCG
CATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACCC
GCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_032_10F_B02.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCAC
CCGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_033_11F_C02.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC

GCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACC
CGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_034_12F_D02.ab1

CKCGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCCG
CATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACCC
GCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_035_13F_E02.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCAC
CCGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_036_14F_F02.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CGCATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCAC
CCGCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

15_0550_037_15F_G02.ab1

CKACGCKCYGMTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTGCCCCGCC
CATGATCGGCACCGACGCCTTCCAGGAGACGCCAATCGTCGAGGTCACCC
GCTCMATCACCAAGCACAACTACCTCGT

Částečná sekvence genu *ALS* (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.) KJ638689.1 (GenBank)

TGCGGCGTCCGCGACGTCTTCGCCTACCCCGGGCGCGCCTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTCACCCGCTCCCC
GTCATCGCCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAAGGGGAGGCCTTCGCCGCTCCGGGTTTCGCGCGCTCGTCCGGC
CGCGTCGGCGTCTGCGTCGCCACCTCGGGCCCCG**SCGCCACCAACCTCGTCTC**CGCGCTCGCCGACGCGCTGCTC
GACTCCATCCCCATGGTCGCCATCACCGGCCAGGTG**CCC**CGCCGATGATCGGCACCGAC**GCC**TTCAGGAGACG
CCAATCGTCGAGGTACCCGCTCCATC**ACCAAGCACAACTACCTCGT**CCTCGACATCGACGACATCCCCGCGTC
ATACAGGAGCCTTCTTCCCTCGCTCCTCTGGCCGGCCCGGGCCGGTGCTCGTCGACATCCCCAAGGACATCCAA
CAGCAGATGGCTATAACCAGGTTGGGACACGCCATGAGTCTGCCGGGTACATTGCGCGCTGCCAAGCCTCCG
GCAACTGAATTGCTTGAGCAGGTGCTGCGTCTTGTGGTGGTGCAGGCGCCCTGTTCTTTATGTTGGTGGTGGT
TGCGCTGCATCCGGTGAGGAGCTGCGCCGCTTTGTGGAGATGACCGGAATCCCAGTGACAATACTCTGATGGGC
CTTGGAACCTTCCCAGTGATGACCCACTGTCTCTGCGCATGCTTGGTATGCACGGTACTGTATATGCAAATTAT
GCAGTGATAAGGCCGACCTGTTGCTGGCATTGGTGTGCGGTTTCGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCT
TTTGCAAGCAGGGCCAAGATTGTGCACATTGATATTGATCCAGCTGAGATTGGCAAGAACAAGCAGCCACATGTG
TCCATCTGTGCGGATGTCAAGCTTGCTTTGCAGGGCATGAATGCTCTTCTGGAAGGAATCATATCAAAGAAGAGT
TTTGACTTTGGCTCATGGCAAGATGAGTTGGATCAGCAGAAGAGGGAATCCCCCTGGGGTACAAAACCTTCGAT
GAGGAGATTACGCCACAGTATGCTATCCAGGTTCTGGATGAGCTGACCAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACTGGT
GTTGGGCAGCACCAGATGTGGGCGGCACAGTACTACACTTACAAGCGGCCAAGGCAGTGGTTGTCTTCAGCTGGT
CTTGGGGCTATGGGATTTGGTTTGGCAGCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTGAC
ATCGATGGGGATGGCAGCTTCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCTATGATCCGCATCGAGAACCCTCCAGTGAAG
GTCTTTGTGCTAAACAACCAACACCTGGGTATGGTGGTGCAGTGGGAGGACAGATTCTACAAGGCCAACAGAGCA
CACATACTTGGGGAACCCAGAGAATGAGAGCGAGATATATCCGGATTTTGTAAACGATTGCCAAAGGGTTCAAC
ATTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTACGTGCAGCAATCAAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCG
TACCTGTTGGATATCATTGTCCCGCACCAGGAACATGTGTTGCCATGATCCCGAGCGGTGGCGCTTTCAAGGAC
ATGATCCTGGATGGTGGTGGCAGGACCGTGTATTGATCCGGATTTTCAGCAAGCGGTGCCCTTGCTTTCTTTGAC
ATTGCATATGAGCTAGTACAAGAGTGATGTGTGCTTACCTGTCTGATGTTCTCCCTTGTCTGTGATTCCTAG
GTTGTGAACTCTGGACCCATCTTTTTCTAATGTGCTTGTGGTGGTATGGTAATC

(V sekvenci vyznačen: **primer ALS EGG F**, sekvenovaný úsek genu, **prolin 197**, **alanin 205**, sekvence odpovídající **primeru ALS EGG R**)

Sekvence genu *ALS* (*Conyza canadensis* L. Cronquist)

15_0550_083_31F_E08.ab1

GGCAACTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG
TTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTTT
CAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
ATCTTTCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_084_32F_F08.ab1

TCTCAAACCTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTT
TTCAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTGCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_085_33F_G08.ab1

ACCACCTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG
TTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTTT
CAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
ATCTTTCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGATTA

15_0550_086_34F_H08.ab1

ACWCAACTTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTT
TTCAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTTCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_087_35F_A09.ab1

GGCAACTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG
TTGCCATCACC GGCCAAGTYCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTTT
CAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
ATCTTTCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_088_36F_B09.ab1

CCTCAAACCTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTT
TTCAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTTCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_089_37F_C09.ab1

CGCAACTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG
TTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTTT
CAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
ATCTTTCCCGGTGCGGTGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_090_38F_D09.ab1
CWCAACTTGTCTCCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTC
GTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTT
TCAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACT
ATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTTT
TATCTTKCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AAA
AGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_091_39F_E09.ab1
CGCAACTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG
TTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTTT
CAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTTT
ATCTTKCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGATKA

15_0550_092_40F_F09.ab1
CCWCAACTTGTCTCCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTT
TTCAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTKCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGATKA

15_0550_094_42F_H09.ab1
CGCAACCTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTC
GTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTT
TCAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACT
ATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTTT
TATCTTTCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AAA
AGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGATT

15_0550_095_43F_A10.ab1
CGCAAACTTGTCTCCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTT
TTCAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTTCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_096_44F_B10.ab1
CGCACCTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG
TTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTTT
CAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTTT
ATCTTGCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_097_45F_C10.ab1
CCTCAACTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTC
GTTGCCATCACC GGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCTTT
TCAAGAAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACT
ATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTC AAGAATTGTTAGAGAAGCTTTT
TATCTTGCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTC AAA
AGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_098_46F_D10.ab1
GGCAACTTGTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGTCG

TTGCCATCACCGGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCCTTTT
CAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
ATCTTTCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGATKA

15_0550_099_47F_E10.ab1

CGTCAACCTTGCTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACCGGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCCTT
TTCAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTTCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_100_48F_F10.ab1

CGTCAACCTTGCTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
GTTGCCATCACCGGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCCTT
TCAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACT
ATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
TATCTTTCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAA
AGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_101_49F_G10.ab1

TGCAACTTGCTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
TTGCCATCACCGGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCCTTT
CAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTA
TTTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTTTT
ATCTTTCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAA
GATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

15_0550_102_50F_H10.ab1

AGTCAAACCTTGCTCTCGGCCTTGCTGACGCGCTTCTTGACAGTGTCCCCGT
CGTTGCCATCACCGGCCAAGTTCCCCGGCGAATGATCGGAACTGATGCCTT
TTCAAGAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAAC
TATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCAAGAATTGTTAGAGAAGCTTT
TTATCTTKCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAA
AAGATATACAACAACAGTTATGTGTGCCTAAATGGGAT

Částečná sekvence genu *ALS* (*Conyza canadensis* L. Cronquist) JF719124.1 (GenBank)

GAACGTGAAGGCGTCACCGACGTCTTCGCTTACCCTGGTGGCGCGTCAATGGAGATCCACCAAGCTCTCACGCGC
TCCACCACCATCCGCAACGTCTCCCCGCCATGAACAAGGTGGCATTCTCGCCGAGAAAGGCTACGCACGTGCC
TCCGGTCTCCCC **GGCGTCTGTATAGCCACTT** CCGGTCCC GGCGCCACAAACCTTGCTCTCCGGCCTTGCTGACGCG
CTTCTTGACAGTGTCCCCGTGCTTGCATCACCGGCCAAGTT **GCC** CGGCGAATGATCGGAACTGAT **GCT** TTTCAA
GAAACACCCATTGTTGAGGTAACAAGATCCATTACTAAACATAACTATTTGGTTTTAGATGTTGATGATATTCCA
AGAATTGTTAGAGAAGCTTTTTATCTTGCCCGGTCGGGTCGACCCGGACCCGTTTTGATTGATATTCCAAAAGAT
ATACAACAACAGT **TATGTGTGCCTAAATGGGAT** GAGCCATGAGGCTTCCCTGGTTATTTATCTAGGTTACCTAAG
CCACCTAATGATGGTTTACTAGAACAAAATTGTGAGGTTAGTTGGAGAGTCGAAAAGGCCGGTTTTGTATGTAGGT
GGTGGTTGTTGAATTCGAGTGATGAGTTGAGACGTTTTGTTGAGCTTACGGGTATCCGGTAGCTAGTACTTTA
ATGGGCTTTGGTCTTATCCAGCTTCGAGTGATTTGTCTCTCAAATGCTTGGAAATGCATGGAAGCTTTTATGCG
AATTATGCTGTTGATAAGGCGGATTTGTTGCTTGCGTTTTGGGTTAGGTTTGATGACCGTGTGACTGGAAAGCTT
GAAGCTTTTTGCTAGTAGAGCTAAGATTGTTTCATATTGATATTGACTCTGCTGAGATTGGGAAGAATAAGCAGCCA
CATGTGTGCGTTTTGTTGGTGATATTAAGATTGCGTTACAGGGTCTTAACAAGATTTTAGAAGGGAGGCGTGAGATG
AGTAATCTTGATTTTTTCGGCGTGAGGGCAGAGTTGGATGAACAAAAGGTGAACCATCCGTTGAGTTTTAAAACG
TTCGGTGAAGCTATTCACCGCAATATGCTATTCANGTGCCTTGATGAGTTAACGGGTGGGAATGCTATTATAAGT
ACTGGGGTCGGGCAACATCAGATGTGGGCTGCTCAGTTTTTACAAGTACAACAGACCTAGACAGTGGTTGACTTCA
GGTGGACTAGGGCTATGGGCTTTGGACTGCCTGCAGCCATTGGTGCAGCCGTTGCAAGACCTGATGCAGTGGTA
GTGGATATCGATGGTGATGGAAGTTTTATCATGAATGTTCAAGAGTTGGCTACTATCCGAGTGGAAAATCTTCCT

GTCAAGGTTTTGTTACTCAATAATCAGCATTGGGTATGGTGGTTC AATGGGAGGATCGTTTCTACAAGGCAAAT
AGGGCGCATACCTACTTGGGGAACCCATCAAAGGAGGCTGAAATATTTCCAAACATGTTGAAGTTTGCCGAAGCG
TGTGATATAACCAGCTGCACGAGTGACCCGTAAAGCTGATCTACGGGCGGCTATT CAGAAGATGTTGGATACTCCT
GGGCCTTACTTGTGGATGTCATTTGTGCCGCATCAAGAACATGTTTTGCCGATGATTCCTGCTGGTGGGGGCTTC
ATGGATGTGATCACCGAGGGA

(V sekvenci vyznačen: **primer ALS CC F**, **sekvenovaný úsek genu**, **substituce prolinu 197 za alanin**, **alanin 205**, **sekvence odpovídající primeru ALS CC R**)

Sekvence genu *ACC2* (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. B.)

15_0550_053_16F_G04.ab1

GTCATCTGCAGTGTGGTTCAGATTCTGCACCAAGACAGCTCAGGCAKTW
KTKGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGA
GAGGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCT
GGGTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGT
CTACATTCCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTGKTGGTTG
ATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCK
AAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTC
AGAGGACCTCCAAGAMCTGCATGGA

15_0550_054_17F_H04.ab1

CTTGGCTGCAGTGTGGTTCAGATTCTGCACCAAGACAGCTCAGGCAKTW
KTKGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGA
GAGGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCT
GGGTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGT
CTACATTCCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTGKTGGTTG
ATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCK
AAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTC
AGAGGACCTCCAGAMCTGCATGGA

15_0550_055_18F_A05.ab1

GTCGGCTGCAGTGTGGTTCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCGGCKTWKT
KGGATTTACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGAGAG
GTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCTGGG
TCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGTCTA
CATTCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTGKTGGTTGATA
GCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCKAAA
GGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTCAGA
GGACCTCCAAGACTGCATGGA

15_0550_056_19F_B05.ab1

GTYATCTGCAGTGTGGTTCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCAGGCAKTW
KTKGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGA
GAGGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCT
GGGTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGT
CTACATTCCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTGKTGGTTG
ATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCK
AAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTC
AGAGGACCTCCAGAMCTGCATGGA

15_0550_057_20F_C05.ab1

GTTGTCTGGCAGTGTGGTTCAGATTCTGCACCAAGACAGCTCAGGCAKT
WTKGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGG
AGAGGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGC
TGGGTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTG
TCTACATTCCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTGKTGGTT

GATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGC
KAAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGT
CAGAGGACCTCCAAGAMCTGCATGGA

15_0550_058_21F_D05.ab1

GTCGTCTGGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCAGGCAKT
WKTGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGG
AGAGGTTTTYTCCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGC
TGGGTCAACAATTGTTGAGAAAYCTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTG
TCTACATTCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTKGTGGTT
GATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGC
KAAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGT
CAGAGGACCTCCAAGAMCTGCATG

15_0550_059_22F_E05.ab1

GTCGGCTGGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACCAAGACAGCTCAGGCAKT
WKTGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGG
AGAGGTTTTYTCCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGC
TGGGTCAACAATTGTTGAGAAAYCTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTG
TCTACATTCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTKGTGGTT
GATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGC
TAAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGT
CAGAGGACCTCCAAGACCTGCATGGA

15_0550_060_23F_F05.ab1

GTCACTGGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCAACCAAGACAGCTCAGGCAK
TWKTGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTG
GAGAGGTTTTYTCCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGG
CTGGGTCAACAATTGTTGAGAAAYCTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTT
GTCTACATTCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTKGTGGTT
TGATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTG
CKAAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGG
TCAGAGGACCTCCAGAAMCTGCATGGA

15_0550_061_24F_G05.ab1

GTCGTCTGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCAGGCAKTW
KTKGGMTTTTCAACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGA
GAGGTTTTYTCCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCT
GGGTCAACAATTGTTGAGAAAYCTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGT
CTACATTCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTKGTGGTTG
ATAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGCK
AAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTC
AGAGGACCTCCAGAMCTGCATGGA

15_0550_062_25F_H05.ab1

GTCAGCTGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCAACMAAGACAGCTCGGCAKTW
KTKGGATTTACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGAG
AGGTTTTYTCCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCTG
GGTCAACAATTGTTGAGAAAYCTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGTC
TACATTCTATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTKGTGGTTGA
TAGCAAAAATAAATCCAGACCGMATTGAGTGTTATGCTGAGAGGACTGCTA
AAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTCA
GAGGACCTCCAAGACTGCATGGA

15_0550_063_26F_A06.ab1

GTTGGCTGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCGGCKTWKT
KGGATTTACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGAGAG
GTTTTYTCCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCTGGG
TCAACAATTGTTGAGAAAYCTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGTCTA

CATTCCATATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGKGTGGTTGATA
GCAAAATAAATCCAGACCGMATTTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCKAAA
GGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTCAGA
GGACCTCCAAGACTGCATGGA

15_0550_064_27F_H04.ab1

GTGGCTGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACCAAGACAGCTCGGCAKTWKT
KGGMTTTC AACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGAGA
GGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCTGG
GTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGTCT
ACATTCCATATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGKGTGGTTGAT
AGCAAAATAAATCCAGACCGMATTTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCTAA
AGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTCAG
AGGACCTCCAAGACTGCATGGA

15_0550_065_28F_C06.ab1

GTCGTCCKCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACCAAGACAGCTCAGGCAKTW
KTKGGMTTTC AACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGA
GAGGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCT
GGGTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGT
CTACATTCCATATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGKGTGGTTG
ATAGCAAAATAAATCCAGACCGMATTTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCK
AAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTC
AGAGGACCTCCAAGACTGCATGGA

15_0550_066_29F_D06.ab1

GTCGGCTGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCGGCKTWKT
KGGATTTACCGTGAAGGATTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGGAGAG
GTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGCTGGG
TCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTGTCTA
CATTCCATATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGKGTGGTTGATA
GCAAAATAAATCCAGACCGMATTTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGCKAAA
GGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGTCAGA
GGACCTCCAAGACTGCATGGA

15_0550_067_30F_E06.ab1

GGTTRGCTGCAGTGTGGTTCCAGATTCTGCACMAAGACAGCTCAGGCAKT
WTKGGMTTTC AACCGTGAAGGAYTGCCTCTRITTCATCCTTGCTAACTGG
AGAGGTTTTYTCGGTGGACAAAAGAGATCTGTTTGAAGGRATTCTTCAGGC
TGGGTCAACAATTGTTGAGAACTTAGGACATAYAATCARCCTGCATTTG
TCTACATTCCATATGGCTGGAGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGKGTGGTT
GATAGCAAAATAAATCCAGACCGMATTTGAGTGTATGCTGAGAGGACTGC
TAAAGGMAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGGT
CAGAGGACCTCCAAGACTGCATG

Úplná sekvence genu *ACC (Echinochloa crus-galli (L.) P. B.) HQ395758.1 (GenBank)*

GAAAACCTACGCCCGCGCCTCCTCACCCCTCCTCTGCTCCGCCCGCCGTCGCAAGGATCCAATCCCCGCGCAT
CGTCTTCTCCGCTGCCTCCCTTTTCTTCCCGAGATTTCTGAGGAGTGCCTCCTCTTTTTATGGCACTGTGCCT
TTGAGAAAACTTCAATTGTGCTGTCTGCGCTACGGAACGACAATGTCGCAACTTGGATTAGCTGCAGCTGCCTC
AAAGGCACTGCCACTACTCCCTAATCGCCAGAGAAGTTCAGCTGGACCTACATTTCCATCATCTCCATCAGTGAG
GCCTTCAAACCGAAGGAAAAGCCGCACTCGTTCCTCGTGATGGAGGAGATGGGGTATCAGATGCCAAAAAGCA
CAACCAGTCTGTTCGTC AAGGTCTTGTGGCATCATCGACCTCCCAAATGAGGCAACTTCGGAAGTGGATATTTT
GCATGGACCTGAGGATCCAGGTGGCCAGCAGAGTCGTGTCAAATGAATGGGATTATAAATGAAATACATAATGG
GAGACATGCCTCAGTGTCCAATGTTGTTGAATTTTGTGCAGCACTAGGTGGCAAAACACCAATTCACAGTATATT
AGTGCCAAACAATGGAATGGCAGCAGCAAAGTTCATGAGGAGCGTCCGGACATGGGCTAACGATACTCTTGGATC
AGAGAGGGCAATTCAGCTCATAGCTATGGCAACTCCGGAGGACATGAGAATAAATGCAGAACACATTAGAATTGC

TGATCAATTTGTGGAGGTGCCAGGTGGAACAAACAATAACAACATATGCAAATGTTCAACTCATAGTGGAGGTAGC
AGAAAGAGTAGGTGTTTCTGCTGTTTGGCCGGTGGGGTTCATGCTTCTGAGAATCCTGAACTGCCAGATGCATT
GACTGCAAAAAGGAATTTGTTTTCTTGGGCCACCTGCGTCATCAATGAATGCATTGGGAGATAAGGTCCGGTTCAGC
TCTCATTGCTCAAGCAGCCGGGGTCCCAACTCTTTCGTGGAGTGGATCACATGTTGAAGTTCATTAGAATGCTG
CTTAGACGCAATACCTGAGGAAATGTATAGAAAAGCTTGTGTTACTACCACAGAAGAAGCTGTTGCAAGTGTCA
GGTGGTTGGTTATCCTGCCATGATTAAGGCATCTTGGGGAGGTGGTGGTAAAGGAATAAGAAAGGTTCCATAATGA
TGATGAGGTTAGAGCACTGTTTAAGCAAGTACAAGGTGAAGTCCCTGGCTCCCCAATATTTATCATGAGGCTTGC
ATCCCAGAGTCGTATCTTGAAGTTCAGTTGCTTTGTGATCAATATGGCAATGTAGCAGCACTTCACAGTCGTGA
TTGCAGTGTGCAACGGCGACACCAAAAAGATTATGAGGAAGGCCAGTTACTGTTGCTCCTCGTGAGACGGTTAA
AGCGCTGAACAGCAGCAAGGAGGCTTGTAAAGCTGTGGGTATGTTGGTGCCTGCTACAGTCAATACCTTTA
CAGCATGGAGACTGGAGAATACTATTTTCTGGAGCTTAATCCCCGATTACAGGTTGAGCATCCAGTCACTGAGTG
GATAGCTGAAGTAAATCTGCCTGCAGCTCAAGTTGCAGTTGGAATGGGCATACCTCTTTGGCAGATTCCAGAAAT
CAGACGTTTCTATGGAATGGACTATGGAGGAGGGTATGACATTTGGAGGAAAACAGCAGCTCTTGCTACACCGTT
TAATTTTGATGAAGTAGATTCTCAATGGCCAAAGGGCCATTGTGTAGCAGTTAGAATTACTAGTGAGGATCCAGA
TGATGGTTTCAAACCTACTGGTGGGAAAAGTGAAGGAGATTAGTTTTAAAAGCAAGCCTAATGTTTGGGCCTACTT
CTCAGTAAAGTCTGGTGGAGGCATTCATGAATTTGCTGATTTCTCAGTTTGGACATGTTTTTGCATATGGACTCTC
TAGATCCGCGACAATAACGAACATGACTCTTGCAATAAAAGAGATTCAAATTCGTGGAGAAATTCATTCAAATGT
TGATTACACAGTTGATCTCTTAAATGCTTCAGACTTCAGAGAAAATAAGATTCACTACTGGTTGGCTCGATACCAG
AATAGCTATGCGTGTTCAGCTGAGAGGCCCCCATGGTTTATTTCTGTGGTTGGAGGAGCTCTATATAAAAACAGT
AACCGCCAATGCAGCCACTGTTTCTGATTATGTTAGTTATCTCACCAAGGGCCAGATTCCACCAAAGCATATATC
CCTTGTCAATTCACAGTTAATCTGAATATTTGAAGGGAGCAAATACACAATGAACTGCAAGGACTGGATATGG
TAGCTACAGATTGCGACTGAATGGTTCAGCAATTTGAAGCGAATGTACAATCTTTATGTGATGGTGGCCTCTTAAT
GCAGTTGGATGGAAATAGCCATGTAATTTACGCGGAAGAAGAAGCTGGTGGTACACGACTTCTAATGATGGAAA
GACATGCTTATTACAGAATGATCATGATCCATCAAAGTTATTTAGCTGAGACACCCCTGCAAACCTCTTCGGTTCTT
GGTTGCTGATGGTGTCTATGTTGATGCCGATGTACCCTATGCGGAAGTTGAGGTTATGAAGATGTGCATGCCTCT
CTTGTCGCTGCTTCTGGTGTCAATTCATGTTATGATGTCTGAGGCCAGGCATTGCAGGTTGATGCTTATAGC
AAGGCTGGATCTTGATGACCTTCTGCTGTGAAAAGAGCTGAACCATTTTCATGGAATGTTTCCACAAATGGGCCT
TCCTGTTGCTGCCCTTAGTCAAGTACACAAAAGATATGCTGCAAGTTTGAACGCTGCTCGAATGGTCCCTTGCAGG
ATACGAGCATAATATAAAACGAAGTTGTACAAGATTTGGTATGCTGCCTGGACGATCCTGAGCTTCCTTTCTACA
GTGGGATGAACTTATGTGAGTTCTAGCAACTAGGCTTCCAAGAAATCTTAAGAGTGAGTTAGAGGATAAAATACAA
GGAATACAAGTTGAACTTTTACCATGGGAAAAACAAGGACTTCCCATCCAAGCTGCTGAGCAACATCATCGAGGC
AAATCTTGATATGGTTTCAGAGAAGGAAAAAGCTACGAACAAGAGGCTCGTTGAACCTCTTATGAGCCTACTTAA
GTCATATGAGGGTGGGAGAGAAAAGCCATGCTCATTTTGTGTCAAGTCCCTTTTCGAGGACTATCTTGTGTGGA
AGAACTTTTCAAGTATGGGATTCAGTCTGACGTGATTGAAACCCCTGCGTCATCAGCACAGTAAAGACCTGCAGAA
GGTTGTAGACGTTGTGTTGTCTCACCAGGGCGTGAGGAGCAAAGCTAAGCTTGTAAATAGCATTATGGAAAAGCT
GGTTTATCCAAATCCTGCTGCTTACAGGATCTGTTGGTTGCTTTTTCTTCACTCAATCATAAAAAGATACTATAA
GTTGGCCCTTAAAGCAAGCGAACTTCTTGAACAACTAAACTAAGTGAGCTCCGTGCAAGCATTGCAAGAAGCCT
ATCTGATCTGGGGATGCACAAGGGAGAAATTAATAACGATAGCATGGAAGATTTGGTATCTACCCCATTGCC
TGTTGAGGATGCACTTATCTCTTTGTTTACTACAGTATCCAAGTTCAGCAGAAAAGTGAATGTAACATACAT
ATCCCGATTGTACCAGCCTCTTCTTGTAAAGGATAGCATCCAAGTGAATTTAAGGAACCTGGTGCCTTTGCTTC
ATGGGAATTTTCTGAAGGCCATGTTGATGCTGAAAATGGACAAGGGGCTGTTTCTGCTCGAAAGAGATGTGGTGC
CATGGTTGTTCTCAAACTCACTTGAATCTGCACGAACAGCCATTGTAGCTGCATTAAGGATTTGTACAGCATGC
CAGCTCTGAGGGCAACATGATGCACATTTGCCCTTATTAAGTGTGAAAATGAAAATAATTTCAAGTATGATCAAGC
TCAACATAGGATGGAAAATCTTACCAAGATACTCAAGGATACTAGTGTCTGTAATGATCTTCGAGTCTCGGTTT
GAAGTTATATGCTGCATTTGTTCAAAGAGATGAAGCAGCATGCCAATGCGCCACACATTTCTTGGTCCAGATGA
AAAAGAGCTGTTATGAGGAAGAGCAGATTCTACGGCATGTGGAGCCTCCCCCTCTGCGCTTCTAGAATTGGATAA
GTTGAAAAGTGAAGGATACAATGAAATGAAGTATACTCCATCACGTGATCGTCAATGGCATACTTACACACTAAG
AAATACTGAAAAACCCCAAAATGTTGCATAGGGTACTTTTTTGAACCTATTTGTCAGGCAACCCCAATGCAGGCAACAA
GTTTACATCAGCCCTAATTTGGCAACCCCTGAAATAGGAGGCCCTGAGGAATCTTTGTCAATTTACATCAAATAGCAT
CTTGAGATCGTTGATGACTGCTATTTGAAGAAATAGAGCTTCATGCGATTAGAAGTGGTCAATTTCTCACATGTA
GTGCATACTGAAAGAACAAAAGCTTCTTGTATCTCATTTCCATTTTTCAGGGAGTACAATTTGTCGATGTTGGCCAAGA
TGAAGCTACTGCTTGTCACTTTTGAATCAATGGCTCTGAAGATACACGAACCTGTTGGGGCACAGATGCATCA
TCTTTCTGTATGCCAGTGGGAGGTGAACTCAAGTTGGACTGTGATGGGCCCTGCCAGTGGCACCTGGAGAGTTGT
AACTACAAATGTTACTAGTCACACTTGCACCGTTGATATCTACCGGAAGTGAAGATACAGAATTCAGAAAGTT
AGTATAACATTTCTGCTTCTTCTGCTGCTAGTCTCTGCATGGTGTGCGCTGAATAATCCGTATCAACCTTTGAG
TGTCATTGATCTAAAACGCTGCTCTGCTAGGAACAACAGAACTACATATTTGCTATGATTTTCCACTGGTATTTGA
AACAGCACTGCAGAAAGTCATGGCAGTCCAATGGCTCCAGTGGAAAGTAGTAAAACCTTATGTGAAGGCAACTGAGCT
GGTGTGTTGCTGAAAAACATGGGTCTTGGGGCACTCCTATAATTTCCATGGAGCGTCTGCTGGGCTCAATGACAT
TGGCATGGTAGCTTGGATCTTAGAGATGTCCACTCCTGAATTTCCATAATGGCAGGCAGATTATGTTGTAGCAAA
TGATATTACCTTTAGAGCTGGATCATTTGGCCAAAGGAAGATGCGTTTTTTGAAGCCGTACCAACCTGGCCTG

CGAGAGGAAGCTTCCTCTTATATACTTGGCAGCAAACCTCCGGTGCCAGGATTGGCATAGCCGATGAAGTGAAATC
TTGCTTCCGTGTTGGGTGGTCTGATGAAGGCAGCCCTGAACGTGGGTTTCAGTACATTTATTTGACTGAAGAAGA
CTATGATCGTATTAGCTCTTCTGTTATAGCACACAAGCTGCAGCTGGATAGTGGTGAAGTTAGGTGGATTATTGA
CTCTGTTGTGGGCAAGGAGGATGGTCTTGGTGTGAGAATATACATGGAAGTGCTGCTATTGCCAGTGCTTATTC
TAGGGCATATGAGGAGACATTTACACTTACATTCGTGACTGGGCGGACTGTAGGAATAGGAGCTTATCTTGCTCG
GCTTGGTATACGGTGCATACAGCGTCTAGACCAGCCTATTATTTTAACCGGGTTTTCTGCCCTGAACAAGCTTCT
TGGGCGGAAGTGTACAGCTCTCACATGCAATTGGGTGGTCCTAAGATCATGGCTACCAATGGTGTGTCCACTT
GACTGTTTCAGATGACCTTGAAGGTGTTTCCAATATATTGAGGTGGCTCAGCTATGTTCCCTGCTAACATTTGGTGG
ACATCTTCCTATTACAAAACCTTTGGACCCACCAGACAGACCTGTTGCATACATCCCTGAGAACACATGTGATCC
GCGTGCAGCCATTCGTGTTAGATGACAGCCAAAGGAAATGGTGGGTGGTATGTTTCGACAAAGACAGTTTTGT
GGAGACATTTGAAGGATGGGCGAAAACAGTGGTTACTGGCAGAGCAAAGCTTGGAGGAATCCCTGTTGGTGTCA
AGCTGTGGAGACGAAAACAATGATGCAGCTTATCCCTGCTGATCCAGGC **CAGCTTGATTCCCATGAGCGATC** TGT
TCCTCGTGCTGGACAAGTGTGGTTCCAGATTCTGCAACAAAGACAGCTCAGGCATTATTGGACTTCAACCGTGA
AGGATTGCCTCTGTTTCATCCTTGCTAAC **TCG**AGAGGTTTCTCCGGTGGACAAAGAGATCTGTTTGAAGGG **ATT**CT
TCAGGCTGGGTCAACAATTGTTGAGAATCTTAGGACATATAATCAACCTGCATTTGTCTACATTCCTATGGCTGG
AGAGCTGCGTGGAGGAGCTTGGGTTGTGGTT **GAT**AGCAAAATAAATCCAGACC GAATTGAGTGTATGCTGAGAG
GACTGCGAAA **GGC**AAATGTTCTTGAACCTCAAGGGTTAATTGAAATCAAGTTCAGG **TCGGAGGAACTCCAAGACTG**
TATGGGTAGGCTTGACCCAGAGTTGATAAATCTGAAAGCAAACCTCCAAGGTGCAAAGGTTGGAAATGGAAGCAT
ACCTGACATAGAATCCCTTCAGAAGAGTATAGAAGCGGTACCAAACAATTGTTGCCTTTATATACCCAGATTGC
AATACGGTTTTGCTGAATTGCATGATACTTCCCTCAGAATGGCAGCTAAAGGTGTGATTAAGAAAGTTGTAGATTG
GGAAGAATCGCGTTCTTTCTTCTACAAAAGGCTGCGGAGGAGGATCTCCGAAGATGTTCTTGCAAAAAGAAATAAG
AGGAATAGCTGGTGACCACTTCACTCATCAGTCAGCAGTTGAGCTGATCAAGGAATGGTACTTGGCTTCTCTAGC
AGCAACAGGAAAACACTGAATGGGATGATGACGATGCTTTTGTGGCTGGAAGGACAATCCTGAAAAC TACAAGG
ATATATCCAGGAGCTAAGGGCTCAAAAGGTGTCTCAATCGCTCTCCGATCTTGCAGGCTCCAGTTCAGATCTAGA
AGCATCTCGCAGGGTCTTTCTACACTATTAGATAAAAATGGATCCTTCTCAGAGAGCCAAGTTCGCTCAGGAAAT
CAAGAAAGTCTTGGTTGATGAAAGATACCAACACATCAACAAAATGTGTATGCTACATGTTTTTGTCTGAGTA
CATACATAGAAGGATATCGCTCGGCTTTGATGTATCATATCTGATCAATCAACCATTATTGTTAAAATTTGT
TCTGTTGGACCTAATCTTATGGCTAATGTGAGCACAAAGCTTGGGTAGCCGAGTGACAGTTTGC AAGGCATAAGT
GAATCTGTGTTCTGTTTTCAATGGTTAATAGTAGTTCTATGATCTAGCCAGCGGTTCAATTCTGTAATTTTAGG
GTGTATCATGCTGATATTAACATACAGTTGAGTGGTTCATTAATTTTGAAC TAGAATAATATATTTTGCAGGCA
TCTGTACCTCTACGTCAAAAAAAAAAAAA

(V sekvenci vyznačen: **primer ACep2 F**, **sekvenovaný úsek genu**, **tryptofan 2027**, **izoleucin 2041**, **kyselina asparagová 2078**, **glycin 2096**, **sekvence odpovídající primeru ACep2 R**)

Sekvence genu *EPSPS1* (*Conyza canadensis* L. Cronquist)

15_2702_001_1F_20151007_1_A09_3730.ab1
AMGTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACAT
ACAGCTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCAG
CAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTCAAGGTATTTGGACGTTGTCATTGAA

15_2702_002_2F_20151007_1_B09_3730.ab1
AAKTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACAT
ACAGCTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCAG
CAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTCAAGGTATTTGGACGTTGTCATTGAA

15_2805_001_3F_20151016_3_G05_3730.ab1
GGTTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACAT
ACAGCTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCAG
CAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTCAAGGTATTTGGACGTTGTCATTGAA

15_2805_002_4F_20151016_3_H05_3730.ab1
GGYTTGGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTCAAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2805_003_5F_20151016_3_A06_3730.ab1
GGAKGTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2702_003_6F_20151007_1_C09_3730.ab1
GAKTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACAT
ACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAMCTGCTATGCGTCCATTGACTGCAG
CAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTGAA

15_2805_004_7F_20151016_3_B06_3730.ab1
GATGTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2702_004_8F_20151007_1_D09_3730.ab1
GAWGTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACA
TACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAMCTGCTATGCGTCCATTGACTGCA
GCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTRA
A

15_2702_005_9F_20151007_1_E09_3730.ab1
GAMGTGCAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2702_006_10F_20151007_1_F09_3730.ab1
GMMGTGCAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2702_007_11F_20151007_1_G09_3730.ab1
GAKTGCAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACA
TACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCA
GCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTGA
A

15_2702_008_12F_20151007_1_H09_3730.ab1
AAMRTKTAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2702_009_14F_20151007_1_A10_3730.ab1
AAWGTGCAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGAC
ATACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGC
AGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTG
AA

15_2702_010_15F_20151007_1_B10_3730.ab1
GAGTGAGTGTGGCGGTGTGTTTCCCTGTGGGTAAGAAGCTAAAGATGACAT
ACAGCTTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACTGCTATGCGTCCATTGACTGCAG
CAGTTACTGCTGCTGGTGGTAATTC AAGGTATTTGGACGTTGTCATTRA

Úplná sekvence genu *EPSPS1* (*Conyza canadensis* L. Cronquist) AY545666.1 (GenBank)

GGCTGGTGTGCATGGCTTAATAACTGTRATGACATTTTGGTGATGCGTAAGACCTGTAAGCACCAGCACAAGTCTA
AGTCTTGAATCTTATACAAAATASGTTTTTTTCTATTTTCCAAATTTATTGAGTTTTCTCRTGAGTTCATGTATGA
GCATTATTGCATAGTGAAAATATGGTCAGATGGTTTCATCGATGACAAGCTAATTTTTTAAGAAAGATATATTACT
TTTTTTTTTAACCTTCGGGAAAATCATAAAAGTGAAATCATCGTTTTTAACTTTTTACGAGCATGGTACTCGCGTAA
TGCAGCGGCGGTGGTATAGAAAGACGGTCTAATGGTGGCAGTGTCAAGTGGTGTAGGTCTATGTGCACCGAAACTC
CAAACCTGACATAGCCGTACCCATTTCCGAAACTCCATGGAAACGTTTTTCTCTTACGAAACACGTATGAAACATTC
CCTAAAATTTTCTATAGATTAACGTTTTCTTTGAAGTTTCCATACGGTTTTCTAATTAATATCAAGTTTTAAAGG
ACTTTTTCGAATCCCCAAACCCAAACATGTTATATTATATAACAATTTGATCAACATTAATTTTTTATATTACAA
AGCCATTATTAACACTAAACATTCATGAGTGATCACAATCAAACATGTATTATAAAGTTCTACATATATAAT
TATACATAATCTCTCAAGTCTCAAATCTCCTTTATGAAAAAATTGATATAATTTATATTTGTATATTTTTTTTTAT
TGTTGTACCCGTATCCTGGATTTTTTAGTTTTACTGTTCCCGTTCCTCGTATTGTTCCCGTACCCTTTTCCCGTA
CCTGTTTCGGTGCTACATAGGTGTAGGTGATGTAATTGTGATAGTGAAGTTTTAGAAAGATAAGAGTTTTAAAG
TGTTAAGTATTAATAAAGGGTTTTATGGTGTAAATTAATTCATTAAGGGGAAAATTTATAAAACTATTTCTATAG
TGGGTTTTTATTAAGAGACAATTTAGTAATTTTATATGTGACATATGAGTAACATTTTTTATTTTGTAGAGGGGTG
CATAATTTTTTATTCGAAGAGTACGGATAAAAAGTCAATAAATTACGAGCAGTGAAGTATCCCAGACACCCCTTGCA
AGGTAATTTTTTAAAATTTTATTCATGGAGTTTTGGTAGGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTATGAAATTTTGT
TTTTGACCTTCTCAAACATCCACCTACTACTGACCCCTCCCTTCAAACCAACCCAAAATCCAAATCATTAAT
CCTTCAAACCCACTGTGTGTTTTGTGTGAAATTTACACACAACAAAACAAATGGCAGCTACTCACATTAACACCAC
CAACATGTCCCAACAATCCAAGTACCACAGTCTTTCCAAAACCCAAACCCCAATCAATAAAGTCAACACTTT
TTTTCTTTTTGGGCCAAAACACAAAACCCGATTTGCCATTTCTCTGTTTTCTTAATAATAATAGAAATCTTGG
AAAAAATGTTTTAATAGTTTTCTGCCGTGACCACCGAGAAACCGTCAACGGTGCCGAAATTTGTGTTACAACC
CATTAAGAAATCTCGGGTACGGTTAATTTACCCGGGTCCAAGTCGTTGTCTAATCGGATCCTCCTCCTTGCTGC
GCTTGCTGAGGTATAGTTTTAATTTGGTAATAATGTTTGACCTTTAAAATTTGACATTTGGGCTACATGATTGATA
TGGGTCTTGAATGAATTTGTGTTATAAAAATTTGGGAAGTTAAATGTTAATAATAGTTTTAATCCTTTAGAAATTATG
AAGTAATGGTTTTAGACCCTGAATTTTTTTTTTATTGCATAGGTTAGTCCCTTAGCTAGTTAGCTTTTGGTTGACA
TCTTAGAAAAACAGTACAGTTTTTATATTTTAGTCCTTAAGCTTCAATTTTTTGAATGTATTGCCATTTGAAA
TGATCTAGTAAAATGTTCAAATCAATGAATTTGGCGTTTTAAAGATATAATGCTTGGATCAATTTGTTATGTAAG
TGTGCTAGCGGTCAAAGCGAATCTTGGATCAAGGAAGTCGTAGAATACTATTGATTTTCATATTATTGATTTCT
TATTATGCATATTTGACATGTGCTTCTAACATCATGGCATTGGGATTTATTTCTATATATAAAGCATGACTGTA
TGGTTATAAAGTTCAAACCTTGATGGTATAAATATACTCTTCTTACTTCTTAGCAGGAATGTGTTGACTTATAA
GCTGAAAACCTTTTATAACTCCAATTTGTGTGTAGTAATACTTGAAGTGGCTGAGTTCCTAGGACAGTATTACATG
CGAACACTACAACGTGTTACTAAAATTTGAGATAGGTATGATTTGGTTTTGTTGGATACAAAGTCTAGGTCAGTTA
ACATAGCCAGTTGAGGACGATAGCTTTCTTGCTTATTTCCTTTTTATAGAGGGTTTTGTGTTTCGTGATGGTAAT
ATTGAGTACCACCATATAGTTTCAAGTCATATAATAAAAATCAGAGCAACATTCGAGGAGTCGCCTATATGCATA
TTATTGCACCATGCTAAAATCCAAGGCATATTTTATGATGCCAATTTGTAATTTATTTCTCAGGGAACGACCATTG
TTGACAACCTACTCAACAGTGATGATGTTTCAATACATGCTTGGAGCTTTAAGAACCTAGGGCTAAACGTTGAGG
AGGATGTTGCAATTAAGGGCAATTTGTGGAAGTTGTGGCGGTGTGTTTTCTGTGGGTAAAGAAGCTAAAGATG
ACATACAGCTTTTTCTTGGGAATGCAGGAACCTGCTATGCGTCCAATTGACTGCCGCAGTTACTGCTGCTGGTGGTA
ATTCAAGGTTATTGGACGTTGTCATTGACTATGCTATAGTAAAATATATGTTGACTTGTGCACACAAGATTTGA
AGCATCTTTTTAAACATATATGATTAGATACAGAGAACACTGCATGTTGAAAACCTGAAATACAGGACTTTCTTAA
AATATTGGGATTTACATATATGGGTTGAATAGTTGAAATTTCTCCTTCTACCTTTAACCAATTTGTATATTACT
TATTTAAAGTTGTGTTTTAAACATGGCGATATGATTAGATACAGAGAACACTACTTATTGAAAGGTTTATGTGGT
ATAGTATGAATTTAACCTCAAAAAGGGTATCTCACTATCTCTTCATATAGAAGCACACATCTGATTTCTGTTATA
TCTTTATGGATCATTTTTTCCAGCTACATACTAGATGGCGTTCCCTCGTATGAGAGAGAGACCAATAGGTGATTTG
GTCACGGGTCTTAAGCAGCTTGGGGCAGATGTTGACTGTTCTCTCGGGACGAACCTGCCCTCCCGTGCCTGTAGTT
GGTGGAGGTGGTCTCCCTGGAGGAAAGTATTGTGTTTTTCATTAGTAGTTGTTTTCTATGCAAATAGCAACACAC
CTTATATATCATCCATTTATAGCTATTTTTCTAATTTGGGGCGTACGTTACTGTAATTTGATCGTCCAACCAGTTG
TCATGACCCTCCTTAGCTAAAATGGATGAAAGCTGGTCCGACAATTGACCATAATAAATGGGTGTGGGCTATCTT
GCTAAAATTTAAGTATTTCACTTAAAATGAGAGTTGGTTTACAGTGTGCATTC AACCTAATTTTTTTTTTTAACGT
CGCATACAACCTAAAATTTGAATAATGTTGTAGACACAAAAGCTCTTAGTGAGCTTTAATAGTAACATTAGAGGTG
GTGATATCAATCAAACAATAAGGGAAAAGTAATATGTATAAAAATTTAGAATTAACAAGAAGTTTTAAAAAATAG
ATCAAATGGTTTTGAAAGTCTTCTAAAGTGTAAATTTAATGCATAAATCTTCTAAATTTATTTTAAAAACTGT
ATTGAAATATAAATTTTCATCATCATATTTGACATTTACATGAAAACAAAATACATTTTGAACAAAACAGTGTACG
GATCGACCCAGCAATCAAAGCTGTCCATTTCAACCTAACCCAGTTTTCCAGGTTACCTTATTTTCTGTTCTT
TCAATTTGCCAGTACAAGAAGCTTCATTTCCACATAACGGTTTACGCTAAAGATGCAAAGAGTCATGATTCGT
TATTTATTATCTTGACTTATTATGATAACAATAGTTTTGGTGTATTTTGTATGCTTTCAGGTTAAGTTGTCGGGAT
CTATTAGTAGTCAATACCTTACTGCTCTGCTTATGGCTTCTCCCTTGGCCCTTGGGGACGTGGAATTTGAAATCA

TAGATAAACTAATTTCCATACCATATGTCGAGATGACACTGAAATTAATGGAACGGTTCGGCGTCTCGGTAGAAC
ATAGTGATAGTTGGGACCAGTTCCTTATTCGAGGCGGCCAAAAGTACAAGTAAGTCTATTTCTTTCTTTTTAAAG
TAAAACGGAAATTTAAAAAGGTTGCAGTTTCTACCCTATCTCTTGTAAATGGGTTGATTCAGGTTATGTATAATCT
CTAATGGGTCAAAGGGGGTAAAAACAAAAAGGTTATTTTGTACCCAAAACGATATGATGCATATTACCTAGTTT
TCTTATTGGAATAGTAAACATTTTTAATCATTTCAATGTACAACCTTTTTATGTGTCCACAGAAATTAACATAG
CCCCTAGGACTATGTTTCATCATTTCCCTTTATAAAC TAGTTGGAGAAAAGTATTTTGGCCAACCCATTCCGAATT
TACACATTTTGGCCTATCACCCAGCCGCTGTCCACTCATTTTTCAGGGTTTTGTATGGAGACCCGTTTTGTTAAT
TAGTTGGATTAATATCTTCAGGTCACCTGGAAAATGCTTATGTAGAAGGTGATGCGTCAAGTGCAGGTACTTCT
TGGCTGGTGTGCCATAACCGGAGGCACCATCACCGTTGAAGGCTGCGGAACAAGTAGTCTGCAGGTGCACTTG
ACCTCCTTTGTTTTTTTATTCTTCGATTTCAATCAAACGGCTTTACGGTTTTACATTTTTAAATGGATTTTGTGG
AAACAACGAGTATTTAAAAGTTCATCAAAAAGATTTTATTATTATTTTTATGCAACAATTATCAGCATCTGTAGTGA
AATATTCAGAAGTCCGTTTTTTAGTTCAAAGTTTTTCTTTTTAACCTTAAAGTCAAAGTGAGATGGCAAATCTTT
TACGTAAAAATGATTCAATTGAGGCTGTACTTTGGTCGATTCTGACTTAATTGGGAACATAGGTTACGTTAGCTAT
AAGCCTATAACTATAAGTAAGCATGTGTTTATATGTCACAATGACTTGATTAAAAGTAACCTTATGATTTTCTTA
GTATACGTTAGTAATCTAACAGTATCATAATAACGGACAAAAATGTGCTGGTGGATCAGCCACCCAGCCCGTTA
GAACATGACATAAAAAATGACCCAACTTGACCTATCACCTAAGCTCATTATAATATGTTATCCAACCCACCCATC
TTGGCCACCTGTGACCTGTATTCAAATGTATACTGTAAAGCAACTTCCTGTTTTTCTTAAAACATGTATTCTGTT
TTTTCTTTCCAATGAAAGGGTGATGTGAAGTTTGGGAGGTACTTGGACAAATGGGTGCGGAAGTAACATGGACT
GAGAACTCAGTCACAGTTAAGGGCCCAAGGGATTCCTTCTGGAAGGAAACATTTACGTGCTGTTGATGTGAAC
ATGAACAAGATGCCTGATGTTGCCATGACTCTTGCTGTGGTCGCTCTTTATGCTGATGGCCCTACAGCCATTAGA
GATGGTATCCTTCTTTAATGTGGAAAAAGTTCAACATGTTTTCACTAAGTTTTCAAAGTAAATAGATAGATA
TGACTTCAAAAATAACTCTATTGCCATGTTAAATCTTACACATATTGCAAGCACATTTCTAGTGGTGGTTTGGAAATG
GCATTATGAAATGAAATATCTAAAAATATTTAATTTAAACATGTTCCGGTTTCTGATCATTTAGGGTCAGTTTTAAC
TGAATCTCAGAGAAGTCGCGCAAGACATGTCACATATTTGTTTTCTCCGAGTCTCAGACAACCTGCTTTTTCAAAT
GAAAGCATTCTAGAACTATTTTGCTTACAGTTGATTTTCTAATTCGGGTGTACATAAATCAAGATAATTACTTT
TATAAAACACATTTCAAAAAGCCTCCTAGATGCCCTATTATGAATTTTCTGTTTGTCTATACGAGTATCTGCTTTG
TTTTTGAAAATGGTTTTTTTTGTTTTTTGCCAGTTGCTAGCTGGAGAGTTAAAGAAACCGAAAGGATGATTGCCAT
TTGCACAGAACTTAGAAAAGGTAAAATGATACTTTGTTACTCTGTGATCTATGATACTGCTATTGCTTAGAGGTCA
CTAAAGTGGTAAGGTCAAATAGGATGGGTTTGAATGGGAACACTTTTCGCCAAAACATATTTAACTAATATAAT
TTCACTTGTACTATCTAATTTCAATAAATGAAATGATTTAGAATTAGAATGTTTTGGGTGTCTTGCAACCTATTC
ATTTTAAAGCTATTTAATTTGCTTTTGGACCCATTAGAAATATACATAAGAAATATACTTAATCAGTCCTCTATTG
TTAATGTTTATCTGGGGTGAAATTTCTTCAGTTGGGAGCAACAGTTGAAGAAGTCCGGACTATTGTGTGATCAC
TCCGCCAGAGAAGTTAAACGTGACAGCAATAGACACATATGATGATCACAGGATGGCCATGGCTTTCTCTCTTGC
CGCTTGTGAGATGTTCTGTGACCATTAAGGATCCTTCTTGCACACGTAAGACGTTTCTGATTACTTTGAAGT
TCTTCAAAGATTTGCCAAGCATTAATGTGATTATGGGTAGTGGTTTGTCTTTCTATATGTAATTTTTGTTTTATT
TGTAACGAGTAAAATGTGAGTTTTGGGCATAACATATCTTATGAACTTGTATTCTTTTCGTAAGATTTTTTTTAGT
GTAATAAAATATA

(V sekvenci vyznačen: **primer EPSPS1 F**, **sekvenovaný úsek genu**, **threonin 102**, **prolin 106**, **sekvence odpovídající primeru EPSPS1 R**)