

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Molekulární detekce rezistence
k ALS inhibujícím herbicidům
u chundelky metlice
(*Apera spica-venti* (L.) P. B.)

Diplomová práce

Bc. Radka Stýblová

Studijní program: N1101 Matematika

Studijní obor: Matematika – učitelství biologie pro střední školy

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Molekulární detekce rezistence k ALS inhibujícím herbicidům u chundelky metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. B.) vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Vladana Ondřeje, Ph.D. a použila pouze pramenů, které uvádím v příloženém seznamu literatury a internetových zdrojů.

V Olomouci, dne

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a připomínky, bez kterých by tato práce nevznikla. Také děkuji své rodině za psychickou a materiální podporu během celého studia.

Shrnutí:

Jméno a příjmení autora: Bc. Radka Stýblová

Název práce: Molekulární detekce rezistence k ALS inhibujícím herbicidům
u chundelky metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. B.)

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky

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

Rok obhajoby práce: 2016

Shrnutí:

Teoretická část této diplomové práce se zabývá problematikou plevelů, regulace plevelů, herbicidní regulací. Konkrétně se zaměřuje na herbicidy inhibující acetolaktát syntázu. Popisuje v ČR významný vůči inhibitorům ALS rezistentní plevel chundelku metlici (*Apera spica-venti* (L.) P. B.), její rozšíření a škodlivost. Zabývá se také rezistencí plevelů k herbicidům, mechanismy rezistence a molekulární podstatou rezistence.

V praktické části této diplomové práce byla zvládnuta molekulární detekce rezistentních jedinců chundelky metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. B.) vůči ALS inhibujícím herbicidům. Jedinci byli sbíráni na různých polních lokalitách kraje Vysočina, Olomouckého kraje a Moravskoslezského kraje. Vyzolovaná DNA byla sekvenována a využita pro analýzu mutací související se vznikem rezistence. Byla sledována oblast genu *als* obsahující triplet pro kódování aminokyseliny prolin na pozici 197. Potvrzené mutací způsobené substituce aminokyselin serin a threonin za prolin souvisí se vznikem rezistence vůči herbicidům inhibujících acetolaktát syntázu. Výsledky byly diskutovány také s výsledky jiných autorů, zabývajících se danou problematikou.

Klíčová slova: plevel, herbicid, acetolaktát syntáza (ALS), herbicidní rezistence,
chundelka metlice, molekulární detekce rezistence

Počet stran: 54

Počet příloh: 0

Jazyk práce: Čeština

Summary:

Autor's first name and surname: Bc. Radka Stýblová

Title: Molecular detection of resistance to ALS-inhibiting herbicides
in loose silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) P. B.)

Type of thesis: Master's thesis

Department: Department of Botany

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

The year of presentation: 2016

Summary:

The theoretical part of this Master's thesis deals with the weed issue, weed regulation and herbicide regulation. The Master's thesis particularly focuses on acetolactate synthase (ALS)-inhibiting herbicides. It describes, in the Czech Republic significant, ALS-inhibiting herbicides resistant weed silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) P. B.), its expansion and harmfulness. It also covers the resistance of weed to herbicides, the mechanisms of resistance and the molecular essence of resistance.

In the practical part of this Master's thesis the molecular detection of the resistant specimen of silky bent grass (*Apera spica-venti* (L.) P. B.) to the ALS-inhibiting herbicides was managed. Specimens were collected in various field locations in Vysočina region, Olomouc region and Moravian-Silesian region. The isolated DNA was sequenced and used for the analysis of mutations related to the origin of the resistance. The area of the ALS gene containing the triplet for coding amino acid prolin at position 197 was monitored. The detected substitutions of amino acids serin, threonin for prolin caused by mutations are connected with the origin of resistance to the ALS-inhibiting herbicides. The results were also discussed with other authors' results who cover the given topic.

Keywords: weed, herbicide, acetolactate synthase (ALS), herbicide resistance, loose
silky bent grass, molecular detection of resistance

Number of pages: 54

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1	Cíl práce	- 7 -
2	Úvod	- 8 -
3	Současný stav řešené problematiky	- 9 -
3.1	Charakteristika plevelů	- 9 -
3.2	Hospodářský význam a škodlivost plevelů.....	- 10 -
3.3	Historický vývoj a změny plevelného spektra.....	- 10 -
3.4	Regulace plevelů.....	- 10 -
3.5	Regulace plevelů pomocí herbicidů.....	- 11 -
3.6	ALS inhibující herbicidy	- 12 -
3.7	Chundelka metlice (<i>Apera spica-venti</i> (L.) P. B.)	- 13 -
3.7.1	Botanický popis a biologické vlastnosti	- 13 -
3.7.2	Rozšíření chundelky metlice (<i>Apera spica-venti</i>) ve světě.....	- 15 -
3.7.3	Rozšíření chundelky metlice (<i>Apera spica-venti</i>) v České republice	- 16 -
3.7.4	Hospodářská škodlivost	- 17 -
3.7.5	Příčiny přemnožení	- 18 -
3.8	Definice a vznik herbicidní rezistence.....	- 19 -
3.9	Vývoj herbicidní rezistence	- 19 -
3.10	Křížová, vícenásobná rezistence a tolerance rostlin	- 20 -
3.11	Mechanismy a molekulární podstata rezistence	- 21 -
3.11.1	Target-site rezistence	- 21 -
3.11.2	Nontarget-site rezistence.....	- 22 -
3.11.3	Rezistence k ALS inhibitorům.....	- 23 -
3.11.4	Diagnostika rezistence	- 27 -
3.11.5	Rezistence u chundelky metlice (<i>Apera spica-venti</i>).....	- 28 -
4	Materiál a metody	- 31 -
4.1	Biologický materiál.....	- 31 -
4.2	Seznam použitých roztoků a médií.....	- 32 -
4.3	Vybavení laboratoře.....	- 33 -
4.4	Metody	- 33 -
4.4.1	Izolace DNA	- 33 -
4.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	- 34 -
4.4.3	Elektroforéza.....	- 35 -
4.4.4	Purifikace PCR produktů, sekvenace.....	- 35 -
5	Výsledky.....	- 37 -
6	Diskuse	- 42 -
7	Závěr.....	- 48 -
8	Seznam použitých zkratk	- 49 -
9	Seznam použité literatury	- 50 -
10	Seznam použitých internetových zdrojů.....	- 54 -

1 Cíl práce

Cílem diplomové práce je shromáždění dostupných literárních zdrojů a vypracování rešerše na téma diplomové práce. Dále je cílem molekulární detekce rezistentních biotypů chundelky metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. B.) vůči herbicidům ze skupiny inhibitorů acetolaktát syntázy (ALS). Součástí detekce je také práce se sekvencemi a jejich analýza.

2 Úvod

Ztráty způsobované plevely jsou známé od dob, kdy lidstvo přešlo od lovecko-sběračského způsobu života k zemědělství. Nejprve převládalo ruční odstraňování plevelů, v 19. století vznikalo plánované střídání plodin a na přelomu 19. a 20. století byly zaváděny chemické látky do zemědělství. Herbicidy jsou chemikálie, které zpomalují nebo přerušují růst rostlin. Dlouhodobé používání herbicidů s sebou nese určitá rizika, jedním z nich je rezistence plevelů. Rezistenci můžeme definovat jako dědičnou schopnost plevelů odolávat takové dávce herbicidů, při které by byla populace plevelů za normálních okolností potlačena. K výraznějšímu nárůstu rezistentních plevelů došlo kolem 60. let 20. století. V současné době jsou různé mechanismy rezistence rozšířeny po celém světě. (Jursík *et al.*, 2011)

Od 90. let 20. století začaly přibývat případy selhání herbicidní ochrany vůči chundelce metlici (*Apera spica-venti* (L.) P. B.). [1] Tato rostlina zapleveluje především ozimy a při vyšším počtu dokáže potlačit pěstovanou plodinu. Problémem je ovšem diagnostika rezistentních jedinců chundelky metlice (*Apera spica-venti*). Citlivé a rezistentní rostliny jsou od sebe okem nerozlišitelné. (Mikulka *et* Kneifelová, 2005) V této diplomové práci je diagnostika provedena za pomoci metody molekulární analýzy.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Charakteristika plevelů

Naše zemědělství prochází v poslední době změnami v oblasti strategie, struktury i organizace výrobních technologií. Nepříznivý vliv na kvalitu i kvantitu rostlinné výroby mají biotické činitele – plevele. Problematika hospodářského a ekologického významu komplexní ochrany proti plevelům se nazývá nauka o plevelech = herbologie.

S vývojem herbologie se postupně měnila i definice plevelů, v nejstarší publikaci je uvedena definice dle Mehlera z roku 1795: „Slovem plevel rozumí zemědělec ony rostliny, které na újmu jím úmyslně pěstovaným, užitečným, zkroceným proti jeho a bez jeho námahy na polích divoce rostou, bují a do polí se šíří a dobrým rostlinám potravu odnímají a jejichž vyhubení mu způsobuje mnohé obtíže, práce a výlohy.“ Za nejvýstižnější je považována definice dle autorů Vodáka a Hrona z roku 1959: „Plevelem je každá rostlina, která se vyskytuje na poli proti vůli pěstitelově vedle určité pěstované plodiny.“ (Kohout, 1996)

Mezi plevele řadíme jak druhy planě rostoucí, které se dostaly na pozemek nezáměrně, tak i kulturní rostliny konkurující v porostech jiných pěstovaných druhů (např. pšenice v porostu řepky). Druhá skupina bývá označována jako zaplevelující plodiny. Ty obvykle pocházejí z tzv. sklizňových ztrát (během sklizně např. obilky vypadávají na povrch půdy). (Jursík *et al.*, 2011)

Klasifikovat plevele můžeme dle několika kritérií, dnes převládá klasifikace dle hlavních biologických vlastností (délka života rostlin, způsob rozmnožování, rozšiřování semen, doba vzcházení rostlin, hloubka kořenů atd.). Výhodou této klasifikace je snadná volba regulace. V historii byly plevelné rostliny tříděny také dle jednotlivých lokalit (plevele luční, polní, zahradní, vodní, lesní), dle výskytu v kulturních plodinách (plevele obilnin, píce, okopanin atd.), dle škodlivosti (velmi nebezpečné, příležitostné, méně významné). (Mikulka *et Kneifelová*, 2005) Další avšak ne příliš vhodnou možností je klasifikace botanická. V jedné skupině se pak nacházejí druhy s rozdílným stupněm škodlivosti a regulací. (Hron *et Vodák*, 1959)

3.2 Hospodářský význam a škodlivost plevelů

Polní plevele jsou trvalou součástí agrosystému. Již od počátků zemědělství snižují výnosy sklizní a patří tak mezi nejvýznamnější škodlivé činitele. V současné době není cílem jejich úplné vyhubení, ale regulace s celkovým snížením zaplevelenosti při zachování druhové rozmanitosti. Snazší je potlačení druhově bohatých plevelných společenstev než pouze několika dominantních druhů. (Kneifelová *et* Mikulka, 2003)

Obecně můžeme říci, že polní plevele podstatně snižují úrodnost půdy neboli schopnost půdy poskytovat pěstované plodině živiny, vláhu a vzduch. Škodlivý účinek jednotlivých druhů může být odlišný. (Hron *et* Vodák, 1959)

3.3 Historický vývoj a změny plevelného spektra

Některé z dnešních plevelů provázejí lidstvo již od prehistorických dob. V České republice se v prehistorickém období, tj. neolit–mladší doba kamenná, vyskytovalo více než 50 druhů plevelů, které se na našem území dodnes vyskytují. (Kohout, 1996)

V okolí Olomouce to dosvědčují nálezy z dobových staveb, kde byla mezi obilím nalezena semena plevelů koukolu polního (*Agrostemma githago* L.), máku vlčího (*Papaver rhoeas* L.) a chrpy modré (*Centaurea cyanus* L.). Naproti tomu se mnoho druhů rostlin stalo plevely až v době pozdější. Plevelem se může stát nový druh, dokonce i druh obecně ve větším územním celku vzácný. (Hron *et* Vodák, 1959)

V poslední době vlivem použití herbicidů, zlepšení čistoty osiva, intenzivního ošetřování rostlin a omezení cest šíření plevelů některé druhy z polí ustoupily a byly nahrazeny jinými a často i odolnějšími druhy. Na orné půdě se tak mění druhové spektrum plevelů. Obecně se však počet druhů vlivem zemědělských technologií na našem území v posledních desetiletích snížil. (Mikulka *et al.*, 1999)

3.4 Regulace plevelů

V minulosti musel být kladen důraz především na preventivní opatření ještě před založením porostu plodiny (vláčení, plečkování, ruční okopávka). Uplatňován byl tzv. koncept maximálního potlačení plevelů již od počátku vegetace. Zanechání plevelu v porostu znamenalo ztížení výchozí situace v dalších letech vlivem vysemenění. S příchodem herbicidů došlo ke změnám v regulaci plevelů. Vysoká účinnost a rychlost regulace způsobila snížení a zanedbávání preventivních opatření. Postupně vlivem

herbicidů došlo ke snížení počtu druhů plevelů, ale naopak ke vzniku problémových, agresivních plevelů a také ke vzniku rezistentních. (Mikulka *et al.*, 1999)

Cílem regulace není úplné vyhubení plevelů, ale snížení jejich výskytu a tím i snížení jejich ekonomické škodlivosti. Úplné vyhubení by vedlo ke zhroucení celého ekosystému a mělo by tak opět za následek hospodářské škody.

V procesu je důležitá nejprve diagnóza plevelů, zaznamenání stupně zaplevelení a popřípadě druhového složení a růstové fáze. Dále prognóza vlivu plevelů na výnos a ekonomického dopadu ošetření a posledním krokem je samotná regulace. (Klem *et Škubalová*, 2003) Od roku 1970 je používán termín regulace místo dřívějšího označení hubení plevelů. (Dvořák *et Smutný*, 2003)

Regulaci můžeme rozlišit na přímou a nepřímou. Mezi nepřímé metody regulace můžeme zařadit použití čistého osiva, výběr vhodného osevního postupu a zpracování půdy. Regulace pomocí herbicidů patří mezi přímá chemická opatření. Regulace je možná také pomocí přímé fyzikální regulace např. mechanické odstraňování plevelů před jejich vysemeňováním nebo termické ošetření pole před vzejitím plodiny. Další možností je přímá biologická regulace, která využívá patogenů nebo živočišných škůdců potravně úzce specializovaných na některé plevele. (Jursík *et al.*, 2011)

3.5 Regulace plevelů pomocí herbicidů

Zhruba od 50. let 20. století se k regulaci plevelů používají herbicidy. Jedná se o látky narušující základní biochemické a fyziologické pochody v plevelech, způsobující jejich úhyn či poškození. (Mikulka *et al.*, 1999) Herbicidy patří mezi pesticidy, chemické látky sloužící k regulaci živých škodlivých činitelů pěstovaných rostlin. Herbicid je přípravek obsahující účinnou látku a řadu dalších složek jako jsou ředidla, barviva atd. Herbicidy mají velmi složité chemické značení, proto se používá zjednodušeně pouze název účinné látky, který je dohodnut. Jednotlivé přípravky mají také svůj obchodní název pod kterým jsou registrovány a distribuovány. (Dvořák *et Smutný*, 2003) V současné době je ve všech zemích (kromě Kanady, USA a Austrálie) používána klasifikace HRAC = Herbicide Resistance Action Committee, jež dělí herbicidy dle způsobu účinku do 22 tříd. Klasifikace je vytvořena na základě místa a mechanismu účinku, poškození plevele a chemického složení herbicidu. (Mikulka *et al.*, 1999) Klasifikace HRAC vznikla na základě iniciativy výrobců herbicidů. Jejím cílem je

vytvoření jednotné klasifikace herbicidní účinnosti, použití v co nejvíce zemích světa a tím pádem co nejjednodušší výběr herbicidu zemědělcem. [1] V USA a Kanadě je používána klasifikace WSSA = Weed Science Society of America, která je nepatrně odlišná od HRAC, obsahuje 28 tříd. (Mikulka *et al.*, 1999) V Austrálii vznikla v roce 1990 třetí klasifikace, která je stejně jako HRAC založená na písmenech. Vybrat z těchto tří systémů klasifikace herbicidů jediný platný by bylo nepraktické, protože řada pěstitelů si už na určitý systém zvykla. [1]

Klasifikovat herbicidy můžeme dle několika kritérií např. podle selektivity, způsobu účinku, doby aplikace, doby trvání účinku nebo již zmíněného mechanismu účinku. (Jursík *et al.*, 2011)

3.6 ALS inhibující herbicidy

Do této skupiny patří herbicidy, které inhibují klíčový enzym acetolaktát syntázu (ALS) v biosyntéze esenciálních aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu. (Hamouzová *et al.*, 2011) Acetolaktát syntáza je lokalizovaný v rostlinných chloroplastech. Tento enzym slouží jako katalyzátor dvou molekul pyruvátu za vzniku acetolaktátu na biochemické cestě vzniku valinu a leucinu. Dále katalyzuje reakci pyruvátu s kyselinou α -ketomáseľnou za vzniku acetohydroxymáseľné kyseliny na začátku biochemické cesty vzniku isoleucinu. (Jursík *et al.*, 2010) ALS bývá také označován jako acetohydroxyacid syntáza (AHAS). (Hamouzová *et al.*, 2011) Zablokováním enzymu ALS se zastaví tvorba aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu a následně i proteinů. Sekundárním důsledkem je inhibice syntézy DNA a zástava dělení buněk v meristematických pletivech. Poté dochází k omezení transportu asimilátů vodivými pletivy (floémem) na místa spotřeby a zastavení růstu. (Jursík *et al.*, 2011) Jako jiný vedlejší účinek můžeme uvést nahromadění 2-ketobutyratu. (Tranel *et Wright*, 2002) Ihned po aplikaci herbicidu dochází k zastavení buněčného dělení, vizuální dojem na rostlině můžeme pozorovat až za několik dní. Buňky totiž obsahují určitou zásobu aminokyselin, ta může ještě chvíli udržovat metabolismus funkční. Po vyčerpání této zásoby dojde ke zpomalení až zastavení růstu, následně ke žloutnutí mladých listů a zaschnutí vegetačního vrcholu. U některých dvouděložných rostlin (typické pro plevele patřící do čeledi *Poaceae* Barnhart) se zbarvuje listová žilnatina do fialové. (Jursík *et al.*, 2011) Dle klasifikace HRAC patří do této herbicidní skupiny třída imidazolinony

(IMI), triazolopyrimidiny (TP), sulfonylaminokarbonyl-triazolinony (SCT), pyrimidinyl(thio)benzoáty (PTB) a sulfonylmočoviny (SU). [4] Sulfonylmočoviny jsou nejflexibilnější skupinou herbicidů. Registrované účinné látky lze použít k regulaci plevelů v mnoha plodinách, největší uplatnění mají v obilninách. V současné době se staly nepoužívanější herbicidní skupinou na světě. Výhody sulfonylmočoviny se zakládají na širokém spektru účinku na plevele, aplikaci velmi nízkých (gramových) dávek na hektar plochy (Košnarová *et al.*, 2011) a nízké toxicitě. Herbicidy z této skupiny jsou vzhledem k termínu aplikace přijímány převážně listy. (Mikulka *et Kneifelová*, 2005) Opakované a časté používání sulfonylmočoviny způsobilo vznik rezistentních biotypů u některých plevelů. (Jursík *et al.*, 2011) Biotypem rozumíme skupinu rostlin v rámci druhu, která má biologické vlastnosti, které nejsou společné populaci jako celku. [5]

3.7 Chundelka metlice (*Apera spica-venti* (L.) P. B.)

3.7.1 Botanický popis a biologické vlastnosti

Český název: Chundelka metlice

Odborný název: *Apera spica-venti* (L.) P. B. / *Agrostis spica-venti* (L.)

Slovenský název: Metlička obyčajná

Anglický název: Silky bent grass / Loose silky bent grass / Wind bent grass

Německý název: Gemeiner Windhalm

Název dle Evropské společnosti výzkumu plevelů (EWRS): APESV

Botanické zařazení: Čeleď: Lipnicovité (*Poaceae*)

Biologie:

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) je charakterizována jako jednoletý ozimý plevel patřící do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Jedná se o volně trsnatou, světle zelenou travu se svazčitými kořeny (Kneifelová *et Mikulka*, 2003), jež však rostlinu příliš neukotvují v půdě. (Jursík *et al.*, 2011)

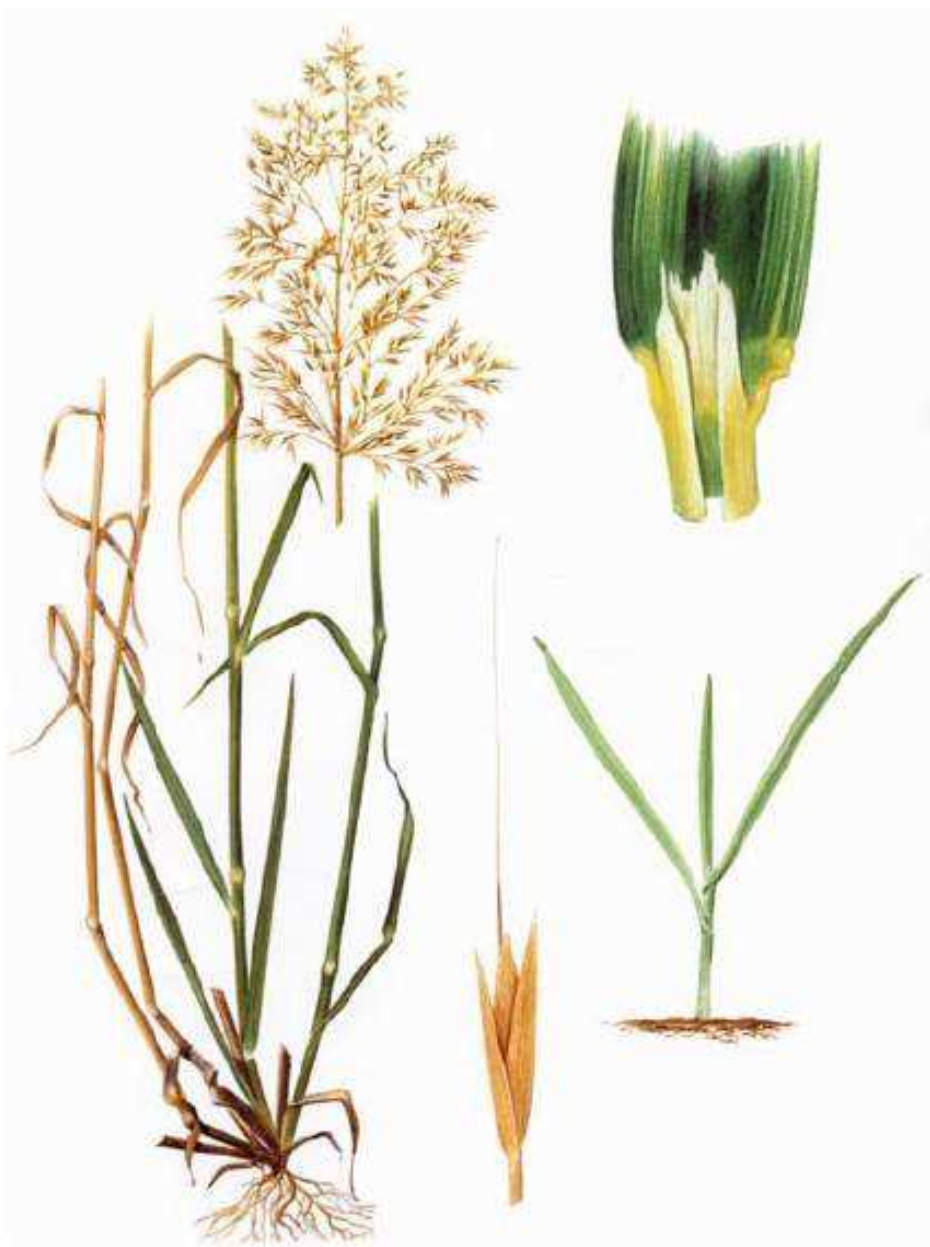
Stébla jsou přímá, hladká, málo olistěná a jejich délka nabývá dle autorů Mikulka a Kneifelová (2005), Mikulka (2014), Kazda *et al.* (2010) 30–100 cm, délku až 120 cm uvádějí Jursík *et al.* (2011) a autoři Mikulka *et al.* (1997) uvádějí až 130 cm.

Listy jsou nafialovělé s pochvou širokou 2–5 mm, plochou, lysou, drsnou s jazýčkem dlouhým až 6 mm. (Kneifelová *et* Mikulka, 2003). Jursík *et al.* (2011) uvádějí šířku pochvy u prvního listu 4–5 mm a u horních listů 3–7 mm. Dále uvádějí zřetelný, rozštěpený, velmi krátký jazýček bez oušek u prvního listu a u horních listů pak postupně delší jazýček. Listové čepele jsou ploché, na líci více drsné. Na rubu mají zprohýbanou pokožku, jsou žebrované a až 5 mm široké. (Pikulka *et al.*, 1997)

Květenstvím je dlouhá, rozkladitá, nafialovělá lata, která může být dlouhá až 20 cm. (Kneifelová *et* Mikulka, 2003) Mikulka *et al.* (1999) uvádějí délku lavy až 25 cm. Lata má jehlanovitý tvar a může být až 15 cm široká. Květenství má drsné větévky s drobnými, lesklými, zelenými či nafialovělými jednokvětými klásky. Klásky mají nestejně velké plevy. Obilka je pluchatá a dlouze osinatá. (Jursík *et al.*, 2011)

Reprodukce:

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) se rozmnožuje pouze generativně. Kvete od června do července, dozrává před sklizní ozimých obilnin. Na jedné rostlině dozrává obrovské množství obilek zpravidla až 12 000 (Mikulka, 2014), někteří autoři uvádějí i více například Kneifelová a Mikulka (2003) uvádějí až 16 000. U chundelky metlice (*Apera spica-venti*) byly nalezeny rozdíly v produkci semen v závislosti na plodině. V ozimém ječmeni vytváří cca 600 až 850 obilek, v ozimé pšenici 1300–5500 obilek. (Jursík *et al.*, 2011) Hmotnost jednoho tisíce obilek je 0,02 g, z toho pak vyplývá počet obilek v jednom gramu $1 \text{ g} = 50\,000$ obilek. [2] Obilky mají dobrou klíčivost, vzchází z povrchu půdy a z hloubky do 1 cm. Mají krátkou dormanci, za vhodných vláhových a teplotních podmínek mohou vzcházet už na podzim nebo brzo na jaře. (Mikulka *et al.*, 1999) Dříve většina rostlin vzcházela už na podzim nebo na jaře v ozimech, ale v posledních několika letech vzchází i v jarních plodinách. Díky nízké hmotnosti obilek, jsou do okolí mateřské rostliny rozšiřovány anemochoricky, hydrochoricky či osivem. (Mikulka, 2014) Na orné půdě si udržují klíčivost pouze do dvou let, ale v chladných oblastech kontinentální Evropy až sedm let. (Jursík *et al.*, 2011)



Obrázek č. 1: Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) – vlevo celá rostlina, vpravo nahoře listová pochva, vpravo ve středu klíčící rostlinka, vpravo dole klásek (převzato z <http://www.crsbooks.net/>)

3.7.2 Rozšíření chundelky metlice (*Apera spica-venti*) ve světě

Původ chundelky metlice (*Apera spica-venti*) se uvádí ve východní palearktické oblasti Evropy a západní Asii. Areál výskytu je v kontinentální Evropě mezi 45° s.š. a severním polárním kruhem s výběžkem až na Sibiř. (Jursík *et al.*, 2011) Ze střední Evropy můžeme uvést Německo, Švýcarsko, Rakousko, Polsko, Českou republiku, Slovensko,

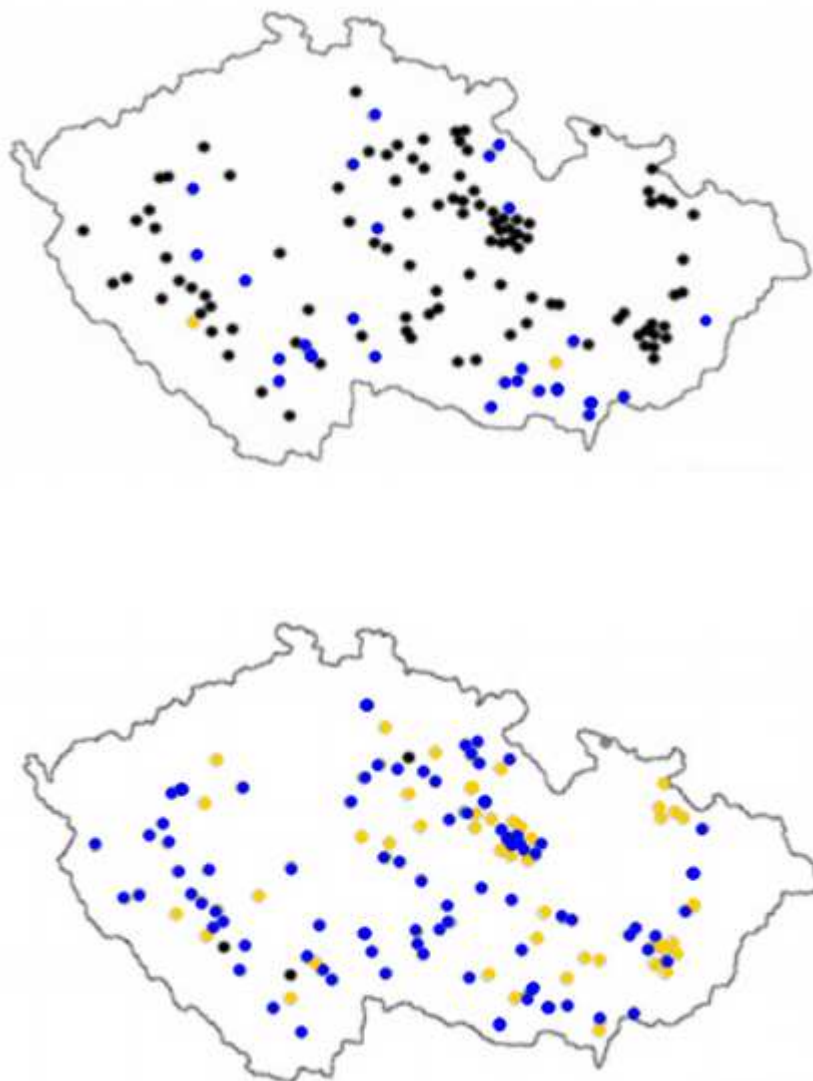
Maďarsko (Massa, 2011), ze západní Evropy Francii a ze severní Evropy Litvu [1], Švédsko a Dánsko. (Massa, 2011) Ve zbylých částech se vyskytuje pouze ostrůvkovitě stejně jako v severní Africe a na Novém Zélandu. Sekundárně ji můžeme nalézt v severovýchodní části Severní Ameriky a západní části USA. V naší zemi je chundelka metlice (*Apera spica-venti*) považována za významný plevel, z celosvětového pohledu je její význam pouze okrajový, v některých částech světa ani není uváděna jako plevel. (Jursík *et al.*, 2011)

3.7.3 Rozšíření chundelky metlice (*Apera spica-venti*) v České republice

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) se v současné době vyskytuje v celé České republice s výjimkou vysokohorských oblastí. Její hustota a škodlivost se oblast od oblasti liší. (Soukup *et al.*, 2005) Preferuje vlhčí lehčí neutrální až kyselé půdy středních a vyšších poloh. V současné době se rozšířila i do poloh nižších. Pravidelně se vyskytuje na více než 80 % ploch ozimé pšenice, na zbylých se objevuje nepravidelně. (Jursík *et al.*, 2011) Soukup *et al.* (2005) uvádějí, že 31,6 % z dotazovaných zemědělců popisuje škody při sklizni způsobené přítomností tohoto plevele.

Tradičně se vyskytuje na Vysočině, ve výšce 350–600 m nad mořem, na chudých mělkých písčitých půdách. Nejsilnější výskyty byly zaznamenány v západní části ČR v blízkosti Šumavy, na Česko-moravské vrchovině a ve východní části Moravy. Lokality s nepravidelným výskytem se nacházejí v nejteplejších a nejsušších oblastech jižní Moravy a středních Čech.

Dříve byla chundelka metlice (*Apera spica-venti*) omezována především klimatickými a půdními podmínkami. V současné době díky změnám v zemědělských systémech (střídání plodin, hnojení, zpracování půdy) dochází ke změnám v druhovém spektru plevelů na jednotlivých lokalitách. Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) se tak rozšiřuje i do nižších oblastí, včetně oblastí s černozemí. (Soukup *et al.*, 2005)



Obrázek č. 2: Mapa výskytu chundelky metlice v ČR (*Apera spica-venti*) v ozimé pšenici (nahore) a v jarních plodinách (dole) – ● pravidelný výskyt, ● nepravidelný výskyt, ● bez výskytu (upraveno dle Soukup *et al.*, 2005)

3.7.4 Hospodářská škodlivost

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) je konkurenčně velmi silná, v případě vyššího výskytu dokáže potlačit pěstovanou plodinu. Vykytuje se především v ozimech (pšenice, žito, ječmen, řepka), v posledních letech se objevuje i v jařině a okopaninách. Většina obilek se vysemeňuje před sklizní obilniny a část při sklizni. (Kneifelová *et Mikulka*, 2003)

V počáteční fázi růstu se chundelka metlice (*Apera spica-venti*) vyvíjí pomaleji než obilnina, přezimuje ve fázi dvou listů, během května přichází období rychlého růstu a snadno přerůstá pšenici či ječmen. Rozkladité laty zakrývají obilniny, brání tvorbě a ukládání asimilátů do zrna. (Jursík *et al.*, 2011)

Ekonomický práh škodlivosti odhadují Jursík *et al.* (2011) na 10 rostlin/m² u pšenice ozimé, na 20 rostlin/m² u pozdních výsevů pšenice a ječmene, na 30 rostlin/m² u ozimého žita.

3.7.5 Příčiny přemnožení

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) nepatřila v době mezi dvěma světovými válkami v československém zemědělství mezi významné plevelné rostliny. Po druhé světové válce vlivem klasického střídání a vysoké pestrosti pěstovaných plodin stále patřila mezi nevýznamné plevele. Až s příchodem velkoplošného používání herbicidů a jejich opakované aplikaci došlo v důsledku rychlé selekce plevelných druhů a potlačením citlivých dvouděložných plevelů k rychlému nárůstu odolné chundelky metlice (*Apera spica-venti*). Přemnožení pomohlo také zvýšení počtu ozimých obilnin v osevních postupech, především ozimé pšenice. V 60. a 70. letech došlo k výraznému nárůstu výskytu chundelky metlice (*Apera spica-venti*) na polích. V 80. letech s příchodem herbicidů ze skupiny sulfonylmočoviny došlo ke snížení jejího výskytu. (Mikulka *et Kneifelová*, 2004) V posledních několika letech došlo opět ke zesílení výskytu a šíření do oblastí, ve kterých se dosud nevyskytovala ve škodlivé míře. (Soukup *et al.*, 2005) Příčinou může být nevhodná volba herbicidu a termínu aplikace, snížení počtu druhů pěstovaných plodin, nárůst ozimů a také strategie minimálního zpracování půdy. (Mikulka *et Kneifelová*, 2004) Mělké zpracování půdy má za následek uložení obilek v horních vrstvách půdy, čímž se zvyšuje počet semen, která mají vhodné podmínky pro vzejití. Dřívějším zaklopením obilek orbou v půdě docházelo ke snížení životnosti a klíčivosti semen. (Soukup *et al.*, 2005) Otázkou je, v jaké míře jsou výše uvedené faktory důvodem selhávání ochrany vůči chundelce metlici (*Apera spica-venti*) nebo vznik rezistence vůči herbicidům. (Nováková *et al.*, 2005)

3.8 Definice a vznik herbicidní rezistence

Živé organismy jsou schopny přizpůsobovat se měnícím se podmínkám prostředí. Tak jako se zemědělec snaží chránit úrodu před škodlivými činiteli, tak se i škodlivé organismy na obdělávaných pozemcích snaží přizpůsobit a vyhnout se nástrahám zemědělství. (Prokop, 2009a)

Rezistence je dle mezinárodní organizace HRAC definována jako spontánně se vyskytující dědičná vlastnost biotypů přežít ošetření herbicidem, které by za normálních aplikačních podmínek účinně tuto populaci potlačilo. [4]

Rezistence nevzniká jako mutace způsobená herbicidem, ale vzniká jako spontánní mutace bez ohledu na používání herbicidů. Velkoplošným používáním herbicidů došlo k selekci přirozených plevelných populací, jež přirozeně obsahují malé množství rezistentních genotypů a šíření rezistentních jedinců. (Kazda *et al.*, 2010) Z výše uvedeného vyplývá, že se rezistence vyskytuje v přírodě přirozeně, na druhou stranu, ale může být indukována metodami genetického inženýrství a používáním herbicidů. Frekvence rezistentního genotypu se v normální populaci pohybuje na úrovni 10^{-4} až 10^{-6} (každá 10 000. až 1 000 000. rostlina je rezistentní). Každé ošetření herbicidy zvyšuje tuto frekvenci. (Hamouzová *et al.*, 2012) Vznik a šíření rezistentních populací je rychlejší v monokulturách a vytrvalých kulturách s dlouhodobým používáním herbicidů. (Mikulka *et Slavíková*, 2008)

Rezistence bývá často chápána jako problém konkrétní účinné látky obsažené v herbicidu. Tento pohled je velice zjednodušující. Rezistence je odezvou na agrosystém, který v regulaci plevelů spoléhá z větší části na chemické metody. (Prokop, 2009)

Na vznik rezistentní populace má vliv celá řada faktorů. Populace jsou ovlivněny používaným herbicidem, biologickými, agroekologickými a dalšími faktory. (Powles *et Yu*, 2010) Za specifických podmínek může herbicidní rezistence vzniknout už do tří let po uvedení účinné látky na trh. (Jursík *et al.*, 2011a)

3.9 Vývoj herbicidní rezistence

První záznam o herbicidní rezistenci pochází už z roku 1957, první potvrzené zprávy jsou zaznamenávány v průběhu 60. let 20. století vůči triazinům. (Prokop, 2009) Tyto herbicidy byly pravidelně používány v monokulturách jabloňových sadů a kukuřici. Ve

Spojených státech amerických byl nalezen první rezistentní plevel starček obecný (*Senecio vulgaris* L.). V průběhu 70. a 80. let byly popsány další druhy především v Severní Americe a Evropě. Dále byly rezistentní biotypy nalezeny v Číně, Japonsku, Jižní Koreji atd. (Kazda *et al.*, 2010) V současné době bylo popsáno celkem 460 jedinečných případů herbicidní rezistence u plevelů. [Pokud se stane turanka kanadská (*Coryza canadensis* (L.) C.) rezistentní k atrazinu a následně také k ALS inhibujícím herbicidům, každý případ počítáme zvlášť jako jedinečný případ rezistence. Pokud se vyvine multiple rezistence u turanky kanadské (*Coryza canadensis*) k atrazinu a současně ALS, tento případ už jako další jedinečný nepočítáme.] Celkem 246 druhů je rezistentních vůči 157 rozdílným druhům herbicidů. Herbicidní rezistence byla hlášena v 86 kulturních plodinách v 66 zemích. [1] Údaje se výrazně liší od údajů publikovaných v bakalářské práci Molekulární detekce herbicid rezistentních plevelů, v roce 2013 bylo potvrzeno 217 rezistentních druhů vůči 148 různým účinným látkám. (Stýblová, 2013) Z hlediska počtu zemí byla rezistence prokázána v dalších pěti. [1]

3.10 Křížová, vícenásobná rezistence a tolerance rostlin

Někdy je možné se setkat s termínem **tolerance rostlin**, jedná se o přirozenou odolnost vůči herbicidu. Každý druh plevele je různě citlivý na různé spektrum herbicidů. Tento termín nelze zaměňovat s termínem rezistence. (Mikulka *et Slavíková*, 2008)

Křížová rezistence (cross-rezistence) je jev, kdy rostlina rezistentní vůči jednomu herbicidu je rezistentní také vůči dalším herbicidům se stejným nebo podobným mechanismem účinku. (Hamouzová *et al.*, 2011) Herbicidy patří do stejné chemické skupiny, v některých případech i do různých skupin, ale se stejným mechanismem účinku. Tento typ rezistence, ale nemusí hned znamenat rezistenci ke všem herbicidům z jedné chemické skupiny nebo se stejným mechanismem účinku. (Hamouzová *et al.*, 2012) Může být spojená s target site rezistencí nebo s metabolickou rezistencí. (Prokop, 2009a) Tento typ rezistence můžeme popsat ještě na příkladu z praxe. V důsledku rozsáhlého používání herbicidu A došlo na poli k selekci ve prospěch rezistentních jedinců vůči herbicidu A. Nezávisle byla potvrzena rezistence u těchto jedinců i k herbicidu B, který na pozemku používán vůbec nebyl. [5] V případě cross-rezistence je ochrana proti těmto populacím velmi komplikovaná. (Mikulka *et al.*, 1999)

Negativní křížová rezistence (negative cross-resistance) nastává pokud je biotyp odolný vůči určité skupině herbicidů a zároveň velmi citlivý vůči jiné skupině. (Dvořák *et* Smutný, 2003) Tento typ rezistence může být užitečný jako preventivní opatření pro oddálení vzniku rezistence nebo pro účinnější regulaci plevelů, u kterých už rezistence vznikla. Tento typ rezistence byl nalezen např. u ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli* (L.) B.) a turanky kanadské (*Conyza canadensis*). (Gadamsk *et al.*, 2000)

Vícenásobná rezistence (multiple resistance) je rezistence vůči více herbicidům s různými mechanismy účinku (Jursík *et al.*, 2011) neboli schopnost projevu více než jednoho mechanismu rezistence. (Prokop, 2009a) Tento mechanismu se vyvinul na základě dvou oddělených procesů. Nejprve se vyvinula rezistence používáním herbicidu A, poté aplikací herbicidu B došlo k vyvolání rezistence také vůči herbicidu B. [5] Vícenásobná rezistence byla dokázán u mnoha druhů z čeledi *Poaceae*. Příčinou vzniku jsou biologické vlastnosti druhu jako vysoká genetická variabilita, cizosprašnost, produkce semen a počet přítomných rostlin na pozemku. (Hamouzová *et al.*, 2012) Tato rezistence může být způsobena změnou v cílovém místě působení herbicidu nebo zvýšeným metabolismem herbicidu. (Mikulka *et* Chodová, 2002)

3.11 Mechanismy a molekulární podstata rezistence

Další možnost jak třídit herbicidní rezistenci je založena na podstatných změnách mezi rezistentními rostlinami a rostlinami citlivými. Podle této klasifikace lze odolnost vůči herbicidům obecně rozdělit na rezistenci v místě účinku (target-site rezistence) a rezistenci mimo cílové místo (nontarget-site rezistence). (Massa, 2011) Druhá z nich je někdy označována jako metabolická rezistence. (Nováková *et al.*, 2007)

3.11.1 Target-site rezistence

Enzymy mají v biologických procesech extrémně specializované funkce. V důsledku toho je mnoho různých enzymů zapojeno v mnoho různých procesech v rostlině. Některé herbicidy mohou zastavit fungování specifických enzymů, které následně povede k zastavení specifických procesů v rostlině a k odumírání rostliny. [5] Obvykle dochází ke změně ve vázání herbicidu na příslušný protein. Příčinou této změny je mutace v genu, jenž kóduje tento protein. Nejčastěji se jedná o bodovou mutaci tzn.

záměnu jednoho nukleotidu v sekvenci genu. Mutace redukuje či zcela zamezí interakci herbicidu s proteinem. Také může dojít k nadprodukci cílového enzymu, herbicid tak nedokáže inaktivovat veškerý vyprodukovaný enzym a ten dále pokračuje ve své metabolické cestě. (Prokop, 2009a) Target-site rezistenci je dnes poměrně snadné ověřit laboratorními metodami. Obecně lze soudit, že rezistence je způsobena změnou jednoho jaderného genu, který je většinou dominantní a děděn dle Mendelovských zákonitostí. Rezistence populace závisí na frekvenci mutací, dominanci daného genu a selekčním tlaku vyvolaného herbicidem. (Hamouzová *et al.*, 2012) Tento mechanismus rezistence byl nalezen u herbicidů inhibujících fotosystém II (PSII), enzym acetolaktát syntázu (ALS), enzym acetyl koenzym A karboxylázu (ACC), chloroplastový enzym 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (EPSPS), enzym protoporphyrinogen-9-oxidázu a tubulin v buněčném dělení. (Powles *et al.*, 2010)

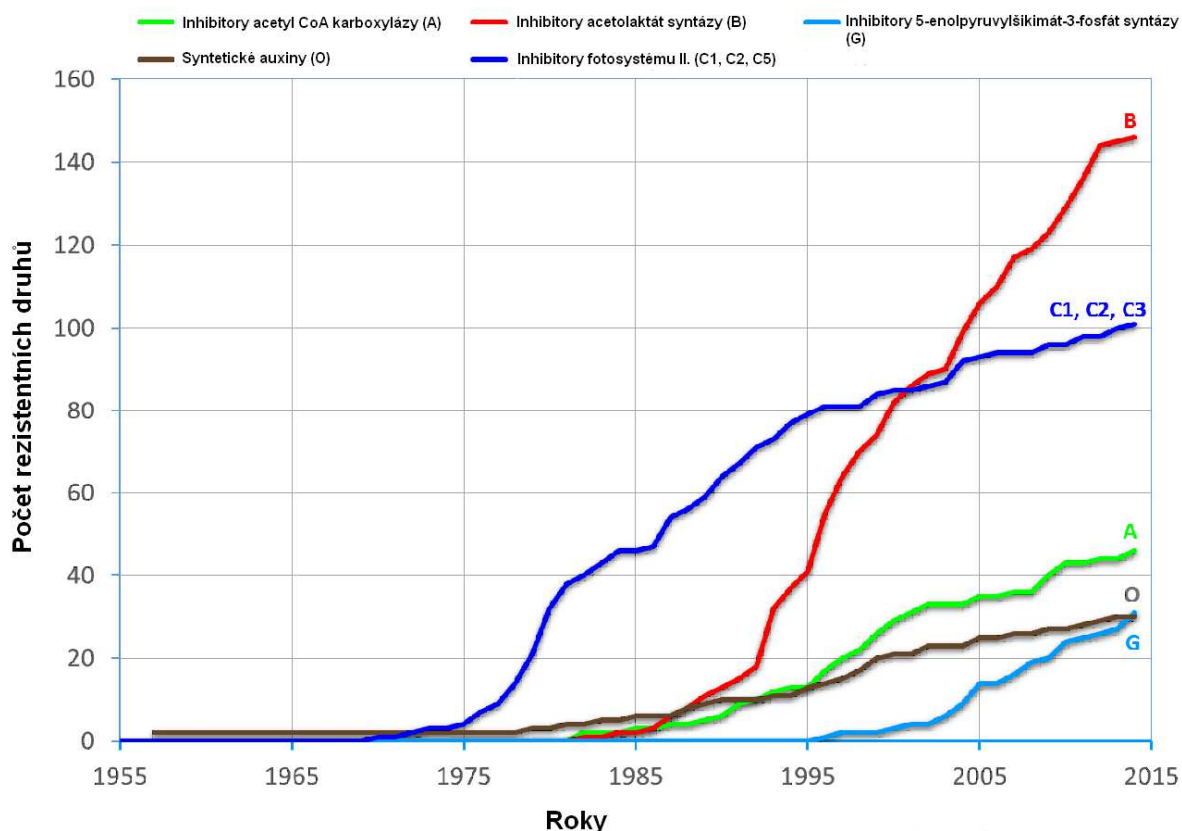
3.11.2 Nontarget-site rezistence

Tento typ rezistence je spojen s fyziologickými mechanismy v rostlině, jejichž cílem je snížit množství herbicidu, který dosáhne cílového místa. Tyto mechanismy se zakládají převážně ze snížení příjmu herbicidu rostlinou, snížení rychlosti translokace, vyšší rychlosti ukládání herbicidu na různých místech v rostlině a vyššího metabolismu. Ve většině případů rezistence mimo cílové místo se jedná o zvýšenou metabolickou detoxikaci herbicidu. (Powles *et al.*, 2010) Schopnost detoxikovat příslušný herbicid zvýšeným metabolismem způsobuje zvýšená aktivita některých rostlinných enzymů. U mnoha rezistentních rostlin byla pozorována zvýšená aktivita cytochromu P450 monooxygenázy, např. u rezistence k ALS, ACC a PSII. Zvýšená aktivita enzymu glutation S-transferázy byla prokázána u rostlin rezistentních vůči atrazinu (inhibitor PSII) a enzymu aryl-acylamidázy u rostlin rezistentních vůči propanilu (inhibitor PSII). Snížení příjmu herbicidu rostlinou bývá způsobeno morfologicky např. nadprodukcí vosků nebo redukovanou listovou plochou. (Prokop, 2009a) Genetický a molekulární základ metabolické rezistence není dosud příliš prozkoumán, většina metabolických procesů je řízena více geny, rezistence je tedy pravděpodobně založena polygenně. (Jursík *et al.*, 2011a) Nedávné studie uvádějí vztah mezi použitím nízkých dávek herbicidů k regulaci plevelů a vzniku vysokého stupně slabší minoritní nontarget-

rezistence už během tří generací. V poslední době se ukazuje, že nelze tento typ rezistence zanedbat. (Neve *et Powles*, 2005)

3.11.3 Rezistence k ALS inhibitorům

Tyto herbicidy se začaly používat v 80. letech 20. století. Od té doby stoupá jejich spotřeba a řadí se mezi světově nejčtenější. (Nováková *et al.*, 2007) Prvním plevelem, u kterého byla dokázána rezistence vůči ALS herbicidům, konkrétně sulfonylmočovinám, byla locika kompasová (*Lactuca serriola* L.) nalezená v roce 1987 v USA. Tento plevel byl nalezen v pšenici, která se od roku 1982 ošetřovala chlorsulfuronem. V roce 1989 následovaly další rezistentní plevele: bytel metlatý (*Kochia scoparia* (L.) Schrader), ptačinec žabinec (*Stellaria media* (L.) Vill.) a slanobýl ruský (*Salsola Australis* R. Br.) v Kanadě a USA. (Mikulka *et Chodová*, 2002) V současné době je známo celkem 157 ALS rezistentních druhů plevelných rostlin. Zatím posledními druhy, u kterých byla rezistence vůči ALS potvrzena, jsou vikev setá (*Vicia sativa* L.), starček jarní (*Senecio vernalis* Waldst. *et* Kit.), *Alopecurus japonicus* Steud., *Cyperus odoratus* L., *Rumex dentatus* L. a hluchavka objímavá (*Lamium amplexicaule* L.). [1] V roce 1998 tato skupina herbicidů předběhla všechny ostatní počtem rezistentních plevelných druhů viz obrázek č. 3. Pozoruhodné na tom je, že ALS inhibitory jsou používány od roku 1982, přičemž triaziny (v obrázku č. 3 označeny tmavě modře) od roku 1960. (Tranel *et* Wright, 2002)



Obrázek č. 3: Vývoj počtu rezistentních plevelů vůči vybraným skupinám herbicidů v období 1955–2015 (upraveno dle [1])

Rezistence může být zapříčiněna jak změnou v místě účinku herbicidu následkem mutace, tak nadměrnou metabolizací účinné látky rostlinou. Rostlina může metabolizovat látku několika možnými cestami. U jílku vytrvalého (*Lolium perenne* L.), rezistentního vůči chlorsulfuronu, dochází ke konjugaci účinné látky s glukózou a následně inaktivaci zapojením hydroxylace a glykosylace. (Prokop, 2009a)

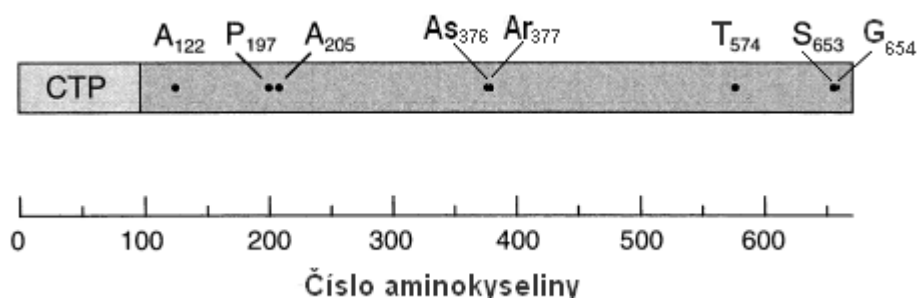
Ačkoliv existují zprávy o metabolicky způsobené rezistenci vůči ALS inhibitorům, ve většině případů se jedná o rezistenci způsobenou změnou ALS enzymu, která změní vazebné místo herbicidu. (Zheng *et al.*, 2011) Rezistence je nejčastěji způsobena bodovou mutací. (Prokop, 2009a) Alely způsobující rezistenci k ALS inhibitorům jsou na rozdíl od původních alel citlivých biotypů dominantní. Stupeň dominance se liší v závislosti na rostlinném druhu a alele. (Tranel *et Wright*, 2002) Košnarová *et al.* (2014) uvádějí, že ve většině případů rezistence vůči ALS herbicidům byla dokázána neúplná dominance. Ačkoliv se funkce enzymu ALS uplatňují

v plastidech, gen *als* je jaderný gen s Mendelovskou dědičností. (Tranel *et Wright*, 2002) Rezistence se tedy může šířit pylem i semeny (Košnarová *et al.*, 2014), narozdíl např. od rezistence k triazinům, která je podmíněna plastidovým genem a šířena pouze semeny. (Tranel *et Wright*, 2002)

Určení mutace způsobující rezistenci rostlin vůči ALS inhibitorům je proces molekulární biologie zahrnující PCR amplifikaci genu souvisejícího se vznikem rezistence a analýzu sekvence či restriční analýzu PCR produktu. V současné době máme k dispozici příklady sekvencí genu *als* (nebo alespoň dílčích sekvencí) rezistentních biotypů. Dodnes bylo hlášeno osm aminokyselin, kterým je vlivem mutace přisuzována rezistence vůči ALS inhibitorům, ve třech regionech genu *als*. Tři z nich (Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅) se nachází v regionu A (Tranel *et Wright*, 2002) a další tři (Trp₅₇₄, Ser₆₅₃, Gly₆₅₄) [1] v regionu B viz obrázek č. 4. (Tranel *et Wright*, 2002) Dále byly detekovány mutace mezi regionem A a B na pozicích Asp₃₇₆, Arg₃₇₇. Čísla jsou standardizována v souladu se sekvencí prekurzoru ALS u *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Celkem tedy bylo dosud detekováno 26 možných substitucí na 8 pozicích způsobujících rezistenci vůči ALS inhibitorům viz tabulka č. 1. [1]

Obvykle jsou aminokyseliny číslovány od začátku prekurzoru ALS proteinu, někteří autoři ale číslovají aminokyseliny bez chloroplastového tranzitního proteinu (CTP), jehož funkcí je zacílení prekurzorového proteinu ALS do plastidů. Vhodné je označovat aminokyselinové substituce s odkazem na sekvenci prekurzoru ALS u *Arabidopsis thaliana*.

Každá z těchto mutací může být snadno amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce a následně sekvenována. (Tranel *et Wright*, 2002)



Obrázek č. 4: Schématické znázornění genu *acetolaktát syntázy* ukazující osm aminokyselin, u kterých může dojít k záměně za jinou aminokyselinu vlivem mutace a následně ke vzniku target-site rezistence k ALS herbicidům u různých rostlinných druhů. Čísla jsou standardizována v souladu se sekvencí u *Arabidopsis thaliana*. A značí alanin, P prolin, As asparagovou kyselinu, Ar arginin, T tryptofan, S serin, G glycin, CTP chloroplastový tranzitní peptid (upraveno dle Tranel *et* Wright, 2002 a [1])

Tabulka č. 1: Shrnutí možných záměn aminokyselin, způsobených mutací v kodonech původních, způsobující vznik rezistence vůči ALS inhibitorům u různých rostlinných druhů. Čísla jsou standardizována v souladu se sekvencí u *Arabidopsis thaliana*. (upraveno dle [1])

Aminokyselina	Ala ₁₂₂	Pro ₁₉₇	Ala ₂₀₅	Asp ₃₇₆	Arg ₃₇₇	Trp ₅₇₄	Ser ₆₅₃	Gly ₆₅₄
Substituce	Thr	Thr	Val	Glu	His	Leu	Thr	Glu
	Val	His	Phe			Gly	Asn	Asp
	Tyr	Arg				Met	Ile	
		Gln						
		Ser						
		Ala						
		Ile						
		Leu						
		Glu						
		Tyr						
		Asn						

Vzhledem k možným substitucím v různých aminokyselinách, které provází minimální následky v katalytické funkci enzymu ALS, existuje relativně vysoká flexibilita ALS herbicid-vazebného místa. Pravděpodobně to může být vysvětleno, tím že se herbicid-vazebné místo liší od aktivního místa enzymu, i když jsou tato dvě místa v těsné blízkosti.

Kromě toho má mutace v genu *als*, při nepřítomnosti ošetření herbicidem, zanedbatelný vliv na fitness rostliny. Může být poukázáno na možnou výhodu ve fitness

u rezistentního druhu rostliny v nepřítomnosti herbicidní selekce. U rezistentních rostlin dochází ke zvýšené akumulaci větvených aminokyselin leucinu, isoleucinu a valinu. Semena těchto rostlin tak budou klíčit rychleji, zejména v chladných oblastech. (Tranel *et Wright*, 2002)

Nejvíce případů rezistence bylo nalezeno vůči sulfonylmočovinám, především následkem jejich všeobecného používání. Současně byla potvrzena i křížová rezistence k chemicky nepříbuzným látkám se stejným mechanismem účinku. (Prokop, 2009a) Cross-rezistence je mezi ALS inhibujícími herbicidy stupňovitého charakteru (různý stupeň rezistence k různým účinným látkám). (Hamouzová *et al.*, 2012)

Nejkomplikovanější situace nastává, když u jednoho individua nalezneme rezistenci cílového místa i rezistenci metabolickou. (Prokop, 2009a)

Četný výskyt rezistentních biotypů může být zapříčiněn širokým rozšířením ALS herbicidů, způsobem používání, vysokým selekčním tlakem a mechanismem rezistence. (Nováková *et al.*, 2007) Výše přirozené variability genu *als* mohou mít vliv na pravděpodobnost vybrání rezistentních biotypů selekcí. Teoreticky by měla vysoká míra mutací v *als* genu odpovídat vysoké frekvenci výskytu rezistence vůči ALS inhibitorům na rozdíl od jiných herbicidů. V praxi ovšem neexistuje žádný důkaz o neobvyklé rychlosti mutací v *als* genu. (Tranel *et Wright*, 2002) Rychlost selekce rezistentního biotypu je tedy dána více selekčním tlakem vyvolaným působením herbicidu než frekvencí mutace. (Nováková *et al.*, 2007)

Kromě plevelů rezistentních k ALS herbicidům se můžeme setkat také s ALS rezistentními GMO plodinami např. kukuřice (*Zea mays* L.), řepka (*Brassica napus* L.), cukrová řepa (*Beta vulgaris* L.), rýže (*Oryza sativa* L.) a pšenice (*Triticum aestivum* L.). (Tranel *et Wright*, 2002) Genetické vyšlechtění rezistentních odrůd kulturních rostlin může usnadnit regulaci plevelů, na druhou stranu může způsobit i škody např. zaplevelováním půd plodinou. (Kohout, 1996)

3.11.4 Diagnostika rezistence

V polních podmínkách je prakticky nemožné pouhým okem od sebe na základě morfologických vlastností rozeznat rostliny citlivé a rezistentní. S problémem rezistence se obvykle setkáme až se zjištěním nedostatečného účinku herbicidu. Z tohoto důvodu je důležité využívat jednoduchých a spolehlivých metod. (Mikulka, 2014) Regulaci

plevelů pomocí herbicidních opatření může komplikovat odlišná fitness rezistentních rostlin. Rostliny mohou vzcházet při jiných teplotách, mít odlišnou klíčivost, hodnoty fotosyntézy, růstovou křivku a reagovat odlišně na agrotechnické postupy. (Dvořák *et* Smutný, 2003) Pokud zemědělec zaznamená podezření na rezistentní biotypy plevelů v pěstované plodině může využít k diagnostice jednodušších metod nenáročných na výbavu nebo odeslat vzorky zralých semen rostlin, jež přežily ošetření herbicidem, do diagnostické laboratoře. (Mikulka *et* Slavíková, 2008)

Mezi metody diagnostiky rezistence patří metoda biologického testu, stanovení rezistence ze semen z půdní zásoby, fluorescenční metoda, metoda Hillovy reakce, metoda agarových pěst a vodních kultur a dále stanovení aktivity acetolaktát syntázy. V posledních patnácti letech se používají také *molekulárně-genetické metody*, jež detekují mutace způsobující rezistenci k herbicidům. Jedná se o změnu pořadí aminokyselin v sekvenci DNA způsobující změnu struktury nebo vazebného místa inhibovaného enzymu. (Mikulka *et* Slavíková, 2008) Gen související se vznikem rezistence k určitému typu herbicidu je pomocí PCR amplifikován a samotné místo mutace je určeno analýzou sekvence nebo restrikční analýzou PCR produktu. (Salava *et* Chodová, 2007)

3.11.5 Rezistence u chundelky metlice (*Apera spica-venti*)

První rezistentní biotypy u chundelky metlice (*Apera spica-venti*) byly detekovány ve Švýcarsku v roce 1994 a Německu v roce 1997 vůči isoproturonu (inhibitor PSII). (Nováková *et al.*, 2007) V roce 2002 byla v Polsku detekována rezistence chundelky metlice (*Apera spica-venti*) vůči chlorsulfuronu (ALS inhibitor) a následně v roce 2005 také v několika populacích v ČR. V roce 2005 byla v Německu popsána rezistence vůči sulfosulfuronu (ALS inhibitor). (Massa *et al.*, 2011) Dále byly v Německu popsány rezistence vůči inhibitorům ACC, v Polsku také vícenásobná rezistence k inhibitorům ACC a zároveň ALS. V posledních letech se rezistence začíná objevovat i v sousedních státech. (Košnarová *et al.*, 2014) Souhrnem můžeme říci, že rezistence chundelky metlice (*Apera spica venti*) byla identifikována v devíti zemích viz obrázek č. 5 a celkem ke třem třídám herbicidů, inhibitorům PSII, ACC a ALS. Konkrétní účinné látky v jednotlivých třídách herbicidů jsou uvedeny v tabulce č. 2. Z hlediska rezistence vůči

ALS inhibitorům byly publikovány čtyři aminokyseliny, jejichž substituce souvisí se vznikem rezistence viz tabulka č. 3. [1]



Obrázek č. 5: Výskyt rezistentních populací chundelky metlice (*Apera spica-venti*) v Evropě. Barvou ■ jsou označeny státy, u kterých byla tato rezistence detekována. FR značí Francii, DE Německo, DK Dánsko, CHE Švýcarsko, SE Švédsko, A Rakousko, CZ Českou republiku, PL Polsko, LT Litvu (upraveno dle (Mikulka *et* Slavíková, 2008), [1])

Tabulka č. 2: Seznam detekovaných účinných látek, ke kterým byla vyvinuta rezistence u chundelky metlice (*Apera spica-venti*) ve světě. [1]

Třída herbicidů	Inhibitory ALS	Inhibitory ACC	Inhibitory PSII
Rezistentní účinné látky	iodosulfuron-methyl-sodium	fenoxaprop-P-ethyl	isoproturon
	chlorsulfuron	pinoxaden	
	mesosulfuron-methyl		
	pyroxsulam		
	sulfosulfuron		
	florasulam		
	flupyrsulfuron-methyl-sodium		
	sulfometuron-methyl		
	procarbzone-sodium		

Tabulka č. 3: Shrnutí možných záměn aminokyselin způsobených mutací v kodonech původních, souvisejících se vznikem rezistence vůči různým třídám ALS inhibitorů u chundelky metlice (*Apera spica-venti*) ve světě. S znamená citlivý biotyp, N rezistence nedetekována, r detekována mírná rezistence, R vysoká rezistence. TP značí triazolopyrimidiny, SU sulfonylmočoviny, PTB pyrimidinyl(thio)benzoáty, IMI imidazolinony a SCT sulfonylaminokarbonyl-triazolinony. Čísla jsou standardizována v souladu se sekvencí *Arabidopsis thaliana* (upraveno dle [1])

Aminokyselina	Substituce	TP	SU	PTB	IMI	SCT
Ala₁₂₂	Val	N	R	N	N	S
Pro₁₉₇	Thr	r	R	N	N	r
	Asn	r	R	N	N	r
	Ser	N	R	N	N	r
	Ala	N	R	N	N	N
Arg₃₇₇	His	R	R	N	N	R
Trp₅₇₄	Leu	R	R	N	N	R
	Met	N	R	N	N	N

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V průběhu června a července 2013–2014 byly sbírány rostliny chudelky metlice (*Apera spica venti*) ve fázi květu na polních lokalitách kraje Vysočina, Olomouckého a Moravskoslezského kraje, viz tabulka č. 4 a č. 5. Z každé polní lokality bylo nasbíráno celkem tři až pět jedinců lišících se místem sběru v daném poli. Tito jedinci byli uchováni ve formě herbářových položek, poté využiti k molekulární detekci rezistence vůči ALS inhibitorům. K polním lokalitám byla zaznačena i příslušná pěstovaná plodina.

Tabulka č. 4: Seznam herbářových položek chudelky metlice (*Apera spica-venti*) kraje Vysočina

Číslo lokality	Obec nejbližší místu sběru	Pěstovaná plodina	Čísla herbářových položek
1	Kozlov	ozimá pšenice	1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5
2	Perknov	ozimý ječmen	2/1, 2/2, 2/3, 2/4, 2/5
3	Havlíčkův Brod	ozimá pšenice	3/1, 3/2, 3/3, 3/4, 3/5
4	Vysoké Studnice	ozimá pšenice	4/1, 4/2, 4/3, 4/4, 4/5
5	Zvonějov	ozimá pšenice	5/1, 5/2, 5/3, 5/4, 5/5
6	Jitkov	ozimá pšenice	6/1, 6/2, 6/3, 6/4, 6/5
7	Přibyslav	ozimý ječmen	7/1, 7/2, 7/3, 7/4, 7/5
8	Oudoleň	ozimá pšenice	8/1, 8/2, 8/3, 8/4, 8/5
9	Malá Losenice	ozimý ječmen	9/1, 9/2, 9/3, 9/4, 9/5
10	Hurtova Lhota	ozimá pšenice	10/1, 10/2, 10/3, 10/4, 10/5
11	Pohled	ozimá pšenice	11/1, 11/2, 11/3, 11/4, 11/5
12	Utín	ozimá pšenice	12/1, 12/2, 12/3, 12/4, 12/5
13	Veselý Ždár	ozimá pšenice	13/1, 13/2, 13/3, 13/4, 13/5
14	Vadín 1	ozimá pšenice	14/1, 14/2, 14/3, 14/4, 14/5
15	Papšíkov 1	ozimá pšenice	15/1, 15/2, 15/3, 15/4, 15/5
16	Knyk	ozimá pšenice	16/1, 16/2, 16/3, 16/4, 16/5
17	Olešná 1	ozimá pšenice	17/1, 17/2, 17/3, 17/4, 17/5
18	Olešná 2	ozimá pšenice	18/1, 18/2, 18/3, 18/4, 18/5
19	Chlum	ozimá pšenice	19/1, 19/2, 19/3, 19/4, 19/5
20	Lučice	ozimá pšenice	20/1, 20/2, 20/3, 20/4, 20/5
21	Papšíkov 2	ozimá pšenice	21/1, 21/2, 21/3, 21/4, 21/5
22	Okrouhlice	ozimá pšenice	22/1, 22/2, 22/3, 22/4, 22/5
23	Vadín 2	ozimá pšenice	23/1, 23/2, 23/3, 23/4, 23/5
24	Herálec	ozimá pšenice	24/1, 24/2, 24/3, 24/4, 24/5

Tabulka č. 5: Seznam herbářových položek chundelky metlice (*Apera spica-venti*) Olomouckého a Moravskoslezského kraje. Všechny lokality s výjimkou lokalit č. 27, 28, 29, 30 patří do Olomouckého kraje.

Číslo lokality	Obec nejbližší místu sběru	Pěstovaná plodina	Číslo herbářových položek
25	Dolany	ozimá řepka	25/1, 25/2, 25/3
26	Domašov nad Bystřicí	ozimá pšenice	26/1, 26/2, 26/3
27	Jakartovice	ozimá pšenice	27/1, 27/2, 27/3
28	Hlavnice	ozimá pšenice	28/1, 28/2, 28/3
29	Sádek	ozimá pšenice	29/1, 29/2, 29/3
30	Slavkov	ozimá pšenice	30/1, 30/2, 30/3
31	Šternberk	ozimá pšenice	31/1, 31/2, 31/3
32	Grygov	ozimá pšenice	32/1, 32/2, 32/3
33	Kožušany	ozimá pšenice	33/1, 33/2, 33/3
34	Vrbátky	ozimá pšenice	34/1, 34/2, 34/3
35	Držovice	ozimá pšenice	35/1, 35/2, 35/3
36	Mostkovice	ozimá pšenice	36/1, 36/2, 36/3
37	Vícov	ozimá pšenice	37/1, 37/2, 37/3
38	Stínava	ozimá pšenice	38/1, 38/2, 38/3
39	Protivanov 1	ozimá pšenice	39/1, 39/2, 39/3
40	Protivanov 2	ozimá pšenice	40/1, 40/2, 40/3
41	Vikýřovice	ozimá pšenice	41/1, 41/2, 41/3
42	Bludov	ozimý ječmen	42/1, 42/2, 42/3
43	Zábřeh	ozimá pšenice	43/1, 43/2, 43/3
44	Mohelnice	ozimá pšenice	44/1, 44/2, 44/3

4.2 Seznam použitých roztoků a médií

Roztoky:

2% CTAB: 2 g CTAB (hexadecyltrimethylamonium bromid); 4 ml 0,5 mol/dm³ EDTA (disodná sůl ethylendiaminteraoctové kyseliny); 10 ml 1 mol/dm³ TRIS (trihydroxymethylaminomethan); 28 ml 5 mol/dm³ NaCl doplněno do objemu 100 ml destilovanou vodou a následně filtrováno

1 mol/dm³ TRIS 1,21 g TRIS do 10 ml destilované vody; pH 8; autoklávováno

5x TBE pufr: 54 g TRIS-HCl; 27,5 g HBO₂; 20 ml 0,5 mol/dm³ EDTA; 1 l destilované vody; pH 8; filtrováno a zředěno na 0,5x TBE

0,5 mol/dm³ EDTA 1,86 g EDTA do 10 ml destilované vody; pH 8; autoklávováno

Další chemikálie:; 3 mol/dm³ octan sodný; agaróza (elektroforetická); izopropanol; chloroform : izoamylalkohol (poměr 24 : 1); 2-merkптоethanol; 70% ethanol; Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA); primery pro PCR (Generi Biotech, Česká republika); destilovaná voda

Komerční kity: FastStart PCR Master (Roche, Německo); 6x Gel Loading Buffer (Takara, Japonsko); HyperLadder 100bp (Bioline, USA); GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich, USA)

4.3 Vybavení laboratoře

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf, Německo), centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), centrifuga 5415D (Eppendorf, Německo), minicentrifuga MCF 2360 (LMS, Japonsko), Transilluminátor UVT-20M (Herolab, Německo) s digitálním fotoaparátem (Kodak EDAS 290), Termocycler TCXP, XP (Bioer, Čína), termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer, Čína), NanoDrop 1000, NanoDrop 2000, flowbox, digestoř, mikrovlnná trouba, elektroforetická aparatura, lednička, mrazicí box, magnetické míchadlo, analytické váhy, kádinky, odměrné válce, PCR mikrozkuřavky, centrifugační zkuřavky, sterilní špičky, dávkovací mikropipety, ochranné rukavice, třecí misky s tloučky, pinzety, parafilm, klasické a chladicí stojánky, výrobník na ledovou tříšť

4.4 Metody

4.4.1 Izolace DNA

Do třecí misky byl vložen vzorek chundelky metlice (*Apera spica-venti*) v podobě dvou středně velkých listů a následně byl pomocí tloučku rozdrcen na prach. Třecí miska byla vypláchnuta zahřátým roztokem 1 ml 2% CTAB a 2 μl 2-merkптоethanolu. Tento roztok byl zahřát na 65 °C a vypláchnut z třecí misky společně s rozdrceným prachem do mikrozkuřavky. Inkubováno 1,5 hodiny při 65 °C v termobloku. Po inkubaci bylo k roztoku přidáno 600 μl směsi chloroformu a izoamylalkoholu (v poměru 24 : 1), protřepáno a necháno 5 min stát. Následně byl roztok 15 min centrifugován v centrifuze chlazené na 4 °C při 11 000 otáčkách/min. Horní vrstva byla odebrána do nové

mikrozkumavky, pak se zopakoval poslední krok. Poté bylo přidáno 60 μl 3 mol/dm³ octanu sodného a 500 μl izopropanolu. Směs byla pomalu promíchána převrácením a inkubována přes noc (popř. minimálně 30 min) v mrazicím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubaci byla provedena centrifugace 30 min v centrifuze chlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 11 000 otáčkách/min. Jedním tahem byl slit supernatant a ke sražené DNA bylo přidáno 200 μl 70% ethanolu z mrazicího boxu. Dále centrifugováno bez promíchání roztoku v centrifuze chlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 11 000 otáčkách/min. Po centrifugaci byl slit ethanol a sražená DNA byla rozpuštěna ve 200 μl sterilní destilované vody. Byla stanovena koncentrace DNA za pomoci přístroje NanoDrop 1000 nebo NanoDrop 2000. Vzorky byly uchovány v mrazicím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně použity pro polymerázovou řetězovou reakci.

4.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zředěná genomická DNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za použití specifických primerů. Podmínky pro PCR jsou zaznamenány v tabulce č. 6 a 7. V závislosti na zkoumané oblasti genu *als* byla zvolena kombinace primerů ALS375for a ALS375rev, viz tabulka č. 8. Tato kombinace nám umožňuje detekovat možnou substituci aminokyseliny na pozici Pro₁₉₇.

Tabulka č. 6: Složení PCR mixu pro jednu reakci

Reakční složky	Objem [μl]
FastStart PCR Master (Roche, Německo)	12,5
Forward primer (Generi Biotech, Česká republika)	0,5
Reverse primer (Generi Biotech, Česká republika)	0,5
Sterilní destilovaná voda	10,5
Genomická DNA	1
Celkový reakční objem	25

Tabulka č. 7: Časový a teplotní profil PCR reakce (upraveno dle Massa *et al.*, 2011)

Počet cyklů	Fáze	Teplota	Doba cyklu
1	Počáteční denaturace	94°C	3 min
35	Denaturace	94°C	30 s
	Hybridizace primerů	55°C	30 s
	Prodlužování primerů	72°C	1 min
1	Konečné prodlužování primerů	72°C	10 min

Tabulka č. 8: Primery použité pro amplifikaci a sekvenaci oblasti genu *als* sloužící k detekci substituce aminokyseliny na pozici Pro₁₉₇ (Massa *et al.*, 2011)

Gen	Název primeru	Sekvence ve směru 5'->3'
<i>als</i>	ALS375for	CGAGCCCCGCAAGGGCGCCGACAT
<i>als</i>	ALS375rev	GTGATGGAGCGGGTGACCTCTA

4.4.3 Elektroforéza

Úspěšnost amplifikace PCR produktů byla hodnocena pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu v prostředí 0,5x TBE pufru. V mikrovlnné troubě byl postupně zahříván roztok 80 ml 0,5x TBE pufru s 0,8 g agarózy do doby, než došlo k úplnému rozpuštění agarózy. Do vzniklého 1% agarózového gelu bylo po mírném vychladnutí přidáno 1,6 µl barvy Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, USA), která v závěrečné fázi umožnila vizualizaci DNA. Připravený gel byl promíchán a nalit do předem připravené elektroforetické vany s hřebínky. Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyndány a vana byla přenesena do elektroforetické komůrky s 0,5x TBE roztokem tak, aby byl gel zcela ponořen. Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů byly do první jamky pipetou nanášeny 2 µl HyperLadderu 100bp (Bioline, USA). Na parafilmu byl smíchán 1 µl DNA se 4 µl destilované vody a s 1 µl nanášecího pufru Gel Loading Buffer (Takara, Japonsko). Připravené vzorky byly pipetou nanášeny do jamek. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji a elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 45 min. Po osušení gelu a přenesení do Transilluminátoru UVT-20M (Herolab, Německo) s digitálním fotoaparátem (Kodak EDAS 290) byla provedena vizualizace DNA a odečteny výsledky.

4.4.4 Purifikace PCR produktů, sekvenace

K rychlému přečištění PCR amplifikačních produktů byl použit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich, USA). Purifikace probíhá v několika krocích.

1. Do středu GenElute kolonky bylo pipetou nanášeno 500 µl přípravného roztoku *Column Preparation Solution* a centrifugováno při 12 000 otáčkách/min po dobu 30 s až 1 min. Eluát byl odstraněn. Tento krok maximalizuje navázání DNA na křemičitou membránku GenElute kolonky.

2. Do mikrozkušavky s 25 μ l PCR produktu bylo pipetou nanášeno 125 μ l (5x objem PCR produktu) roztoku pro navázání DNA *Binding solution*. Centrifugováno při 12 000 otáčkách/min po dobu 1 min. Eluát byl odstraněn.

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

4. Kolonka byla přenesena do nové 2 ml zkumavky a pipetou bylo do centra kolonky nanášeno 50 μ l elučního roztoku *Elution Solution*. Následovala inkubace po dobu 1 min při pokojové teplotě a centrifugace po 1 min při 12 000 otáčkách/min. Eluát představoval přečištěný PCR amplifikační produkt, připravený pro další použití či uchování v mrazicím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

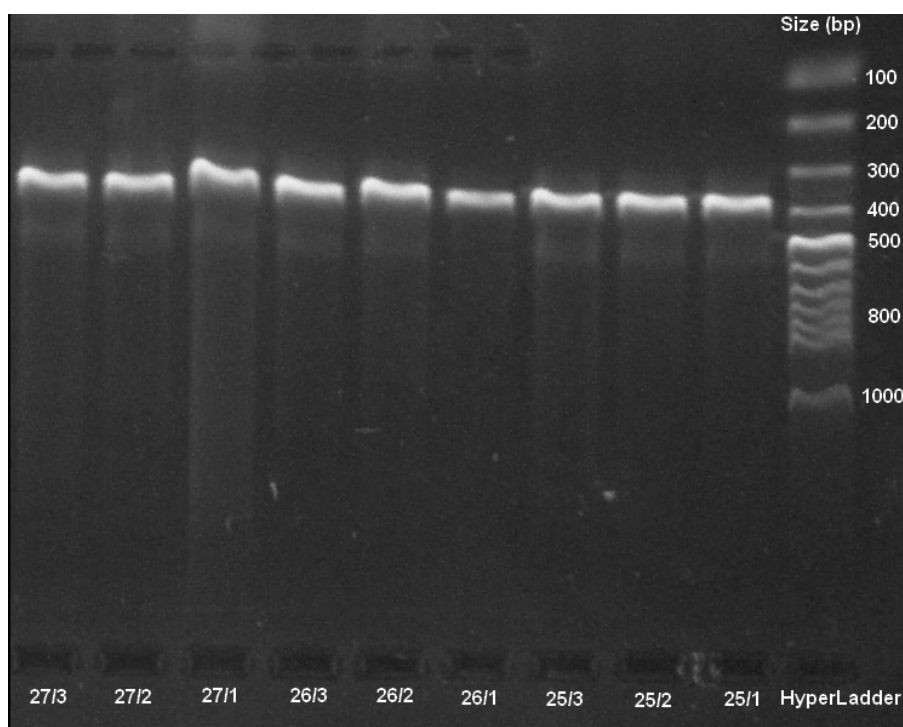
Koncentrace DNA přečištěného PCR produktu byla změřena za pomoci přístroje NanoDrop 1000 nebo NanoDrop 2000. Vzorky byly připraveny pro DNA sekvenování a to smícháním purifikovaného PCR produktu společně se sekvenačním primerem, viz tabulka č. 9. Každému amplifikovanému přečištěnému PCR produktu tak odpovídají dvě mikrozkušavky, jedna s primerem ALS375for a druhá s primerem ALS375rev. Vzorky proto byly přečíslovány a následně odeslány na sekvenování firmou SEQme s.r.o. v Dobříši, viz odkaz <http://www.seqme.eu/>.

Tabulka č. 9: Příprava vzorku pro sekvenování [6]

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

5 Výsledky

K molekulární detekci rezistence chundelky metlice (*Apera spica venti*) vůči ALS inhibujícím herbicidům bylo nasbíráno tři až pět jedinců rostliny chundelky metlice (*Apera spica venti*) na každé z 20 polních lokalit Olomouckého kraje, čtyř lokalit Moravskoslezského kraje a 24 lokalit kraje Vysočina. Celkem tedy bylo k molekulární analýze použito 195 herbarizovaných vzorků *Apera spica venti*. U každého vzorku byla provedena izolace DNA z listu, u většiny vzorků se podařilo vyizolovat DNA v dobré kvalitě. Ověření úspěšnosti amplifikace PCR produktů elektroforézou je ukázáno na obrázku č. 6. Vyizolovaná DNA byla použita pro sekvenaci firmou SEQme s.r.o. v Dobříši.



Obrázek č. 6: Ověření amplifikace PCR produktů elektroforetickou separací, jako molekulární marker byl použit HyperLadder 100bp (Bioline, USA).

K analýze sekvencí byl použit program Geneious Pro 5.6.6. Jednotlivé sekvence byly do tohoto programu vloženy ve formátu ab1. Ke každé zadní (reverse) konci sekvence byl vytvořen reverzní komplement a porovnán s předním (forward) koncem sekvence tak, aby byla genetická informace řádně přečtena.

Pomocí funkce „Align/Assembly“ byly získány sekvence zarovnané pod sebou tak, že shodné báze genetického kódu jsou na stejných pozicích, viz obrázek č. 7. Následovalo zaměření na jednotlivé nukleotidy kodonu kódující aminokyselinu Pro₁₉₇.

Celkem bylo detekováno sedm lokalit kraje Vysočina s jedinci, jejichž DNA obsahuje mutaci související se vznikem rezistence vůči ALS inhibujícím herbicidům, a dohromady 16 jedinců chundelky metlice (*Apera spica venti*). Mezi tyto lokality patří lokalita Zvonějov, Vadín 1 a 2, Papšíkov 1, Knyk, Lučice a Okrouhlice. V Olomouckém kraji byly detekovány čtyři lokality a celkem 6 jedinců chundelky metlice (*Apera spica venti*). Lokality s jedinci, jejichž DNA obsahuje mutaci související se vznikem rezistence, jsou Bludov, Mohelnice, Mostkovice a Vícov. V Moravskoslezském kraji byly potvrzeny dvě lokality s mutací související se vznikem rezistence, konkrétně lokalita Jakartovice a Slavkov s celkem čtyřmi jedinci.

Souhrn lokalit krajů, v jejichž polních lokalitách byly sbírány vzorky chundelky metlice (*Apera spica venti*) a následně molekulárně detekovány, jsou zobrazeny na přiložené mapce, viz obrázek č. 8 a 9. Zároveň byly červeně označeny lokality s přítomnou mutací v kodonu Pro₁₉₇ související se vznikem rezistence.

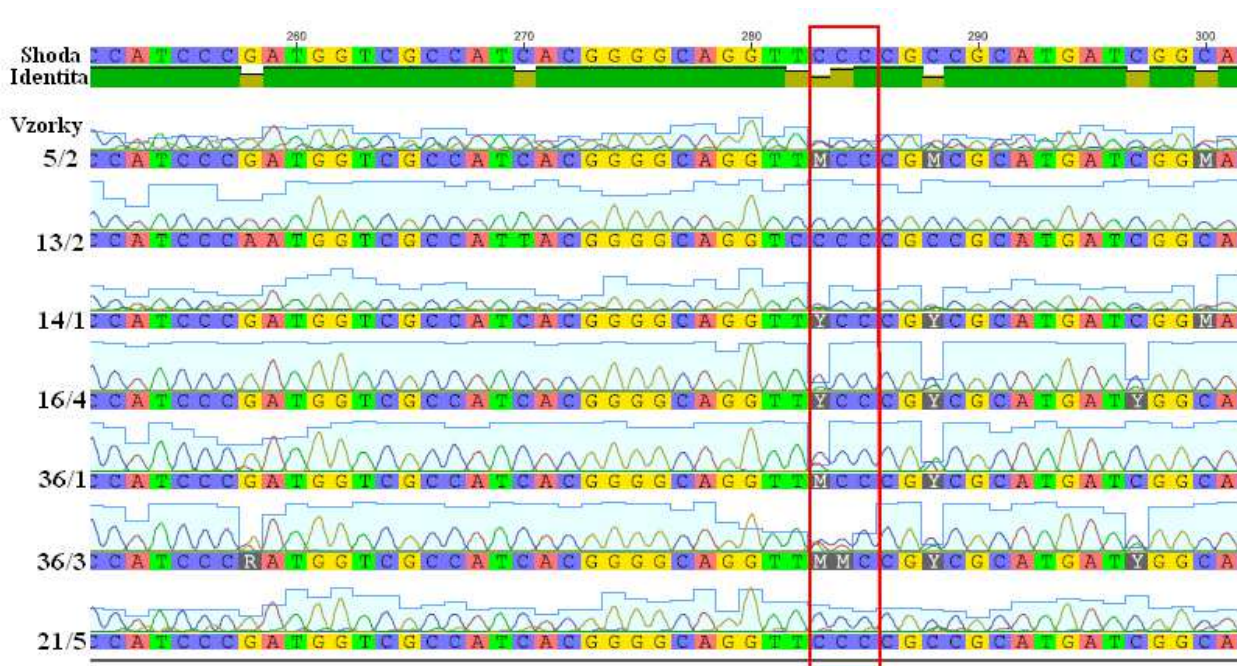
U herbářových položek č. 5/2 z lokality Zvonějov, 36/1, 36/2 z lokality Mostkovice a 42/1 z lokality Bludov byl nalezen polymorfismus v prvním nukleotidu kodonu Pro₁₉₇, viz obrázek č. 7. Vzorky jsou v tomto lokuse heterozygotní. Sekvenátor označil v sekvenci s přímým primerem smíšenou bázi M=cytosin/adenin. Kodon ACC je čten jako aminokyselina threonin. Substituce threoninu za Pro₁₉₇ souvisí se vznikem rezistence k ALS inhibujícím herbicidům.

U jedince č. 36/3 z lokality Mostkovice byl analyzován polymorfismus v prvních dvou nukleotidech kodonu Pro₁₉₇, viz obrázek č. 7. Sekvenátor označil v sekvenci s přímým i zpětným primerem triplet MMC. Možné kombinace tedy jsou AAC, CCC, CAC nebo ACC. V případě AAC je čtena aminokyselina asparagin, CCC prolin, CAC histidin, ACC threonin. V případě substituce asparaginen nebo threoninem by se jednalo o substituci související se vznikem rezistence.

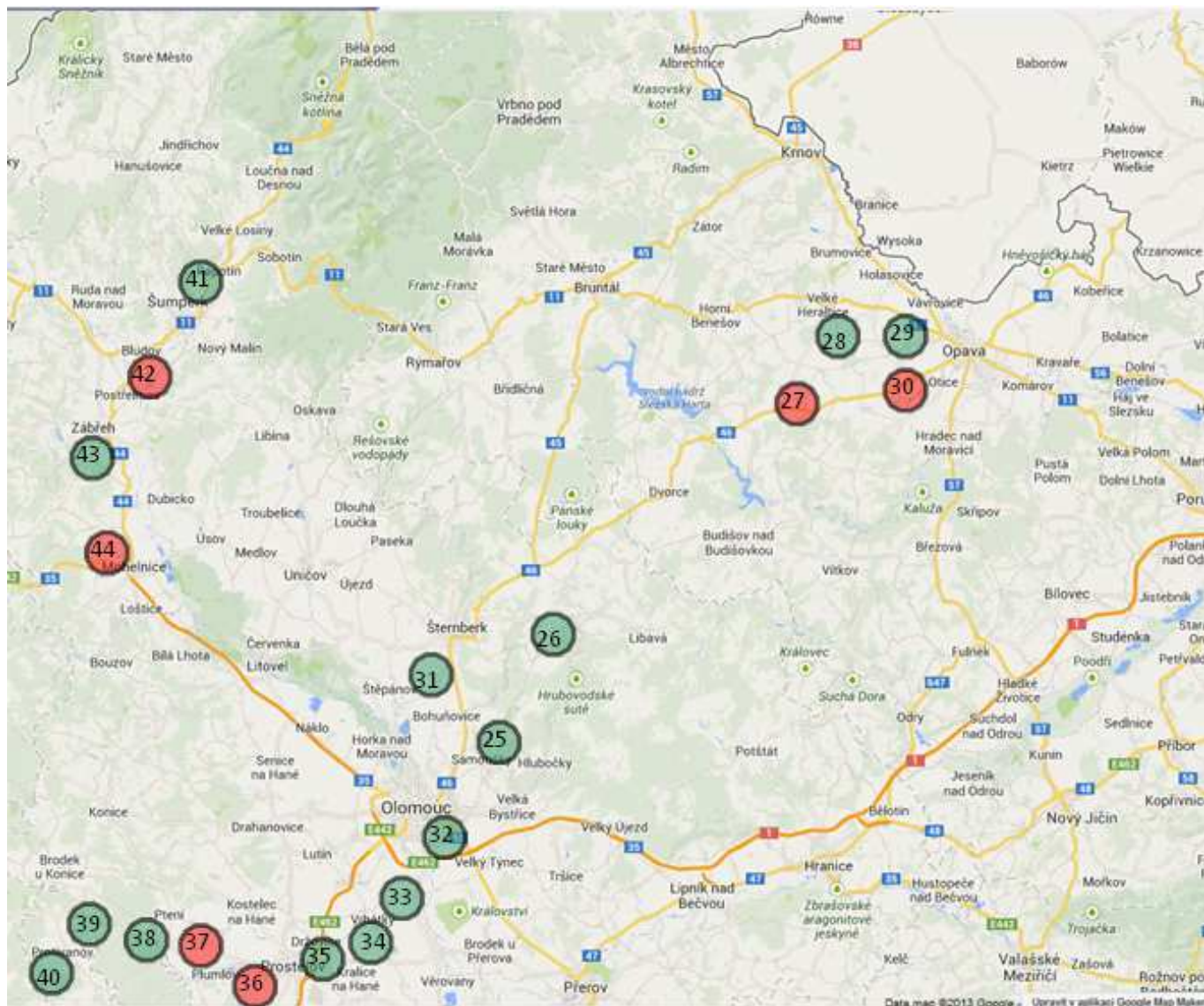
U vzorků č. 14/1, 14/2, 14/3, 14/4, 14/5 z lokality Vadín 1, 15/5 z lokality Papšíkov 1, 16/4, 16/5 z lokality Knyk, 20/1, 20/2, 20/3, 20/5 z lokality Lučice, 23/1, 23/2, 23/3, 23/4 z lokality Vadín 2, 27/1, 27/2, 27/3 z lokality Jakartovice, 30/3 z lokality Slavkov, 37/3 z lokality Vícov a 44/2 z lokality Mohelnice byl detekován

polymorfismus prvního nukleotidu v kodonu Pro₁₉₇. V sekvenci s přímým primerem sekvenátor označil na pozici prvního nukleotidu prolinu smíšenou bázi Y= cytosin/thymin, viz obrázek č. 7. Kodon TCC je čten jako aminokyselina serin, která souvisí se vznikem rezistence k ALS inhibujícím herbicidům.

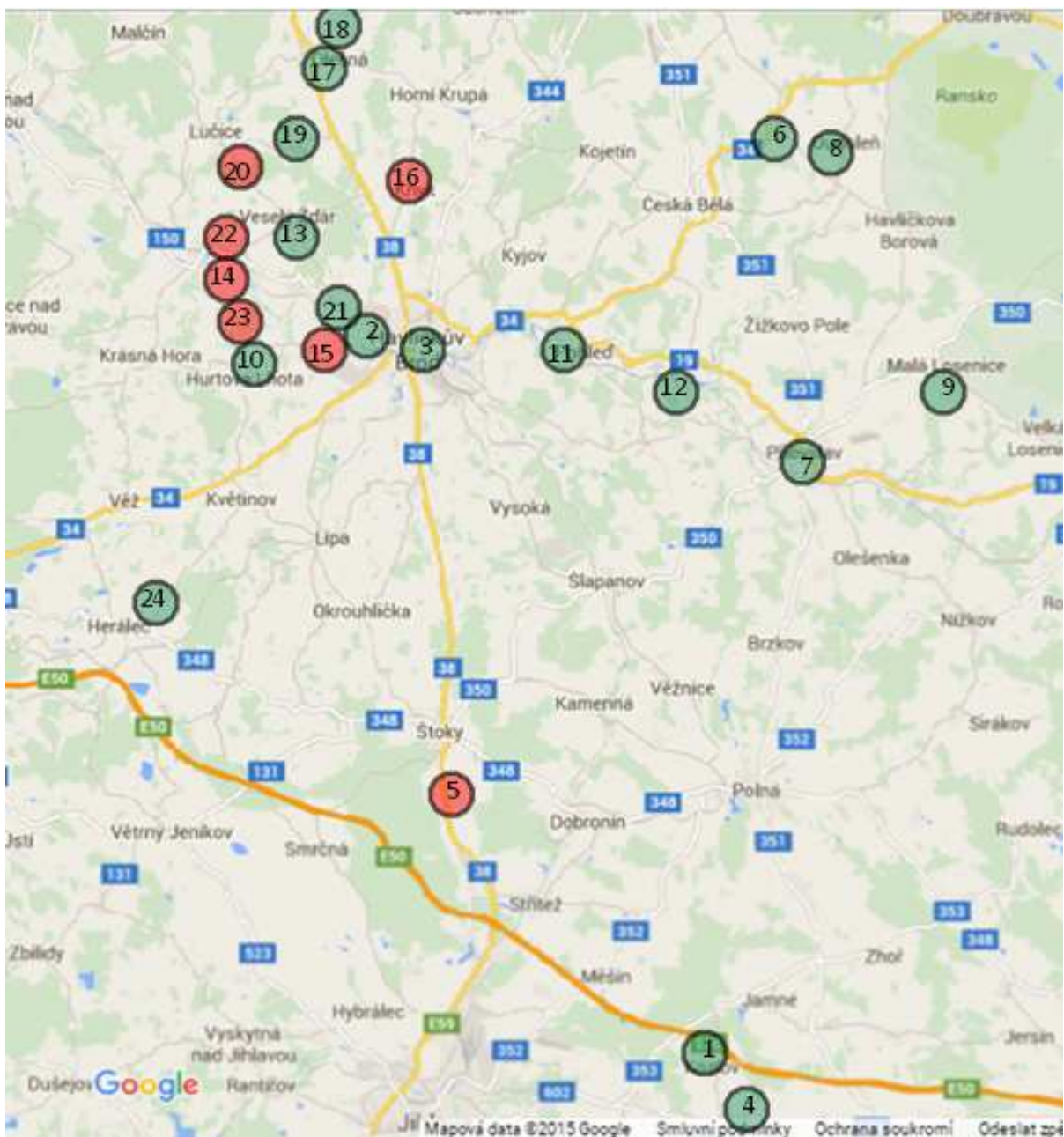
U všech ostatních vzorků chundelky metlice (*Apera spica venti*) kromě vzorku č. 24/1 byla aminokyselina prolin na pozici 197 kódována tripletem CCC, viz vzorky 13/2 a 21/5 na obrázku č.7. U herbářové položky č. 24/1 byl prolin určen tripletem CCA.



Obrázek č. 7: Srovnání sekvencí DNA u vzorků č. 5/2, 13/2, 14/1, 16/4, 36/1, 36/3 a 21/5 pomocí funkce „Align“ v programu Geneious Pro 5.6.6. Červeně je označená oblast genu *als* související se vznikem rezistence – triplet aminokyseliny Pro₁₉₇.



Obrázek č. 8: Polní lokality Olomouckého a Moravskoslezského kraje. Červeně je označená lokalita s alespoň jedním jedincem chundelky metlice (*Apera spica-venti*), u které byla analyzována mutace v Pro₁₉₇ související se vznikem rezistence vůči ALS inhibitorům. Ostatní lokality jsou označeny zeleně.



Obrázek č. 9: Polní lokality kraje Vysočina. Červeně je označená lokalita s alespoň jedním jedincem chundelky metlice (*Apera spica-venti*), u které byla analyzována mutace v Pro₁₉₇ související se vznikem rezistence vůči ALS inhibitorům. Ostatní lokality značeny zeleně.

6 Diskuse

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) je jednoletý ozimý plevel patřící do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Jedná se o konkurenčně velmi silný plevel, který dokáže při vyšší hustotě potlačit pěstovanou plodinu. Rozšíření chundelky metlice (*Apera spica-venti*) je spojeno s pěstováním ozimých plodin. (Kneifelová *et* Mikulka, 2003) Ztráty způsobuje především v ozimé pšenici a ječmeni. (Nováková *et al.*, 2005) Chundelka metlice (*Apera spica-venti*) se vyskytuje pravidelně na více než 80 % ploch ozimé pšenice v ČR, na zbylých se vyskytuje nepravidelně. (Jursík *et al.*, 2001) Soukup *et al.* (2005) uvádějí, že 31,6 % z dotazovaných zemědělců popisuje škody při sklizni způsobené přítomností tohoto plevele. V posledních letech došlo v ČR k zesilování výskytu a šíření *Apera spica-venti*, ve značné míře k tomuto procesu přispěly změny v pěstitelských systémech (Mikulka *et* Kneifelová, 2004) Byl také zaznamenán výskyt rezistentních biotypů chundelky metlice (*Apera spica-venti*) vůči ALS inhibitorům. ALS inhibitory jsou herbicidy pracující na bázi inhibice klíčového enzymu acetolaktát syntázy v rostlinné biosyntéze esenciálních aminokyselin valinu, leucinu, isoleucinu (Jursík *et al.*, 2010) a jsou řazeny mezi celosvětově nejpoužívanější. (Nováková *et al.*, 2007)

Od roku 2000 začaly přibývat případy selhání herbicidní regulace chundelky metlice (*Apera spica-venti*) při použití herbicidů na bázi inhibice acetolaktát syntázy. Poprvé byla rezistence u chundelky metlice (*Apera spica-venti*) potvrzena vůči chlorsulfuronu v Polsku v roce 2002, následně také v ČR v roce 2005 a ve stejném roce v Německu vůči sulfosulfuronu. (Massa *et al.*, 2011) Postupně přibývaly případy rezistence v dalších zemích, dosud byla potvrzena v 9 zemích: Francii, Německu, Dánsku, Švýcarsku, Švédsku, Rakousku, České republice, Polsku a v Litvě. Z hlediska rezistence vůči konkrétním třídám ALS herbicidů byla do dnešní doby ve světě prokázána rezistence vůči: sulfonylmočovinám, sulfonylaminokarbonyl-triazolinonům a triazolopyrimidinům. K imidazolinonům a pyrimidinyl(thio)benzoátům u chundelky metlice (*Apera spica-venti*) zatím rezistence nebyla potvrzena. [1]

První rezistentní populace v ČR byly potvrzeny v roce 2005 vůči chlorsulfuronu, rezistence byla identifikována metodou biologického testu a testu aktivity acetolaktát syntázy u 5 biotypů ze 40 lokalit (u nichž byla v předchozích letech neúspěšná regulace chlorsulfuronem). (Nováková *et al.*, 2006) V další studii byla nalezena rezistence i vůči sulfosulfuronu a iodofosulfuronu a také cross-rezistence k těmto třem herbicidům

současně. V této studii byla využita metoda biologické testu, aktivity enzymu ALS a polní experimenty. (Hamouzová *et al.*, 2010) V letech 2010–2013 byl proveden monitoring rezistence vůči inhibitorům ALS u 173 populací chundelky metlice (*Apera spica-venti*). Vzorky semen byly odebírány z polí, na kterých byly dlouhodobě používány sulfonylmočoviny. Kromě přechozích byla pomocí biologického testu detekována ještě cross-rezistence k účinné látce pyroxsulam a nízká rezistence k isoproturonu. (Košnarová *et al.*, 2014) V roce 2013 byla publikována studie, ve které byly potvrzeny rezistentní biotypy vůči sulfometuron-methylu. (Hamouzová *et al.*, 2014) Souhrnem můžeme říci, že v ČR je známa rezistence k účinným látkám: chlorsulfuron, iodosulfuron-methyl-sodium, isoproturon, mesosulfuron-methyl, pyroxsulam a sulfosulfuron, může se vyskytovat ještě křížová rezistence k dalším herbicidům ze skupiny inhibitorů ALS a PSII. V ČR byly rezistentní biotypy chundelky metlice (*Apera spica-venti*) potvrzeny v porostech obilovin, především v ozimé pšenici. [1] V souvislosti s výše uvedeným byly v této diplomové práci až na několik výjimek rostliny chundelky metlice (*Apera spica-venti*) sbírány na polích s ozimou pšenicí.

Rezistence vůči herbicidu je vždy spojena s otázkou, jaký typ rezistence se u daného plevele vyvinul. Rezistence může být způsobena změnou v místě účinku herbicidu (target-site rezistence) nebo jiným mechanismem, např. zvýšenou metabolickou detoxikací herbicidu (nontarget-site rezistence). Principem target-site rezistence je modifikace vazebného místa herbicidu způsobená mutací v genu inhibovaného enzymu. (Nováková *et al.*, 2007)

V poslední době začínají mít v herbologii stále větší uplatnění molekulárně-genetické detekční metody, jež spočívají v přímém důkazu sekvence DNA kódující změnu v pořadí aminokyselin, čímž jde i o změnu vazebného místa. (Nováková *et al.*, 2007) Gen enzymu ALS byl sekvenován u řady různých plevelů. (Massa *et al.*, 2011) V souvislosti s problémem výskytu rezistentních biotypů chundelky metlice (*Apera spica-venti*) se několik autorů začalo zabývat detekcí mutací v genu *als* u tohoto plevele.

V roce 2011 byla publikována studie zabývající se identifikací molekulárního pozadí rezistence u chundelky metlice vůči ALS inhibitorům v Polsku. Cílem této studie bylo přiřazení jednotlivých mutací k odolnosti vůči specifickým herbicidům a stupeň propůjčené rezistence. Autoři identifikovali rezistentní jedince vůči některým účinným

látkám ze skupiny ALS inhibitorů pomocí biologického testu a následně provedli molekulární analýzu. Amplifikace metodou PCR a sekvenace *als* domén (kodony 122, 197, 205, 574, 653 a 654) prokázala četné jednonukleotidové polymorfismy. Autoři analyzovali substituci serinu, nebo threoninu za Pro₁₉₇ a záměnu valinu za Ala₁₂₂. Substituce valinu za alanin na pozici 122 byla poprvé hlášena v této studii a byla spojena s rezistencí vůči chlorsulfuronu a mesosulfuronu + iodosulfuronu. Substituce serinu, nebo threoninu za Pro₁₉₇ dokazovala silnou rezistenci vůči chlorsulfuronu, sulfosulfuronu, mesosulfuronu + iodosulfuronu a procarbzone-sodiu. Na druhou stranu ne všechny rostliny, které přežily ošetření herbicidem, vykazovaly mutace ve studovaných doménách. (Krysiak *et al.*, 2011)

Ve stejném roce byla publikována studie s názvem Target-site rezistence k ALS inhibujícím herbicidům v populacích *Apera spica-venti* způsobená dokumentovanými i dříve neznámými mutacemi. Populace použité k testování pocházely z polí, kde v minulých letech přežily ošetření ALS inhibujícími herbicidy. V této studii bylo testováno 72 populací. Spojením metody biologického testu a molekulárně-genetické analýzy byla odhalena mutace Thr na pozici Pro₁₉₇ v rámci 67 populací, mutace Leu na Trp₅₇₄ u dvou populací, mutace Asn na Pro₁₉₇ u dvou populací. Výsledky sekvenování potvrzené biologickým testem ukázaly dosud nehlášenou mutaci Asn na Pro₁₉₇ a mutaci His na Arg₃₇₇. Zapojení těchto mutací do target-site rezistence bylo potvrzeno na základě výsledků sekvenování celého genu *als* a analýzy aktivity enzymu ALS, která ukázala významné snížení inhibice enzymu ve srovnání s citlivým biotypem. Tato studie jako první zdokumentovala kompletní gen *als* u *Apera spica-venti*, v GenBance nalezneme pod HM458301.1 (citlivý biotyp). (Massa *et al.*, 2011)

V roce 2014 byla publikována studie zabývající se mechanismem rezistence k ALS inhibitorům u chundelky metlice (*Apera spica-venti*) v ČR. Cílem této studie byla detekce molekulární báze a objasnění mechanismu rezistence u populací s rozdílným stupněm rezistence. Rezistentní jedinci chundelky metlice (*Apera spica-venti*) byli sbíráni na polích s ozimou pšenicí, na kterých selhala herbicidní regulace za použití sulfonylmočovín. Nejprve byly identifikovány rezistentní biotypy vůči sulfometuron-methylu pomocí biologického testu. Následně sekvenování fragmentů (obsahující dříve identifikované rezistenci přiřazující mutace) genu *als* rezistentních biotypů vedlo k identifikaci čtyř mutací, konkrétně v kodonu aminokyselin Pro₁₉₇ a

Trp₅₇₄. Na pozici 197 došlo ke změně původní aminokyseliny prolin na alanin a ke změně na threonin. Na pozici Trp₅₇₄ byla detekována, dosud u žádného rostlinného druhu nehlášená, substituce methioninem. Ve většině případů bývá tryprofan substituován leucinem, tato mutace byla také ve studii prokázána. V této studii byl sekvenován kompletní gen *als* citlivého jedince *Apera spica-venti* a vložen do GenBanky jako JN646110.1. K určení proporce target-site rezistentních jedinců v populaci byla použita restriční analýza. V populaci lokality Dynín bylo analyzováno 65 % rezistentních heterozygotů a 2 % rezistentních homozygotů v Pro₁₉₇. V populaci lokality Lomnice byli potvrzeni pouze rezistentní homozygoti. Dále bylo prokázáno větší procento rezistentních jedinců ve všech lokalitách, než bylo detekováno rezistentních genotypů, což indukuje přítomnost ještě dalšího mechanismu rezistence kromě target-site rezistence. (Hamouzová et al., 2014)

Shrnutím výše uvedených studií, můžeme uvést, že do dnešní doby byly ve světě detekovány čtyři aminokyseliny spojené se vznikem ALS rezistence u *Apera spica venti*. Jedná se o aminokyseliny Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Arg₃₇₇ a Trp₅₇₄. Mutací způsobená substituce aminokyselin Val za Ala₁₂₂, His za Arg₃₇₇, Leu nebo Met za Trp₅₇₄, či Thr, Asn, Ser nebo Ala za Pro₁₉₇ souvisí se vznikem rezistence k ALS inhibujícím herbicidům u chundelky metlice (*Apera spica venti*). [1]

Předložená diplomová práce se zaměřuje na princip monitorování přítomnosti rezistentních jedinců chundelky metlice (*Apera spica venti*) vůči ALS inhibitorům na zemědělských lokalitách použitím molekulárně-genetických metod. K molekulární detekci target-site rezistence byli shromážděni jedinci rostliny chundelky metlice (*Apera spica venti*) z polních lokalit Olomouckého, Moravskoslezského a kraje Vysočina. U každého vzorku byla provedena izolace DNA z listu, amplifikace oblasti genu *als* obsahující Pro₁₉₇, sekvenace a bioinformatická analýza.

Dále jsou porovnány výsledky diplomové práce s výše uvedenými studiemi, zabývajícími se molekulární detekcí rezistence. V této diplomové práci byly detekovány substituce threonin a serin na pozici Pro₁₉₇ spojené se vznikem rezistence chundelky metlice (*Apera spica venti*) vůči ALS inhibitorům. Nejčastěji nalezená substituce serin za prolin na pozici 197 byla detekována u 22 jedinců. Tuto substituci potvrzují Krysiak et al. (2011), v polské studii publikované v roce 2011, jako substituci související se vznikem rezistence. Substituce serinu je spojena dle *International Survey of Herbicide-*

Resistant Weeds se vznikem rezistence vůči sulfonylmočovinám nebo sulfonylaminokarbonyl-triazolinonům. [1] Substitute threoninem byla molekulárně prokázána u čtyř jedinců chundelky metlice (*Apera spica-venti*). Tuto mutaci uvádějí také Hamouzová *et al.* (2014). Substitute threoninu je spojena dle *International Survey of Herbicide-Resistant Weeds* se vznikem rezistence vůči sulfonylmočovinám nebo sulfonylaminokarbonyl-triazolinonům nebo triazolopyrimidinům. [1] Hamouzová *et al.* (2014) uvádějí většinu rezistentních biotypů chundelky metlice (*Apera spica-venti*) homozygotních na pozici Pro₁₉₇. V této diplomové práci byli všichni analyzovaní jedinci s mutací na Pro₁₉₇ heterozygoti. Výsledky studie autorů Massa *et al.* (2011) potvrzují častý výskyt mutace Thr na Pro₁₉₇ v target-site rezistenci u populací *Apera spica-venti*, ačkoliv u ostatních plevelných druhů se častěji objevuje mutace Ser za Pro₁₉₇. Porovnáme-li tyto výsledky s výsledky diplomové práce, zjistíme, že v této práci byla častěji detekována mutace Ser za Pro₁₉₇. Tento rozdíl může být způsoben malým počtem hodnocených jedinců. Důležité je také zmínit možnost vícenásobných rezistencí podmiňujících záměn aminokyselin v ALS enzymu. Hamouzová *et al.* (2014) uvádějí, že byli identifikováni jedinci se zároveň dvěma rozdílnými rezistentními alelami, konkrétně na pozici Pro₁₉₇ a zároveň na Trp₅₇₄. Vzhledem k vybrané oblasti genu *als* obsahující kodon pro aminokyselinu Pro₁₉₇, která byla v této diplomové práci sekvenována a analyzována, nemohla být prokázána přítomnost zároveň dvou rezistentních alel. Zajímavé by bylo sekvenovat oblast genu *als* v širším rozsahu a zkoumat tak možnost přítomnosti zároveň více mutací spojených s rezistencí.

Porovnáním mapy výskytu chundelky metlice (*Apera spica-venti*) v ČR v ozimé pšenici z roku 2005 (Soukup *et al.*, 2005) s polními lokalitami (s ozimou pšenicí) této diplomové práce byl zaznamenán výskyt chundelky metlice (*Apera spica-venti*) navíc v okolí Olomouce a Zábřehu. V této diplomové práci byly potvrzeny dvě lokality s rezistencí v Moravskoslezském kraji v blízkosti Opavy. Jedná se o lokalitu Jakartovice a Slavkov. V souvislosti s potvrzenými rezistentními biotypy v Polsku by mohla být předmětem další studie možnost šíření rezistentních populací do ČR a jejich vzájemná příbuznost.

Molekulárně-genetické metody se v porovnání s metodou biologického testu pro monitorování rezistentních populací na polních lokalitách jeví jako časově výhodnější. (Nováková *et al.*, 2006) Izolace rostlinné DNA může být provedena ze zelené hmoty

plevelných rostlin identifikovaných na poli mezi plodinou. Gen zodpovědný za rezistenci k určitému typu herbicidu může být pomocí PCR amplifikován a místo mutace určeno analýzou sekvence nebo restriční analýzou. Metoda biologického testu je prostorově a časově náročnější, je třeba počítat s dormancí semen, růstem sazenic, aplikací herbicidu a hodnocením výsledků. (Mikulka *et* Slavíková, 2008) Na základě genetických analýz může zemědělec velmi rychle uplatnit správné postupy ochrany rostlin v rámci jeho zemědělské činnosti.

7 Závěr

V této diplomové práci byl v teoretické části shrnut současný stav řešené problematiky. V praktické části byl metodicky zvládnut princip monitorování přítomnosti rezistentních jedinců chundelky metlice (*Apera spica venti*) vůči ALS inhibitorům na zemědělských lokalitách použitím molekulárních metod. Monitoring rezistentních jedinců byl proveden na polích v lokalitách Olomouckého, Moravskoslezského kraje a kraje Vysočina. Na základě sekvenčních dat byly analyzovány přítomné mutace v kodonu aminokyseliny Pro₁₉₇ související se vznikem rezistence vůči ALS inhibitorům. Konkrétně byly potvrzeny mutací způsobené substituce aminokyselin serin a threonin za aminokyselinu Pro₁₉₇. Tyto mutace jsou dle publikovaných studií spojeny se vznikem rezistence vůči ALS inhibitorům. Substituce serinu za Pro₁₉₇ byla detekována u 22 jedinců, substituce threoninu u 4 jedinců chundelky metlice (*Apera spica venti*). Souhrnem bylo detekováno sedm lokalit kraje Vysočina, čtyři lokality Olomouckého kraje a dvě lokality Moravskoslezského kraje s jedinci, jejichž DNA obsahuje mutaci související se vznikem rezistence vůči ALS inhibitorům.

Metodika by mohla být dále rozšířena ve smyslu většího množství vzorků odebraných z dané lokality a zapojení např. metody biologického testu, díky kterému by došlo k ověření rezistence vůči konkrétním účinným látkám ALS herbicidů. Sekvenování by mohlo být zaměřeno nejen na doménu Pro₁₉₇, ale i na další domény potvrzené v publikovaných studiích. Mohl by tak být studován vliv přítomnosti zároveň dvou a více rezistenci podmiňujících substitucí na rezistenci vůči konkrétním účinným látkám. Dále by mohla být metodika rozšiřována ve směru nalezení vhodných markerů pro rezistenci tak, aby byla snadno použitelná v praxi, jednak pro monitoring rezistence tak pro následné uplatnění správných postupů ochrany rostlin.

8 Seznam použitých zkratek

ACC	acetyl koenzym A karboxyláza
AHAS	acetohydroxyacid syntáza
ALS	acetolaktát syntáza
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTP	chloroplastový tranzitní peptid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	disodná sůl ethylendiaminteraoctové kyseliny
EPSPS	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza
EWRS	European Weed Research Society
GMO	geneticky modifikované organizmy
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
IMI	imidazolinony
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PSII	fotosystém II
PTB	pyrimidinyl(thio)benzoáty
SCT	sulfonylaminokarbonyl-triazolinony
SU	sulfonylmočoviny
TP	triazolopyrimidiny
TRIS	trishydroxymethylaminomethan
WSSA	Weed Science Society of America

9 Seznam použité literatury

- 1 DVOŘÁK, Jiří a Vladimír SMUTNÝ. *Herbologie - Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 186 s. ISBN 978-80-7157-732-4.
- 2 GADAMSK, Grzegorz, Dorota CIARKA, Jonathan GRESSEL a Stanislaw W. GAWRONSKI. Negative cross-resistance in triazine-resistant biotypes of *Echinochloa crus-galli* and *Conyza canadensis*. *Weed science*. 2000, roč. 48, č. 2, s. 176-180.
- 3 HAMOUZOVÁ, Kateřina, Josef SOUKUP, Miroslav JURŠÍK, Pavel HAMOUZ, Veronika VENCLOVÁ a Pavlína TŮMOVÁ. Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Weed Research*. 2010, roč. 51, č. 2, s. 133-122.
- 4 HAMOUZOVÁ, Kateřina, Jaroslav SALAVA, Josef SOUKUP, Daniela CHODOVÁ a Pavlína KOŠNAROVÁ. Weed Resistance to Herbicides in the Czech Republic: History, Occurrence, Detection and Management. In: HASANEEN, Mohammed Naguib Abd El-Ghany. *Herbicides: mechanisms and mode of action*. Rijeka: InThech, 2011, s. 84-102. ISBN 9789533077444.
- 5 HAMOUZOVÁ, Kateřina, Miroslav JURŠÍK a Pavlína KOŠNAROVÁ. Rezistence plevelů vůči herbicidům. *Agrotip*. 2012, č. 9, s. 6-7.
- 6 HAMOUZOVÁ, Kateřina, Pavlína KOŠNAROVÁ, Jaroslav SALAVA, Josef SOUKUP a Pavel HAMOUZ. Mechanisms of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Pest Management Science*. 2014, roč. 70, č. 4, s. 541-548.
- 7 HRON, František a Aleš VODÁK. *Polní plevelé a boj proti nim*. Vyd. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1959, 373 s.
- 8 JURŠÍK, Miroslav, Josef SOUKUP, Josef HOLEC a Jiří ANDR. Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Inhibitory acetolaktát syntázy (ALS inhibitory). *Listy cukrovarnické a řepařské: odborný časopis pro obor cukrovka-cukr*. Praha: VUC Praha, a. s. ve spolupráci s ČMCS a SPC, 2010, roč. 126, č. 11, s. 377-379. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/376-379.PDF

- 9 JURSIK, Miroslav, Josef HOLEC, Pavel HAMOUZ a Josef SOUKUP. *Plevelé: biologie a regulace*. Vyd. 1. České Budějovice: Kurent, 2011, 232 s. ISBN 978-80-87111-27-7.
- 10 JURSIK, Miroslav, Kateřina HAMOUZOVÁ, Josef SOUKUP a Josef HOLEC. Rezistence plevelů vůči herbicidům a problémy s rezistentními populacemi v ČR. *Listy cukrovarnické a řepářské: odborný časopis pro obor cukrovka-cukr*. Praha: VUC Praha, a. s. ve spolupráci s ČMCS a SPC, 2011a, roč. 127, č. 4, s. 123-128. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2011/PDF/123-129.pdf
- 11 KAZDA, Jan, Jan MIKULKA a Evženie PROKINOVÁ. *Encyklopedie ochrany rostlin: polní plodiny*. Praha: Profi Press, 2010, 399 s. ISBN 978-80-86726-34-2.
- 12 KLEM, Karel a Lenka ŠKUBALOVÁ. Rozhodovací a diagnostické metody v regulaci plevelných společenstev. In: *Biologie a regulace plevelů: sborník ze semináře konaný [sic] 25.11.2003 ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze 6-Ruzyni*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2003, s. 59-65. ISBN 80-86555-33-X.
- 13 KNEIFELOVÁ, Marta a Jan MIKULKA. *Významné a nově se šířící plevelé*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2003, 59 s. ISBN 80-727-1142-3.
- 14 KOHOUT, Václav. *Herbologie: plevelé a jejich regulace*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 1996, 115 s. ISBN 80-213-0308-5.
- 15 KOŠNAROVÁ, Pavlína, Kateřina HAMOUZOVÁ a Josef SOUKUP. Chundelka metlice rezistence vůči sulfonylmočovinám. *Časopis pro rostlinnou výrobu vyd. Min. Zemědělství a Výživy*. 2011, č. 8, s. 16-17.
- 16 KOŠNAROVÁ, Pavlína, Kateřina HAMOUZOVÁ a Josef SOUKUP. Vývoj herbicidní rezistence u chundelky metlice v ČR. *Časopis pro rostlinnou výrobu vyd. Min. Zemědělství a Výživy*. 2014, č. 12, s. 10-14.
- 17 KRYSIAK, Michał, Stanisław GAWROŃSKI, Kazimierz ADAMCZEWSKI a Roman KIERZEK. ALS gene mutations in *Apera spica-venti* confer broad-range resistance to herbicides. *Journal of Plant Protection Research*. 2011, roč. 51, č. 3, s. 26-267.
- 18 MASSA, Dario, Roland GERHARDS a Björn KRENZ. Target-site resistance to als-inhibiting herbicides in silky bent grass (*Apera spica-venti* L. Beauv.)

- populations is conferred by documented and previously unknown mutations. *Weed Research*. 2011, roč. 51, č. 3, s. 294-303.
- 19 MASSA, Dario. *Investigations on herbicide resistance in *Apera spica-venti* populations*. Palermo, 2011. Disertační práce. University of Hohenheim, Faculty of Agricultural Sciences.
- 20 MIKULKA, Jan, Daniela CHODOVÁ a Václav KOHOUT. *Plevelné rostliny polí, luk a zahrad*. Vyd. 1. Praha: Farmář-Zemědělské listy, 1999, 160 s. ISBN 80-902-4132-8.
- 21 MIKULKA, Jan a Daniela CHODOVÁ. *Hubení plevelů odolných vůči herbicidům*. Vyd. 3. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2002, 54 s. ISBN 80-727-1116-4.
- 22 MIKULKA, Jan a Marta KNEIFELOVÁ. Příčiny přemnožení chundelky metlice. *Úroda časopis pro rostlinnou výrobu vyd. Min. Zemědělství a Výživy*. 2004, č. 9, s. 3-5.
- 23 MIKULKA, Jan a Marta KNEIFELOVÁ. *Plevelné rostliny*. Vyd. 2. Praha: Profi Press, 2005, 148 s. ISBN 80-86726-02-9.
- 24 MIKULKA, Jan a Lucie SLAVÍKOVÁ. *Metody diagnostiky a regulace rezistentních populací plevelů vůči herbicidům: uplatněná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008, 39 s. ISBN 978-80-87011-50-8.
- 25 MIKULKA, Jan. *Plevele polních plodin*. Vyd. 1. Praha: Profi Press, 2014, 179 s. ISBN 978-80-86726-60-1.
- 26 NEVE, Paul a Stephen POWLES. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity*. 2005, roč. 95, č. 6, s. 485-492.
- 27 NOVÁKOVÁ, Kateřina, Josef SOUKUP, Pavel HAMOUZ a Jan NÁMĚSTEK. Chundelka metlice (*Apera spica-venti* L. Beauv.): Regulace výskytu v polních plodinách. *Rostlinolékař*. 2005, č. 5, s. 24-26.
- 28 NOVÁKOVÁ, Kateřina, Josef SOUKUP, Jean WAGNER, Pavel HAMOUZ a Jan NÁMĚSTEK. Chlorsulfuron resistance in silky bent-grass (*Apera spica-venti* (L.) Beauv.) in the Czech Republic. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*. 2006, s. 139-146.

- 29 NOVÁKOVÁ, Kateřina, Josef SOUKUP a Jan NÁMĚSTĚK. Problémů s rezistencí plevelů přibývá i v ČR. *Úroda časopis pro rostlinnou výrobu vyd. Min. Zemědělství a Výživy*. 2007, č. 10, s. 54-55.
- 30 PIKULA, Jiří, Dagmar OBDRŽÁLKOVÁ a Milan ZAPLETAL. *Polní, zahradní a lesní plevely České republiky*. Praha: Peres, 1997, 256 s. ISBN 8090169198.
- 31 POWLES, Stephen a Qin YU. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, č. 61, s. 317-347.
- 32 PROKOP, Martin. Vznik a rozšíření rezistence plevelů vůči herbicidům. *Rostlinolékař*. 2009, č. 2, s. 15-16.
- 33 PROKOP, Martin. Obrana plevelů proti ošetření herbicidy. *Rostlinolékař*. 2009a, č. 4, s. 35-37.
- 34 SALAVA, Jaroslav a Daniela CHODOVÁ. The present state of herbicide resistance of weed populations in the Czech Republic. *Journal of plant protection research*. 2007, roč. 47, č. 4, s. 437-444.
- 35 SOUKUP, Josef, Kateřina NOVÁKOVÁ, Pavel HAMOUZ a Jan NÁMĚSTEK. Chundelka metlice - *Apera spica-venti* (L.) Beauv. Biologie, ekologie a hospodářská škodlivost. *Rostlinolékař*. 2005, č. 4, s. 25-27.
- 36 STÝBLOVÁ, Radka. *Molekulární detekce herbicid rezistentních plevelů*. Olomouc, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- 37 TRANEL, Patrick a Terry WRIGHT. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned?. *Weed Science*. 2002, roč. 50, November-December, s. 700-712.
- 38 ZHENG, Danman, Greg KRUGER, Sukhvinder SINGH, Vince DAVIS, Patrick TRANEL, Stephen WELLER a William JOHNSON. Cross-resistance of horseweed (*Conyza canadensis*) populations with three different ALS mutations. *Pest Management Science*. 2011, roč. 67, č. 12, s. 1486-1492.

10 Seznam použitých internetových zdrojů

- [1] HEAP, Ian. *International Survey of Herbicide-Resistant Weeds*. [online]. [cit. 2015-11-06]. Dostupné z: www.weedscience.org
- [2] *Agrostis Trávníky*. [online]. [cit. 2015-10-15]. Dostupné z: <http://www.agrostis.cz/>
- [3] GEISSEL, Hermann. *CRS Publications*. [online]. [cit. 2015-11-16]. Dostupné z: <http://www.crsbooks.net/>
- [4] *Herbicide Resistance Action Committee: HRAC* [online]. [cit. 2015-10-19]. Dostupné z: <http://hracglobal.com/>
- [5] GUNSOLUS, Jeffrey L. Herbicide resistant weeds. In: *University of Minnesota: Extension* [online]. [cit. 2015-10-23]. Dostupné z: <http://www.extension.umn.edu/agriculture/crops/weed-management/herbicide-resistant-weeds/>
- [6] *SEQme s.r.o.* [online]. [cit. 2015-11-16]. Dostupné z: <http://www.seqme.eu/>