

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Genetická diverzita a pohlavní poměr larev mandelinky
bramborové v testech na rezistenci k pyretroidům**

Diplomová práce

**Monika Vandová
Výživa a ochrana rostlin**

Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Genetická diverzita a pohlavní poměr larev mandelinky bramborové v testech na rezistenci k pyretroidům“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce také prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2023 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákoví, Ph.D. za lidský přístup a cenné rady, které mi během psaní této práce poskytoval. Mé díky dále patří Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za zpřístupnění vědeckých článků pro teoretickou část práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým úžasným přátelům, kteří mě podporují ve všem, pro co se nadchnu.

Genetická diverzita a pohlavní poměr larev mandelinky bramborové v testech na rezistenci k pyretroidům

Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá detekcí pohlaví a variability mikrosatelitních markerů u dvou populací larev mandelinky bramborové, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), v souvislosti s rezistencí k pyretroidním účinným látkám v insekticidech. Rezistence tohoto škůdce k insekticidům je již od poloviny minulého století aktuálním tématem a jeho citlivost k pyretroidům je navíc vázaná na pohlaví, tudíž bylo předpokládáno, že ošetření postřikem budou lépe přežívat samice. Z předchozích studií na téma genetické diverzity lze vyvodit, že je rezistence u mandelinky geograficky různorodá, a tudíž lze na základě poznatků o regionálních diferencích mezi jedinci navrhnout účinnější metody pro jejich kontrolu. V teoretické části práce jsou předloženy základní informace o mandelince bramborové, její rezistenci k insekticidům a populační genetice se zaměřením na výsledky studií z různých částí světa. Cílem experimentální části bylo ověřit, zda testy rezistence v souborech vytváří strukturu korelující s pohlavím jedince a genetickou diverzitou. Na larvy dvou populací z území České republiky získané z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. v Ruzyni, ošetřené různými letálními koncentracemi přípravku Karate byl aplikován panel 9 mikrosatelitních markerů a následně provedena metoda qPCR k determinaci pohlaví. Data z kapilární elektroforézy byla zpracována programem GenAlEx 6.5 a provedena analýza difference alel v populacích, F-statistiky, Neiovy genetické distance a odchylek od Hardy–Weinbergovy rovnováhy. Programem DARwin 6.0 byly sestaveny fylogenetické stromy příbuznosti jedinců. Na základě identifikovaných pohlaví byl proveden neparametrický chí kvadrát test ve shlučích přeživších a nepřeživších jedinců v testu proti očekávanému pohlavnímu poměru 1:1.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že jsou obě populace geneticky diferenciované, hypotézu o genetické struktuře asociující s rezistencí však nebylo možné potvrdit, protože nebyla nalezena struktura prokazující specifika v přežití jedinců. Statistické vyhodnocení testů pohlaví také neprokázalo odchylky od očekávaného poměru, a tudíž asociaci s lepším přežíváním samic. Pro objasnění větší míry přežití samců by bylo potřebné mít poznatky o založení *ksr* lokusu a fenotypové výsledky asociovat s nimi.

Klíčová slova: mandelinka bramborová, rezistence k insekticidům, SSR markery, qPCR, pohlavní poměr

Genetic diversity and sex ratio of Colorado potato beetle larvae in pyrethroid resistance tests

Summary

This diploma thesis deals with the detection of sex and the variability of microsatellite markers in two populations of potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), in connection with resistance to pyrethroid active substances in insecticides. The resistance of this pest has been a current topic since the middle of the last century, and its sensitivity to pyrethroids is also sex-linked. Therefore it was assumed females will possess a higher level of resistance. Previous studies focused on the topic of genetic diversity showed resistance in Colorado potato beetle is geographically heterogenous, and therefore, based on the knowledge of regional differences between individuals, more effective methods for their control can be designed. The theoretical part of the thesis presents basic information about the Colorado potato beetle, its insecticide resistance and population genetics, focused on the results of studies from various parts of the world. The aim of the experimental part was to verify whether resistance tests in ensembles create an individual structure correlated with sex and genetic diversity. A panel of 9 microsatellite markers was applied to the larvae of two populations from the Czech Republic obtained from the Research Institute of Plant Production, v. v. i. in Ruzyn, sprayed using various lethal doses of Karate insecticide. The qPCR method was performed to determine larval sex. Capillary electrophoresis data were processed by the GenAEx 6.5 program and analysis of allelic difference in populations, F-statistics, Nei's genetic distance and deviation from Hardy–Weinberg equilibrium was performed. The DARwin 6.0 program was used to compile the phylogenetic trees of the kinship of individuals. Based on the identified sexes, a non-parametric chi-square test was performed on the clusters of survivors and non-survivors in a test against the expected 1:1 sex ratio.

It was found both populations are genetically differentiated, but the hypothesis about genetic structure associating with resistance was not confirmed, as no structure to prove the specifics in the survival of individuals was found. Statistical evaluation of the gender tests also showed no deviations from the expected ratio and thus an association with greater female survival rate. To clarify the greater survival rate of males, it would be necessary to have knowledge about the establishment of the *kdr* locus to associate with the phenotypic results.

Keywords: Colorado potato beetle, insecticide resistance, SSR markers, qPCR, sex ratio

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
2.1 Vědecká hypotéza.....	9
2.2 Cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Leptinotarsa decemlineata	10
3.1.1 Taxonomické zařazení	10
3.1.2 Původ a rozšíření	10
3.1.3 Životní cyklus	11
3.1.4 Význam.....	14
3.1.5 Metody regulace	14
3.1.5.1 Biologická regulace.....	14
3.1.5.2 Chemická regulace.....	15
3.2 Rezistence škůdců k insekticidům	17
3.2.1 Mechanismy rezistence.....	17
3.2.1.1 Zvýšení metabolismu biologicky aktivních látek (metabolická rezistence) 17	
3.2.1.2 Snížení citlivosti cílového místa (target site rezistence).....	18
3.2.1.3 Omezení penetrace účinných látek přes kutikulu hmyzu.....	18
3.2.1.4 Behaviorální rezistence	19
3.2.2 Typy rezistence	19
3.2.3 Antirezistentní strategie	20
3.3 Rezistence mandelinky k pyretroidům	20
3.4 Populační genetiká	21
3.4.1 Populační genetiká mandelinky bramborové.....	21
4 Metodika	24
4.1 Materiál.....	24
4.2 Metody.....	25
4.2.1 Izolace DNA	25
4.2.2 Determinace pohlaví larev	26
4.2.3 Stanovení genetické diverzity larev pomocí mikrosatelitních markerů ...	27
4.2.4 Kapilární elektroforéza	28
4.2.5 Statistické hodnocení experimentu	28
5 Výsledky.....	30
5.1 Diference alel v populacích.....	30
5.2 Genetická diverzita populací.....	34
5.2.1 Odchyly od Hardy–Weinbergovy rovnováhy.....	34

5.2.2	F – statistika	39
5.2.3	Neiova genetická vzdálenost	40
5.2.4	Shlukovací analýza	41
5.3	Poměr pohlaví.....	45
6	Diskuze	47
6.1	Rozdíly v rozsahu diverzity mezi jedinci z populací Ruzyně a Svitavy	48
6.2	Rozdíly v rozsahu diverzity mezi přeživšími a nepřeživšími v lokalitě Svitavy 49	
6.3	Rozdíly v rozsahu diverzity v lokalitě Ruzyně v souvislosti s koncentrací letální dávky a přežitím jedince.....	49
6.4	Determinace pohlaví	50
7	Závěr	52
8	Literatura.....	53
9	Internetové zdroje	60
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata* Say) je považována za jednoho z nejvytrvalejších škůdců zemědělských plodin. Rychlý, flexibilní a rozmanitý životní cyklus, vysoce destruktivní stravovací návyky a vysoká adaptabilita na různé podmínky prostředí učinily kontrolu tohoto škůdce obtížným úkolem. Defoliací rostlin brambor způsobuje významné ztráty na výnosech hlíz. Bez využití insekticidní ochrany mohou škody dosahovat až 80 % z celkové produkce. V současné době registrujeme rezistenci k více než 50 různým druhům insekticidů, v některých případech se vyvinula už během prvního roku používání přípravku (Maharijaya & Vosman 2015; Molnar & Rakosy-Tican 2021).

Hlavním důvodem zvyšující se odolnosti je především nevhodná aplikace insekticidů, kdy je v dané oblasti používána stále stejná účinná látka, nebo více účinných látek ze stejné skupiny. U mandelinky je rezistence k pyrethroidům podmíněna *kdr* mutací, která způsobuje substituci aminokyselin v sodíkovém kanálu, který se nachází na pohlavním chromozomu X. Oproti autozomálně podmíněné necitlivosti k ostatním druhům chemických sloučenin je rezistence k pyrethroidům podmíněna gonozomálně – vázána na pohlaví (Zichová et al. 2010; Huseeth et al. 2014).

I přes rychlou prostorovou expanzi jsou populace geneticky diferencované a rezistence na insekticidy je geograficky heterogenní (Pélessié et al. 2022). Pochopení genomických zdrojů škůdce a migračních tras by však mohlo pomoci navrhnout systémy řízení, které jej dokáží udržet pod kontrolou schopností dokumentovat genetické změny v populačním měřítku a nasazovat proaktivní strategie řízení rezistence (Huseeth et al. 2014; Hamilton 2022). Genetickou variabilitu mezi populacemi pak lze detekovat porovnáním některých morfologických znaků, testováním mitochondriální DNA nebo jaderných DNA markerů, sekvencí nukleotidů umožňujících zjišťování úrovně polymorfismu mezi jedinci.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Testy rezistence k pyretroidům vytváří v souborech testovaných larev strukturu, která asociuje s pohlavím jedince a/nebo diverzitou mikrosatelitních markerů.

2.2 Cíle práce

Detekce pohlaví a variability mikrosatelitů u larev mandelinky bramborové testovaných na rezistenci k pyretroidům a ověření asociace výsledků molekulárních analýz s fenotypem larev.

3 Literární rešerše

3.1 *Leptinotarsa decemlineata*

3.1.1 Taxonomické zařazení

Říše: živočichové (*Animalia*)

Kmen: členovci (*Arthropoda*)

Třída: hmyz (*Insecta*)

Řád: brouci (*Chrysomelidae*)

Čeleď: mandelinkovití (*Chrysomelidae*)

Rod: mandelinka (*Leptinotarsa*)

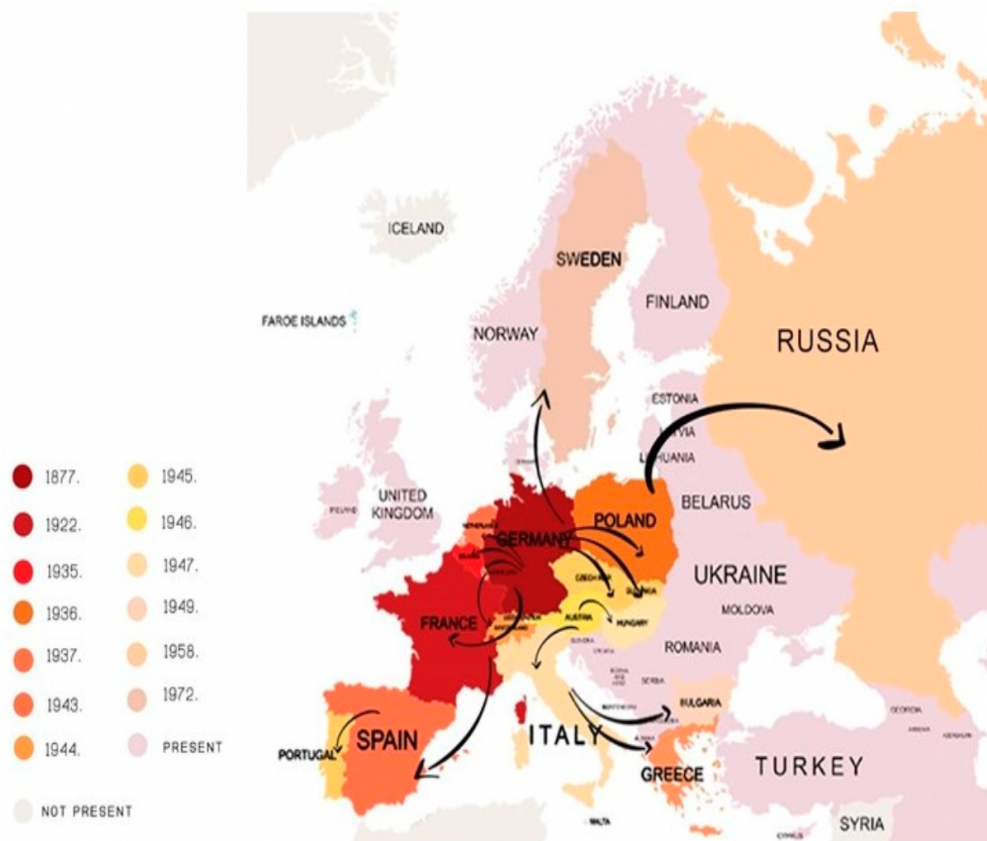
Druh: mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*)

(BioLib 2023).

Od ostatních mandelinkovitých brouků se snadno determinuje hlavou zasunutou hluboko v hrudní části. Rozdílná je i velikost, průměrně 6-11 mm na délku. Tento oranžovo žlutý brouk má na hlavě černé znaky, jejichž velikost a počet se odlišuje jedinec od jedince. Krovky (elytra) na hřbetu hrudníku a břicha vyobrazují deset charakteristických pruhů černé barvy. Zadní konec posledního ventrálního břišního segmentu je u samečků promáčklý, zatímco u samic tato prohlubeň chybí (Rivnay 1928).

3.1.2 Původ a rozšíření

Tohoto škůdce poprvé pozoroval Thomas Nuttall roku 1811 v USA. Zde bylo vážné poškození brambor zaznamenáno teprve v roce 1874 v Coloradu. V Evropě se první populace mandelinky vyskytla v Německu roku 1877, nicméně se jí podařilo úspěšně vymýtit. V období po první světové válce se usídlila ve Francii, kde se rozmnožila a expandovala po celé Evropě a dále i do Asie (Balaško et al. 2020). Dle Webera (2003) je dnes rozšířena na přibližně 16 milionech km² na území Severní Ameriky, Evropy a Asie. V současnosti se šíří dále na východ a také do vyšších zeměpisných šířek. Výskyt byl potvrzen téměř ve všech bramborářsky vyspělých zemích světa, kromě Nového Zélandu a Austrálie (Hausvater & Doležal 2013; Kumar et al. 2014).



Obrázek 1: Rozšíření mandelinky v Evropě v průběhu 20. století (Balaško et al. 2020)

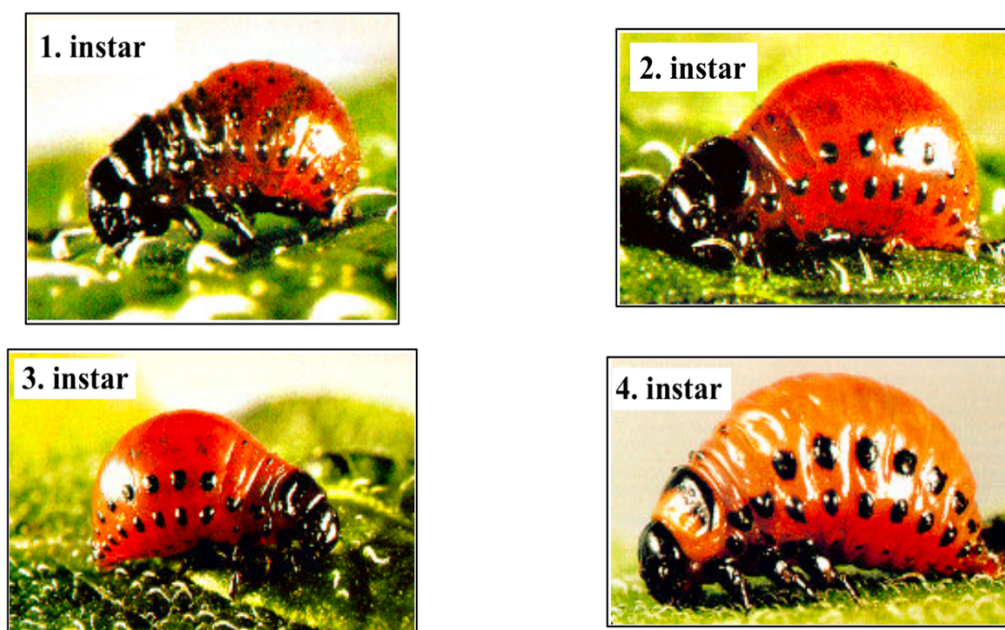
U nás škodí mandelinky nejvíce v teplejších oblastech, především v Polabí a na jižní a jihovýchodní Moravě. V těchto podmínkách dokáže vytvořit až dvě generace do roka, zatímco v bramborářských oblastech je typická pouze jedna (Rasochoa et al. 2008; Hausvater & Doležal 2013).

3.1.3 Životní cyklus

Vývoj se skládá z vajíčka, čtyř larválních stádií, kukly a dospělosti. (Wiebe et al. 2020). Dospělý brouk přezimuje v půdě, přibližně ve hloubce 10-40 cm. Na jaře vylézá a zakládá novou generaci. Samice kladou vajíčka na spodní strany listů, kde vytváří hnízda po 30-35 kusech. Průměrný počet vajíček na samičku je 500. Vajíčka jsou žlutě až oranžově zbarvená, přibližné délky 0,8-1 mm. Zbarvení je však odvislé od délky vývoje. Čerstvě nakladená mají sytou barvu, později tmavnou. Ovipozice následně pokračuje i několik týdnů, kdy se samice přesouvají ze starších rostlin na mladší. V tomto období se dospělci živí listy brambor (Boiteau & Le Blanc 1992; Hausvater Doležal 2013; Petříček 2021).

Páření taktéž ovlivňuje letovou aktivitu. Oproti samicím jiných druhů hmyzu, samice mandelinky vykazují vyšší stupeň letové aktivity, což umožňuje distribuci vajec mezi zemědělskými poli. Stále však létají méně než ty nespárené, pravděpodobně z důvodu fyziologické náročnosti rozmnožování a migrace. Samci pak létají více, čímž zvyšují množství populací s rozmanitými partnerkami a genetickou variabilitu svých potomků (Alyokhin et al. 2008).








Z nakladených vajíček se líhnou larvy během 4-9 dnů. Vylíhlá oligopodní larva se třemi páry končetin pozře svou vaječnou skořápku a postupem času vyžírá uprostřed listu drobná políčka, později pak ožírá list od okraje (Zahradník 2008). Během 3-4 týdnů prodělá larva 4 vývojová stádia (instary) (Wiebe et al. 2020).



Obrázek 2: Larvální instary (upraveno dle Boiteau & Le Blanc 1992)

Tyto instary jsou charakteristické velkým břichem a klenutým hřbetem. Larvy mají oranžovo růžově zbarvené s černými skvrnami. Hlava je malá a černá. Nad prvním párem nohou za hlavou se nachází sklerotizovaná struktura pronotum. Tato struktura je u larev prvního a druhého instaru zcela černá. Ve třetím instaru se přední okraj pronota jeví oranžově hnědý. U larev čtvrtého instaru je asi polovina pronota vpředu světle hnědá. Břicho má devět segmentů (Rivnay 1928; Boiteau & Le Blanc 1992).

Dle Boiteau & Le Blanc (1992) se mezi nejspolehlivější rozlišující znaky řadí velikost hlavy vzhledem k tomu, že je velikost a barva těla larválních instarů variabilní. Šířka hlavy se mění při každém svlékání (přechod z jednoho vývojového stádia do druhého).

Znak Larvální instar	(pohled shora) 	(pohled shora) 	(pohled z boku) 
	Šířka hlavy (mm)	Pronotum	Průměrná délka těla (mm)
1	0,6		1,5
2	1,0		3,0
3	1,6		5,0
4	2,4		8,0

Obrázek 3: Identifikační tabulka ke čtyřem larválním instarům (upraveno dle Boiteau & Le Blanc 1992)

V průběhu čtvrtého instaru se larvy začnou méně krmit. Následně se zavrtají do půdy, aby proběhlo zakuklení. V půdě dojde k línání, které odkryje kuklu. Dospělci se objevují o 1-2 týdny později, čímž dokončí metamorfózu. Poté začnou nový cyklus rozptylování, krmení, páření a kladení vajec. Délka životního cyklu trvá 2 až 8 týdnů v závislosti na podmínkách prostředí (Wiebe et al. 2020; Rondon et al. 2021). Optimální teplota pro vývoj je 25~30 °C s teplotním rozsahem 15 °C až 32 °C, během kterého se postupně zkracuje doba vývoje každého instaru (Guo et al. 2011).

Ve většině oblastí výskytu má mandelinka dvě nebo tři generace do roka. Značná část každé z generací vstupuje do diapauzy a zavrtá se do půdy bez rozmnožování, nebo po uložení vajíček. Přezimující populace je složena z brouků generací časných a pozdních letních, a i těch ze začátku podzimu. Vstup do diapauzy nastává v klimaticky nepříznivém období a dochází při něm k reverzibilní degeneraci létacích svalů (Tauber & Tauber 2002; Petříček 2021). Navzdory relativně krátkému evolučnímu věku, mandelinky mají vysoký vnitrodruhový polymorfismus, umožňující širokou škálu ekologické plasticity a adaptability na různé faktory, jak biotické, tak abiotické (Udalov & Benkovskaya 2011; Molnar & Rakosy-Tican 2021).

3.1.4 Význam

Potravou dospělců i larev jsou rostliny čeledi *Solanaceae*. Vyjma brambor (*Solanum tuberosum*) se mandelinky běžně vyskytují na baklažánu (*Solanum melongena*) a rajčatech (*Solanum lycopersicum*). Díky citlivým čichovým receptorům jsou brouci schopni rozpoznávat a vyhledávat hostitelské rostliny (Petříček 2021). Mladé larvy vykusují malé otvory v listu, starší larvy a brouci škodí na jejich okrajích. Když už na rostlině nezbydou žádné listy, okusují odnože a stonky. Poškozováním rostliny napomáhají k šíření *Rhizoctonia solani* a prstencové hniloby (Liao et al. 2021). Jedna larva zkonzumuje po dobu svého vývoje až 40 cm² listů brambor denně, dospělý brouk pak 10 cm² denně. Ztráta více než 75 % listů může způsobit úplnou likvidaci plodiny (Ferro et al. 1985; Zhu et al. 2010; Maharijaya & Vosman 2015).

Škodlivost a tím způsobené ztráty na výnosu obecně závisí na době a intenzitě výskytu mandelinky v porostech. V období brzy po vzejití (časný výskyt), kdy se zatím netvoří hlízy, může při absenci ochrany dojít k naprosté likvidaci natě, což zapříčiní i zničení veškeré produkce brambor. Za předpokladu, že se první generace mandelinky objeví po nasazování hlíz (pozdější období), může při nevhodně použité ochraně redukovat výnos i v řádu desítek procent (Doležal & Hausvater 2018).

3.1.5 Metody regulace

3.1.5.1 Biologická regulace

Klasická biologická regulace je záměrným zavedením přirozených nepřátel ve snaze omezit hustotu invazního druhu (Louda et al. 2003). Jedná se o využívaný a účinný nástroj v ochraně proti škůdcům, zvláště v dnešní době, kdy jsou invazní druhy na vzestupu vzhledem k celosvětovému obchodu a cestování (Cock et al. 2016). Tato metoda je vhodná zejména v případě, kdy je cizí druh zavlečen do nové oblasti, kde se stává zavedeným škůdcem. Často se zakládá na předpokladu, že v nové oblasti introdukovaný druh unikl přirozeným nepřátelům,

kteří regulují jeho populace v oblasti endemismu, a že invazní škůdce bude pod kontrolou, jakmile se znovu objeví jeho přirození nepřátelé (Hajek et al. 2007).

V Severní Americe byly pozorovány predace některých stenofágních členovců právě na mandelince bramborové. V současnosti se jedná o velmi významné dravce. Zvláště pak slunéčko *Coleomegilla maculata* (DeGeer), které se živí vajíčky na listech a prvními instary larev. Štěnice *Podisus maculiventris* (Say) taktéž konzumuje vajíčka a larvy (Greenstone et al. 2010; Lynch et al. 2021). Ploštice *Lygus pratensis* (Linnaeus) a slunéčko *Coccinella septempunctata* (Linnaeus) likvidují vajíčka (Wale et al. 2008). Střevlík *Lebia grandis* (Hentz) je obligátním parazitoidem larev mandelinkovitých brouků (Weber et al. 2006).

Zemek et al. (2016) prováděli testy působení entomoparazitické houby *Isaria fumosorosea* proti mandelince. Výsledky prokázaly velkou účinnost, během jednoho týdne bylo usmrceno až 97 % larev. *Steinernema feltiae*, entomopatogenní hád'átko, působí společně se symbiotickými bakteriemi *Xenorhabdus* nebo *Photorhabdus*. Tyto bakterie se v mrtvém těle hostitele rozmnožují a slouží hlísticím jako potrava. Hlístice nejsou schopny živiny z těla za normálních okolností využít. Mortalita mandelinek byla oproti houbě nižší, přibližně 85 % s vyšším účinkem na larvy než na kukly. Taktéž byla zkoušena společná aplikace obou patogenů v různých kombinacích. Použití houby společně s hlísticí při současné aplikaci obou organismů zvýší úhyn larev o téměř 100 % a zkrátí střední letální dobu na dva dny.

V našich podmínkách jsou typickými predátory ptáci, slunéčka, ploštice, střevlíci, škvoři nebo pavouci. Eliminace výskytu mandelinky je nicméně malá, a proto i stoupá na významu využívání mikroorganismů, především houby *Beauveria bassiana* a bakterie *Bacillus thuringiensis* (Doležal & Hausvater 2020). Wraight & Ramos (2005) aplikovali během tří polních sezón biopesticidy na bázi houbového patogenu *Beauveria bassiana* a bakteriálního patogenu *Bacillus thuringiensis* za účelem zjištění jejich synergického působení. Výsledky prokázaly, že kombinované využití vedlo až ke 35 % snížení populací larev oproti samostatnému použití přípravků.

3.1.5.2 Chemická regulace

Mandelince je do značné míry připisována zodpovědnost za tvorbu moderního insekticidního průmyslu. Od roku 1864 byly proti tomuto škůdci testovány stovky sloučenin. Prvními využívanými chemikáliemi byly přípravky na bázi arsenu jako Paris Green (acetoarsenit měďnatý), arzeničnan olovnatý a v menší míře botanický rotenon. Paris Green byl proti mandelince vysoce účinný a pěstители brambor hojně využívány spolu s dalšími arzeniky až do konce 40. let dvacátého století. Mandelinka byla taktéž jedním z prvních cílů pro aplikaci

DDT, jehož testovací aplikace započaly již v roce 1939. DDT se rychle stalo základem kontroly hmyzu pro většinu pěstitelů brambor a nahradilo mnohem toxičtější a pro životní prostředí nebezpečná arzenika. Ačkoli se možnosti chemické ochrany od té doby značně rozrostly na více než 30 různých aktivních látek, myšlenka úplného vymýcení mandelinky zůstala do značné míry stejná. Problém dosáhl krizové úrovně na počátku 90. let dvacátého století. V té době pěstitelům brambor v některých oblastech zcela došly možnosti chemické kontroly. V současné době zůstávají insekticidy stále základem kontroly mandelinky bramborové na komerčních bramborových farmách (Alyokhin et al. 2008; Casagrande 2014).

V důsledku skutečnosti, že použití insekticidů vedlo k drastickému snížení populací mandelinky, byl pozorován vývoj rezistence vůči účinným látkám. Genetickou adaptací si jedinci dokázali vyvinout rezistenci vůči většině registrovaných insekticidů (Stankovic et al. 2012; Szendrei et al. 2012; Alyokhin et al. 2015). Zvýšení dávky je pouze krátkodobým řešením a výrazně zvyšuje rychlost rozvoje rezistence (Maharijaya & Vosman 2015).

Doležal et al. (2022) hodnotili v letech 2019-2022 dostupné insekticidy proti mandelince v České republice. Benevia a Coragen 20 SC z chemické skupiny diamidů měly v pokusech nejvyšší účinnost. Zatím v našich podmínkách nebyl pozorován výskyt rezistence, tudíž je jejich použití vhodné při antirezistentní strategii. Také byly testovány skupiny biochemických pesticidů. Účinná látka přípravku NeemAzal se získává ze semen stromu *Azadirachta indica* a zastavuje žír brouků i larev. Tento insekticid prokázal v testech dobrou účinnost. Spinosad řadící se do chemické skupiny spinosinů vzniká fermentací půdní bakterie *Sacharopolyspora spinosa*. Je obsažen v pesticidu SpinTor a jeho účinnost převyšovala 90 % u všech vývojových stádií larev. S ohledem na omezování neonikotinoidů v Evropské unii je v České republice proti mandelince registrovaná pouze jedna účinná látka z této skupiny – acetamiprid. Z pokusů vyplývá lokální výskyt rezistence v populacích při použití přípravku Mospilan 20 SC. K antirezistentní strategii je jeho použití vhodné pouze v oblastech, kde není tolik využíván a zároveň není zaznamenán pokles jeho účinnosti. Byly také potvrzeny rezistentní populace mandelinky vůči pyretroidním přípravkům Karate se Zeon technologií a Decis Mega. Výsledky ošetřených variant byly téměř totožné s neošetřenou kontrolou.

S ohledem na pravděpodobné budoucí nadužívání stávajícího nízkého množství dostatečně působících přípravků a selekce rezistentních populací je hledání nových účinných látek nutností.

3.2 Rezistence škůdců k insekticidům

Neúčinnost aktivní látky aplikované za účelem likvidace hmyzích škůdců může mít mnoho důvodů. Jedním z nich je bezpochyby odolnost vůči insekticidům. Klíčovou je pak dědičná změna v citlivosti populace škůdců na ošetření. Spojuje se zde evoluce fenotypových znaků se selekcí a specifickými geny zodpovědnými za rezistenci (Zalucki & Furlong 2017). V případě opakovaného působení jedné účinné látky na několik generací škůdců se v populaci zvyšuje podíl rezistentních jedinců. Je taktéž časté, že se u jednoho druhu hmyzu současně projevuje více mechanismů rezistence (Kocourek 2017).

Tolerance je oproti rezistenci přirozeným jevem a není výsledkem selekčního tlaku. Vzhledem k rozdílům ve velikosti těla, tloušťce exoskeletu a schopnostem metabolizovat jedovaté látky jsou dospělé housenky mnohem více tolerantní k většímu množství insekticidů než housenky mladší. Tyto vlastnosti jsou definovány jako tolerance nebo přirozená rezistence (Buhler 2020).

3.2.1 Mechanismy rezistence

3.2.1.1 Zvýšení metabolismu biologicky aktivních látek (metabolická rezistence)

Metabolickou rezistencí rozumíme transformaci látek biologickou cestou, která v konečném důsledku snižuje schopnost interakce účinné látky pesticidu s cílovým místem působení. Mezi hlavní tři skupiny enzymů, které se podílí na molekulárním mechanismu metabolické rezistence se řadí esterázy, glutathion S-transferázy nebo monooxygenázy (Hemingway 2000; Karunaratne et al. 2018). Tyto enzymy si hmyz vyvinul z důvodu eliminace potenciální toxicity rostlin, kterými se živí, v důsledku produkce alkaloidů nebo fenolů (Yu 2008; Rane et al. 2016).

Ve většině případů může být rezistentní hmyz detekován prostřednictvím zvýšeného množství enzymu ve srovnání s citlivými jedinci (Brown & Brogdon, 1987). Za zvýšenou aktivitu enzymů zodpovídají amplifikace genu, zvýšená exprese, mutace kódující sekvence nebo kombinace zmíněných. Esterázy umožňují odolnost vůči karbamátům, pyretroidům a organofosfátům. Glutathion S-transferázy zprostředkovávají rezistenci vůči pyretroidům, organofosfátům a organochlorům. Monooxidázy působí proti všem skupinám insekticidů (Li et al. 2007).

Celý detoxikační proces se skládá ze dvou částí. V primární fázi probíhá hydrolyza nebo oxidace, v sekundární fázi dochází ke konjugaci (spojení) produktů primární fáze s endogenními sloučeninami a jejich následné vyloučení z těla (Li et al. 2007; Yu 2008). Pochopení a znalost detoxikace insekticidů umožňuje porozumění mechanismům rezistence jako celku a pomáhá k vytváření lepších antirezistentních strategií (Panini et al. 2016).

3.2.1.2 Snížení citlivosti cílového místa (target site resistance)

Ke snížení citlivosti cílového místa dochází prostřednictvím bodových mutací ve strukturálních genech. Avšak pouze omezené množství změn může snížit citlivost k insekticidům bez narušení normálních fyziologických funkcí cílového místa (Hemingway et al. 2004; Karunaratne et al. 2018). Proto je počet možných aminokyselinových substitucí velmi omezený. I u vysoce odlišných taxonů se tedy běžně vyskytují identické mutace související s rezistencí (Karunaratne et al. 2018).

Mutace v cílových místech mění jejich vazebnou afinitu k různým insekticidům v závislosti na molekulární struktuře insekticidu. Změněná cílová místa tedy nezprostředkovávají stejnou úroveň rezistence vůči všem insekticidům patřícím do určité skupiny. V důsledku toho se metabolická rezistence stává výhodnější v evolučním měřítku, protože umožňuje hmyzu přežít i místech, kde mohou být rostlinné toxiny méně rovnoměrně distribuovány. Míra, do jaké je normální fyziologická funkce narušena mutací rezistence, se odráží ve zdatnosti rezistentních jedinců při absenci selekce insekticidy (Panini et al. 2016; Karunaratne et al. 2018).

3.2.1.3 Omezení penetrace účinných látek přes kutikulu hmyzu

Pro dosažení cílového místa je nejprve nutné, aby insekticid pronikl do těla hmyzu. K odolnosti proti průniku dochází při fyzikálně-chemických modifikacích ve struktuře kutikuly, což vede k pomalejší absorpci chemikálií nebo ke snížení množství insekticidu procházejícího skrze fyzické bariéry (Panini et al. 2016). V základu se změny týkají tloušťky nebo složení kutikuly, zejména zvýšeným ukládáním strukturálních složek, jako jsou epikutikulární lipidy nebo strukturní kutikulární proteiny (Fang et al. 2015). Díky zpomalovacímu mechanismu nedosáhnou molekuly insekticidu cílových proteinů v neuronech (Panini et al. 2016).

Tento mechanismus chrání hmyz před širokou škálou insekticidů, ale sám o sobě poskytuje nízkou úroveň odolnosti. Ve skutečnosti se obvykle vyskytuje v kombinaci s jinými formami rezistence, což zvyšuje jejich účinnost, kdy pomalejší či opožděná penetrace může poskytnout více času na enzymatickou detoxikaci (Ahmad et al. 2006; Valles et al. 2000).

Odolnost proti pronikání může také rozšířit odolnost proti insekticidům napříč různými chemickými třídami (mnohonásobná rezistence), což má podstatné praktické důsledky pro běžné antirezistentní strategie (Balabanidou et al. 2018).

3.2.1.4 Behaviorální rezistence

Kromě cíleně specifické je známa také rezistence behaviorální. Je definována jako vyvinuté chování, snižující vystavení hmyzu toxickým sloučeninám, nebo umožňující přežít v prostředí, které by bylo za jiných okolností toxické a smrtelné. Hmyzí škůdci vykazující behaviorální rezistenci se vyhýbají kontaktu s insekticidem nebo požití letální dávky, čímž zvyšují své šance na přežití. Takto odolní jedinci detekují nebo rozpoznávají nebezpečí a vyhýbají se toxinům. Hlavním předpokladem je schopnost členovců vnímat přítomnost pesticidů, čímž upravují své stravovací návyky, způsob kladení vajíček nebo opouštějí chemicky ošetřenou oblast (Khodaverdi et al. 2016; Nansen et al. 2016; Zalucki & Furlong 2017).

Dle Khodaverdi et al. (2016) nejsou konkrétní mechanismy zodpovědné za schopnost vnímání přítomnosti pesticidů dobře popsány. Je ovšem dobře známo, že během evoluce působil na populace členovců selekční tlak a byly publikovány studie o nenáhodném výběru hostitelů (Brattsten 1988). Některé ze základních rysů využívaných k optimalizaci výběru míst pro kladení vajíček a obstarávání potravy mohou také umožnit vyhnout se rostlinným tkáním s vyššími koncentracemi pesticidů.

3.2.2 Typy rezistence

Hmyzí škůdci nemusí být rezistentní pouze k jedné účinné látce insekticidu (jednoduchá rezistence). Dále ještě rozlišujeme:

- Křížová rezistence – rezistence vůči určitému pesticidu, která vede k rezistenci vůči jiným pesticidům prostřednictvím společného mechanismu rezistence. Obvykle se vyskytuje mezi pesticidy, které sdílí podobná vazebná cílová místa nebo detoxikační cesty (Wu 2014).
- Mnohonásobná rezistence – jedná se o rezistenci vůči více než jedné skupině pesticidů u jednoho škůdce prostřednictvím různých mechanismů rezistence (Wu 2014). Je méně častá než například křížová, ale potenciálně představuje mnohem větší problém. Extrémním způsobem snižuje množství přípravků, které lze ke kontrole dotyčného hmyzu použít (Buhler 2020).

- Kombinovaná rezistence – působení více mechanismů rezistence. Příkladem pak může být rezistence typu *kdr* a metabolická k jedné skupině účinných látek (Kocourek et al. 2020).

3.2.3 Antirezistentní strategie

Antirezistentními strategiemi se rozumí taková opatření, která v konečném důsledku sníží riziko vzniku rezistence u hmyzích škůdců. Hlavní metodou je střídání používaných přípravků s různými mechanismy účinku. Stejná účinná látka případně látky ze stejné skupiny by měly být použity maximálně dvakrát za sezónu (v některých případech pouze jednou). Dle vývojového stádia škůdce, fenofáze plodiny a prahu škodlivosti ošetřovat ve vhodném termínu. Minimalizaci potřeby ošetření lze docílit podporou přirozených nepřátel, monitoringem škůdců nebo využitím selektivních přípravků (Kocourek et al. 2015).

3.3 Rezistence mandelinky k pyretroidům

Insekticidy na bázi pyretroidů jsou využívány již od 70. let 20. století, kdy byly zavedeny na trh. Velmi rychle se však na tyto látky vyvinula u různých druhů hmyzu rezistence a mandelinka nebyla výjimkou (Kim et al. 2005).

Mezi pyretroidní sloučeniny se řadí například permethrin, cyfluthrin a esfenvalerát. Působí toxicky tím, že zabraňují inaktivaci citlivého napěťového sodíkového kanálu (*Vssc*), čímž následně prodlužují depolarizaci neuronu. Významným mechanismem rezistence je u pyretroidů knockdown resistance (*kdr*), který je charakteristický sníženou citlivostí na tyto sloučeniny v nervovém systému jedince. Jedná se o modifikaci cílových míst pyretroidů na sodíkových kanálech nervového axonu, který je řízen genem na 3. chromozomu (Zichová et al. 2010; Rinkevich et al. 2012; Rinkevich et al. 2013). *Kdr* alela byla poprvé zjištěna a popsána u *Musca domestica* (Linnaeus) a je způsobena polymorfismem jednoho nukleotidu (z C na T), který vede ke změně aminokyseliny z leucinu na fenylalanin (L1014F) v transmembránové oblasti IIS6 sodíkového kanálu (*Vssc1*). Identická mutace byla pozorována v ortologním genu *LdVssc1* a identifikována jako hlavní faktor odpovědný za rezistenci u brouků rezistentních na pyretroidy (Udalov & Benkovskaya 2011; Rinkevich et al. 2012). V Evropě byla pyretroidní rezistence způsobená *kdr* detekována u polních populací mandelinky v Bulharsku, České republice, Německu a Srbsku (Molnar & Rakosy-Tican 2021). Knockdown rezistence je u mandelinky, na rozdíl od jiného hmyzu, vázaná na pohlaví, gen *LdVssc1* se nachází na pohlavních chromozomu X (Zichová et al. 2010). Dle analýzy karyotypu mají 17 autozomů a

system určování pohlaví XO, ve kterém jsou samci XO a samice XX (Hawthorne 2001). Samci tedy *kdr* mutaci mají nebo ne, zatímco samice mohou být homozygotní citlivé, homozygotní rezistentní nebo heterozygotní pro tento znak. Výsledky testů prokázaly, že hemizygotní rezistentní samci a homozygotní rezistentní samice mají stejně vysokou úroveň rezistence a že rezistence u heterozygotních samic je neúplně recesivní (Rinkevich et al. 2012).

Rinkevich et al. (2012) shromáždili 96 larev z 10 lokalit (USA a Bulharsko) za účelem zjištění evolučního původu *kdr* rezistence u mandelinky. U každého jedince pak byla získána genomová sekvence pro *LdVssc1*. Pro identifikaci nových rezistentních a citlivých alel byly použity přidružené introny ve směru od místa mutace. V konečném důsledku identifikovali 8 rezistentních (všechny *kdr*) a 21 citlivých haplotypů. Fylogenetická analýza pak naznačuje 2-3 pravděpodobné nezávislé původy *kdr* mutace.

Benkovskaya et al. (2006) ve svém výzkumu zjistili, že i morfologické vlastnosti do určité míry mohou souviset s rezistencí. Fenotypy se specifickými skvrnami na hlavě, pronotu a krovkách byly ve vyšší frekvenci zastoupeny v populacích jedinců rezistentních než v populacích citlivých. Taktéž pozorovali, že se diverzita skvrn během 10 let snížila, patrně z důvodu tlaku na selekci insekticidů.

3.4 Populační genetika

Genetická variabilita uvnitř populací, a i mezi nimi může být ovlivněna mutacemi, genetickým driftem, tokem genů a selekcí. Distribuce genetické variability bývá často nenáhodná. V inbredních přirozených populacích bývá například variabilita alozymových markerů nízká, zatímco u outbrední populace vysoká. Druhy obývající malé a geograficky narušené oblasti mívají slabší tok genů mezi populacemi a jsou tedy i více ovlivněny genetickým driftem. Genetická diverzita má pak tendenci se zvyšovat s geografickou vzdáleností (Sidorenko & Berezovska 2001).

Diference v citlivosti populací na nové přípravky mohou ovlivňovat i jejich účinnost a případný rozvoj rezistence mandelinky bramborové. Zjišťování regionálních rozdílů ve výchozí citlivosti na nové insekticidy a jejich genetické mechanismy zjednoduší vývoj a hodnocení rezistence pro případné nové přípravky (Dively et al. 2020).

3.4.1 Populační genetika mandelinky bramborové

Pro udržitelnou a vědecky podložitelnou strategii účinné karantény, kontroly a eradikace škůdců, jako je i mandelinka, jsou potřeba informace o zdroji a způsobu šíření invaze a genetické struktury druhů. Schopnost populací zachovat si během invaze genetickou variabilitu

a přizpůsobit se měnícím se stanovištím může být do určité míry důvodem, proč se úspěšně rozšířily téměř po celém světě. Jako velmi významné a užitečné se ukázalo využití molekulárních markerů pro hodnocení genetické struktury invazních druhů a toho, jak k invazím dochází v různých měřítkách od lokálních přes regionální až po globální. Mitochondriální DNA (mtDNA) se osvědčila jako nástroj pro pochopení zdroje druhů, genetické diverzity, rozdílů mezi populacemi nebo toho, jak invaze v dané oblasti postupuje (Zhang et al. 2013; Koca et al. 2021). Genom mandelinky bramborové byl nedávno sekvenován (Schoville et al. 2018), díky čemuž je snazší provádět studie mtDNA na úrovni celého genomu (Wiebe et al. 2020). Mitochondriální a jaderná DNA poskytly cenné informace o původu kolonizace, rozsahu genetické diferenciaci a toku genů během expanze mandelinky bramborové v Severní Americe a Evropě (Sidorenko & Berezovska 2002; Grapputo et al. 2005; Zhang et al. 2013).

Cenným nástrojem studia genetické variability v populacích jsou mikrosatelitní markery, jež jsou tandemově uspořádané sekvence o velikosti 1–6 oligonukleotidů. Podléhají mendelistické dědičnosti, vyznačují se genomickou distribucí, multialelickou povahou, kodominantní dědičností a vysokým polymorfismem. Nalezneme je v celé délce genomu, častěji pak v nekódujících oblastech. Vykazují vysoký stupeň polymorfismu alel a vyskytují se v eukaryotickém i v prokaryotickém genomu (Bhargava & Fuentes 2010; Senan et al. 2014). Hamada et al. (1982) poprvé zdokumentoval existenci mikrosatelitních markerů v širokém měřítku evolučně rozmanitých eukaryotických organismů, od kvasinek po člověka. Z toho důvodu jsou využitelné pro studium populací invazních druhů. U mandelinky bramborové pak byly vyvinuty a použity ke studiu populací v různých částech světa. Pomocí molekulárních markerů (isoenzymy, RAPD, RFLP a mikrosatelitní markery) byl z lokálních analýz zkoumán proces kolonizace a genetická diferenciaci mezi různými populacemi. V kontinentálním měřítku pak například v Severní Americe, Evropě a Asii (Koca et al. 2021).

Genetickou diferenciaci mezi mexickými a americkými populacemi mandelinky odhalily časné studie založené na variaci izoenzymů. Nedávný výzkum však odhalil, že tento brook pravděpodobně pochází z jižní části Severní Ameriky díky bližšímu zkoumání polymorfismem délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), mtDNA a mikrosatelitními markery. V Severní Americe bylo také rozpoznáno 20 haplotypů mtDNA, z nichž byl pouze jeden nalezen v evropských populacích. Při kolonizaci do Evropy se genetická diverzita výrazně snížila v důsledku efektu zakladatele (Dively et al. 2020).

Grapputo et al. (2005) zkoumali invazi tohoto brouka ze Severní Ameriky do Evropy, kde se během téměř 30 let rozšířil po celém kontinentu. Analýzou mtDNA a markerů polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) zjistili nejvyšší genetickou diverzitu v populacích jedinců ze středu USA. Evropské populace měly pouze zlomek variability pozorované u té severoamerické. Evropské populace také vykazovaly významné snížení variability jaderných markerů (AFLP). Navzdory vysoké schopnosti šíření a snížení genetické diverzity v Evropě byly mezi jedinci na obou kontinentech nalezeny vysoká úroveň struktury populace a nízký tok genů.

V Číně byla mandelinka poprvé pozorována v roce 1993. Pro lepší porozumění genetické struktury a toku genů byly provedeny studie (Zhang et al. 2013; Yang et al. 2020) pomocí mikrosatelitních markerů na populacích napříč téměř celou zemí. Zjištěné hodnoty genetické variability byly nízké.

Ve výzkumu Koca et al. (2021) byly použity mikrosatelitní markery a mtDNA pro informace o populačním zdroji, struktuře a postupu invaze mandelinky v Turecku. Byl detekován pouze jeden evropský haplotyp ve všech tureckých populacích. To dokazuje, že k invazi došlo právě z Evropy. Výsledky ukázaly, že si populace zachovaly dostatečnou genetickou variabilitu, aby se dokázaly přizpůsobit novému prostředí. Obecně nízká genetická variabilita, stejně jako v Číně, je důsledkem kratšího časového období rozšíření z Ameriky do Evropy.

V této době se mandelinka nadále rozšiřuje do východní a jihovýchodní Asie. Pro pochopení šíření z Evropy do Asie je důležité se do budoucna zaměřit na výzkum jedinců právě z těchto oblastí, abychom byli schopni objasnit naše současné chápání této skutečnosti.

4 Metodika

4.1 Materiál

Larvy mandelinky bramborové, ošetření přípravkem Karate s účinnou látkou lambda cyhalothrin byly získány z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. V Ruzyni. Jednalo se o jedince ze dvou lokalit – Svitavy a Ruzyně. Populace Svitavy byla reprezentována potomstvy 3 samic (1,2,5). Potomstva byla ošetřena stejnou letální koncentrací LC 1500. Bližší detaily struktury pokusu a rámcový výsledek insekticidního testu jsou uvedeny v tabulce 1. Jedinci Ruzyně byli ošetřeni různými letálními koncentracemi účinné látky dle tabulky 2. U obou lokalit bylo zaznamenáno, zda daný jedinec přežil, či ne.

Tabulka 1: Seznam vzorků z lokality Svitavy

Označení	Potomstvo	Počet jedinců	Přežití dávky
A	1/2	4	Mrtvý
B	1/3	3	
C	1/4	6	
D	1/5	4	
E	1/6	3	
F	2/1	7	
G	2/2	5	
H	2/3	5	
I	2/4	8	
J	2/5	8	
K	5/1	3	
L	5/2	4	
M	5/4	7	
N	1/1	7	
O	1/2	6	
P	1/3	7	
Q	1/4	4	
R	1/5	5	
S	1/6	6	
T	2/1	3	
U	2/2	5	
V	2/3	4	
W	2/4	3	
X	2/5	2	
Y	5/1	7	
Z	5/2	4	
α	5/3	8	
β	5/4	3	

Tabulka 2: Seznam vzorků z lokality Ruzyně

Označení	Počet jedinců	Letální koncentrace	Přežití dávky
A	9	LC 100	Mrtvý
B	9	LC 500	
C	24	LC 1500	
D	21	LC 100	Živý
E	22	LC 500	
F	7	LC 1500	

4.2 Metody

4.2.1 Izolace DNA

Pro individuální extrakci genomové DNA byla využita metoda CTAB dle Chen et al. (2010). Do 1,5 ml zkumavek byla vložena hlava s hrudí každé larvy. Bylo přidáno 200 μ l CTAB pufru, 2 μ l RNázy (Qiagen, Německo) a vše důkladně zhomogenizováno skleněnou tyčinkou. Následně byly přidány 2 μ l proteinázy K (Macherey-Nagel, Německo) a 2 μ l merkptoethanolu (Qiagen, Německo). Vzorky byly zvortexovány a inkubovány 30 minut v termobloku při teplotě 65 °C.

Po inkubaci bylo přidáno 200 μ l Rotifenol (směs fenolchloroformizoamylalkohol v poměru 25:24:1, Carl Roth, Německo) a vzorky byly opět důkladně zvortexovány. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut při 14 000 rpm (Eppendorf), aby se oddělily jednotlivé frakce. Supernatant byl převeden do nové zkumavky o objemu 1,5 ml. Do zkumavek se supernatantem bylo přidáno 200 μ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1. Zkumavky byly důkladně zvortexovány a centrifugovány po dobu 10 minut při 14 000 rpm. Horní frakce byla opět převedena do nové 0,5 ml zkumavky. Do těchto zkumavek bylo přidáno 200 μ l izopropanolu, obsah promíchán převrácením a ponechán po dobu 1 hodiny v mrazícím boxu (-20 °C) k vysrážení.

Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 14 000 rpm. Supernatant byl odebrán pipetou a dále bylo přidáno 225 μ l 100 % etanolu a 25 μ l 5 M octanu sodného (pH 5,3). Opět následovala centrifugace po dobu 10 min při 14 000 rpm a oddělení supernatantu slítím. Pelet byl opláchnut 200 μ l 100 % ethanolu a centrifugován po dobu 10 min při 14 000 rpm. Poté byl ethanol odsát pipetou a vzorky vysušeny v termobloku při teplotě 39 °C. Suchý pelet byl poté rozpuštěn ve 40 μ l TE pufru (pH=8).

Vzorky DNA byly kvantifikovány pomocí spektrofotometru NanoPhotometer (Implen, Německo) a zředěny PCR vodou (Sigma, Německo) na finální koncentraci 5 ng μl^{-1} .

4.2.2 Determinace pohlaví larev

Pohlaví larev bylo určeno použitím qPCR na principu CNV (copy number variation). Jako cílové a referenční geny byly použity gonosomální *LdVssc* a autozomální *LdUBE3B*. Primery a metodika byly navrženy, ověřeny a publikovány v práci Sedlákové et al. (2022).

Tabulka 3: Použité lokusy

Lokus	Primery	Počet bp
<i>LdVssc</i>	F 5' AGAATCATGGATTGTCCGAAGGTT 3'	243
	R 5' GAGGGTGGTAAGAGTGGCAAAAGT 3'	
<i>LdUBE3B</i>	F 5' AACAACTGCAGCATCTGAAACTCC 3'	250
	R 5' TACGGCTTTGAACACTTTGACACA 3'	

Směsi qPCR o celkovém objemu 10 μl byly připraveny samostatně pro každý marker v technických triplikátech. Ty se skládaly z 5,0 μl FastStart Essential DNA Green Master (Roche, Švýcarsko), 20 ng genomové DNA a 0,5 μM každého primeru. Amplifikace a analýza teploty tání byly provedeny na tenkostěnných PCR destičkách BRAND 96-well PCR plate (Bio-Rad, USA) pomocí systému CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, USA) za podmínek v tabulce 4.

Tabulka 4: PCR cyklus použitý pro amplifikaci

Fáze	Teplota	Čas	Opakování
Predenaturace	95 °C	10 minut	1 cyklus
Denaturace	95 °C	20 sekund	40 cyklů
Annealing	60 °C	20 sekund	
Elongace	72 °C	20 sekund	

Hodnota počtu kopií založená na algoritmu REST[©] podle Pfaffl et al. (2002) byla vypočtena s použitím samce jako kalibrátoru (obrázek 4), kde E: účinnost primerů stanovená ředící řadou, ΔCt : rozdíl v prahu cyklu (Ct) mezi průměrem technických replikátů kalibrátoru a průměrem technických replikátů testovaného vzorku.

$$CNV_{LdVssc} = \frac{E(LdVssc)^{\Delta Ct(LdVssc)}}{E(LdUBE3B)^{\Delta Ct(LdUBE3B)}}$$

Obrázek 4: Vzorec pro výpočet hodnoty počtu kopií (Sedláková et al. 2022)

4.2.3 Stanovení genetické diverzity larev pomocí mikrosatelitních markerů

Genetická diverzita byla stanovena pomocí primerů dle Grapputo (2006). Celkem bylo použito 10 mikrosatelitních lokusů s dinukleotidovými sekvencemi. Primery byly uspořádány ve dvou multiplexech, jejichž specifikace, značení primerů a rozsah detekovaných alel jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Použité mikrosatelitní lokusy (*a* multiplex 1, *b* multiplex 2)

Lokus	Primery	Barva	Koncentrace	Rozsah bp
LdAC5-2 ^a	F 5' CACTCTGGGGTCAAATAGAG 3'	6-FAM	0,13 μM	208-231
	R 5' GTTTCTTTTCGAGTGACTTGTGTGTGT 3'			
LdE11c ^a	F 5' GCGGCCAGATGTTATCAGTT 3'	6-FAM	0,07 μM	138-160
	R 5' GTTTCTTCACCGCGACTTCAAAGGTAT 3'			
LdAC5-22 ^a	F 5' CGTTTATGATTAGCATTCTGA 3'	VIC	0,07 μM	147-160
	R 5' GTTTCTTACTTTCAATAAAAAGGTCGAT 3'			
LdGA4-5 ^a	F 5' CCAGTTGATATTGAGAGAGA 3'	NED	0,13 μM	208-230
	R 5' GTTTCTTCAAACGCACTCAGTACAAAA 3'			
LdGA5-30 ^b	F 5' GTTTTCCATCATGATCCATT 3'	6-FAM	0,13 μM	173-182
	R 5' GTTTCTTATAGGAAGCAACGACCATC 3'			
LdB8b ^b	F 5' TGCTCATTTCAAATATGGTTTTG 3'	VIC	0,07 μM	94-104
	R 5' GTTTCTTCCAACAGGTATCCAACAAACG 3'			
LdA11b ^b	F 5' CAACGTACAGTGTGCTTCATTTG 3'	VIC	0,1 μM	163-169
	R 5' GTTTCTTTCAAGATTTGTTGCAGACATCA 3'			
LdGA5-11 ^b	F 5' TTTGGTGGGTGTTTCTATTC 3'	NED	0,13 μM	175-189
	R 5' GTTTCTTAAATGCGCCTGATGATAG 3'			
LdE10e ^b	F 5' ACAGCGTCCCTGTCACCTTCT 3'	PET	0,13 μM	115-132
	R 5' GTTTCTTCCCAGCGAGGTTTATTAGGA 3'			
LdGA4-18 ^b	F 5' GCTCGTCAAATCTAGGAAGA 3'	PET	0,35 μM	204-212
	R 5' GTTTCTTAAGAATGAAATCCAGGAGAA 3'			

Multiplexy byly sestaveny takovým způsobem, aby se fragmenty značené stejným fluorochromem nepřekrývaly. Každý vzorek o objemu 10 μl pro multiplex PCR obsahoval 5 ng DNA, 4 μl Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) a koncentrace primerů odpovídající údajům v tabulce 5.

Vlastní PCR proběhla v termocyleru (C1000™ Thermal Cyler, BioTech) dle programu uvedeného v tabulce 6.

Tabulka 6: PCR cyklus použitý pro amplifikaci mikrosatelitních markerů

Fáze	Teplota	Čas	Opakování
Pre-denaturace	95 °C	6 minut	1 cyklus
Denaturace	94 °C	30 sekund	35 cyklů
Annealing	60 °C	90 sekund	
Elongace	72 °C	1 minuta	
Závěrečné prodlužování	60 °C	48 minut	1 cyklus

4.2.4 Kapilární elektroforéza

V deionizované vodě byl 1 µl PCR produktu naředěn v poměru 1:19. Z každého takto naředěného vzorku byl poté odebrán 1 µl a smíchán s 12 µl Hi-Di formamidu (Life Technologies) a 0,2 µl hmotnostního standardu GeneScan-600LIZ (Life Technologies).

Takto připravené vzorky byly denaturovány při 95 °C 5 min v termocyleru (C1000™ Thermal Cyler, BioTech). Jednotlivé fragmenty byly poté separovány v genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 (Life Technologies). Separace probíhala v kapiláře dlouhé 36 cm. Doba nástřiku byla 5 s při napětí 12 kV. Separace probíhala 24 minut při napětí 15 kV. Přístroj byl kalibrován barevnou sadou DS-33 Matrix Standard Kit (Applied Biosystems).

4.2.5 Statistické hodnocení experimentu

Elektroforeogramy z kapilární elektroforézy byly analyzovány v programu GeneMapper 4.1 (Life Technologies, USA). Alely byly detekovány automaticky s využitím nastavených analytických modulů. Všechny profily byly ještě vizuálně zkontrolovány a byly opraveny případně chybně označené či falešně pozitivní alely.

Výsledná data byla analyzována v programu GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012) s cílem odpovědět na 3 otázky:

- Jsou rozdíly v rozsahu diverzity mezi jedinci z populací Ruzyně a Svitavy?
- Jsou rozdíly v diverzitě mezi přeživšími a nepřeživšími v lokalitě Svitavy?
- Jsou v lokalitě Ruzyně rozdíly v diverzitě v souvislosti s koncentrací letální dávky a přežitím jedince?

Programem DARwin 6.0 (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006) byla provedena shlukovací analýza pro hodnocení podobnosti alelických profilů u studovaných vzorků.

V programu STATISTICA 6.0 byl proveden neparametrický chí kvadrát test poměru pohlaví ve shlucích přeživších a nepřeživších jedinců v testu proti očekávanému pohlavnímu poměru 1:1, kdy se předpokládalo, že pokud souvisí rezistence s pohlavím, budou lépe přežívat samice.

5 Výsledky

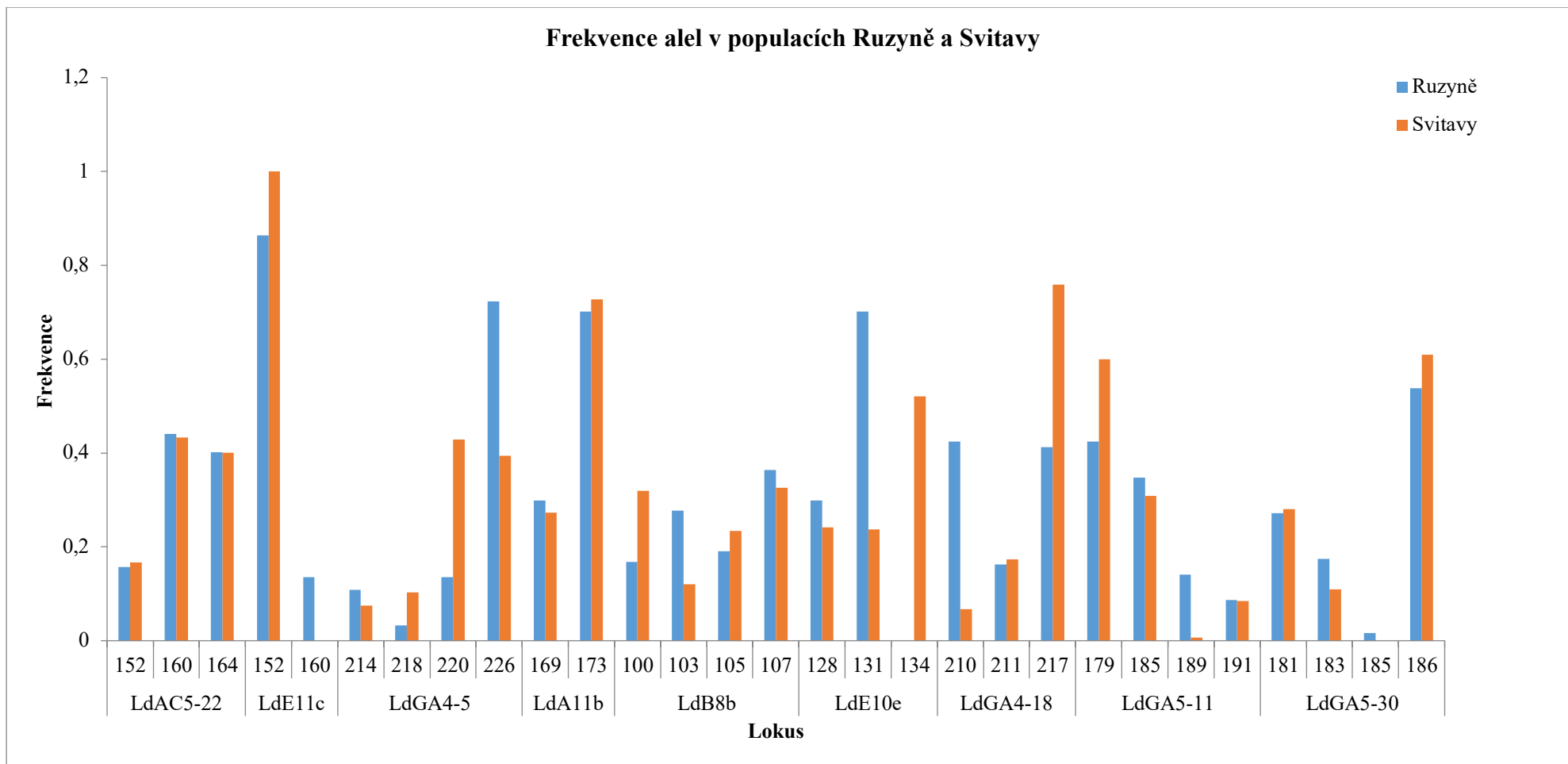
5.1 Diference alel v populacích

Na základě velikostí alel byly v programu GenAIEx 6.5 provedeny analýzy zastoupení alel v jednotlivých zkoumaných lokusech na úrovni obou populací s následným zaměřením na přeživší a nepřeživší jedince, v případě populace Ruzyně i na použitou letální koncentraci. Nejvyšší počet alel (4) byl ve všech testech detekován na lokusech LdGA4-5, LdB8b a LdGA5-11. Nejméně (1-2) pak na lokusu LdE11c. Výsledky jsou patrné z grafů 1, 2 a 3.

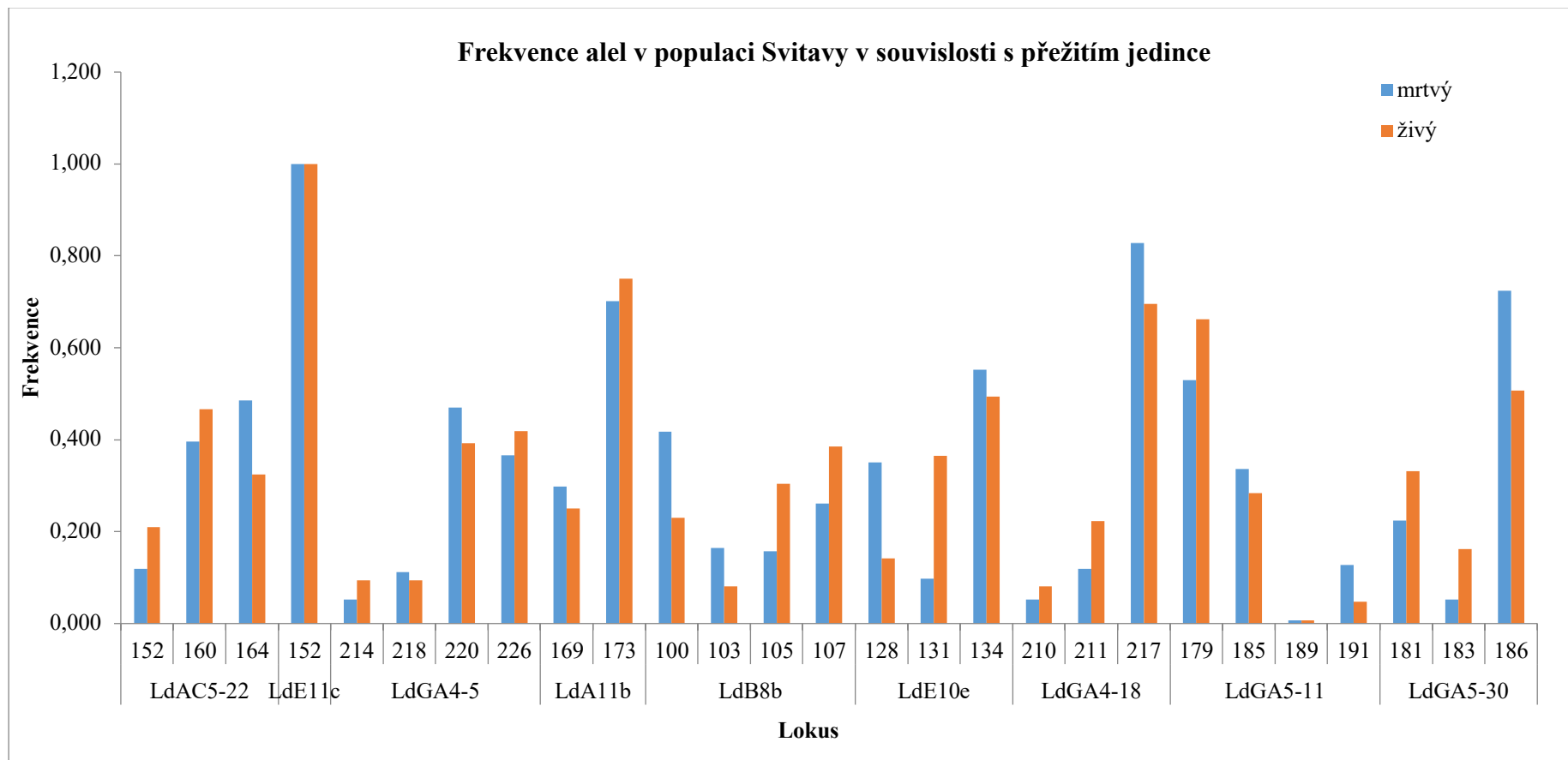
V populaci Ruzyně byly detekovány dvě unikátní alely, konkrétně 185 (lokus LdGA5-30) a 160 (lokus LdE11c). V populaci Svitavy byla zaznamenána pouze jedna unikátní alela 134 (lokus LdE10e). Významnější odchylky od frekvence byly pozorovány v lokusu LdGA4-5 alela 220 (Ruzyně 0,136; Svitavy 0,429) alela 226 (Ruzyně 0,729; Svitavy 0,394) a také v lokusu LdGA4-18 alela 210 (Ruzyně 0,424; Svitavy 0,067) a alela 217 (Ruzyně 0,413; Svitavy 0,759).

V případě testování přeživších a nepřeživších jedinců v populaci Svitavy nebyly nalezeny žádné unikátní alely. Ve frekvencích se významně lišily pouze alely 128 (přeživší 0,142; nepřeživší 0,351) a 131 (přeživší 0,365; nepřeživší 0,097) v lokusu LdE10e.

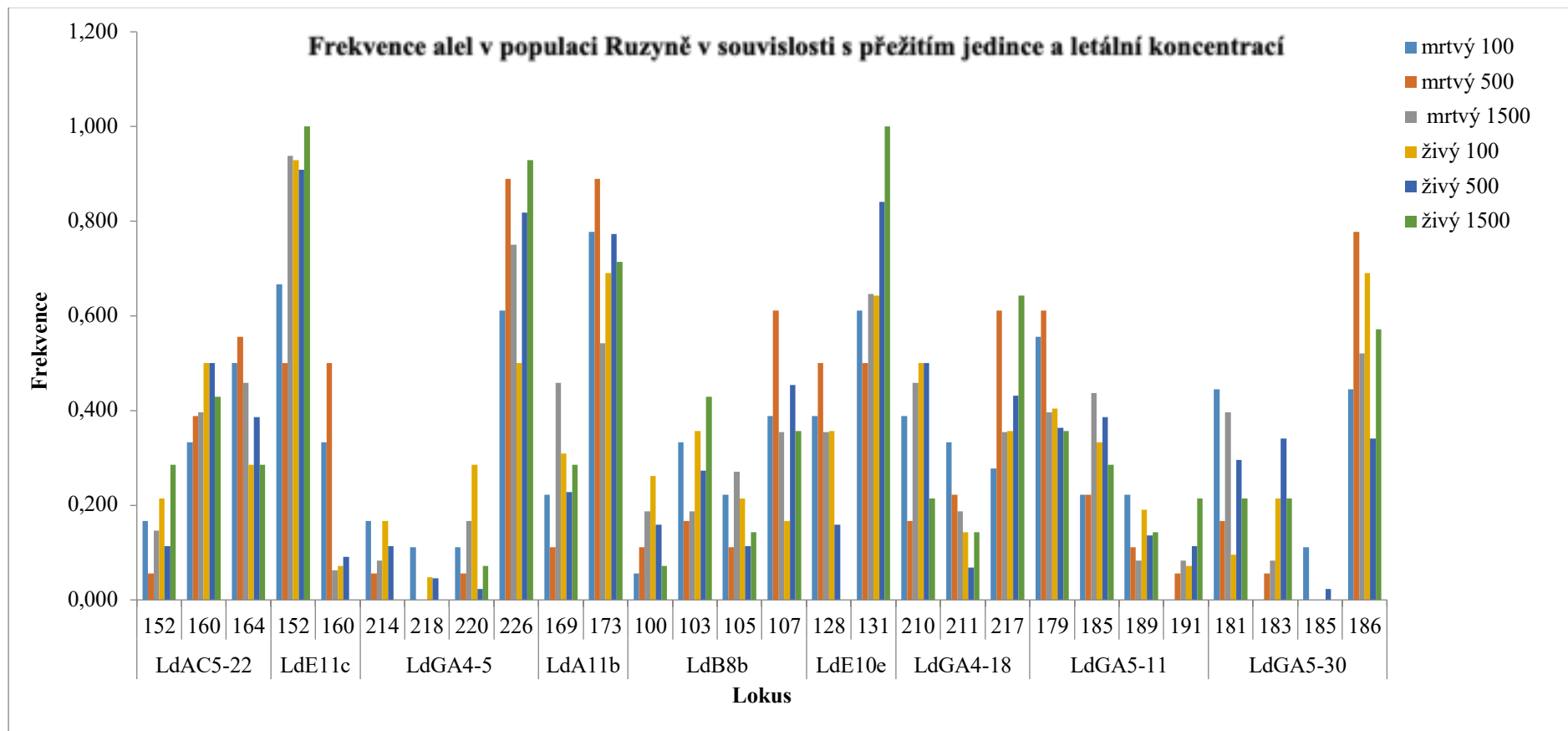
Alelická struktura mezi kategoriemi přeživších a nepřeživších jedinců v populaci Ruzyně vykazuje v určitých případech odchylky. Týká se především přeživších jedinců ošetřených LC 1500. U této skupiny nebyly detekovány alely 160 (lokus LdE11c), alely 214 a 218 (lokus LdGA4-5), alela 128 (lokus LdE10e) a alela 185 (lokus LdGA5-30). Alela 218 (lokus LdGA4-5) se nevyskytuje ani v případě nepřeživších jedinců ošetřených LC 500 a LC 1500. Alela 185 (lokus LdGA5-30) nebyla také detekována u nepřeživších jedinců ošetřených LC 500 a LC 1500 a přeživších ošetřených LC 100. S ohledem na frekvence jednotlivých alel je třeba zmínit alelu 160 (lokus LdE11c), která má velmi nízké frekvence u všech přeživších jedinců oproti nepřeživším. Alela 131 (lokus LdE10e) je pak více zastoupena u přeživších LC 500 a LC1500



Graf 1: Frekvence alel v populacích Ruzyně a Svitavy



Graf 2: Frekvence alel v populaci Svitavy v souvislosti s přežitím jedince



Graf 3: Frekvence alel v populaci Ruzyně v souvislosti s přežitím jedince a letální koncentrací

5.2 Genetická diverzita populací

Genetická diverzita byla krom četností alel sledována také z pohledu prostorového a vnitřního uspořádání populací. Uspořádání populací bylo sledováno odchylkami od Hardy–Weinbergovy rovnováhy, hodnotami F-statistiky a Neiovy genetické vzdálenosti.

5.2.1 Odchylky od Hardy–Weinbergovy rovnováhy

Obě populace byly ve všech devíti lokusech testovány na odchylky od Hardy–Weinbergovy rovnováhy. V případě, že je pozorovaná hodnota větší než 0,05, (P v rozmezí 0,05 až 1,0), není výsledek statisticky významný a přijímá se hypotéza, že se populace páří náhodně. Hodnota nižší než 0,05 (v rozsahu $0 < P < 0,05$) ukazuje na nenáhodnost páření. S ohledem na detailnější rozdělení populací jsou i nižší počty jedinců ve skupinách. Lze pozorovat trend mezi četnějšími skupinami, které se projevují jako signifikantní ve více lokusech oproti méně četnějším skupinám. Výsledky analýzy jsou společně i s vysvětlivkami patrné z tabulek 7, 8, 9 a 10.

Tabulka 7: Odchytky jednotlivých lokusů od Hardy–Weinbergovy rovnováhy v populacích Ruzyně a Svitavy. ns=not significant/neprůkazné, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

Populace	Lokus	Odchylka	Signifikance
Ruzyně	LdAC5-22	3	***
	LdE11c	1	***
	LdGA4-5	6	ns
	LdA11b	1	***
	LdB8b	6	*
	LdE10e	1	***
	LdGA4-18	3	***
	LdGA5-11	6	*
	LdGA5-30	3	***
Svitavy	LdAC5-22	3	***
	LdE11c	Monomorfní	
	LdGA4-5	6	***
	LdA11b	1	***
	LdB8b	6	***
	LdE10e	3	***
	LdGA4-18	3	***
	LdGA5-11	6	**
	LdGA5-30	3	***

Tabulka 8: Odchytky jednotlivých lokusů od Hardy–Weinbergovy rovnováhy v populaci Svitavy. ns=not significant/neprůkazné, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

Populace Svitavy	Lokus	Odchylka	Signifnifikance
Mrtvý	LdAC5-22	3	***
	LdE11c	Monomorfní	
	LdGA4-5	6	ns
	LdA11b	1	***
	LdB8b	6	***
	LdE10e	3	***
	LdGA4-18	3	***
	LdGA5-11	6	***
	LdGA5-30	3	***
Živý	LdAC5-22	3	***
	LdE11c	Monomorfní	
	LdGA4-5	6	***
	LdA11b	1	***
	LdB8b	6	***
	LdE10e	3	***
	LdGA4-18	3	***
	LdGA5-11	6	ns
	LdGA5-30	3	***

Tabulka 9: Odchytky jednotlivých lokusů od Hardy–Weinbergovy rovnováhy v populaci Ruzyně, nepřeživší jedinci, rozdělení dle letální koncentrace. ns=not significant/neprůkazné, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Populace Ruzyně	Lokus	Odchylka	Signifikance
Mrtvý 100	LdAC5-22	3	ns
	LdE11c	1	ns
	LdGA4-5	6	ns
	LdA11b	1	**
	LdB8b	6	ns
	LdE10e	1	ns
	LdGA4-18	3	ns
	LdGA5-11	3	ns
	LdGA5-30	3	***
Mrtvý 500	LdAC5-22	3	ns
	LdE11c	1	ns
	LdGA4-5	3	ns
	LdA11b	1	**
	LdB8b	6	ns
	LdE10e	1	*
	LdGA4-18	3	ns
	LdGA5-11	6	ns
	LdGA5-30	3	ns
Mrtvý 1500	LdAC5-22	3	**
	LdE11c	1	ns
	LdGA4-5	3	ns
	LdA11b	1	*
	LdB8b	6	ns
	LdE10e	1	ns
	LdGA4-18	3	***
	LdGA5-11	6	ns
	LdGA5-30	3	***

Tabulka 10: Odchytky jednotlivých lokusů od Hardy–Weinbergovy rovnováhy v populaci Ruzyně, přeživší jedinci, rozdělení dle letální koncentrace. ns=not significant/neprůkazné, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001

Populace Ruzyně	Lokus	Odchylka	Signifikance
Živý 100	LdAC5-22	3	ns
	LdE11c	1	**
	LdGA4-5	6	ns
	LdA11b	1	***
	LdB8b	6	ns
	LdE10e	1	**
	LdGA4-18	3	**
	LdGA5-11	6	ns
	LdGA5-30	3	ns
Živý 500	LdAC5-22	3	ns
	LdE11c	1	***
	LdGA4-5	6	*
	LdA11b	1	***
	LdB8b	6	ns
	LdE10e	1	***
	LdGA4-18	3	*
	LdGA5-11	6	**
	LdGA5-30	6	***
Živý 1500	LdAC5-22	3	ns
	LdE11c	Monomorfní	
	LdGA4-5	1	ns
	LdA11b	1	**
	LdB8b	6	ns
	LdE10e	Monomorfní	
	LdGA4-18	3	ns
	LdGA5-11	6	ns
	LdGA5-30	3	**

5.2.2 F – statistika

Počet odlišných alel (N_a) vyjadřuje genetickou proměnlivost populace. Čím vyšších hodnot dosahuje, tím je populace v rámci lokusů proměnlivější. Byly také zjišťovány hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_e , modelové zastoupení heterozygotů v populaci za předpokladu ideální Hardy–Weinbergovy rovnováhy) a pozorované heterozygotnosti (H_o , zjištěný podíl heterozygotů v populaci). Fixační index (F) udává genetickou vzdálenost mezi populacemi, tudíž na jeho základě můžeme odhadnout genetickou diferenciaci. Nabývá kladných i záporných hodnot, přičemž hodnoty blízké nule indikují vznik testované populace náhodným oplozením v rodičovské generaci. Vyšší hodnoty signalizují inbreeding nebo nedetekovatelné nulové alely. V případě záporných hodnot se předpokládá heterózní selekce nebo negativní výběrové křížení.

Tabulka 11: Diverzita popsána hodnotami F-statistiky: N_a (počet odlišných alel); H_e (očekávaná heterozygotnost); H_o (zjištěná heterozygotnost); F (fixační index)

Populace	N_a	H_o	H_e	F
Ruzyně	3,111	0,383	0,530	0,331
Svitavy	3,000	0,438	0,496	0,159

Tabulka 12: Diverzita popsána hodnotami F-statistiky v populaci Svitavy: N_a (počet odlišných alel); H_e (očekávaná heterozygotnost); H_o (zjištěná heterozygotnost); F (fixační index)

Populace Svitavy	N_a	H_o	H_e	F
Mrtvý	3	0,488	0,469	0,04
Živý	3	0,393	0,501	0,234

Tabulka 13: Diverzita popsána hodnotami F-statistiky v populaci Ruzyně: N_a (počet odlišných alel); H_e (očekávaná heterozygotnost); H_o (zjištěná heterozygotnost); F (fixační index)

Populace Ruzyně	N_a	H_o	H_e	F
Mrtvý 100	9	0,42	0,553	0,285
Mrtvý 500	9	0,37	0,443	0,22
Mrtvý 1500	24	0,412	0,517	0,201
Živý 100	21	0,418	0,529	0,297
Živý 500	22	0,313	0,477	0,446
Živý 1500	7	0,365	0,409	0,143

5.2.3 Neiova genetická vzdálenost

Byly zjišťovány hodnoty Neiovy genetické vzdálenosti (D'), která vyjadřuje příbuznost či odlišnost v genotypch populací. Pokud je rychlost genetických změn konstantní v průběhu generací či let, pak se hodnota Neiovy distance zvyšuje v poměru k divergenci času. Čím vyšší je výsledná hodnota, tím je i větší statistická odlišnost v zastoupení a distribuci jednotlivých alel.

Tabulka 14: Neiova genetická vzdálenost mezi populacemi Ruzyně a Svitavy

	Svitavy	Ruzyně
Ruzyně		0
Svitavy	0	0,132

Tabulka 15: Neiova genetická vzdálenost mezi přeživšími a nepřeživšími v populaci Svitavy

	Živý	Mrtvý
Mrtvý		0
Živý	0	0,041

Tabulka 16: Neiova genetická vzdálenost mezi přeživšími a nepřeživšími v populaci Ruzyně v souvislosti s použitou letální koncentrací

	Živý 1500	Živý 500	Živý 100	Mrtvý 1500	Mrtvý 500	Mrtvý 100
Mrtvý 100						0
Mrtvý 500					0	0,077
Mrtvý 1500				0	0,132	0,062
Živý 100			0	0,049	0,156	0,089
Živý 500		0	0,068	0,046	0,136	0,081
Živý 1500	0	0,041	0,085	0,075	0,157	0,126

Hodnoty genetické distance prokázaly mezi populacemi Ruzyně a Svitavy určitou míru odlišnosti. U přeživších a nepřeživších jedinců ze Svitav byla však odlišnost v genotypch velmi nízká. Ve srovnání s ostatními kategoriemi z Ruzyně pak vykazují nepřeživší jedinci LC 500 větší genetickou odchylku. Vyšší hodnota distance byla pozorována i mezi přeživšími LC 1500 a nepřeživšími LC 100.

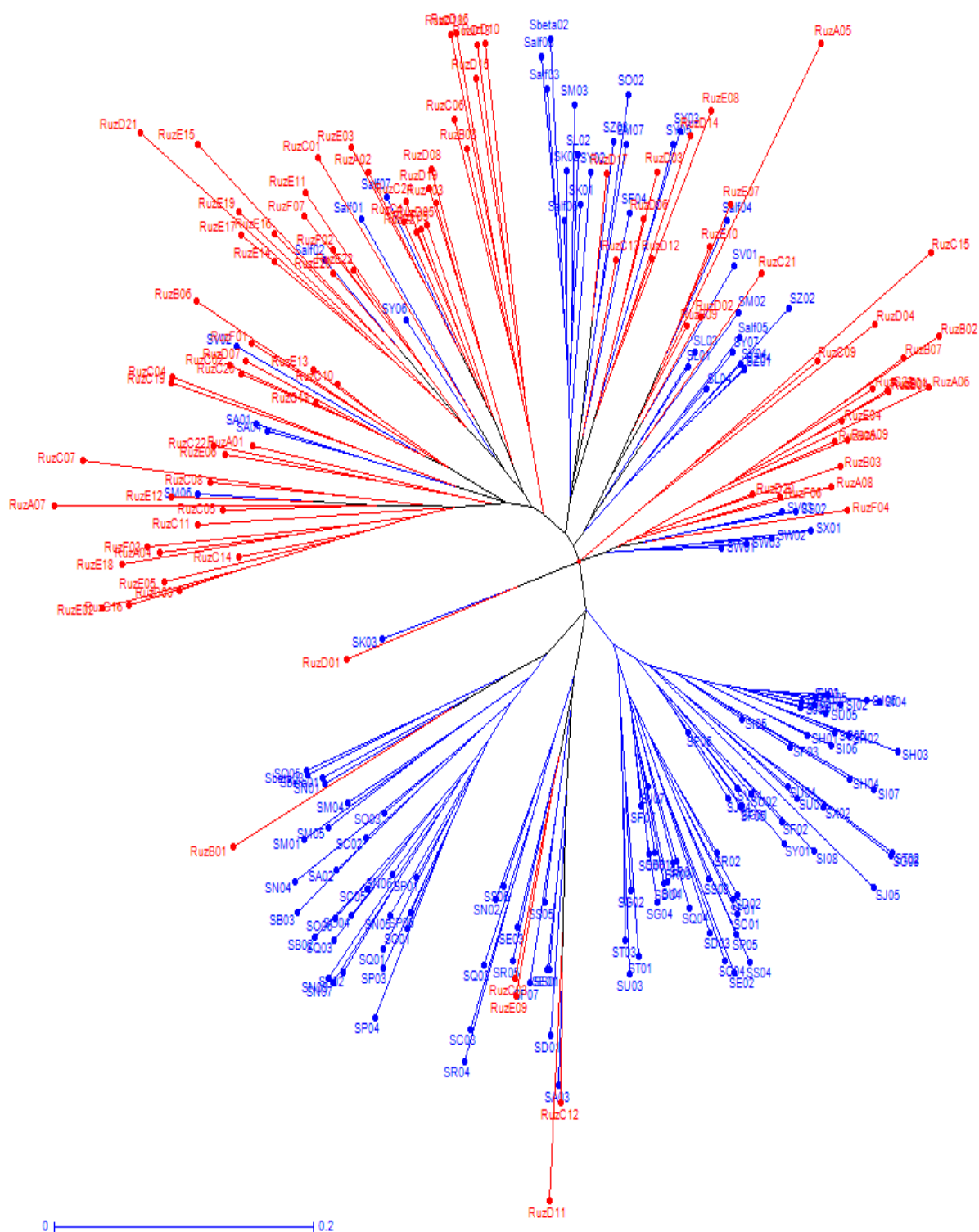
5.2.4 Shlukovací analýza

V programu DARwin 6.0 byly metodou Neighbor Joining podobnostních koeficientů na základě velikostí alel zjištěných kapilární elektroforézou sestaveny tři fylogenetické stromy příbuznosti vzorků. Výsledky jsou prezentovány na obrázcích 4, 5 a 6.

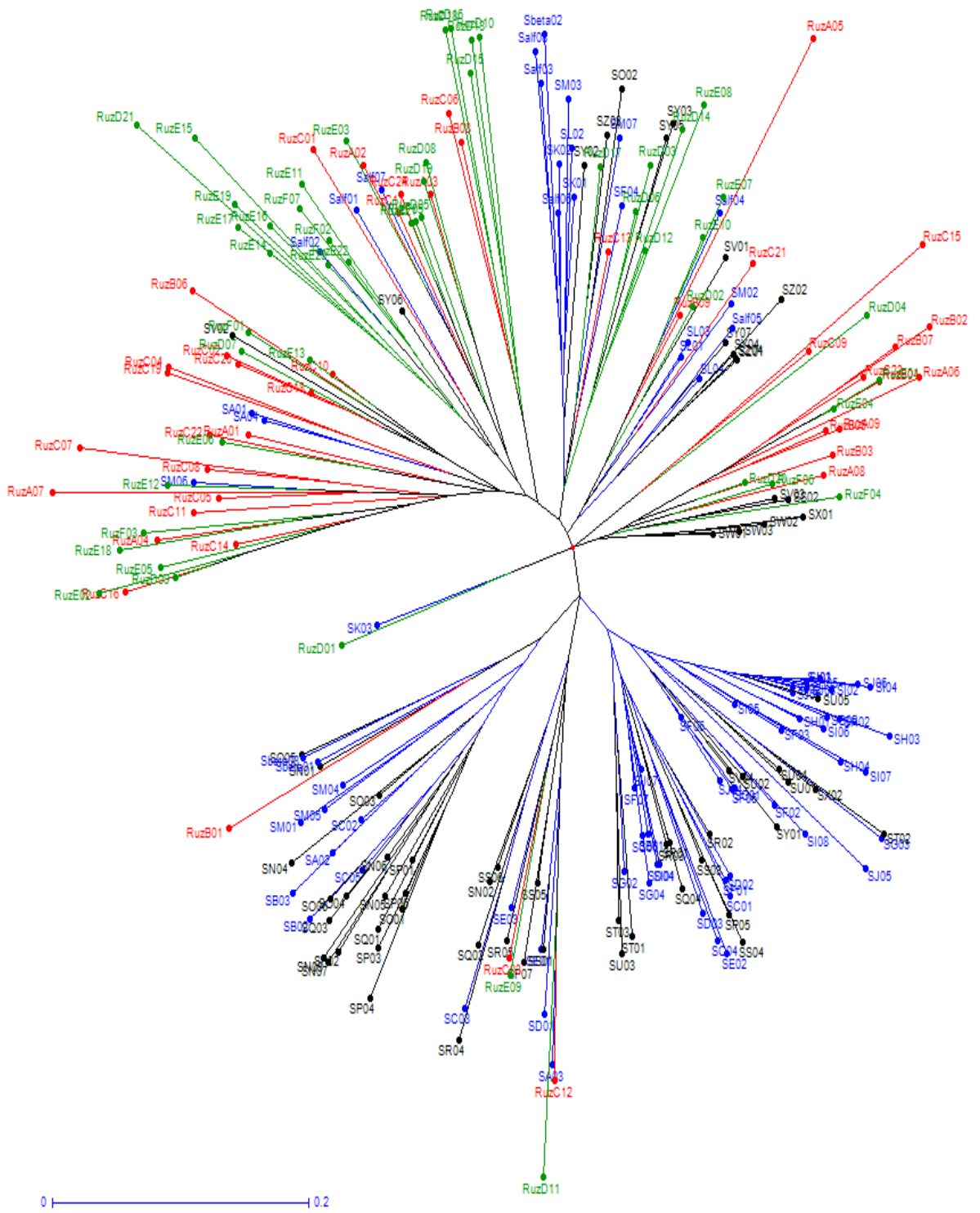
Obrázek 4 představuje základní uspořádání jedinců z lokalit Ruzyně a Svitavy. Díky barevnému rozlišení je patrné, že si jsou vzorky uvnitř populací vzájemně relativně blízké a až na pár výjimek netvoří separátní skupiny, a naopak porovnání vytváří dva velké populačně charakteristické shluky. To ukazuje na populačně fixovanou genotypovou skladbu.

Obrázek 5 je navíc doplněn o rozdělení obou populací na mrtvé a živé po ošetření pyretroidním insekticidem. V tomto případě nebyla rozpoznána žádná významnější struktura, která by dokazovala genetickou asociaci mikrosatelitního profilu a přežití insekticidního testu v rámci populace.

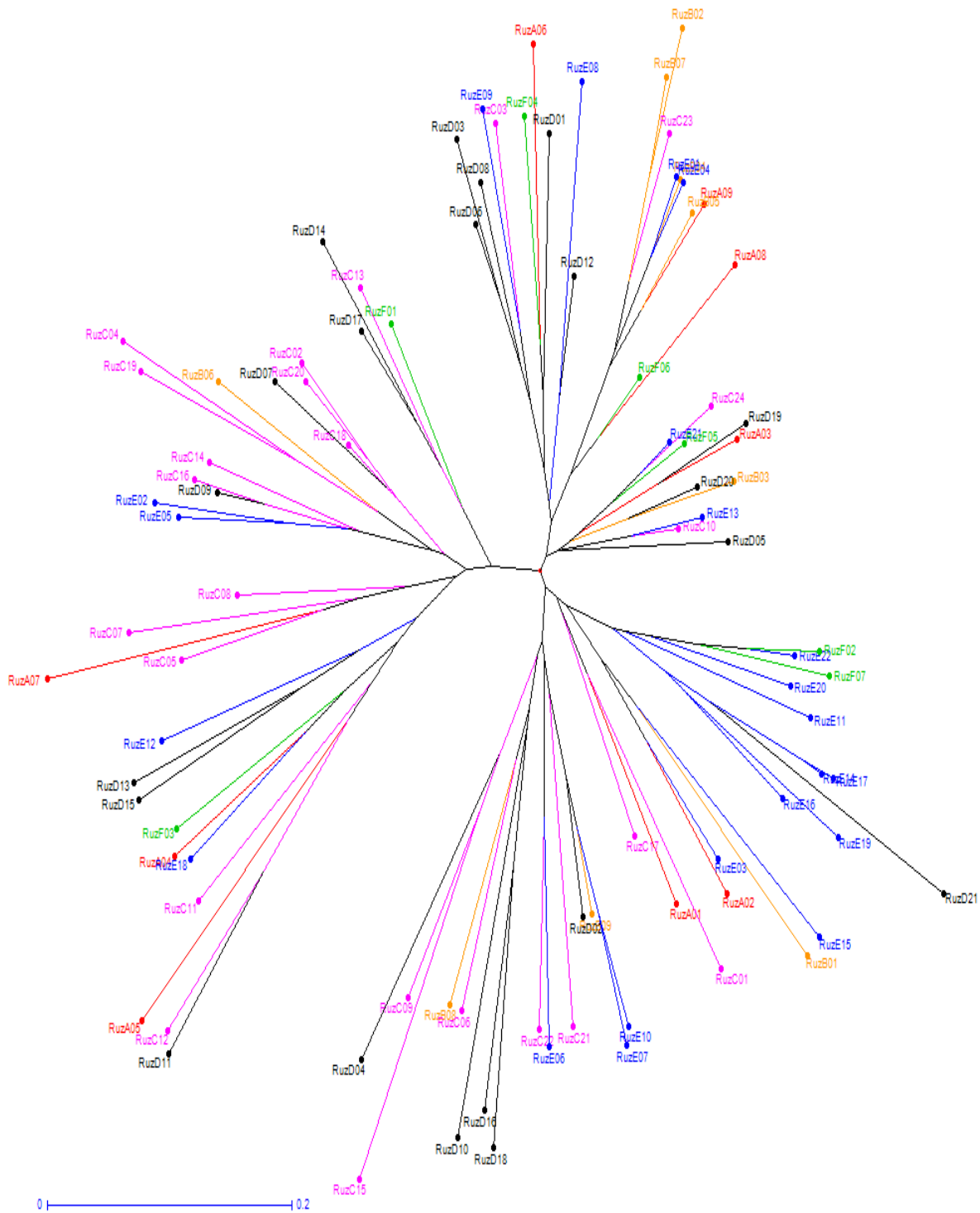
Obrázek 6 zahrnuje pouze jedince z Ruzyně rozdělené podle užití letální koncentrace a mortality. Zde je možné si všimnout několika malých izolovaných shluků jedinců, které částečně korelují s přežitím letální dávky: jeden shluk sestává pouze z jedinců přeživších LC 100, LC 500 i LC 1500, jeden z jedinců přeživších pouze LC 100 a LC 500 a jeden shluk sestává z jedinců nepřeživších aplikaci LC 100 a LC 1500. Jinak i zde obecně nelze najít jednoznačnou strukturu, neboť většina vytvořených shluků zahrnuje všechny fenotypové kategorie.



Obrázek 4: Fylogenetický strom populací mandelinky bramborové v lokalitě Ruzyně (červeně zbarvení) a Svitavy (modré zbarvení)



Obrázek 5: Fylogenetický strom populací mandelinky bramborové na základě přežití jedinců v lokalitě Ruzyně (živí jedinci zelené zbarvení, mrtví červení) a Svitavy (živí jedinci černé zbarvení, mrtví modré zbarvení)



Obrázek 6: Fylogenetický strom populace lokality Ruzyně barevně odlišené dle použité letální koncentrace a přežití. LC 100 (živí jedinci černé zbarvení, mrtví červeně), LC 500 (živí jedinci modré zbarvení, mrtví oranžové), LC 1500 (živí jedinci zelené zbarvení, mrtví růžové)

5.3 Poměr pohlaví

Ve zkoumaných populacích byla identifikovaná pohlaví jedinců s následujícími výsledky – Ruzyně 45 samců a 47 samic, Svitavy 63 samců a 78 samic. Jedinci Ruzyně byli následně rozděleni dle použitých letálních koncentrací. Poté byl proveden neparametrický chí kvadrát test poměru pohlaví ve shlucích přeživších a nepřeživších jedinců v testu proti očekávanému pohlavnímu poměru 1:1. Očekávalo se, že rezistence souvisí s pohlavím a lépe tedy budou přežívat samice. Výsledná hodnota pravděpodobnosti každého testu (parametr p) byla vyhodnocena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 17: Zjištěná pohlaví v celé populaci Ruzyně, rozdělená dle přeživších a nepřeživších společně s výsledným parametrem p

	Ruzyně celá populace		
	Samci	Samice	p
Živí	26	24	0,777
Mrtví	19	23	0,537

Tabulka 18: Zjištěná pohlaví v populaci Ruzyně dle LC 100, rozdělená dle přeživších a nepřeživších společně s výsledným parametrem p

	Ruzyně LC 100		
	Samci	Samice	p
Živí	8	13	0,275
Mrtví	4	5	0,739

Tabulka 19: Zjištěná pohlaví v populaci Ruzyně dle LC 500, rozdělená dle přeživších a nepřeživších společně s výsledným parametrem p

	Ruzyně LC 500		
	Samci	Samice	p
Živí	11	11	1
Mrtví	5	4	0,739

Tabulka 20: Zjištěná pohlaví v populaci Ruzyně dle LC 1500, rozdělená dle přeživších a nepřeživších společně s výsledným parametrem p

	Ruzyně LC 1500		
	Samci	Samice	p
Živí	7	0	0,008
Mrtví	10	14	0,414

Tabulka 21: Zjištěná pohlaví v celé populaci Svitavy, rozdělená dle přeživších a nepřeživších společně s výsledným parametrem p

	Svitavy		
	Samci	Samice	p
Živí	34	40	0,485
Mrtví	29	38	0,272

V populaci Ruzyně mortalita larev v nižších letálních koncentracích (LC 100 a LC 500) na použité letální koncentraci nesouvisela s pohlavím jedinců, poměr samců a samic byl v přibližném poměru 1:1, ($p=0,275$). Avšak při letální koncentraci LC 1500 byli v kategorii přeživších pouze samci ($p=0,008$). V populaci Svitavy se poměr přeživších samců a samic shodoval s poměrem nepřeživších. Výsledky z ruzyňské populace tedy z tohoto hlediska nevyovídají o lepší odolnosti samců.

6 Diskuze

Pro izolaci živočišné genomové DNA byla použita metoda CTAB (cetyl trimetyl amonium bromid) dle Chen et al. (2010). Ti ve svém výzkumu zjistili, že má tento postup ze všech pěti jimi testovaných nejvyšší výtěžnost DNA, její nejnižší degradaci a obecně bylo potřeba nejméně finančních nákladů pro vykonání. Metodu lze taktéž využít pro extrakci DNA z různých organismů jak živočišného, tak rostlinného původu. Na druhou stranu je pracovní proces relativně časově náročný a pro jeho uskutečnění je v laboratoři potřeba digestoř kvůli použitému fenolu a chloroformu. I přes tuto skutečnost je metoda využívána i v jiných studiích na mandelince bramborové (Sedláková et al. 2022), nebo můře makadlovce bramborové *Phthorimaea operculella* Zeller (Elshehaby 2014). Sönmezoğlu & Terzi (2019) využili CTAB metodu pro extrakci DNA z pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), Xin & Chen (2012) izolovali genetický materiál z listů čiroku dvoubarevného *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

Charakterizací 11 mikrosatelitních lokusů mandelinky bramborové se zabýval Grapputo (2006). Testoval celkem 54 vzorků z jedné lokality v Rusku (15 jedinců), dvou lokalit v Estonsku (12 jedinců z každé lokality) a jedné lokality v Kentucky, USA (15 jedinců). Zhang et al. (2013) použili 7 mikrosatelitních markerů k testování 10 populací v Ujgurské autonomní oblasti Sin-ťiang (Čína). Do studie bylo zahrnuto 392 dospělých jedinců mandelinky odebraných mezi roky 2007 a 2009. Zjištěná genetická diverzita byla u všech populací na nízké úrovni i s ohledem na to, že k invazi tohoto škůdce došlo v Číně teprve v roce 1993. Na stejném území pak prováděli výzkum i Yang et al. (2020), ti testovali 232 vzorků z 9 populací mandelinky panelem 9 mikrosatelitních markerů taktéž dle Grapputo (2006). Podařilo se jim identifikovat dva geneticky diferenciované shluky a předpokládají, že populace v Číně pochází ze dvou migračních vln. Jedné z Chabarovského kraje a Přímořského kraje (Rusko) a druhé z Evropy.

Koca et al. (2021) využili 11 mikrosatelitních markerů také dle Grapputo (2006) pro získání informací o populačním zdroji, struktuře a cestách invaze populací mandelinky v Turecku. Testované vzorky odebírali v letech 2016 až 2018 z 91 lokalit ve 36 provinciích odlišných regionů, přičemž z každé lokality bylo pro analýzu využito 5 jedinců. Jejich výsledky prokázaly nízkou až střední úroveň genetické variability mezi populacemi v různých oblastech země.

6.1 Rozdíly v rozsahu diverzity mezi jedinci z populací Ruzyně a Svitavy

V devíti sledovaných mikrosatelitních lokusech bylo celkem detekováno 28 alel. Míra překryvu byla mezi populacemi 16 %. Průměrný počet alel na lokus byl v populaci Ruzyně 3,11 a ve Svitavách 3, což je podobné výsledkům z Číny, kdy Zhang et al. (2013) detekovali průměrně $3,09 \pm 1,09$ alel na lokus, Yang et al. (2020) uvádí 3,62 alely na lokus. Nejvíce polymorfni byly lokusy LdGA4-5, LdB8b a LdGA5-11 které u obou populací identifikovaly 4 alely. Oproti tomu Koca et al. (2021) identifikovali u LdGA4-5 průměrně 6,67 alel, ale u lokusu LdE10e byly výsledky srovnatelné s našimi – 3 alely. Zichová et al. (2010) ve svém výzkumu českých populací mandelinky, ve kterém byly zahrnuty i jedinci z Ruzyně a Svitavy nenalezli žádný vztah mezi výskytem alel rezistence k pyrethroidům a lokalitou.

Průměrná očekávaná heterozygotnost byla 0,53 (Ruzyně) a 0,496 (Svitavy). Tyto hodnoty jsou opět srovnatelné s výsledky z Číny, kde Zhang et al. (2013) uvádí průměrně $0,47 \pm 0,13$ a Yang et al. (2020) 0,52 což je téměř totožná hodnota jako u populace Ruzyně. Při porovnání očekávaná heterozygotnosti (H_e) a zjištěné heterozygotnosti (H_o) bylo zjištěno, že se populace Svitavy nachází v blízkosti Hardy–Weinbergovy rovnováhy, avšak populace Ruzyně z rovnováhy vybočuje, čemuž odpovídá i fakt, že má nižší hodnotu zjištěné heterozygotnosti než Svitavy.

Odchyly od Hardy–Weinbergovy rovnováhy byly vyhodnoceny pro každý lokus a signifikantní odchylka od očekávané hodnoty byla detekována ($P < 0,05$) v 16 z 18 testů. Hodnota Neiovy genetické distance (D') byla mezi populacemi 0,132. Yang et al. (2020) ve svém výzkumu prokázali výskyt dvou populačních shluků při hodnotě D' 0,217. Jedná se o mnohem vyšší hodnotu než mezi Ruzyní a Svitavami. Zhang et al. (2013) uvádí, že výsledky D' $0,141 \pm 0,029$ mezi některými populacemi z jejich práce naznačují zvýšenou genetickou diferenciaci, ale nerozlišili žádné separátní populační shluky.

V kapitole 5.2.4. obrázek 4 je zřetelné, že se je mezi populacemi významná genetická diverzita s ohledem na vytvoření dvou shluků vedoucích na opačné póly. V některých případech se v populaci Ruzyně vyskytuje jedinec ze Svitav a naopak, což je důsledek možných rekombinací genů a individuální podobností daných jedinců. Z obrázku 5 ve stejné kapitole lze ale vyvodit, že přežívání insekticidních zásahů není genotypem významně ovlivněno. Vysvětlení odlišností u populací v lokalitách je komplikované, neboť si jsou oba regiony relativně podobné ať už s ohledem na nadmořskou výšku nebo panující podmínky podnebí.

6.2 Rozdíly v rozsahu diverzity mezi přeživšími a nepřeživšími v lokalitě Svitavy

Počet detekovaných alel v lokusech se pohyboval od 1 (LdE11c) do 4 (LdGA4-5, LdB8b, LdGA5-11). U obou skupin jedinců se množství alel nelišilo, průměrný počet na lokus byl 3. Zhang et al. (2013) ve svém výzkumu detekovali průměrně $3,09 \pm 1,09$ alel na lokus, Yang et al. (2020) uvádí 3,62. Ani u jedné skupiny nebyly nalezeny unikátní alely. Významnější odchylky ve frekvencích byly pozorovány pouze u lokusu LdE10e alela 128 (přeživší 0,142; nepřeživší 0,351) a alela 131 (přeživší 0,365; nepřeživší 0,097). S těmito hodnotami souvisí i výsledek Neiova podobnostního koeficientu (0,041), který neprokazuje statistickou odlišnost v zastoupení a distribuci jednotlivých alel. Podobné hodnoty ($D' 0,031$) dosáhli mezi dvěma populacemi i Yang et al. (2020), dle jejich výsledků byla tato genetická diference jedna z nejnižších ze všech studovaných lokalit.

Také v testu Hardy-Weinbergovy rovnováhy vykazovaly obě skupiny výchyly v sedmi lokusech z devíti. Očekávaná heterozygotnost byla 0,469 (nepřeživší) a 0,501 (přeživší), což nepředstavuje významný rozdíl. Z hlediska fixačního indexu jsou nepřeživší blízcí hodnotě 0 (0,04), zatímco přeživší jedinci dosáhli hodnoty 0,234. Nicméně s ohledem na náhodné vybrání 3 samic a rovnoměrné zastoupení jejich potomků na obrázku 5 v kapitole 5.2.4. lze tvrdit, že se v případě nepřeživších jedinců nejednalo o inbreeding, ale všechny samice byly oplozeny náhodně a potomci byli statisticky geneticky podobní v důsledku rozřídění daným ošetřením. Nízkou variabilitu mezi jedinci lze vysvětlit vyšší mírou příbuznosti larev, které pocházely pouze ze tří volně oplozených matek.

6.3 Rozdíly v rozsahu diverzity v lokalitě Ruzyně v souvislosti s koncentrací letální dávky a přežitím jedince

V alelické struktuře populace Ruzyně lze najít odlišnosti. Nejvyšší informativní charakter měl lokus LdB8b, který u všech jedinců identifikoval 4 alely, lokusy LdAC5-22 a LdGA4-18 identifikovaly alely 3. Významnější odchylky byly pozorovány u lokusu LdGA5-30, který identifikoval alelu 185 pouze u nepřeživších LC 100 a přeživších LC 500. Alela 218 v lokusu LdGA4-5 byla detekována pouze u nepřeživších LC 100, přeživších LC 100 a LC 500.

Skupina přeživších jedinců LC 500 má ze všech skupin nejnižší míru zjištěné heterozygotnosti ($H_o = 0,313$), což bylo potvrzeno v testu Hardy-Weinbergovy, kdy vykazuje v sedmi lokusech z devíti významnou odchylku ($P < 0,001$). Fixační index (0,446) mají nejvyšší ze všech sledovaných skupin.

Nepřeživší jedinci ošetření LC 500 vykazují větší odchylky oproti ostatním v Neiově genetické distanci ($D = 0,132-0,157$). Vyšší hodnota distance byla nalezena i mezi přeživšími jedinci LC 1500 a nepřeživšími LC 100 (0,126).

Zjištěná heterozygotnost je u všech testovaných skupin nižší než očekávaná. Při porovnání očekávané heterozygotnosti (H_e) a zjištěné heterozygotnosti (H_o) bylo zjištěno, že skupiny mají tendenci vybočovat z Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Nejnižší rozdíl je u přeživších LC 1500 (H_o 0,365; H_e 0,409), nejvyšší pak u přeživších LC 500 (H_o 0,313; H_e 0,477) a nepřeživších LC 100 (H_o 0,42; H_e 0,553).

S ohledem na výsledky analýz genetické diverzity populace je třeba zmínit, že nepřeživší LC 1500 a přeživší LC 500 a LC 100 mají oproti ostatním skupinám více než dvojnásobné zastoupení jedinců.

Ve vytvořeném dendrogramu na obrázku 6 v kapitole 5.2.4. nalezneme tři odlišné skupiny, výsledky ale neukazují stejné seskupení jako ostatní analýzy. Nepřeživší jedinci LC 1500 jsou rozprostřeni relativně rovnoměrně celým spektrem a lze si všimnout pouze jedné výjimky, zahrnující přeživší jedince LC 100, LC 500 a LC 1500. Alely jedinců byly na základě vytvořených klastrů subjektivně porovnány, ale nebyla nalezena žádná specifika, která by prokazovala vliv genotypu na přežití.

6.4 Determinace pohlaví

Pohlaví larev bylo detekováno za použití qPCR na principu copy number variation. Jako cílové a referenční geny byly použity gonosomální *LdVssc* a autozomální *LdUBE3B* navržené dle Sedláková et al. (2022). Ti v souboru 50 náhodných larev 4. instaru identifikovali 27 samic a 23 samců, což bylo v souladu s očekávaným pohlavním poměrem 1:1 ($p = 0,689$).

Jedním z nejdůležitějších mechanismů odolnosti mandelinky bramborové k pyretroidům je *kdr* mutace, která je vázaná na pohlaví, tudíž se předpokládá, že aplikaci insekticidu budou lépe přežívat samice, které mohou lokus nést v homozygotní nebo heterozygotní formě. V našem případě nebyla zjištěna korelace s pohlavím a přežitím jedince. Neparametrický chí kvadrát test poměru pohlaví přeživších a nepřeživších jedinců v testu oproti očekávanému poměru 1:1 vyhodnotil pouze jednu odchylku od poměru. Jednalo se o populaci Ruzyně ošetřenou letální koncentrací LC 1500. Přeživší byli reprezentováni pouze samci ($p = 0,008$). S ohledem na výsledky ve svitavské populaci, které se s očekávaným pohlavním poměrem shodovaly ($p = 0,275$), by bylo možné říci, že výsledky nemají vypovídací hodnotu a jedná se o náhodný jev. Rinkevich et al. (2012) shromáždili 96 larev z 10 lokalit, zíkali genomové sekvence pro *LdVssc1* a identifikovali nové rezistentní a citlivé alely. Pokud bychom měli

k dispozici molekulární analýzu *kdr*, daly by se naše výsledky interpretovat přesněji. Samci pozitivní na *kdr* by byli schopni aplikaci insekticidu přežít, zatímco heterozygotní samice nikoliv. Ačkoliv může kontrola škůdce pyretroidy do značné míry probíhat i bez ohledu na přítomnost *kdr*, Kim et al. (2005) prokázali korelaci mezi přítomností mutace L1014F a přežitím na základě reziduální účinnosti.

S ohledem na významnou roli *kdr* mutace je publikováno množství studií zabývajících se především problematikou jejího evolučního původu (Rinkevich et al. 2012) nebo výskytem a šířením v místních populacích (Kim et al. 2005; Jiang et al. 2011; Tebbe et al. 2016). I přes tuto skutečnost nenalezneme práce, které by se zabývaly závislostí pohlaví na přežití jedince po aplikaci insekticidů. Není tudíž k dispozici adekvátní možnost pro porovnání s našimi výsledky. Do budoucna by bylo jistě vhodné se na tuto problematiku zaměřit.

7 Závěr

- Na základě prezentovaných výsledků je zřejmé, že analýza mikrosatelitními markery dokázala určit jasnou strukturu mezi populacemi Ruzyně a Svitavy a potvrdila existenci genetické variability rozdílným zastoupením alel v lokusech a odlišnostmi v genotypoch.
- Uvnitř populací nebyla nalezena struktura, která by naznačovala jakoukoliv specifickou míru přežití ošetřených jedinců. Mandelinka bramborová se na našem území vyskytuje už téměř 80 let, nicméně uvnitř populací nejsou rozdíly signifikantní natolik, aby bylo možné tyto genetické rozdíly interpretovat z hlediska přežívání insekticidního zásahu.
- Genetická variabilita jedinců je hlavním důvodem opakovaného vzniku rezistence ke stávajícím i novým přípravkům, které by měly udržet brouka pod kontrolou. Znalost a pochopení procesu může přispět ke změně přístupu eradikace a zpomalení jeho šíření. S ohledem na neprokázání dostatečných rozdílů mezi našimi jedinci a nenalezení struktury vypovídající o jejich přežívání je i nadále nutné věnovat této problematice zvýšenou pozornost.
- Nebyla potvrzena hypotéza, že výsledky testů rezistence asociují s pohlavím jedince. Pohlaví testovaných larev bylo determinováno použitím qPCR na principu CNV (copy number variation) a statistické vyhodnocení neparametrickým chí kvadrát testem neprokázalo odchylky od očekávaného poměru 1:1. Pro objasnění větší míry přežití samců by bylo potřebné mít poznatky o založení *kdr* lokusu a fenotypové výsledky asociovat s nimi.

8 Literatura

- Ahmad M, Denholm I, Bromilow RH. 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science* **62**:805-810.
- Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *American Journal of Potato Research* **85**:395-413.
- Alyokhin A, Mota-Sanchez D, Baker M, Snyder WE, Menasha S, Whalon M, Dively G, Moarsi WF. 2015. The Red Queen in a potato field: integrated pest management versus chemical dependency in Colorado potato beetle control. *Pest Management Science* **71**:343-356.
- Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J. 2018. Insect cuticle: a critical determination of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* **27**:68-74.
- Balaško MK, Mikac KM, Bažok R, Lemic D. 2020. Modern Techniques in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Control and Resistance Management: History Review and Future Perspectives. *Insects* **11**:581.
- Benkovskaya, GV, Udalov MB, Nikolenko AG, Leontieva TL. 2006. Temporal and toxicological dynamics in the cover spot patterns of the Colorado potato beetle in South Ural. *Resistant Pest Management* **15**:13-15.
- Bhargava A, Fuentes FF. 2010. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology* **44**:250-266.
- Boiteau G, Le Blanc JPR. 1992. Colorado potato beetle LIFE STAGES. Agriculture Canada Publication, Ottawa. ISBN 0-662-19264-8.
- Brattsen LB. 1988. Potential role of plant allelochemical in the development of insecticide resistance. Pages 313-348 in Barbosa P, Letourneau DK, editors. *Novel aspects of insect plant interactions*. Wiley, New York.
- Brown TM, Brogdon WG. 1987. Improved Detection of Insecticide Resistance Through Conventional and Molecular Techniques. *Annual Review of Entomology* **32**:145-162.
- Casagrande RA. 2014. The Colorado Potato Beetle: 125 Years of Mismanagement. *Bulletion of the Entomological Society of America* **33**:142-150.
- Cock MJW, Murphy ST, Kairo MTK, Thompson E, Murphy RJ, Francis AW. 2016. Trends in the classical biological control of insect pests by insects: an update of the BIOCAT database. *Biological Control* **61**:349-363.
- Dively GP, Crossley MS, Schoville SD, Steinhauer N, Hawthorne D. 2020. regional differences in gene regulation may underlie patterns of sensitivity to novel insecticides in *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science* **76**:4278-4285.

Doležal P, Hausvater E, Sedláková V, Baštová P, Sedlák P. 2022. Účinnost prostředků ochrany proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata* (Say 1824)) v letech 2019-2022 v České republice. Vědecké práce – Vědecký ústav bramborářský Havlíčkův Brod **28**:9-28.

Elshehaby M. 2014. Population Structure of the Potato Tuber Moth ,*Phthorimaea operculella* (Zeller), *Lepidoptera: Gelechiidae*) in Delta Egypt Using RAPD Analysis. Al Azhar Bulletin of Science **25**:11-20.

Fang F, Wang W, Zhang D, Lv Y, Zhou D, Ma L, Sun Y, Zhu Ch. 2015. The cuticle proteins: a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. Parasitology Research **114**: 4421-4429.

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

Grapputo A, Boman S, Lindstrom L, Lyytinen A, Mappes J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. Molecular Ecology **14**:4207-4219.

Grapputo A. 2006. Development and characterization of microsatellite markers in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. Molecular Ecology Notes **6**:1177-1179.

Greenstone MH, Szendrei Z, Payton ME, Rowley DL, Coudron TC, Weber DC. 2010. Choosing of natural enemies for conservation biological control: use of the prey detectability half-life to rank key predators of Colorado potato beetle. Entomologia Experimentalis et Applicata **136**:97-107.

Guo LN, Guo WC, Tuerxsun A, He J, Xu JJ. 2011. Effects of temperature and feedings status on flight capacity of overwintering Colorado potato beetles. Plant Protection **37**:56-61.

Hajek AE, McManus ML, Delalibera I. 2007. A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. Biological Control **41**:1-13.

Hamada HM, Petrino MG, Kakunaga T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences **79**:6465-6469.

Hausvater E, Doležal P. 2013. Ochrana brambor proti mandelince bramborové. Havlíčkův Brod, Výzkumný ústav bramborářský. ISBN 978-80-86940-50-2.

Hawthorne DJ. 2001. AFLP-Based Genetic Linkage Map of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*: Sex Chromosomes and a Pyrethroid-Resistance Candidate Gene. Genetics **158**:695-700.

Hemingway J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology **30**:1009-1015.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology **34**:653-665.

- Huseth AS, Groves RL, Chapman SA, Alyokhin A, Kuhar TP, Macrae IV, Szendrei Z, Nault BA. 2014. Managing Colorado Potato Beetle Insecticide Resistance: New Tools and Strategies for the Next decade of Pest Control in Potato. *Journal of Integrated Pest Management* **5**:A1-A8.
- Chen, H. et al. 2010. Evaluation of five methods for total dna extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE* (e11963) DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>.
- Jiang WH, Guo WC, Lu WP, Shi XQ, Xiong MH, Wang ZT, Li GQ. 2011. Target site insensitivity mutations in the AChE and LdVssc1 confer resistance to pyrethroids and carbamates in *Leptinotarsa decemlineata* in northern Xinjiang Uygur autonomous region. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **100**:74-81.
- Karunaratne P, De Silva PP, Weeraratne TCh, Surendran SN. 2018. Insecticide resistance in mosquitoes: Development, mechanism and monitoring. *Ceylon Journal of Science* **47**:299-309.
- Khodaverdi H, Fowles T, Bick E, Nansen Ch. 2016. Does Drought Increase the Risk of Insects Developing Behavioral Resistance to Systemic Insecticides? *Journal of Economic Entomology* **106**:2027-2031.
- Kim HJ, Hawthorne DJ, Peters T, Dively GP, Clark M. 2005. Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of *kdr*-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **81**:85-96.
- Koca AO, Barkcan SB, Alas BL, Kandemir I. 2021. Population structure and pattern of geographic differentiation of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Turkey. *Challenges and Opportunities in Managing Pests of Potato* **78**:3804-3814.
- Kocourek F, Stará J, Zichová T, Hubert J, Nesvorná M. 2015. Metodika hodnocení rezistence škůdců k zoocidům pomocí biologických metod antirezistentní strategie pro zabránění výskytu škůdců. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha. ISBN: 978-80-7427-190-8.
- Kocourek F, Stejskal V, Aulický R. 2017. Rezistence škodlivých organismů k pesticidům ve vztahu k bezpečnosti potravin. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí, Praha.
- Kocourek F, Stará J, Horská T, Hovorka T, Seidenglanz M, Kolařík P, Havel J, Hrudová E. 2020. Biologické metody hodnocení rezistence škůdců k insekticidům a antirezistentní strategie. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha. ISBN: 978-80-7427-334-6.
- Kumar A, Congiu L, Lindrom L, Piironen S, Vidotto M, Grapputo A. 2014. Sequencing, De Novo Assembly and Annotation of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, Transcriptome. *PLOS One* (e86012) DOI:10.1371/journal.pone.0086012.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. 2007. Molecular Mechanism of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology* **51**:231-253.
- Liao J, Liu J, Guan Z, Li Ch. 2021. Duration of Low Temperature Exposure Affects Egg Hatchong of the Colorado Potato Beetle and Emergence of Overwintering Adults. *Insects* **12**:609.

Louda SM, Arnett AE, Rand TA, Russell FL. 2003. Invasiveness of Some Biological Control and Adequacy of Their Ecological Risk Assessment and Regulation. *Conservation Biology* **17**:73-82.

Lynch CA, et al. 2021. Alternative prey and farming system mediate predation of Colorado potato beetle by generalists. *Pest Management Science* (e34250727) DOI: 10.1002/ps.6553.

Nansen C, Baissac O, Nansen M, Powis K, Baker G. 2016. Behavioral avoidance – will physiological insecticide resistance level of insect strains affect their oviposition and movement responses? *PLoS ONE* (e0149994) DOI: [10.1371/journal.pone.0149994](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149994).

Maharajaya A, Vosman B. 2015. Managing the Colorado potato beetle; the need for resistance breeding. *Euphytica* **204**:487-501.

Molnar I, Rakosy-Tican E. 2021. Difficulties in Potato Beetle Pest Control: The Case of Pyrethroids on Colorado Potato Beetle. *Agronomy* **11**:1920.

Panini M, Manicardi GC, Moores GD, Mazzoni E. 2016. An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invertebrate Survival Journal* **13**:326-335.

Peakall R, Smouse PE. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**:2537-2539.

Pélissié B, Chen YH, Cohen ZP, Crossley MS, Hawthorne DJ, Izzo V, Schoville SD. 2022. Genome Resequencing Reveals Rapid, Repeated Evolution in the Colorado Potato Beetle. *Molecular Biology and Evolution* (msac016) DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msac016>.

Perrier, X, Jacquemoud-Collet, J.P. 2006. DARwin software: dissimilarity analysis and representation for Windows (version 6.0. 021).

Rane RV, Walsh TK, Pearce SL, Jermini LS, Gordon KH, Richards S, Oakeshott JG. 2016. Are feeding preferences and insecticide resistance associated with the size of detoxifying enzyme families in insect herbivores? *Current Opinion in Insect Science* **13**:70-76.

Rasocha V, Hausvater E, Doležal P. 2008. Ochrana brambor proti mandelince bramborové. Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod. ISBN 978-80-86940-16-8.

Rinkevich FD, Su C, Lazo TA, Hawthorne DJ, Tingey WM, Naimov S, Scott JG. 2012. Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (*kdr*) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **104**:192-200.

Rinkevich FD, Yuzhe D, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **106**:93-100.

Rivnay E. 1928. External Morphology of the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Journal of the New York Entomological Society* **36**:125-145.

- Rondon SI, Feldman M, Thompson A, Oppedisano T, Shrestha G. 2021. Identifying Resistance to the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in Potato Germplasm: Review Update. *Frontiers in Agronomy* (642189) DOI:[10.3389/fagro.2021.642189](https://doi.org/10.3389/fagro.2021.642189).
- Sedláková V, Vejl P, Doležal P, Vašek J, Čílová D, Melounová M, Sedlák P. 2022. Detection of sex in adults and larvae of *Leptinotarsa decemlineata* on principle of copy number variation. *Scientific Reports* **12**:4602.
- Senan S, Kizhakayil D, Sasikumar B, Sheeja TW. 2014. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview. *Notulae Scientia Biologicae* **6**:1-13.
- Schoville SD, et al. 2018. A model species for agricultural pest genomics: the genome of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Scientific Reports* **8**:1931.
- Sidorenko AP, Berezovska OP. 2001. Individual polymorphism for RAPD markers in spring generation of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Russian Journal of Genetics* **37**:1130–1133.
- Sidorenko AP, Berezovska OP. 2002. Genetic Structure of Populations of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) *Russian Journal of Genetics* **38**: 1256-1261.
- Sönmezoğlu ÖA, Terzi B. 2019. Comparison of DNA extraction protocols for PCR-based techniques in wheat. *European Journal of Science and Technology* **17**:860-865.
- Stankovic S, Kostic M, Sivčev I, Jankovic S, Kljajic P, Todorovic G, Radoslav J. 2012. Resistance of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to neonicotinoids, pyrethroids and nereistoxins in Serbia. *Romanian Biotechnological Letters* **17**:7599–7609
- Szendrei Z, Grafius E, Byrne A, Ziegler A. 2012. resistance to neonicotinoid insecticides in field populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* **68**:941-946-
- Tauber MJ, Tauber CA. 2002. Prolonged Dormancy in *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera; Chrysomelidae): A Ten-Year Field Study with Implications for Crop Rotation. *Environmental Entomology* **31**:499-504.
- Tebbe C, Breckheimer B, Radda P, Schorn C, Kleinhenz B, Nauen R. 2016. Incidence and spread of knockdown resistance (*kdr*) in German Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) populations. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **46**:129-138.
- Udalov MB, Benkovskaya GV. 2011. Population Genetics of the Colorado Potato Beetle: From Genotype to Phenotype. *Russian Journal of Genetics* **1**:321-333.
- Valles SM, Dong K, Brenner RJ. 2000. Mechanisms responsible for cypermethrin resistance in a strain of German cockroach, *Blattella germanica*. *Pesticide biochemistry and physiology* **66**:195-205.

Wale S, Platt HW, Cattlin ND. 2008. Diseases, Pests and Disorders of Potato. Manson Publishing, London. ISBN 9781840760217.

Weber DC. 2003. Colorado beetle: Pest on the move. *Pesticide Outlook* **14**:256-259.

Weber DC, Rowley DL, Greenstone MH, Athanas MM. 2006. Prey preference and host suitability of the predatory and parasitoid carabid beetle, *Lebia grandis*, for several species of *Leptinotarsa* beetles. *Journal of Insect Science* **6**:1-14.

Wiebe KF, Elebute OO, LeMoine CMR, Cassone BJ. 2020. A Day in the Life: Identification of Developmentally Regulated MicroRNAs in the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa desemlineata*; *Coleoptera*; *Chrysomelidae*). *Journal of Economic Entomology* **113**:1445-1454.

Wraight SP, Ramos ME. 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana*-and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Pathology* **90**:139-150.

Wu Y. 2014. Detection and Mechanism of Resistance Evolved in Insects to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. Pages 297-342 in Dhadialla TS, Gill SS, editors, *Advances in Insect Physiology, Insect Midgut and Insecticidal Proteins*. Elsevier, Amsterdam. ISBN: 978-0-12-800197-4.

Xin Z, Chen J. 2012. A high throughput DNA extraction method with high yield and quantity. *Plant Methods* **8**:26.

Yang FY, Guo JJ, Liu N, Zhang RZ 2020. Genetic structure of the invasive Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* populations in China. *Journal of Integrative Agriculture* **19**:350-359.

Yu SJ. 2008. *The toxicology and biochemistry of insecticide*. CRC Press, Boca Raton. ISBN: 9780429136870.

Zahradník J. 2008. *Brouci*. Aventinum, Praha. ISBN 978-80-86858-43-2.

Zalucki MP, Furlong MJ. 2017. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science* **21**:19-25.

Zemek R, Půža V, Habušťová O. 2016. Mikroskopické houby a parazitické hlístice k hubení mandelinky bramborové. *Akademický bulletin Akademie věd České republiky* **24**:12-14.

Zhang JJ, Yang J, Li YCh, Liu N, Zhang RZ. 2013. Genetic relationships of introduced Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* populations in Xinjiang, China. *Insect Science* **20**:643-654.

Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J, Palli SB. 2010. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science* **67**:175-182.

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

9 Internetové zdroje

BioLib. 2023. Mandelinka bramborová. Available from: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id11674/> (accessed January 2023).

Buhler W. 2020. Introduction to Insecticide Resistance. Available from: <https://pesticidestewardship.org/resistance/insecticide-resistance/> (accessed August 2022).

Doležal P, Hausvater E. 2018. Mandelinka bramborová – nejvýznamnější škůdce bramborové natě. Available from: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/mandelinka-bramborova-nejvyznamnejsi-skudce-bramborove-nate> (accessed September 2022).

Doležal P, Hausvater E. 2020. Ochrana brambor proti mandelince bramborové a výsledky pokusů s insekticidy v roce 2019. Available from: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/ochrana-brambor-proti-mandelince-bramborove-a-vysledky-pokusu-s-insekticidy-v-roce-2019> (accessed August 2022).

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. FAO statistical database. Available from: <http://www.fao.org.infozdroje.czu.cz/> (accessed July 2022).

Hamilton E. 2022. ‘Super pest’ Colorado potato beetle has the genetic resources to sidestep our attacks. Available from: <https://news.wisc.edu/super-pest-colorado-potato-beetle-has-the-genetic-resources-to-sidestep-our-attacks/> (accessed July 2022).

Petříček L. 2021. Účinnost přírodních látek při regulaci mandelinky bramborové v pásmech vodních zdrojů. Available from: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/ucinnost-prirodnich-latek-pri-regulaci-mandelinky-bramborove-v-pasmech-vodnich-zdroju> (accessed August 2022).

10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Frekvence jednotlivých alel v populaci Ruzyně a Svitavy

Lokus	Velikost alel	Frekvence alely v populaci	
		Ruzyně (92)	Svitavy (141)
LdAC5-22	152	0,158	0,167
	160	0,44	0,433
	164	0,402	0,401
LdE11c	152	0,864	1
	160	0,136	0
LdGA4-5	214	0,109	0,074
	218	0,033	0,103
	220	0,136	0,429
	226	0,723	0,394
LdA11b	169	0,299	0,273
	173	0,701	0,727
LdB8b	100	0,168	0,319
	103	0,277	0,121
	105	0,19	0,234
	107	0,364	0,326
LdE10e	128	0,299	0,241
	131	0,701	0,238
	134	0	0,521
LdGA4-18	210	0,424	0,067
	211	0,163	0,174
	217	0,413	0,759
LdGA5-11	179	0,424	0,599
	185	0,348	0,309
	189	0,141	0,007
	191	0,087	0,085
LdGA5-30	181	0,272	0,28
	183	0,174	0,11
	185	0,016	0
	186	0,538	0,61

Příloha 2: Frekvence jednotlivých alel v populaci Svitavy v souvislosti přežitím jedince

Lokus	Velikost alel	Frekvence alel v populaci Svitavy	
		Mrtvý	Živý
LdAC5-22	152	0,119	0,209
	160	0,396	0,466
	164	0,485	0,324
LdE11c	152	1	1
LdGA4-5	214	0,052	0,095
	218	0,112	0,095
	220	0,47	0,392
	226	0,366	0,419
LdA11b	169	0,299	0,25
	173	0,701	0,75
LdB8b	100	0,418	0,23
	103	0,164	0,081
	105	0,157	0,304
	107	0,261	0,385
LdE10e	128	0,351	0,142
	131	0,097	0,365
	134	0,552	0,493
LdGA4-18	210	0,052	0,081
	211	0,119	0,223
	217	0,828	0,696
LdGA5-11	179	0,53	0,662
	185	0,336	0,284
	189	0,007	0,007
	191	0,127	0,047
LdGA5-30	181	0,224	0,331
	183	0,052	0,162
	186	0,724	0,507

Příloha 3: Frekvence jednotlivých alel v populaci Ruzyně v souvislosti v přežitím jednice a letální koncentrací

Lokus	Velikost alel	Mrtvý 100	Mrtvý 500	Mrtvý 1500	Živý 100	Živý 500	Živý 1500
LdAC5-22	152	0,167	0,056	0,146	0,214	0,114	0,286
	160	0,333	0,389	0,396	0,5	0,5	0,429
	164	0,5	0,556	0,458	0,286	0,386	0,286
LdE11c	152	0,667	0,5	0,938	0,929	0,909	1
	160	0,333	0,5	0,063	0,071	0,091	0
LdGA4-5	214	0,167	0,056	0,083	0,167	0,114	0
	218	0,111	0	0	0,048	0,045	0
	220	0,111	0,056	0,167	0,286	0,023	0,071
	226	0,611	0,889	0,75	0,5	0,818	0,929
LdA11b	169	0,222	0,111	0,458	0,31	0,227	0,286
	173	0,778	0,889	0,542	0,69	0,773	0,714
LdB8b	100	0,056	0,111	0,188	0,262	0,159	0,071
	103	0,333	0,167	0,188	0,357	0,273	0,429
	105	0,222	0,111	0,271	0,214	0,114	0,143
	107	0,389	0,611	0,354	0,167	0,455	0,357
LdE10e	128	0,389	0,5	0,354	0,357	0,159	0
	131	0,611	0,5	0,646	0,643	0,841	1
LdGA4-18	210	0,389	0,167	0,458	0,5	0,5	0,214
	211	0,333	0,222	0,188	0,143	0,068	0,143
	217	0,278	0,611	0,354	0,357	0,432	0,643
LdGA5-11	179	0,556	0,611	0,396	0,405	0,364	0,357
	185	0,222	0,222	0,438	0,333	0,386	0,286
	189	0,222	0,111	0,083	0,19	0,136	0,143
	191	0	0,056	0,083	0,071	0,114	0,214
LdGA5-30	181	0,444	0,167	0,396	0,095	0,295	0,214
	183	0	0,056	0,083	0,214	0,341	0,214
	185	0,111	0	0	0	0,023	0
	186	0,444	0,778	0,521	0,69	0,341	0,571