

Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů  
katedra agroekologie a biometeorologie



**Rozdíly v senzitivě turanky kanadské k herbicidům  
s účinnou látkou glyphosate**

Diplomová práce

Autorka práce: Bc. Adriana Andreu

Vedoucí práce: prof. Ing. Josef Soukup, CSc.

Konzultantka: Ing. Kateřina Hamouzová, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Rozdíly v senzitivitě turanky kanadské k herbicidům s účinnou látkou glyphosate" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2014

.....

Adriana Andreu

## **Poděkování**

Děkuji touto cestou vedoucímu diplomové práce prof. Ing. J. Soukupovi CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Dále děkuji Ing. K. Hamouzové Ph.D. za poskytnutí literárních podkladů a pomoc při experimentální práci.

**Rozdíly v senzitivě turanky kanadské k herbicidům s účinnou látkou glyphosate**

---

## Differences in sensitivity of horseweed to glyphosate containing herbicides

### Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo stanovit rozdíly v senzitivitě turanky kanadské (*Conyza canadensis*) k herbicidům s účinnou látkou glyphosate. Turanka kanadská patří mezi významné a nově se šířící plevely. S šířením a chemickou ochranou proti němu vznikají i problémy s výskytem rezistentních populací vůči některým herbicidním látkám. V České republice existuje podezření na toleranci vůči glyphosate, proto je nutné se tímto plevelným problémem zabývat a snažit se zabránit jeho dalšímu šíření. Regulace tohoto plevelu je velmi obtížná vzhledem k jeho biologickým vlastnostem. Nemá specifické požadavky na stanoviště, semena jsou velmi plodná, mají životaschopnost v půdě několik let a rozšiřují se na dlouhou vzdálenost. Tyto biologické vlastnosti dělají z turanky kanadské významný plevel z pohledu vzniku a šíření herbicidní rezistence.

V praktické části byla odebrána na vybraných železničních nádražích s výskytem t. kanadské semena a následně založen nádobový pokus s 36 biotypy, v němž byla testována senzitivita jednotlivých biotypů (populací) k účinné látce glyphosate. Jednotlivé biotypy byly ošetřeny koncentrační řadou herbicidu. Hodnocení účinnosti bylo provedeno na základě produkce nadzemní biomasy a pro každý biotyp byla stanovena pomocí nelineárních regresních modelů hodnota GR50 a vypočten faktor rezistence (RF). Na základě výsledků uskutečněného pokusu byla prokázána snížená citlivost k účinné látce glyphosate u materiálů ze dvou lokalit, u nichž byly zjištěny hodnoty RF = 10-12.

Vzhledem k opakovanému používání herbicidu s účinnou látkou glyphosate lze předpokládat další šíření tolerantních rostlin nebo i vznik rezistentních biotypů, které mohou v budoucnu působit značné problémy.

**Klíčová slova:** turanka kanadská, glyphosate, železnice, plevely, rezistence

**Rozdíly v senzitivitě turanky kanadské k herbicidům s účinnou látkou glyphosate**

---

## Differences in sensitivity of horseweed to glyphosate containing herbicides

### Summary

The aim of this thesis was to determine differences in sensitivity of Canadian fleabane (*Conyza canadensis*) to herbicides with active ingredient glyphosate. Canadian fleabane is one of the important and newly spreading weeds. With its spread and usage of herbicides, problems arise with occurrence of resistant populations against certain herbicidal compounds. Suspicion on development of resistance to glyphosate exists in the Czech Republic; therefore it is necessary to deal with this species and avoid its spread. Control of this weed is very difficult due to its biological properties. It does not have specific habitat requirements; the seeds are very prolific, can spread over long distances, and are viable in soil seed bank for several years. These features make from Canadian fleabane an important weed from the development of herbicide resistance point of view.

In the practical part, the seeds of Canadian fleabane were collected on selected railway stations in the Czech Republic with its increasing densities. Glasshouse pot trial was established with 36 populations and sensitivity to glyphosate tested. Individual biotypes were treated by various rates of glyphosate. After the treatment, the efficacy was assessed by weighing of biomass produced in individual pots. Using a nonlinear regression, values GR50 and resistance factors (RF) were calculated. Lower sensitivity to glyphosate, substantially different was found in two localities (RF = 10-12).

Due to repeated use of the glyphosate containing herbicides, we can assume propagation of more tolerant populations or even a development of herbicide resistance which may cause serious problems in the future.

**Keywords:** Canadian horseweed, glyphosate, railway, weeds, resistance

# OBSAH

1. Úvod .....	9
2. Cíl práce.....	11
3. Literární rešerše.....	12
3.1 Charakteristika turanky kanadské .....	12
3.1.1 Biologie a ekologie .....	13
3.1.2 Výskyt turanky kanadské ve světě.....	14
3.1.3 Výskyt turanky kanadské v České republice .....	14
3.1.3.1 Výskyt a regulace plevelů na železnici.....	15
3.1.4 Hospodářská škodlivost.....	16
3.1.5 Metody ochrany .....	17
3.1.5.1 Nepřímé metody .....	18
3.1.5.2 Přímé metody .....	20
3.2 Charakteristika herbicidů používaných proti turance kanadské .....	23
3.2.1 Význam herbicidů .....	23
3.2.2 Zásady používání herbicidů.....	23
3.2.3 Místo a mechanismus působení herbicidů .....	24
3.2.4 Příjem a translokace herbicidu v rostlině .....	26
3.2.5 Selektivní herbicidy .....	27
3.2.5.1 Selektivní herbicidy používané proti turance kanadské .....	28
3.2.6 Neselektivní herbicidy.....	28
3.2.6.1 Neselektivní herbicidy používané proti turance kanadské.....	29
3.3 Účinná látka glyphosate .....	30
3.3.1 Fyzikální, chemické a environmentální vlastnosti.....	30
3.3.2 Vznik glyphosate rezistentních plodin .....	31
3.3.3 Ekonomický dopad plodin s rezistencí ke glyphosate .....	31
3.4 Herbicidní rezistence a tolerance .....	32
3.4.1 Úvod.....	32
3.4.2 Mechanismus rezistence .....	34
3.4.2.1 Specifická rezistence (Target site resistance) .....	35
3.4.2.2 Nеспецифická rezistence (Non – target site resistance) .....	35

3.4.2.3	Křížová a vícenásobná rezistence.....	36
3.4.2.4	Další mechanismy rezistence .....	36
3.5	Rezistence vůči glyphosate .....	36
3.5.1	Mechanismus účinku glyphosate .....	37
3.5.2	Genetická podstata rezistence plevelů vůči glyphosate .....	38
3.5.3	Četnost genů rezistence a fitness plevelů rezistentních vůči glyphosate .....	39
3.5.4	Popsané mechanismy rezistence vůči glyphosate u turanky kanadské .....	40
3.5.5	Stav ve výskytu rezistence u turanky kanadské .....	41
3.5.6	Geografický výskyt rezistentních biotypů turanky kanadské v Evropě.....	43
3.6	Metody diagnostiky rezistence .....	45
3.6.1	Metody stanovení rezistence u turanky kanadské.....	48
3.7	Antirezistentní strategie uplatňovaná v oblasti s výskytem turanky kanadské rezistentní k glyphosate .....	51
4.	Metody.....	52
4.1	Metodika nádobového pokusu.....	52
4.1.1	Nádobový pokus .....	52
4.1.2	Aplikace herbicidu .....	53
4.1.3	Hodnocení účinnosti.....	53
4.1.4	Vážení čerstvé a suché nadzemní biomasy.....	53
4.1.5	Statistické zpracování dat .....	53
5.	Výsledky .....	56
6.	Diskuze .....	66
7.	Závěr .....	70
8.	Seznam literatury:.....	71
9.	Seznam příloh.....	78

# 1. Úvod

V souvislosti s rozšířením cestovního ruchu a výměnou zboží dochází k zavlékání a rozšiřování celé řady plevelných rostlin z jiných geografických oblastí. Tyto plevelné rostliny nazýváme invazní plevele. Invazní druhy mají silný sklon se šířit do přirozených, polopřirozených společenstev a nakonec ve vegetaci převládnout. Jde o druhy konkurenčně velmi silné s vysokou rozmnožovací a rozšiřovací schopností. Mezi invazní plevele patří turanka kanadská, která byla na naše území zavlečena v 19. století.

V České republice dnes patří tato rostlina mezi nejčastější druh invazivní rostliny na železničních nádražích. Možnost uchycení se invazních druhů podpořily i změny krajinné struktury vyvolané dlouhodobou činností člověka. Dokáží měnit zásadním způsobem celé ekosystémy a dokonale využívat abiotické a biotické zdroje. Významnou cestou přisunu invazivních rostlin je železniční doprava, zvláště nádraží v okolí skladištních, ramp a odstavných kolejí, skladů, ale i samotná nástupiště a kolejiště. Velmi hustá železniční síť má značný význam pro šíření invazivních druhů a vyžaduje neustálou pozornost, protože se předpokládá zavlékání i nových druhů pro naši květenu. V České republice se sleduje vývoj plevelných společenstev na železničních nádražích od devadesátých let. Ze zemědělských komodit se nejvíce k nám dovážejí olejniny a obiloviny, které mohou být zdrojem diaspor cizích plevelů. Po naturalizaci druhů může docházet k jejich expanzi a kolonizaci nových stanovišť. Zavlečené plevele jsou z počátku na území neznámé, a proto se snadno množí a rozšiřují. Stále častěji stoupá význam rezistence vůči herbicidům. V současné době je rezistence plevelů vůči herbicidům celosvětovým problémem. Bylo popsáno více než 315 případů rezistence plevelných druhů k různým mechanismům účinku herbicidů a předpokládá se, že jejich počet se bude navyšovat. Také na našem území vzrostl výskyt rezistentních populací plevelů. Jedním z plevelů na území České republiky, který začíná být tolerantní vůči účinné látce glyphosate je turanka kanadská.

Účinná látka glyphosate se velmi rychle uchýtila a stala se celosvětově užívaným prostředkem sloužícím k regulaci plevelů na zemědělských i nezemědělských půdách. Oblasti plevelných společenstev na železničních nádražích jsou regulovány především chemicky, herbicidním přípravkem Roundup (® Monsanto) s účinnou látkou glyphosate. V počátcích



rozvoje této účinné látky byla možnost vzniku rezistence hodnocena jako nepravděpodobná, a tak trvalo dlouho, než byly zjištěny první případy rezistentních plevelů. Ke vzniku rezistence vůči glyphosate došlo především v případech, kdy byla dlouhodobě aplikována pouze tato účinná látka bez dalších možností regulace. Jedním z případů, u kterých se velmi brzy vytvořila rezistence vůči glyphosate, je turanka kanadská. Mechanismy rezistence turanky kanadské jsou předmětem studií, které se snaží odhalit podstatu vznikající rezistence. Znalost této problematiky je zásadní pro budoucí kladný vliv na ekologii agroekosystémů, efektivnější údržbu zeleně či snížení nákladů na ochranu.

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je získat údaje o citlivosti populací turanky kanadské z prostředí vlakových nádraží k herbicidům s účinnou látkou glyphosate, které se zde dlouhodobě používají a vytvářejí tak selekční tlak na vznik rezistence vůči této účinné látce.

Práce má poskytnout odpovědi na následující výzkumné hypotézy:

- Vlivem dlouhodobého používání glyphosate na železnicích došlo ke vzniku populací s vyšší úrovní tolerance k herbicidům obsahujícím tuto účinnou látku.
- Mezi jednotlivými populacemi existují rozdíly v úrovni tolerance / citlivosti ke glyphosate.
- Míra tolerance ke glyphosate je doposud na takové úrovni, že registrované dávky herbicidu jsou schopny hubit i biotypy, u nichž byla zjištěna vyšší míra tolerance.

### 3. Literární řešerše

#### 3.1 Charakteristika turanky kanadské

Turanka kanadská (*Conyza Canadensis* (L.) Cronq.) patří mezi jednoleté ozimé plevely. Jedná se o zavlečenou rostlinu, která se stala na našem území zdomácněným druhem. Pravděpodobně jejímu šíření významně pomohlo budování železnic a vzdušné proudy vznikající při jízdě vlaků, tzv. ferroviatická agestochorie a migrace (Hejný a Jehlík, 1973).

V České republice ji nalezneme od nížinných oblastí až po podhůří. Jako plevel je velmi přizpůsobivá a dokáže růst na velmi neúrodných půdách. Nalezneme ji na rumišťích, náspech železničních tratí, podél silnic, okrajích cest, v okolí štěrkové navážky, v lomech, pískovnách, lesích, sadech a zahradách, na loukách, intravilánech obcí, antropicky narušených lučních společenstvech a v poslední době i na orné půdě (Mikulka a Slavíková, 2008). Typické půdy pro turanku kanadskou jsou mírně vlhké až vysychavé, různého stupně zrnitosti a obsahu humusu. Druh upřednostňuje lehčí až méně živěné půdy, zejména písčité a štěrkovité, před hliněnými a dobře hnojenými půdami.

Významným plevelem je jen ve vytrvalých kulturách, v jednoletých plodinách patří mezi méně významné plevely. Nejčastěji se vyskytuje ve společenstvech tříd *Epilobietea angustifolii*, *Chenopodietea* a *Secalietea*. (Kneifelová a Mikulka, 2003; Slavík a Štěpánková, 2004). Turanka kanadská je velmi odolný druh, vytvářející mohutné, husté porosty, které odčerpávají velké množství vody a živin z půdy. V oblastech přemnožených tímto plevelem se vyskytuje až 1000 jedinců na m<sup>2</sup> (Mikulka a Slavíková, 2008). Jako typický r-stratég je dominantou počátečních sukcesních stádií, zejména polí v prvních třech letech po opuštění. Vyznačuje se populacemi, které kolísají v čase a prostoru a produkují mnoho drobných snadno se šířících semen (Regehr a Bazzaz, 1979). V České republice je přes svou dlouhodobou přítomnost stále invazivním druhem, který nese rizika. V poslední době proniká především do sadů, na pole či do rudérálně ovlivněné přirozené vegetace. Zásoba jeho plodů se čím dál více zvětšuje. Nebezpečí hrozí zejména v klimaticky nejteplejších oblastech státu na územích lehkých písčitých půd (Mlíkovský a Stýblo, 2006).

### 3.1.1 Biologie a ekologie

#### Botanická charakteristika

##### Turanka kanadská

*Conyza canadensis* (L.) Cronq.

Syn.: *Erigeron canadensis*

Slovenský název: Turica kanadská

Anglický název: Canadien fleabane

Německý název: Kanadisches Berufskraut

Název EWRC: CONCA

Podle botanického zařazení je turanka kanadská řazena do čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), řádu hvězdnicotvarých (*Asterales*) a třídy dvouděložných (*Magnoliopsida*). Klíčící rostliny jsou velmi drobné. Děložní listy jsou okrouhle vejčité a krátce řapíkaté s lysou, tmavě zelenou čepelí. Pravé listy jsou střídavé. První list bývá okrouhle vejčitý až okrouhlý tmavozelený s čepelí hustě chlupatou, 5-7 mm dlouhý a 4-5 mm široký. Další listy jsou postupně delší, krátce řapíkaté, mělce pilovité, vejčité až podlouhle vejčité. Pozdější listy růžice jsou světle zelené, obkopynaté, hruběji pilovité, někdy v horní části až laločnatě dělené. Kořen je vřetenovitý s tenkými postranními kořeny, který je bohatě větven. Lodyha je jednoduchá, přímá, oblá obvykle 20 – 80 cm vysoká. Je krátce chlupatá, v dolní části hustě olistěná a v horní části bohatě rozvětvená. Dolní lodyžní listy jsou nedělené, velmi četné, obkopynaté, 6-10cm dlouhé a 1 cm široké. V průběhu vegetace dochází často k zasychání těchto listů. Horní listy jsou přisedlé, čárkovité, celokrajné a úzce kopinaté. Okrajové jazykovité květy úboru jsou bílé až načervenalé a jen o málo delší než zákrov, terčovité květy jsou nažloutle bílé (Jursík a kol., 2011).

Květenstvím je lata, mnohoúborná, hroznovitá, která se skládá z drobných 3 mm širokých úborů. Drobné úbory jsou uspořádány v bohatých latách. Rostliny kvetou od června do pozdního podzimu. Plodem jsou bleďožluté nažky, které nesou špinavě bílý chmýr, který je 3 x delší než nažka. Na jedné rostlině může dozrát až 100 000 nažek s chmýrem, které jsou schopné ihned klíčit (Kneifelová a kol., 2003; Kohout a Mentbergr, 1992). Semena nevykazují dormanci a

mohou vzházet ihned z povrchu půdy během celého roku. Podmínky pro vzházení jsou velmi variabilní. Hraniční hloubka půdy je 0,5 cm, v které jsou schopné dobře vyklíčit (Nandula, 2010).

Turanka kanadská se rozmnožuje výhradně generativně. Rozšiřování je uskutečňováno převážně semeny. Mohou se šířit jak větrem, tak i vodou. Semena se rozšiřují na ploše do 500 m od místa rodičovské generace. Téměř 99 % těchto semen se vyskytuje do 100 m od zdrojové populace. V USA byly prováděny polní studie na dálkový rozptyl semen, kde byl potvrzen rozptyl semen až na vzdálenost 500 km (Nandula, 2010). V jednom úboru dochází k dozrání 45-70 nažek. Nažky jsou pozitivně fotoblastické a odolné k zasolení půdy. Klíčí ihned po vysemenění z povrchu půdy a klíčivost si zachovává řadu let. Rostliny vyklíčené na podzim přezimují v listové růžici. Optimální teplota pro fázi klíčení je 15-20°C. (Mikulka a Kneifelová, 2005).

### **3.1.2 Výskyt turanky kanadské ve světě**

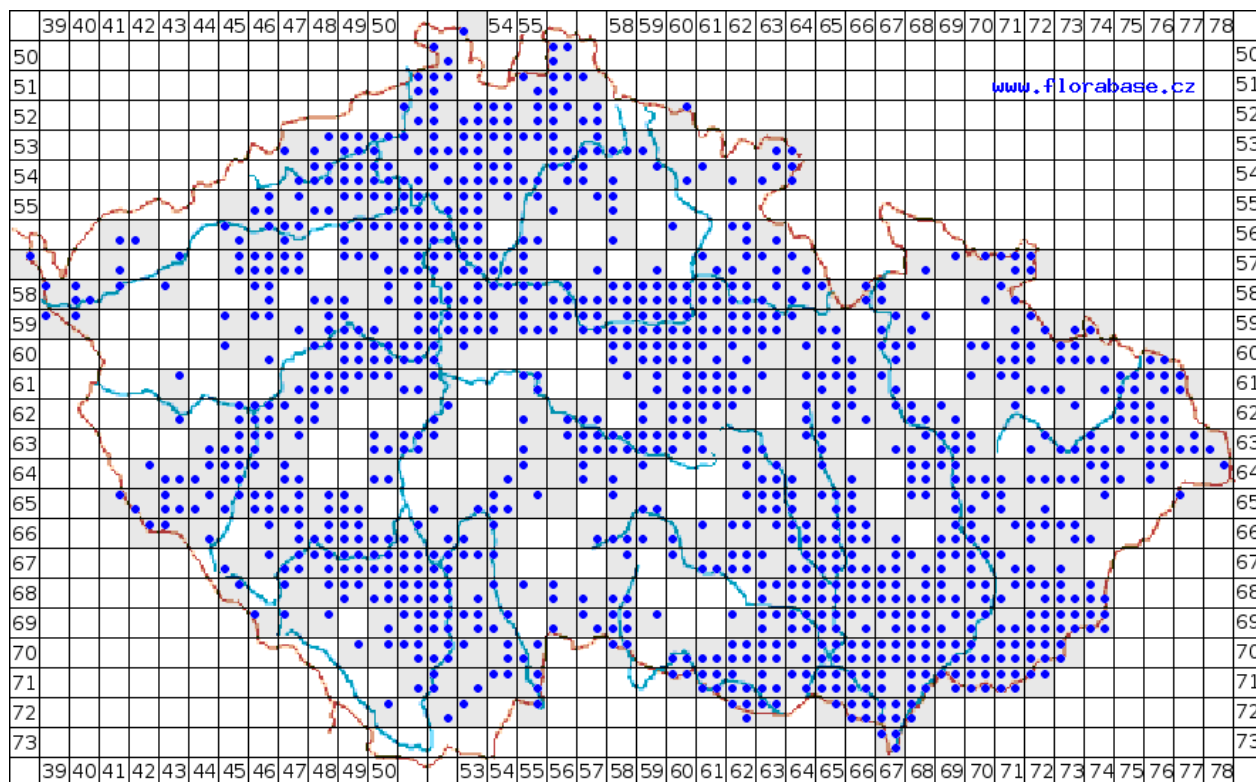
Turanka kanadská je takřka kosmopolitním druhem, vyskytuje se po celém světě s výjimkou Arktidy. Jejím původním stanovištěm byla pouze Severní Amerika (USA a jižní Kanada) ze které se rozšířila do celého světa. Nejvhodnější geografické podmínky pro tuto rostlinu jsou především v mírném a subtropickém pásu. V 17. století byla zavlečena na území Evropy, kde vyskytuje na území Polska, Německa, Francie, Anglie, Španělska, Belgie a Švýcarska. Z Německa existují údaje o výskytu turanky kanadské již od počátku 18. století (Mikulka a Slavíková, 2008).

### **3.1.3 Výskyt turanky kanadské v České republice**

V České republice patří turanka kanadská mezi nejrozšířenější severoamerický plevelný druh. První záznam o výskytu turanky kanadské u nás byl datován v roce 1750. V 19. století již byla udávána jako obecně rozšířená a dnes je zcela zdomácněnou rostlinou (Jursík a kol., 2011). Na našem území se tento druh vyskytuje od nížin do podhorských oblastí. V nejvyšších partiích pohoří byla zaznamenána do nadmořské výšky 1200 m.n.m., kde byla objevena na Šumavě,

Březníku a na území Novohuťské nádrže. Na mapě (obr. č.1) je zobrazena intenzita výskytu turanky kanadské v České republice (Mikulka a Slavíková, 2008; Slavík a Štěpánková, 2004).

**Obr.č.1 Mapa výskytu turanky kanadské v České republice**



(florabase.cz)

### 3.1.3.1 Výskyt a regulace plevelů na železnici

Významným zdrojem šíření plevelných druhů po celém světě je železnice. V České republice se sleduje vývoj plevelných společenstev na těchto stanovištích od roku 1995. V dávné minulosti byly plevele hubeny mechanicky, dnes se upřednostňuje především herbicidní ochrana. Od roku 1992 byly nádražní plochy u nás ošetřovány herbicidy s účinnou látkou atrazine. Po dlouhodobé aplikaci této účinné látky došlo k vyhubení některých plevelných druhů nebo naopak k rozšíření nových, které začaly vykazovat nízkou citlivost na danou látku, nebo došlo k výskytu rezistentních biotypů. V období od roku 1993 až do roku 1997 se používal k regulaci plevelů imazapyr.

V dnešní době se aplikuje dvakrát ročně herbicid s účinnou látkou glyphosate. Vykazuje velmi dobrý účinek, ale objevují se i problémy s hubením bytlu metlatého, rosičky krvavé, přesličky rolní a turanky kanadské. V sousedním Rakousku a Polsku je též používán k ošetření železničních prostorů herbicid s účinnou látkou glyphosate. Dochází tam také k značným problémům s výskytem turanky kanadské. Plevelná společenstva na železnici jsou velmi specifická a jejich regulace začíná představovat čím dál větší problém. Je nutné věnovat pozornost likvidaci černých skládek v blízkosti železnic, které představují problém jak ekologický, tak i šíření do dalších lokalit či městských komunikací (Chodová a Salava, 2004).

### **3.1.4 Hospodářská škodlivost**

Turanka kanadská se především vyskytuje na okrajích cest, silnic, železnic, mezi dlažbou, na rumišťích či lesních pasekách. Na orné půdě se většinou neuplatní, proto ji řadíme mezi méně nebezpečné plevele. V některých zemích (např. USA) však bylo zaznamenáno intenzivnější rozšíření i v jenoletých plodinách (Jursík a kol., 2011). Její konkurenční schopnost je značná, proto je schopna vytvářet velké kolonie rostlin. Při přemnožení vytváří husté porosty, které odčerpávají značné množství vody a živin z půdy (Kneifelová a Mikulka, 2003).

U nás se setkáme s turankou kanadskou jako polním plevelem, především v oblasti s vyšším zastoupením zeleniny. V ozimých zeleninách kořenové zeleniny, cibule sklizené na jaře se jí daří velmi dobře. Na orné půdě větší škody nepůsobí, protože je potlačována osevním postupem, zpracováním půdy a podmítkou s hrubou orbou na podzim. Ve vinicích, chmelnicích a sadech způsobuje nepříznivé podmínky konkurence dřevinám a ovlivňuje jejich důležité životní faktory. V ovocných sadech se může vyskytovat až 1000 jedinců na m<sup>2</sup>. Značné obtíže byly zaznamenány také v kulturách jahodníku, rybízovných a v lesních školkách (Jursík a kol., 2011)

Na nezemědělské půdě se chová především jako ruderalní rostlina, obývající okraje cest, silnic, nově opuštěné pole, břehy, městské pustiny. Je nejrozšířenějším druhem lemových společenstev, protože snáší velmi dobře zasolení (Mikulka a Kneifelová, 2005).

### 3.1.5 Metody ochrany

Z hlediska dlouhodobé udržitelnosti systémů ochrany a ekologickým limitům je kladen důraz na preventivní i nechemické metody ochrany. Turanka kanadská má obrovskou rozmnožovací schopnost a možnost dalekého šíření nažek. Ochmýřené nažky vydrží na statných rostlinách i několik měsíců. Ochranu je třeba zaměřit na odstranění zdrojů nažek a likvidaci ohnisek zaplevelení před dozráním všemi způsoby. V ruderálních oblastech můžeme dosáhnout ochrany chemickými, fyzikálními nebo mechanickými metodami (Dubois a Plancke, 2010).

Efektivním způsobem regulace turanky kanadské na orné půdě je narušení životního cyklu střídáním plodin spolu s použitím herbicidů. Mezi nejčastější metody regulace plevelných rostlin stále patří použití herbicidů. V uplynulých desetiletích došlo k vyselektování odolných a rezistentních biotypů (Kohout, 1997). Poměrně snadná regulace na orné půdě je z důvodu vysoké citlivosti turanky kanadské k většině herbicidům. Pokud se opakovaně aplikují přípravky se stejným mechanismem účinku snadno dochází k výskytu rezistentních populací (Jursík a kol., 2011). Nejeftektivnější ochrana je ve vývojovém stádiu, kdy je rostlina ve fázi listové růžice. U starších rostlin je regulace obtížnější. Pro efektivní regulaci turanky kanadské se osvědčilo kombinování různých metod ochrany. Používají se přímé metody jako je kosení nebo obdělávání půdy (Dubois a Plancke, 2010). Pomocí sečení můžeme regulovat turanku kanadskou v porostech víceletých píceň po jejich založení. Kosení rostlin se provádí dříve, než rostliny mají vyvinutá semena či plody (Mikulka a Kneifelová, 2005).

V jihozápadním Quebecu se přestala používat metoda střídání plodin a turanka kanadská se stala běžným plevelem při pěstování mrkve a cibule. Nejvíce využívanou metodou je metoda chemická. Pro ošetření se doporučuje používat herbicidy s odlišným způsobem působení, aby nedocházelo k rezistenci vůči herbicidu (Dubois a Plancke, 2010). Metody se stále rozvíjejí a do oboru pronikají disciplíny molekulární biologie a informatiky. Přínosy vedou ke zdokonalování metod ochrany, omezení míry škodlivosti a využití pozitivní ekologické funkce (Jehlík, 1998). Další metodou ochrany, která se začíná uplatňovat v posledních letech, je integrovaná ochrana.

Integrovaná ochrana rostlin (IPM- Integrated Pest Management) je metoda, která využívá různé prvky metod ochrany proti škodlivým činitelům. Zahrnuje soubor ochranných opatření, ekonomicky, ekologicky a toxikologicky přijatelných metod, které vedou k udržení škodlivých



činitelů na požadovaných hladinách se záměrným upřednostňováním přirozených regulačních faktorů. Integrovaná ochrana rostlin proti plevelům patří mezi nejdůležitější, neboť plevel dlouhou dobu patří k nezávadnějším škodlivým činitelům, na jejichž chemickou ochranu jsou vynakládány vysoké finanční částky představující více než 40% nákladů vydaných na chemickou ochranu rostlin. Tato dlouhodobá a intenzivní aplikace herbicidů nezůstala bez negativních následků na životní prostředí, proto se snaží integrovaná ochrana minimalizovat používání chemické ochrany a využívat jiných technologií a technik, které vedou k potlačení šíření plevelů. Jsou jimi např.: biologická ochrana proti plevelům, která je šetrná k prostředí, energeticky nenáročná, nenákladná a dlouhodobě přetrvávající po zavedení. V biologické ochraně jsou využívány různé organismy, nejčastěji viry, bakterie, houby, a zejména zástupci nejrůznějších hmyzích řádů. Až do dnešní doby bylo po celém světě vypuštěno asi 200 bioagens proti 114 plevelům. Jen do Kanady a USA bylo dovezeno 165 bioagens převážně původem z Evropy (Phytosanitary.org).

#### **Metody regulace můžeme rozdělit do dvou skupin:**

- Nepřímé metody - preventivní
- Přímé metody :
  - Mechanické metody
  - Fyzikální metody
  - Biologické metody
  - Chemické metody

#### **3.1.5.1 Nepřímé metody**

Nepřímé metody jsou též nazývány preventivními metodami. Z dlouhodobého hlediska jsou neúčinnější a cenově nejpříjemnější. Mají za cíl dlouhodobé udržování společenstev plevelů a omezení výskytu v budoucích pěstovaných plodinách. V současné době z ekonomického hlediska tyto metody nedostávají moc prostoru k uplatnění. Metody spočívají ve způsobu hospodaření, jaké použijeme soustavy hospodaření, strukturu rostlinné výroby, zvolené střídání plodin v osevních postupech, čištění osiva a také technologie pěstování polních plodin

pomáhá omezit plevele. Důležitý je také výběr odrůd, které nesou určitý stupeň odolnosti vůči plevelným druhům a jsou doporučeny do jednotlivých regionů k pěstování (Jursík a kol., 2011).

- **Osevní postupy – střídání plodin**

Osevní postupy zajišťují příznivé růstové podmínky kulturním plodinám a zároveň podporují konkurenční schopnost proti plevelům. Musí vytvořit nepříznivé podmínky pro určitou skupinu plevelů, a to vhodným způsobem střídání plodin různého charakteru agrotechniky. Určitý plevelný druh se může konkurenčně uplatnit v jednotlivých plodinách především tehdy, je-li jeho životní rytmus sladěn s danou plodinou a technologií pěstování. Střídání plodin přispívá k regulaci zaplevelení. Měly by se pravidelně střídát plodiny s různým charakterem (ozimy, jařiny, víceleté plodiny), aby se zamezovalo jednostrannému zaplevelení a docházelo k pravidelnému vyčerpání půdní zásoby. U jednoletých plevelů je vhodné několikaleté zařazení pícnin, které se sečou dřívě, než mohou plevely dozrát a vysemenit (Jursík a kol., 2011; Mikulka a Kneifelová, 2005).

- **Zpracování půdy**

Zpracování půdy je již od počátku zemědělství prováděno i z důvodu snižování výskytu plevelů. K metodám zpracování půdy řadíme kypření, podmítku, orbu a operace předseťového zpracování půdy. Snižuje-li se intenzita zpracování půdy, je nutné zvýšit intenzitu přímých metod regulace (Jursík a kol., 2011). Každý plevelný druh má specifické vlastnosti, které mohou představovat ve vztahu ke zpracování půdy konkurenční výhodu, nebo naopak handicap. Jedná se především o schopnost druhu vzcházet z různých hloubek orničního profilu, dlouhověkost diaspor a požadavky na světelný režim během vzcházení. Podle toho pak dochází k ústupu určité skupiny plevelů, ale není také vyloučeno i opačné působení, zpracování půdy může rozvoj některých plevelných druhů podpořit. Meziporostní období po sklizni zrnin lze využít k potlačování plevelů. U jednoletých plevelů z důvodu nedostatku vláhy a primární dormance je v letním období vzcházení čerstvě dozrálých semen plevelů minimální. Mnohá semena vyžadují ke klíčení světlo a nejsou v půdě schopna vzcházet. Vliv podmítky je často nadhodnocen. Dozrálá semena jednoletých plevelů jsou zapravena do půdy a vyprovokována ke vzcházení. Plevelé vzešlé po podmítce proto pocházejí převážně ze semen z půdní zásoby (Mikulka a Kneifelová, 2005). Vlastní orba působí na plevely přímým účinkem hubení a nepřímým účinkem očišťování půdy od semen plevelů. Nejpriznivější období pro orbu je podzim, kdy se zneškodní

plevele vzešlé na podzim. Plevelé klíčící na jaře jsou zničeny v předset'ové přípravě půdy (Mzp.cz).

- **Čistota osiva**

Šíření plevelů osivem je stále aktuálním problémem. Zdravé a čisté osivo je jedním z nejdůležitějších předpokladů pro dobré výsledky v rostlinné výrobě. Hlavní způsoby rozšíření většiny plevelů je nečistým osivem. Nejvíce plevelů se také šíří necertifikovaným, farmářským osivem (Jursík a kol., 2011). Jednou možností zavlékání cizích plevelů je zavlečení pomocí krmných semen či semen určených k lidské výživě, případně semen k technickým účelům. Čištění osiva je věnována velká péče a prostředky k čištění se neustále specializují a zdokonalují. Jsou používány celé soustavy čistících strojů, kde je využíváno různé specifické hmotnosti, velikosti, tvaru, povrchu a v zahraničí také barvy semen. Stálým čištěním osiva se vyselektovávají u některých druhů plevelů semena, která se svými morfologickými vlastnostmi čím dál více podobají semenům kulturních rostlin. Úporný boj s čistotou osiva však není nikdy skončen. Pomocí daných opatření vnější i vnější karantény je možné se proti novým plevelným druhům do značné míry úspěšně ubránit (Mikulka a Kneifelová, 2005).

### **3.1.5.2 Přímé metody**

Přímé metody zahrnují pracovní postupy a zásahy již do stávajících nebo budoucích zaplevelených míst s cílem nežádoucí plevelnou vegetaci zcela odstranit nebo omezit její škodlivost na akceptovatelnou úroveň. Mezi nejdůležitější kritéria přímých metod patří časová efektivita, účinnost, ekologie a náklady na ochranu. Podle požadavků na míru potlačení plevelů rozlišujeme několik konceptů:

- **Úplné odstranění plevelů (eradikace)**

Snaha potlačit co největší množství plevelů byla typická pro pěstitelské systémy s nedostatečně účinnými a flexibilními prostředky ochrany, kde každý ponechaný plevel představoval potencionální nebezpečí při uplatnění v pozdějších fázích vegetace, kdy již neexistují možnosti zásahu proti němu. V minulosti se proto z tohoto důvodu většina zásahů směřovala do úplného počátku vegetace. Tento koncept se používá proti nežádoucím invazním druhům, kdy je nutné odstranit zakladatelské rostliny. V případech regulace zaplevelení

v některých okrasných rostlinách, kdy plevele narušují estetický dojem. Proti zaplevelujícím rostlinám vzešlým ze sklizňových ztrát, které mohou přenášet škůdce a choroby a pro potlačení plevelů v konkurenčně slabých porostech (Jursík a kol., 2011).

- **Regulace zaplevelení na základě odhadu míry škodlivosti**

Postupy používající všechny ekonomicky, ekologicky a toxikologicky přijatelné metody pro udržení škodlivého organismu pod hladinou škodlivosti se nazývají integrovanou ochranou. Součástí integrovaného přístupu je správné diagnostikování a vyhodnocení úrovně výskytu škodlivého plevelu, cílené používání komplexu dostupných metod a posouzení potencionálních metod z více hledisek (Phytosanitary.org).

- **Regulace zaplevelení s ohledem na ekologické přínosy plevelů**

Hlavním rozhodovacím kritériem je využití pozitivních ekologických funkcí. Přínosy plynou z pozitivních funkcí rostlinného pokryvu, vyšší biodiverzity. Přispívá ke stabilizaci potravních řetězců, sítí a cyklů živin. Tyto regulace jsou v některých zemích evropské unie podporovány formou dotačních titulů (Mzp.cz).

- **Mechanické metody**

Mechanické hubení plevelů se ve většině případů uplatňuje v systému zpracování půdy při pěstování jednotlivých plodin. Hlavním cílem je úprava orničního profilu a regulace vzdušného, vodního a tepelného režimu půdy (Kohout, 1996). Do mechanizačních způsobů regulace řadíme většinu kultivačních zásahů v průběhu vegetace plodiny. Stále se uplatňuje i v dnešní době na malých plochách ruční pletí a okopávka. Ruční odstraňování plevelů se používá v zahradnictví, při pěstování zeleniny, při produkci osiv a sadby. V porostech hustě setých plodin se využívá vláčení. Velmi rozšířené jsou pro tuto metodu prutové brány. Pružné pruty bran poškozují drobné vzcházející plevele. První vláčení se provádí co nejdříve, krátce před vzejitím porostů, aby nedošlo k většímu poškození plodiny. Další až když je již plodina dostatečně silná a zakořeněná. Tento zásah je vhodné použít na podzim a na jaře. Vlácením je možné odstranit nebo poškodit asi 30 – 70 % plevelů. Tuto metodu upřednostňují v ekologickém zemědělství, kdy je nežádoucí použití herbicidu (Jursík a kol., 2001).

Nejčastější mechanickou metodou je plečkování. Plečky se dělí podle různé konstrukce a používají se v porostech širokořádkových plodin. Tato metoda narušuje kořenový systém plevelů.

Intenzivní zpracování povrchové vrstvy půdy provádí rotační plečky. Rostliny plevelů jsou silně mechanicky poškozeny a částečně zapraveny do půdy, takže nemohou dále růst. Sečení či mulčování se provádí k údržbě okolních ploch, ze kterých se mohou některé druhy plevelných rostlin šířit do porostů plodin (Jursík a kol., 2011).

- **Fyzikální metody**

Fyzikální metody jsou technicky a energeticky velmi náročné. Z tohoto důvodu nenacházejí moc uplatnění. Nejpoužívanější mezi těmito metodami jsou metody termické. Mezi ně řadíme požívání plamenových pleček či hořáků. Různé typy náradí přenáší tepelnou energii působením horké směsi vodní pára/vzduch, plamenem vznikajícím ze spalování plynu, infračerveným zářením z rozžhavené keramické destičky nebo elektrickým výbojem (Jursík a kol., 2011). V rostlinách dochází při termické regulaci k přehřátí a k nenávratným změnám. Krátkodobé zvýšení teploty na 45 °C vede k nevratnému poškození pletiv. Využívají se v porostech širokořádkových plodin i mimo ornou půdu na pevných površích (Mikulka a Kneifelová, 2005).

- **Biologické metody**

Biologické metody využívají negativních interakcí mezi rostlinami a jejich antagonisty. Na negativních interakcích se podílejí patogenní organismy – viry, bakterie, houby i bezobratlí živočichové. Principem biologické regulace je introdukce přirozených nepřátel cílového plevele, kteří sníží jeho populační hustotu na přijatelnou úroveň a na této úrovni jej dlouhodobě udrží. Biologická regulace se používá proti nepůvodním, invazivním druhům rostlin. V polních plodinách je tato metoda omezena (Mikulka a Kneifelová, 2005).

- **Chemické metody**

K chemickým metodám ředíme používání herbicidů, které se začaly využívat od 50. let 20. Století (Jursík a kol., 2011). Herbicidy patří mezi pesticidy, které se používají k regulaci přemnožených rostlinných druhů na zemědělské i lesní půdě, v parcích, hřištích nebo cestách. Státní rostlinolékařská správa vydává každoročně seznam registrovaných přípravků na ochranu rostlin, které jsou schválené k používání dle zákona č. 174/1996 Sb. o rostlinolékařské péči (Vanc, 2001). V největším rozsahu je herbicidů využíváno na orné půdě, kde jejich spotřeba převažuje nad všemi ostatními pesticidy. Výhodou používání herbicidů je nenáročnost z hlediska lidské

práce a nízké náklady. Na druhou stranu je jejich používání spojeno s mnoha negativními vlivy jak na životní prostředí, zvířata, člověka nebo poškození kulturních plodin (Jursík a kol., 2011). Dalším problémem je oslabování přirozených konkurentů (škůdců) či vznik rezistentních populací (Čača, 1990).

## **3.2 Charakteristika herbicidů používaných proti turance kanadské**

### **3.2.1 Význam herbicidů**

Herbicidy jsou sloučeniny s fyto toxickými účinky, které se využívají pro omezení nežádoucí vegetace. Použití herbicidů je relativně nenáročné na lidskou práci a většinou bývá méně nákladné než ostatní možnosti regulace, přesto nese jejich používání určitá rizika. Při nevhodném používání mohou herbicidy způsobovat poškození pěstované plodiny či zatěžovat životní prostředí. Dalším negativním vlivem je působení na obsluhu postřikovačů a dalších osob, které přichází do kontaktu s těmito látkami. Pro správné používání herbicidů je důležitá znalost mechanismů působení herbicidů (Jursík a kol., 2011). Podstatou biologické aktivity herbicidů je narušení některého z životně důležitých biochemických pochodů v plevelné rostlině. Herbicid způsobí inhibici jednoho nebo více enzymů, které katalyzují některou z reakcí při biosyntéze organických sloučenin. Při používání herbicidu je nutné dodržovat předepsané metodiky aplikace (Mikulka a Kneifelová, 2005).

### **3.2.2 Zásady používání herbicidů**

Herbicid se doporučuje aplikovat ve fázi listové růžice, kdy je regulace snazší, později jsou s regulací větší problémy. Za ztížených podmínek růstu např. sucha, je kontrola náročnější. Pokud dochází ke kosení porostu, nelze aplikovat postřik v ideální fázi růstu a i v této situaci může být regulace ztížena. Tak jako u každého správného postřiku je základem nastavení postřikovače včetně jeho kalibrace, aby měl postřik dobré pokrytí. Pokud je v dané oblasti postřiku zdroj tvrdé vody je nezbytné tuto vodu změkčit, neboť by mohlo dojít ke snížení efektivity dávky herbicidu (Dubois a Plancke, 2010).

### 3.2.3 Místo a mechanismus působení herbicidů

Herbicidní účinek je založen na porušení životně důležitých biochemických, fyziologických procesů, které jsou nezbytné pro normální vývoj a růst. Většinou se jedná o inhibici jednoho nebo více enzymů. Tyto enzymy katalyzují některou z reakcí při biosyntéze organických sloučenin - karotenoidů, aminokyselin, lipidů, apod. (Jursík a kol., 2011). Konečným stavem je poškození nebo úhyn rostliny či vegetace. Mezi biochemické a fyziologické pochody v rostlině patří fotosyntéza, buněčné dýchání, biosyntéza lipidů, proteinů, karotenoidů, nukleových kyselin a aminokyselin, ve kterých dojde k narušení pomocí účinné látky (Procházka a Šebánek, 1997). Ke správné účinnosti herbicidů je třeba, aby byly splněny následující podmínky:

- cílová rostlina musí být zasažena herbicidem
- transport v rostlině na dané místo účinku
- příjem účinné látky v dostatečném množství
- akumulace a perzistence herbicidu v místě účinku, aby mohl být inhibován cílový enzym herbicidního účinku.

Pokud některá z těchto podmínek není splněna výsledná účinnost je nedostačující. Herbicid se naváže na některý významný protein, který nazýváme místem účinku herbicidu. Mechanismus působení herbicidu se liší podle způsobu, jakým herbicid inhibuje určitý biochemický proces v rostlině. V současné době bylo zaznamenáno jen dvacet míst působení herbicidu v rostlině. Tento omezený počet míst působení herbicidů vede k opakovanému používání herbicidů působících na stejné místo účinku, které často vede ke vzniku rezistence k danému herbicidu. Střídání herbicidů s různým místem působení snižuje vznik rezistence. Prevencí proti vzniku rezistence u plevelů je znalost mechanismů účinku herbicidů a volba správného termínu ošetření.

V Evropě byla zavedena klasifikace herbicidů podle místa působení HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) (Jursík a kol., 2011). Herbicidní látky jsou podle mechanismu účinku řazeny do klasifikace HRAC (identifikace pomocí písmene) a WSSA (číselné označení) do 28 skupin. Jednotlivá písmena a čísla definují princip herbicidního účinku (Procházka a

Šebánek, 1997). WSSA (Weed Science Society of America) podporuje výzkum, vzdělávání ve všech aspektech rezistence k herbicidům, včetně zveřejňování nových případů rezistence. Zkoumají mechanismy, způsoby dědičnosti rezistence a publikují osvědčené postupy pro prevenci, oddálení nebo řízení rezistentních plevelů (Wssa.net).

Tabulka č.1: **Mechanismy působení herbicidů vybraných herbicidů dle klasifikace HRAC**

HRAC skupina	Místo účinku	Chemická skupina	Účinná látka	WSSA skupina
<b>B</b>	Inhibice acetolaktát syntázy ALS	Sulfonylurea	Amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron-methyl, chlorimuron-ethyl, chlorsulfuron, cinosulfuron, cyclosulfamuron, ethametsulfuronmethyl, ethoxysulfuron, flazasulfuron, flupyrsulfuron-methyl-Na, foramsulfuron, halosulfuron-methyl, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metsulfuron-methyl, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron-methyl, prosulfuron, pyrazosulfuron-ethyl, rimsulfuron, sulfometuron-methyl, sulfosulfuron, thifensulfuron-methyl, triasulfuron, tribenuron-methyl, trifloxysulfuron, triflusulfuron-methyl, tritosulfuron	<b>2</b>
<b>C1</b>	Inhibice fotosyntézy v fotosystému II	Triazine	Ametryne, atrazine, cyanazine, desmetryne, dimethametryne, prometon, prometryne, propazine, simazine, simetryne, terbumeton, terbuthylazine, terbutryne, trietazine	<b>5</b>
<b>C2</b>	Inhibice fotosyntézy v fotosystému II	Urea	<i>Chlorobromuron, chlorotoluron, chloroxuron, dimefuron, diuron, ethidimuron, fenuron, fluometuron (see F3), isoproturon, isouron, linuron, methabenzthiazuron, metobromuron, metoxuron, monolinuron, neburon, siduron, tebuthiuron</i>	<b>7</b>
<b>D</b>	Fotosystém I- elektronový odklon	Bipyridylium	Diquat, paraquat	<b>22</b>
<b>G</b>	Inhibitory EPSP syntázy	Glycine	Glyphosate, sulfosate	<b>9</b>

(hracglobal.com)



### 3.2.4 Příjem a translokace herbicidu v rostlině

Účinek herbicidu se dostaví poté, co je rostlinou přijat a transportován na místo jeho působení. Transport účinné látky v rostlině probíhá symplastem, apoplastem nebo vodivými pletivy. Příjem herbicidní látky může být uskutečněn pomocí kořenů, listů, hypokotylem nebo kombinací. Hlavními způsoby příjmu jsou kořenový příjem a listový příjem (Jursík a kol., 2011).

- **Kořenový příjem**

Prostřednictvím kořenového vlášení převážně pasivní cestou na základě koncentračního spádu mezi koncentrací herbicidu v půdním roztoku a koncentrací látek v rostlině se uskutečňuje kořenový příjem. Kořen není chráněn jako nadzemní části kutikulou ale později dochází k tvorbě korkové vrstvičky, která kořen chrání. Rychlost příjmu ovlivňuje dostupnost herbicidu v zóně kořenového vlášení, na což mají vliv sorpční vlastnosti půdy, půdní vlhkost a zóna zakořeňování plevelů. Vyšší příjem herbicidu z půdního roztoku často souvisí s intenzitou transpirace, která se zvyšuje se vzrůstající teplotou. Jednotlivé druhy plevelů se liší různou hloubkou vzcházení. Plevely, které tvoří malá semena, vzcházejí z povrchových vrstev půdy (do 2 cm) a jsou vystaveny vyšší koncentraci herbicidu. Z hlubších vrstev půdy (5-10 cm) mohou vzcházet velká semena, která nemusejí být dostatečně zasažena preemergentním zasažením (Jursík a kol., 2011).

- **Listový příjem**

U listového příjmu herbicidu musí být aplikační roztok co nejrovnoměrněji rozptýlen, aby byla zajištěna jeho vysoká přilnavost na jeho povrchu. Pomocí aplikační techniky můžeme ovlivnit velikost kapének, rychlost jejich letu, dopadu a dávku postřikové jichy. Fyzikálně-chemické vlastnosti účinné látky a formulační přísady mají vliv na podmínky pro dokonalý příjem herbicidu rostlinou. Na příjem herbicidů působí také intenzita slunečního záření, relativní vlhkost a teplota vzduchu. Účinná látka se musí z povrchu listu dostat do cytoplazmy přes tři vrstvy. Kutikulu, která je tvořena hydrofobními kutikulárními vosky, buněčnou stěnou tvořenou polysacharidy a plazmalemou tvořenou fosfolipidy, která je polopropustná. Transport herbicidů z povrchu listů probíhá difúzí. Translokace probíhá symplastickou cestou mezi jednotlivými buňkami pomocí plazmodesmatických kanálků nebo floémem (Jursík a kol., 2011).

Kontaktní listové herbicidy musí být aplikovány přímo na místo účinku herbicidu. Nadzemní biomasa musí být zvlhčená, aby účinnost herbicidu byla co nejvyšší. Po aplikaci roztokem nadzemní části rostliny odumírají, podzemní orgány zůstávají nezasázeny.

Systemicky působící listové herbicidy mohou být transportovány floémem nebo xylémem v rostlině. Floém je systém pletiv, kterým probíhá transport vzhůru i dolů ke kořenům. Přepравuje asimiláty z listů a stonku do kořenů a do vegetačních vrcholů. Xylém je neživá rostlinná tkáň, probíhá v něm translokace z kořenů do nadzemních orgánů (Jursík a kol., 2011).

### 3.2.5 Selektivní herbicidy

Selektivní herbicidy se řadí mezi přípravky, které ničí určité druhy plevelů nebo jejich skupiny. Nepoškozují kulturní plodiny, ve kterých byl herbicid použit. Účinky selektivity působí při správné dávce herbicidu, termínu aplikace, aplikační technice a při určité teplotě vzduchu. Záleží také na růstové fázi plevelu i kulturní plodiny (Dvořák a Smutný, 2008). Selektivita herbicidů k plodině se liší v míře selektivity. Vyjadřuje se pomocí tzv. kvocientu selektivity ( $Q_s$ ). Kvocient selektivity je dán poměrem mezi dávkou herbicidu, v jejímž důsledku dochází k 10 % poškození plodiny a dávkou potřebnou k zajištění 90 % účinnosti na plevele. Tento vztah lze vyjádřit vzorcem:

$$Q_s = \frac{ED_{10} \text{ plodina}}{ED_{90} \text{ plevel}}$$

Čím je herbicid selektivnější, tím je rozpětí těchto hodnot dávek vyšší a kvocient nabývá vyšších hodnot. Selektivita je pouze relativní hodnota, která závisí na mnoha faktorech, které již byly uvedeny výše (Soukup, 2005). Selektivní herbicidy se dělí do dvou skupin: dotykové a translokační.

**Dotykové herbicidy (kontaktní)** působí jen na zasaženou část rostliny. Pletivo zasažené herbicidem odumře a účinná látka není dále rozváděna do dalších částí rostliny. Kontaktní herbicidy způsobují srážení bílkovin a dehydratační účinek.

**Translokační herbicidy (systemické)** jsou rozváděny po celé rostlině i do míst, které nebyly zasaženy látkou. Účinná látka může být rozváděna cévními svazky xylémem nebo

floémem. Xylémem je látka vedena od kořenů do nadzemní části rostliny. U floému se látka pohybuje z listů do spodní části rostliny. U některých druhů herbicidů se oba způsoby propojují (Dvořák a Smutný, 2008).

Používají se v několika termínech:

- Před setím plodiny
- Po zasetí a před vzejitím plodiny (preemergentní aplikace )
- Po vzejití plodiny (postemergentní aplikace)
- Po sklizni plodiny (posklizňová aplikace – v mezíporostním období nebo v době vegetačního klidu) (Hron a Kohout, 1988)

### **3.2.5.1 Selektivní herbicidy používané proti turance kanadské**

Lontrel 300 a Cliophar 300 SL jsou selektivní postřikové herbicidy. Účinnou látkou je clopyralid. Registrant přípravku Lontrel 300 je Dow AgroSciences s.r.o. Registrant pro přípravek Cliophar je Agriphar S.A. Formulace přípravku je kapalný koncentrát. Účinná látka clopyralid je určena k hubení odolných dvouděložných plevelů. Používá se na regulaci turanky kanadské v sadech, v lesním hospodářství, na uvolněných prázdných plochách, záhonech. Účinná látka clopyralid je řazena mezi syntetické auxiny (skupina O dle klasifikace HRAC) a působí jako růstový herbicid. Po aplikaci postřiku citlivé plevele zastavují růst a postupně ztrácejí svoji přirozenou barvu. V průběhu 10 – 21 dnů po aplikaci se listy a stonky deformují a umírají. Doporučuje se jedna aplikace za vegetační sezonu (agromanual.cz).

### **3.2.6 Neselektivní herbicidy**

Neselektivní herbicidy se používají k regulaci veškeré vegetace na nezemědělské půdě a také k hubení plevelů na orné půdě i dalších zemědělských kulturách. K nejrozšířenějším herbicidním přípravkům patří účinná látka glyphosate obsažená např. v přípravcích Glyphogan, Roundup a Touchdown. Hubí široké spektrum jednoletých i víceletých plevelů. Potlačují nadzemní i podzemní část rostlin a mohou hubit rostliny v plné metabolické aktivitě. Podle délky

reziduálních účinků v půdě a rostlině se rozdělují na s dlouhodobou a krátkodobou rezistencí. Herbicidy s krátkou rezistentní dobou působí na jednotlivou část rostliny nebo pouze na podzemní nebo jen nadzemní část (Dvořák a Smutný, 2008; agrokrom.cz).

### **3.2.6.1 Neselektivní herbicidy používané proti turance kanadské**

Glyfogan 480 SL je univerzální neselektivní herbicid. Účinná látka je izopropylaminová sůl glyphosate 480 g/l. Registrantem je Makhteshim Agan Industries Ltd. Koncentrát je ředitelný vodou, dávka vody je 150 – 200 l/ha. Používá se v zemědělství, ovocnářství, na nezemědělské půdě, železnici, v lesním a vodním hospodářství. V ovocných sadech a v révě vinné, kde se vyskytuje turanka kanadská je dávkování 2 l/ha. Přípravek se rychle rozvádí do kořenů plevelů a spolehlivě je vyhubí. Má výborné ekotoxikologické vlastnosti a jeho použití je ekonomické. Glyfogan 480 SL působí systémovým účinkem, rostlina jej přijímá jen zelenými částmi a asimilačním proudem rozvádí do celé rostliny. Aplikace se provádí v období nasazování květních pupenů, nebo po odkvětu, kdy jsou plevele v plném růstu. Účinek herbicidu se projeví vadnutím, žloutnutím, zasycháním a zhnědnutím rostlin během 10 – 14 dnů (agrovita.cz).

Roundup Klasik je určený k hubení širokého spektra jednoletých a víceletých plevelů. Aplikuje se jako postřik na list. Jeho účinnou látkou je glyphosate – IPA – 480g. Registrantem je Monsanto Europe S.A./N.V. Používá se jako hubicí prostředek na mimoprodukční plochy, nezemědělská půda, železnice, louky a pastviny. Aplikuje se na počátku tvorby květů do odkvětu, aby se zabránilo šíření klíčících semen. Přípravek nesmí zasáhnout zelené části kulturních plodin a sousední kultury.

Touchdown Quatro se řadí mezi nejúčinnější herbicid. Velmi spolehlivě působí na širokolisté plevele a trávy. Účinnou látkou je glyphosate – 360g. Registrantem je Syngenta Limited (agromanual.cz).

Dominátor patří mezi neselektivní herbicidní přípravek k hubení jednoletých i vytrvalých plevelů. Používá se na orné půdě před setím a po sklizni, v jádrovinách a peckovinách (kromě broskvoní) a ve vinicích, k preemergentní aplikaci do brambor a kukuřice, proti pýru plazivému a vzešlým vytrvalým a jednoletým plevelům, k obnově trvalých travních porostů a retardaci na loukách a pastvinách, proti jednoletým a vytrvalým plevelům v lesních školkách a

kulturách jehličnanů (s výjimkou modřínu), proti jednoletým a vytrvalým plevelům a ostružiníku křovitému při přípravě lesní půdy pro přirozenou i umělou obnovu lesa. Účinná látka je glyphosate – IPA – 480g/l. Registrem je Dow AgroSciences s.r.o. Dominátor se používá k hubení turanky kanadské při výskytu ve vinné révě a jádrovínách (e-agro.cz).

### 3.3 Účinná látka glyphosate

#### 3.3.1 Fyzikální, chemické a enviromentální vlastnosti

Chemický název: N-(phosphonomethyl) glycin

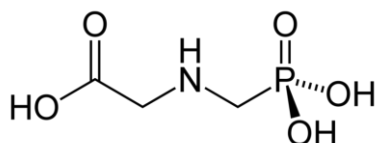
Chemická třída / použití: fosphanoglycine herbicid

Rozpustnost ve vodě: 900.000 mg/l

Rozpustnost v jiných rozpouštědlech: nerozpustné v běžných organických rozpouštědlech

Sumární vzorec: C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P

Strukturní vzorec:



(Pmep.edu)

Glyfosát je bílá, krystalická pevná látka bez zápachu, s bodem tání 185 °C. Rozkládající se při 187 °C, přičemž při rozkladu uvolňuje toxické plyny - oxidy dusíku a fosforu. Čistý glyphosate je mírně rozpustný ve vodě (12g/litr při 25 °C) a je prakticky nerozpustný ve většině organických rozpouštědel. Glyphosate a jeho různé formy vykazují stabilitu do teploty 60°C (arnika.org). V roce 1950 byl objeven švýcarským chemikem Dr. H. Martinem, který pracoval pro malou farmaceutickou firmu Cilag. Dlouho nebyl zjištěn žádný farmaceutický účinek a tak byl prodáván různým firmám, aniž by byly publikovány informace o jeho biologických aktivitách. Herbicidní účinek objevil John Franz pro společnost Monsanto. V roce 1970 byl glyphosate syntetizován a na trh se dostal v roce 1974 jako účinná látka herbicidu Roundup. Po testování glyphosate jako herbicidu se ukázala určitá herbicidní aktivita u vytrvalých plevelů (Nandula, 2010).

### 3.3.2 Vznik glyphosate rezistentních plodin

Začátkem 90. let 20. století objevila firma Monsanto kmen bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, které se díky dlouhodobému vystavení účinkům tomuto herbicidu staly vůči němu rezistentní. Z bakterie následně firma izolovala gen pro bakteriální verzi enzymu EPSP syntázy, který byl poté postupně vložen do některých zemědělských plodin. Dnes je v tomto ohledu dostupná široká škála glyphosate-rezistentních plodin např. sója, řepka olejná, kukuřice, bavlník, cukrová řepa a vojtěška. V současné době se používá glyphosate ve více než 130 zemích a aktuální celkový objem se odhaduje každoročně na 600 kilotun (Nandula, 2010).

V průběhu posledních 30 let, se stal glyphosate nejdůležitějším herbicidem v celosvětovém zemědělství. Glyphosate byl uveden na trh od různých firem a v současné době je registrován tento přípravek v Evropě pro použití na zemědělských půdách. V některých evropských zemích, například v Německu a Velké Británii, zemědělci používají glyphosate pro pěstování plodin až na 40% z celkové zemědělské výměry.

Během několika posledních desetiletí byl glyphosate hodnocen řadou mezinárodních oficiálních regulačních orgánů, které dospěli k závěru, že představuje nízké riziko pro lidské zdraví na základě výsledků rozsáhlé toxikologické databáze. Pro zemědělce poskytují herbicidy s účinnou látkou glyphosate jednoduché, flexibilní a nákladově efektivní kontrolu plevelů. Pomáhá odstranit vytrvalé plevele po dobu několika let. Jeho aplikací se snížilo používání orby jako prostředek k snižování množství plevelů (glyphosate.eu). Glyphosate přinesl mnoho výhod pro pěstební systémy a pěstitelé by měli směřovat své úsilí k zachování jeho použití (Vondrášková, 2006).

### 3.3.3 Ekonomický dopad plodin s rezistencí ke glyphosate

Za účelem rozšiřování použití glyphosate jako herbicidu jsou vyvíjeny geneticky modifikované plodiny, které jsou vůči této látce odolnější. Tyto plodiny nazýváme transgenní plodiny. Jsou to geneticky modifikované rostliny, do jejichž buněk byla vnesena DNA z jiného druhu organismu prostřednictvím metod genového inženýrství.

V roce 1996 byla vyvinuta první řada transgenní sóji tolerantní vůči glyphosate. (Halford, 2003). Od roku 2002 došlo v USA k rychlému přechodu k plodinám tolerantním k herbicidům, především ke glyphosate. V roce 2007 dosáhly výměry sóji, kukuřice a bavlníku tolerantních ke glyphosate téměř 100%. Nová technologie zcela změnila obraz zemědělství v USA. Zemědělci s touto technologií dosahovali až 100% regulace plevelů.

V roce 1997 Dr. Ian Heap, ředitel mezinárodního programu zabývajícího se průzkumem rezistentních plevelů upozornil, že by měl být glyphosate používán spolu s osvědčenými postupy antirezistentního managementu a s nechemickými metodami kontroly plevelů, aby byl omezen jeho selekční tlak v transgenních pěstitelských systémech. Od zavedení transgenních plodin došlo k dramatickému nárůstu počtu druhů plevelů vykazujících rezistenci vůči glyphosate. Rezistence ke glyphosate byla potvrzena u více než 20 druhů s více než 100 identifikovanými rezistentními biotypy (gate2biotech.cz).

V roce 2000 v Delaware ve Spojených Státech byl potvrzen první případ rezistentní turanky kanadské v oblasti pěstování transgenních plodin. Od té doby, odolnost vůči glyphosate byla potvrzena v dalších populacích 10 druhů plevelů v několika státech. Glyphosate-rezistentní plevele byly také hlášeny v Kalifornii v sadech mandloní, v ovocných sadech v Oregonu a Michiganu. V současné době je turanka kanadská nejrozšířenější plevel s rezistencí ke glyphosate v USA (Nandula, 2010).

### **3.4 Herbicidní rezistence a tolerance**

#### **3.4.1 Úvod**

Tolerance k herbicidům je vlastní schopnost druhu přežít a množit se i po ošetření herbicidem. Znamená to, že neexistuje žádný výběr nebo genetická manipulace, která dělá rostliny tolerantními. Tolerance je tedy přirozená vlastnost rostlin (Wssa.net). Podle Mikulky a Chodové (1998) je tolerance plevelů, na rozdíl od rezistence, normální. Variabilita citlivosti vůči herbicidům je danému druhu plevele vlastní. Projevem aktivity detoxikačního nebo metabolizujícího enzymu se může tolerance zvyšovat od nízké k vysoké (Nandula, 2010).

Herbicidní rezistence je absolutní tolerance k takové dávce herbicidů, která daný druh plevelné rostliny za normálních okolností v porostu plodiny hubí. Po delším používání a po opakovaných aplikacích vysokých dávek určitého herbicidu eventuálně herbicidů se stejným mechanismem účinku, daný druh přežívá (Mikulka a Kneifelová, 2005). Jde o selekční proces, ve kterém se populace plevelného druhu přizpůsobuje podmínkám prostředí a stává se postupně z citlivé rezistentní (Vencill, 2008). Rezistence v minulosti nebyla považována za aktuální problém z důvodu nepravidelné aplikace herbicidů, střídání plodin či relativně pomalému rozmnožování plevelů (Mikulka, 2003). V roce 1956 Hasper uvedl, že dlouhodobé používání herbicidů může způsobit vznik rezistentních populací (Kohout, 1996). Pozornost tomuto problému byla věnována až při prvních nálezech rezistentních biotypů. Vznik rezistence byl zpočátku v monokulturách kukuřice, sadech a vinicích. Z těchto kultur se rezistentní populace šířily na další plochy. Rozšiřování probíhalo pomocí statkových hnojiv, zemědělské mechanizace, splavem půdy nebo větrem. Dlouhodobě se zde používány herbicidy se stejným mechanismem účinku – triazianové herbicidy. Po několika letech byl pozorován menší účinek herbicidu. Zvyšováním dávek se problém nevyřešil a jedinců stéle přibývalo. Citlivé rostliny byly hubeny, zatímco rezistentní zůstávaly nedotčené a zvyšoval se poměr semen rezistentních jedinců v půdě. Po několika letech se výskyt citlivých jedinců redukoval nebo úplně vymizely (Mikulka, 2003). Řešení problému rezistence plevelů je komplikováno morfologickou identitou rezistentních a citlivých biotypů. Prokázání rezistence je možné pouze laboratorními metodami (Kneifelová, 2003).

Historicky byly první nálezy rezistentních plevelných rostlin vůči herbicidům zaznamenány koncem 60. let v USA. Byly aplikovány perzistentní herbicidy ze skupiny triazinů, které byly opakovaně používány v monokulturách kukuřice a jabloňových sadech. V Severní Americe a v Evropě v průběhu 70. – 80. let byly popsány nové druhy rezistentních plevelů vůči triazinům (laskavec ohnutý, merlík bílý, turanka kanadská aj.). Na celém světě bylo doposud popsáno 300 biotypů plevelů, které vytvořily rezistentní populace vůči různým účinným látkám.

Na našem území se první herbicidy začaly masově používat již v průběhu 50. let 20. století, k výraznějšímu zvýšení rezistentních populací plevelů došlo až se zavedením triazinových herbicidů v polovině 60. let. Od počátku 80. let docházelo k výraznému nárůstu počtu rezistentních populací právě vůči triazinovým herbicidům. Negativní vliv se projevil u velkoplošného pěstování kukuřice, která byla pěstována od nížin až do podhorských oblastí. Od



90. let minulého století se pak velmi rychle objevovaly populace plevelů rezistentní k dalším herbicidním skupinám, především vůči ALS inhibitorům a inhibitorům ACCasy (Mikulka a Slavíková, 2008).

### 3.4.2 Mechanismus rezistence

Mechanismy rezistence rostlin vůči herbicidům způsobují změny v základních biochemických nebo fyziologických procesech. Nejčastěji je to způsobeno prostřednictvím specifické interakce s jednou cílovou molekulou v rostlině (Chodová a Salava, 2004). K navržení efektivní strategie řízení herbicidní rezistence je důležité porozumět těmto mechanismům rezistence (Nandula, 2010). Celkem bylo do dnešní doby definováno pět druhů herbicidní rezistence vůči herbicidům:

- Změna cílového místa, díky mutacím vznikajícím v místě působení herbicidu s úplnou nebo částečně nedostatečnou inhibicí
- Translokace nebo redukováná absorpce způsobující omezení letálního působení herbicidní účinné látky
- Metabolická deaktivace, při níž je herbicidní účinná látka přeměněna na netoxické metabolity
- Nadměrná exprese cílového místa s následným ředěním účinku herbicidní látky
- Rozklad, kterým je herbicid imobilizován v místě působení a dále lokalizován do buněčné stěny nebo vakuol (Nandula, 2010).

Nejběžnějším mechanismem rezistence je tzv. rezistence v místě účinku (z angl. Target site resistance). V tomto případě pak mluvíme o takzvané specifické rezistenci. Druhý mechanismus rezistence se označuje jako nespecifická rezistence (z angl. Non – target site resistance), která spočívá v metabolické přeměně herbicidů na neúčinné látky nebo zamezení jeho příjmu (Lutman a Health, 1990).

### **3.4.2.1 Specifická rezistence (Target site resistance)**

Specifickou rezistenci lze označit za modifikaci vazebného místa herbicidu, při které dochází k zamezení navázání herbicidu s cílovým místem účinku (Hamouzová a kol., 2012). Dochází k záměně aminokyselin v primární struktuře cílového enzymu na místě, kde se herbicid váže. Takto modifikované místo ztrácí citlivost k herbicidu (Jursík a kol., 2011). Cílovým místem jsou obvykle enzymy, proteiny nebo jejich komponenty, které se v těchto místech váží s herbicidy a tím narušují v rostlině základní fyziologické funkce (Coby a Kirkwood, 2000). Modifikace vazebného místa je zapříčiněna bodovou mutací genu, který kóduje enzym, se kterým by se za normálních podmínek herbicid vázal. Bodová mutace, která změní pořadí aminokyselin proteinu, umožní enzymu jeho normální funkci i za přítomnosti herbicidu. Tento mechanismus rezistence byl objeven u herbicidů inhibující fotosystém II, acetylkoenzym A, acetolaktátsyntázu, enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu a buněčné dělení (Devine a Eberlein, 1997).

### **3.4.2.2 Nespecifická rezistence (Non – target site resistance)**

Plevelé s touto rezistencí jsou schopné velmi rychle metabolizovat herbicid na netoxické či méně toxické látky. Mechanismus nespecifické rezistence spočívá v tom, že zabraňuje molekulám herbicidů dosáhnout v dostatečném množství cílového místa účinku. U citlivých plevelů je metabolizace příliš pomalá. Vzniklý metabolit u citlivých rostlin má toxické vlastnosti, netoxické metabolity se tvoří u rezistentních rostlin. Metabolická rezistence mnoha populací plevelů se do jisté míry podílí na zvýšené aktivitě enzymů patřící do komplexu cytochrom P450 monooxygenáz a glutation S-transferáz (Jursík a kol., 2011). Důležitým mechanismem u metabolické rezistence je kompartmentace a translokace herbicidu neboli uložení a přemístění na místo, odkud nemůže účinkovat (Heap a Knight, 2003). V tukových tělískách se mohou imobilizovat lipofilní herbicidy. Také detoxikace herbicidu prostřednictvím oxidace, redukce, hydrolýzy nebo konjugace je další příčinou metabolické rezistence. V těchto biochemických reakcích je herbicid odbouráván rychleji, než dosáhne místa účinku (Steging a Vaughn, 1988).

### **3.4.2.3 Křížová a vícenásobná rezistence**

Křížové rezistence (angl. cross-resistance) znamená, že rostlina, u níž byla vyvolána rezistence jedním herbicidem, je rezistentní i vůči jiným herbicidním látkám ze stejné nebo odlišné chemické skupiny se stejným mechanismem účinku (Mikulka a Slavíková, 2008). Tato rezistence nemusí ovšem vždy znamenat, že by plevelný druh byl rezistentní ke všem herbicidům se stejným mechanismem účinku (Hamouzová a kol., 2012).

Vícenásobná rezistence (angl. multiple-resistance) je pokládána za nejnebezpečnější druh rezistence. U rostlin vzniká odolnost proti více než jedné skupině účinných látek patřící do různých herbicidních skupin (Mallory–Smith a Namuth, 2011). U plevelů s vícenásobnou rezistencí je velmi obtížná regulace z důvodu rezistence vůči širokému spektru herbicidních přípravků (Powles a Shaner, 2001).

### **3.4.2.4 Další mechanismy rezistence**

U některých herbicidů může dojít k zabudování do buněčných vakuol, kde mohou aktivovat místo působení. Jedním z dalších možných mechanismů rezistence je snižování příjmu a translokace herbicidu na místo působení v rostlině. Některé herbicidy jsou formulovány nebo aplikovány v neaktivní formě až v rostlině dojde k jejímu spuštění. Nedostatečná aktivace těchto herbicidů je dalším mechanismem rezistence (Jursík a kol, 2011).

## **3.5 Rezistence vůči glyphosate**

Glyphosate je používán od roku 1974 jako postemergentní, systémový, neselektivní přípravek pro regulaci jednoletých či víceletých plevelů se širokým spektrem uplatnění. Celosvětově byl využíván přes dvacet let bez známky vzniku rezistence proti tomuto herbicidu (Nandula, 2010). Je zajímavé, že první případ rezistentního biotypu byl popsán až v r. 1996 u jílku tuhého v Austrálii (Pratley a kol., 1996). Od tohoto roku byly dále nalézány další a další druhy s rezistencí vůči glyphosate. Po prvním potvrzení případu rezistence vůči glyphosate, začaly být zkoumány mechanismy herbicidní rezistence. Podle Bradshawa a kol. (1997) byl první

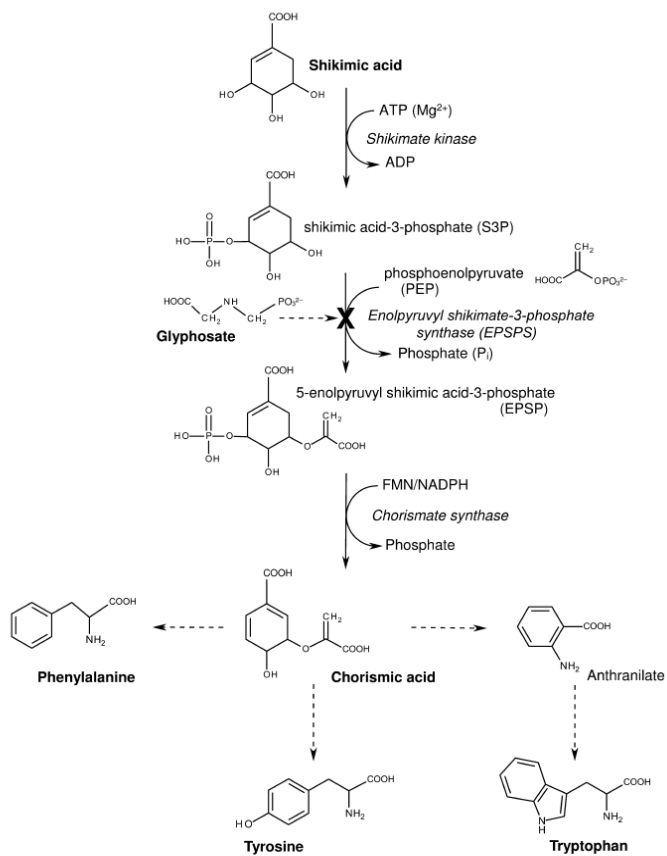
biotyp s rezistencí vůči glyphosate objeven tak pozdě, díky jeho vlastnostem - mechanismus účinku, metabolismus, chemická struktura a nízká reziduální aktivita v půdě.

V současné době bylo objeveno více než 300 populací jílku tuhého, 50 populací turanky kanadské, 20 populací ježatky kuří nohy a dalších významných plevelných druhů s rezistencí ke glyphosate. Všechny dosud potvrzené případy rezistence byly pozorovány na plochách, které byly touto účinnou látkou ošetřovány po dobu nejméně 15 let (Nandula, 2010).

### **3.5.1 Mechanismus účinku glyphosate**

Glyphosate má jedinečný systém účinku. Z hlediska herbicidního účinku je v pochodech biosyntézy aminokyselin nejvýznamnějším cílovým enzymem herbicidního účinku enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza (EPSP). Následkem zablokování enzymu dochází k inhibici syntézy v organických sloučeninách buněčného dělení v meristematických pletivech. (Jursík a kol., 2011). Glyphosate inhibuje enzym 5-enolpyruvyl-šikimát-3-fosfát syntázu (EPSPS). Šikimátovou cestou vznikají aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan a tyrosin) a další různorodé sloučeniny fenylypropanoidového metabolismu (flavenoidy, auxiny, ligniny, kumariny, antokyaniny a alkaloidy). EPSPS katalyzuje tvorbu 5-enolpyruvyl-šikimát-3-fosfátu (EPSP) z fosfoenolpyruvátu (PEP) a šikimát-3-fosfátu (S3P). Tato reakce je předposlední reakcí šikimátové dráhy, na jejímž konci se tvoří chorismát. Chorismát je nezbytný pro syntézu mnoha aromatických rostlinných metabolitů včetně aminokyselin fenylalaninu, tryptofanu a tyrosinu (Halford, 2006). EPSPS syntáza katalyzuje přenos poloviny enolpyruvylu z fosfoenolpyruvátu (PEP) na šikimát-3-fosfát (S3P) a vytvoří tak EPSP a anorganický fosfát (Nandula, 2010). Glyphosate je přechodný stav analogu PEP, který inhibuje EPSP syntázu přes EPSP syntázu-S3P-glyphosate vzniklý komplex vázaný jen na enzym po vzniku EPSP syntázy-S3P binárního komplexu. Konkurenčním inhibitorem pro PEP je tedy glyphosate, který zaujímá polohy jeho vazeb (Schönbrunn a kol., 2001). Šikimátová dráha je přítomna v rostlinách, houbách, bakteriích ale u živočichů se nevyskytuje (Nandula, 2010).

Obr.č.2 Šikimátová cesta, která vede k biosyntéze aromatických aminokyselin a mechanismus účinku glyphosate



(Pollegioni a kol., 2011)

### 3.5.2 Genetická podstata rezistence plevelů vůči glyphosate

Herbicidní účinek glyphosate je založen na inhibici 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS) v chloroplastech. Inhibice brání tvorbě důležitých aromatických aminokyselin, fenylalaninu, tyrozinu a tryptofanu. Doposud byly objeveny dva mechanismy rezistence ke glyphosate. Jedním z mechanismů je snížená translokace glyphosate, jejíž molekulárně-genetický základ ještě není zcela objasněn. Dalším mechanismem je snížená citlivost ke glyphosate, zapříčiněná vznikem mutace v pozici genu *epsps* který kóduje EPSPS. Poslední výzkumy ukázaly další možný mechanismus rezistence u glyphosate. Třetí potenciální mechanismus

rezistence by mohl být způsoben genovou amplifikací, kdy dochází ke zvýšení exprese citlivé EPSPS (Gaines a kol., 2010).

Studie zabývající se rezistencí vůči glyphosate u jílku tuhého a turanky kanadské poukázaly na to, že dědičnost patrně souvisí s neúplnou dominancí jaderného genu (Zelaya a kol., 2007). Neúplná dominance rezistence byla potvrzena v případech snížené translokace a změněného místa účinku EPSPS (Powles a Preston, 2006). Také reakce na glyphosate u citlivých a rezistentních F1 hybridů turanky kanadské potvrdila neúplnou dominanci rezistence (Nandula, 2010).

### **3.5.3 Četnost genů rezistence a fitness plevelů rezistentních vůči glyphosate**

Četnost genů rezistence vůči glyphosate v populacích plevelů můžeme považovat za relativně nízkou (Bradshaw a kol., 1997). Díky tomu nejsou vždy glyphosate rezistentní plevele považovány za potenciální hrozbu ekonomického významu. Jander a kol. (2003) se zabýval výzkumem, jehož výsledky podpořily nízkou pravděpodobnost vzniku rezistence vůči glyphosate závislé na bodové mutaci. Neselektovanou četnost glyphosate rezistentních mutantů v populaci je těžké odhadnout. Z důvodu, že se vyskytují jen zřídka a kvůli nedostatečným informacím o dalších bodových mutacích, které mohou způsobovat rezistenci vůči glyphosate (Nandula, 2010). Populace plevelů, které nebyly vystaveny působení glyphosate jsou skoro nedostupné. Důležitým aspektem pro výzkum glyphosate rezistentních plevelů je genová četnost, protože tento údaj vstupuje do simulačních modelů. Simulační modely se dále využívají ke stanovení ideální strategie regulace plevelů (Nandula, 2010). Většinou se v případě herbicidní rezistence vůči glyphosate uplatňuje jeden gen. Simarmata a kol. (2005) zjistili, že se nemusí vždy uplatňovat pouze jeden gen, dědičnost GR u jílku tuhého z Kalifornie je důsledkem dvoujaderné neúplné dominance genu.

Yu a kol. (2007) také zjistili a potvrdili u jílku tuhého přítomnost alespoň dvou genů. Proměnlivost herbicidního účinku mezi rostlinami laskavce tamaryškového (*Amaranthus tuberculatus*) po opakované selekci dokazuje, že snížení vlivu glyphosate na rostlinu může být způsobeno více geny (Zelaya a kol., 2007; Owen 2008 ). Lorraine-Colwill a kol. (2001) se zabývají také jílkiem tuhým u kterého zmiňují možnost působení více genů. Další výzkumy u

svlačce rolního (*Convolvulus arvensis*) ukázaly existenci dalších genů ovlivňujících působení glyphosate (Nandula, 2010).

Fitness rostliny je definováno jako reprodukční úspěšnost. Jde o celý komplex vlastností, které umožňují, aby potomstvo rezistentního jedince přeživalo a množilo se v konkurenci původních citlivých biotypů. Porovnání reprodukční úspěšnosti jednotlivých rostlin v populaci v polních podmínkách je velmi složité. Většina studií se tedy zaměřuje především na snadněji stanovitelné charakteristiky, jako rychlost růstu nebo produkce biomasy, které s rozdíly ve fitness velmi úzce souvisí (Jursík a kol., 2011). Byly provedeny experimenty, které potvrdily, že rezistence vůči glyphosate u plevelů může být spojena s omezeným fitness. Jeden z výzkumů se zabýval glyphosate tolerantní povijnicí nachovou (*Ipomoea purpurea*), která produkuje o 35 % méně semen v porovnání s citlivými rostlinami, které nebyly ošetřeny účinnou látkou glyphosate. V další studii byly u jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) pozorovány rozdíly v konkurenceschopnosti mezi rezistentními a citlivými biotypy. Fenotyp rezistentních biotypů produkoval větší semena v menší míře v porovnání s citlivými rostlinami, jestliže nebyl vystaven konkurenci pšenice (*Triticum aestivum*) nebo při jejím nízkém výskytu (Nandula, 2010). U jílku tuhého (*Lolium rigidum*) byl popsán mechanismus rezistence jako snížená translokace glyphosate. Při tomto mechanismu rezistence se v populaci, kdy nebyl aplikován glyphosate na pozemku, vyskytuje s menší četností ve srovnání s citlivými biotypy (Preston a Wakelin, 2008). Preston a Wakelin (2008) také pozorovali četnost rezistence u jílku tuhého (*Lolium rigidum*), která klesala v průběhu času při absenci ošetřování glyphosateem. Výsledky experimentů a uvedených studií mohou být využity ke zlepšení kontroly plevelů rezistentních vůči glyphosate (Nandula, 2010).

#### **3.5.4 Popsané mechanismy rezistence vůči glyphosate u turanky kanadské**

Několik výzkumníků zkoumalo důvody rezistence turanky kanadské vůči glyphosate. Byla zjištěna specifická rezistence (target site resistance) i nespecifická rezistence (non – target site resistance). U specifické rezistence dochází k záměně aminokyselin v primární struktuře cílového enzymu na místě, kde se herbicid váže. V konzervované oblasti genu *epsps*, dochází k bodové mutaci a změně kódování aminokyselinové sekvence. Takto modifikované místo ztrácí

citlivost k herbicidu. U plevelů rezistentních k herbicidům byla zjištěna substituce ve vazbě aminokyseliny. Prolin v pozici 106 (číslování dle *Arabidopsisthaliana*) se nalézá v genových sekvencích *epsps* planých rostlin, ale u rezistentních rostlin dochází k nahrazení této aminokyseliny za serin, threonin nebo alanin. Tato záměna aminokyselin způsobí, že se glyphosate nemůže navázat. Translokací dochází také k nadprodukcí až 50-násobné akumulaci *epsps*. Herbicid je přemístěn na jiné místo, kde nemůže účinkovat. Kořenová translokace glyphosate v rezistentních biotypech, vedla k zpoždění a snížení rychlosti vstupu do apoplastu a floému. Další metabolický gen, glyphosate-N-acetyl transferázy a acetyláty deaktivuje glyphosate. Pravděpodobně se uplatňuje u mnohých biotypů více mechanismů účinku dohromady. Zvyšující se počet výskytu těchto mutací u rezistentních plevelů hraje důležitou roli v rezistenci vůči glyphosate. Cílená mutagenese v rostlinách by mohla usnadnit posuzování specifických efektů mutací na rostliny a případně hrát roli ve výzkumu rezistentních plevelů. Zatím ještě ale tato cílená mutagenese v rostlinách není zcela snadno dosažitelná (Nandula, 2010).

Některé studie zjišťovaly, zda se cílové místo se zvýšenou expresí podílí na rezistenci. Začaly porovnávat tedy úroveň exprese *epsps* v rezistentních a citlivých plevelných biotypech. Úrovně mRNA *epsps* byly podobné jak u rezistentních, tak i u citlivých rostlin jílku tuhého (Lorraine-Colwill a kol., 2003). Baerson a kol. (2002) vyzorovali naopak rozdíly úrovně mRNA *epsps*. Neošetřované jílky tuhé měli 2,5-3 krát vyšší úroveň mRNA *epsps* u většiny rezistentních biotypů ve srovnání s citlivými biotypy nebo rostlinami se středním stupněm rezistence. U rezistentní turanky kanadské byl také zjištěn rozdíl úrovně mRNA *epsps*. Hladinu mRNA *epsps* má 1,8-3,1 krát vyšší než citlivé biotypy (Dinelli a kol., 2006). Zvýšená exprese genu *epsps* se však nezdá být zcela plně odpovědnou za úroveň rezistence u turanky kanadské (Nandula, 2010).

### **3.5.5 Stav ve výskytu rezistence u turanky kanadské**

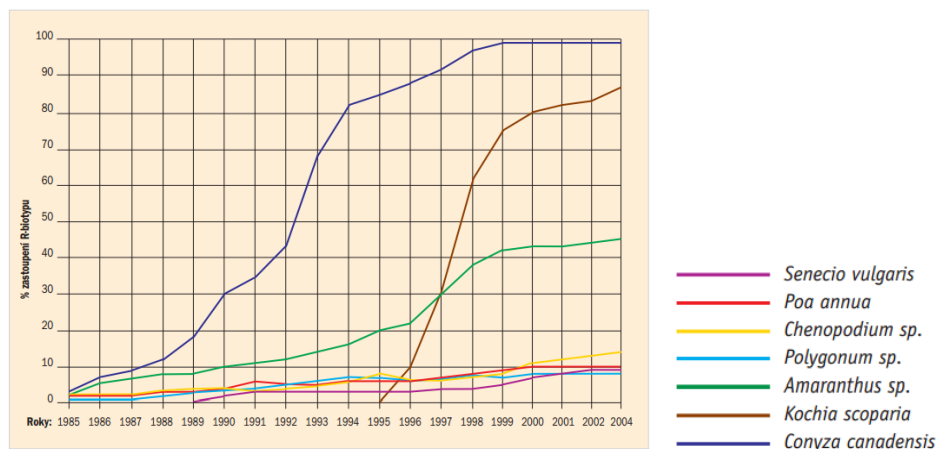
Od poloviny sedmdesátých let probíhá na našem území výzkum, který řeší problém rezistentních druhů populací (obr.č.3). V průběhu osmdesátých let bylo v Čechách a na Slovensku nalezeno devět rezistentních biotypů plevelů, mezi nimiž byla objevena turanka kanadská (Kneifelová, 2003).



V České republice se vyskytuje u turanky kanadské spektrum rezistence vůči atrazine, simazine, prometrynu, cyanazinu, paraquatu a diquatu (Mikulka a Chodová, 2002). Na území České republiky byly v roce 1987 zjištěny první rezistentní biotypy turanky kanadské (Mikulka a Chodová, 2002). Rezistentní populace na našem území byly nalezeny v porostech kukuřice, v zahradnických školkách, v sadech, na pastvinách, na železnicích a silnicích. Vyvinula se nejdříve rezistence vůči C1/5 herbicidům inhibujícím fotosystém PSII (klasifikace HRAC). Chemická skupina triazinu s aktivní složkou atrazine a simazine. Tato skupina herbicidů patří k inhibitorům fotosystému II. Tyto herbicidy působí přes půdu. Triaziny jsou herbicidy určené k preemergentní, případně časně postemergentní aplikaci v řadě plodin. Jsou přijímány kořeny i listy rostlin, převažuje však kořenový příjem. Účinkují pouze na klíčící plevely, případně na plevely v raných růstových fázích. Herbicidy z této skupiny se vyznačují dlouhou perzistencí v půdě. V zemích EU jsou triaziny postupně vyřazovány ze seznamu registrovaných přípravků.

V roce 2007 byla skupina G/9 - inhibice EPSP syntázy (klasifikace HRAC) herbicidů zaznamenána na našem území. Tato skupina herbicidů glyficidy mají dvě účinné látky glyphosate a glyphosate-trimesium. Jedná se o neselektivní herbicidy, které rostlina přijímá listy. V ošetřených rostlinách jsou rychle translokovány z listů do kořenů a oddenků, což vede k totálnímu zničení rostliny. Tyto herbicidy jsou také používány při předsklizňových aplikacích pro urychlení dozrávání, kdy mají vysoký účinek i na plevelné rostliny (Jursík a kol., 2011; Mikulka, 2008; Weedsience.org).

Obr.č.3 Podíl rezistentních a citlivých populací plevelů v ČR



(Mikulka a Slavíková, 2008)

### 3.5.6 Geografický výskyt rezistentních biotypů turanky kanadské v Evropě

V Evropě se vyskytují tři druhy turanky *Conyza*, které zaplevelují různé oblasti Evropy a Středozeří, jsou to *C. canadensis*, *C. bonariensis* and *C. sumatrensis* (Syn. *C. albida*). Během 80. let minulého století, kdy byly běžně používané triazinové herbicidy, bylo popsáno mnoho případů rezistentních populací turanky kanadské vůči PSII inhibitorům v různých částech Evropy, hlavně Francii, UK, Švýcarsku, Španělsku, Polsku, Belgii, Izraeli a České republice (Weedscience.org). Nejčastěji popisovaným mechanismem rezistence byla rezistence v místě účinku, kdy byla nalezena substituce aminokyseliny serin za glycin v pozici 264 ve vazebném místě D1 proteinu (Nandula, 2010). Jiné mechanismy účinku byly popsány u *C. bonariensis* vyskytující se v sadech v Egyptě a u *C. canadensis* v Belgii a Maďarsku, které byly rezistentní k účinné látce paraquat. V těchto případech se pravděpodobně vyvinuly dva odlišné mechanismy účinku – sekvestrace paraquatu z chloroplastů a zvýšená aktivita antioxidantních enzymů. Případy ALS rezistentních *Conyza* spp. V Evropě a Středomoří jsou překvapivě nízké. Před více než 30-ti lety byly v Izraeli a Polsku však nalezeny populace, které vykazovaly vícenásobnou rezistenci k ALS a PSII inhibitorům.

Rezistence ke glyphosate byla popsána u všech tří výše uvedených druhů, v místech, kde byla turanka vystavena dlouhodobému selekčnímu tlaku herbicidů s touto účinnou látkou. Byly potvrzeny oba mechanismy účinku – v cílovém i necílovém místě, stejně jako vícenásobná rezistence vůči dalším herbicidům s různými mechanismy účinku.

V Belgii se objevily první populace rezistentní vůči skupině C1/5 herbicidů v roce 1989. Výskyt byl zaznamenán v porostech kukuřice, ve školkách a podél silnic. V roce 1998 se objevila další rezistence turanky kanadské vůči herbicidům ze skupiny D/22 (Weedscience.org).

Ve Francii se našly první rezistentní druhy turanky kanadské vůči skupině C1/5 v roce 1981. Tyto druhy se nacházejí převážně na zemědělské půdě. O sedm let později se vyvinuly další rezistentní druhy vůči skupině C2/7 vůči chemickým skupinám substituovaných močovín a amidů, které jsou inhibitory fotosyntézy ve fotosystému II (Weedscience.org).

V roce 1983 byly v Polsku evidovány místa s rezistencí vůči skupině C1/5. Výzkum ukázal, že zkoumané biotypy jsou vysoce odolné vůči simazineu. V roce 2000 byla objevena další odolnost vůči skupině B/2 herbicidů (Weedscience.org).

V jižní Evropě zaznamenali rezistenci vůči skupině C1/5 ve Španělsku už v roce 1987. Bylo objeveno několik set hektarů zaplevelených oblastí. V roce 2006 byla objevena herbicidní rezistence vůči skupině G/9, kde byly zaznamenány biotypy s rezistencí vůči glyphosate (Weedscience.org).

Ve Švýcarsku a Velká Británii v roce 1982 zdokumentovali výskyt turanky kanadské rezistentní vůči atrazine a simazine ze skupiny C1/5 herbicidů. Ve Španělsku se odhadují její výskyty na několika set hektarech půdy. Spojené království zaznamenalo několik desítek lokalit s výskytem rezistentních populací turanky kanadské (Weedscience.org).

Rezistentní biotypy turanky kanadské byly zaznamenány v Evropě na území několika států, které jsou zaznamenány na mapě (obr. č. 4).

**Obr.č.4 Mapa rezistentních populací turanky kanadské vůči skupině B/2, C1/5, C2/7, D/22, G/9 v Evropě**



(Mikulka a Slavíková, 2008)

### 3.6 Metody diagnostiky rezistence

Jak již bylo popsáno výše, rostliny rezistentní od citlivých nelze od sebe vzájemně odlišit na základě morfologických změn. Byla vyvinuta celá řada metod, které jsou uplatňovány při popisech rezistentních druhů (Mikulka a Slavíková, 2008). Předpokladem pro úspěšnou diagnostiku je kvalita vzorku, při špatné kvalitě dochází k nízkému procentu klíčivosti. Sběr probíhá ve fázi zralých semen za příznivých vlhkostních podmínek. Následně jsou semena usušena teplým vzduchem a připravena k testovacím metodám (Prokop, 2009).

- **Metoda biologického testu**

Jedná se o nejjednodušší, spolehlivou a přesnou metodu, která umožňuje charakterizovat citlivost a stanovit faktor rezistence (Hamouzová a kol., 2011). Rostlinný materiál je vypěstován ze semen. Princip spočívá v ošetřování rostlin odstupňovanými dávkami herbicidů. Rostliny se pěstují ve sklenících nebo klimatizovaných komorách (klimaboxech), po vytvoření 2 - 4 pravých listů jsou ošetřeny herbicidními přípravky v odstupňovaných dávkách. Ošetření se provádí podle etikety a doporučení výrobce herbicidu (Mikulka a Slavíková, 2008). Testované vzorky rostlin je vhodné poté porovnat s variantami, ve kterých byla použita semena z rostlin známé citlivosti (Mikulka a Chodová, 2002). Účinek herbicidů se obvykle projeví za několik týdnů (2-4 týdny) a hodnotí se vizuálně v procentech (0% - úhyn, 100% - rostliny bez jakéhokoliv poškození) (Hamouzová a kol., 2011). Tato metoda je pomalá a velmi náročná na pěstovanou plochu, i přesto jde o nejpoužívanější metodu, která se na pracovištích zabývajících se testováním rezistence, provádí (Mikulka a Slavíková, 2008).

- **Metoda vodních kultur**

Jedná se o metodu blízkou biologickému testu, kde se uplatňuje modifikovaný biologický test. Metoda je především vhodná k detekci rezistence vůči herbicidům, které jsou přijímány kořeny a translokovány do nadzemních částí. Je možné také testovat rostliny u kterých je podezření na výskyt rezistentních plevelů (Mikulka a Slavíková, 2008). Výhodou tohoto testu je, že můžeme testovat rostliny přímo odebrané z pozemku. Rostliny se odstříhnou těsně u povrchu ornice a vloží se do speciálních nádob s roztokem herbicidu (Mikulka a Chodová, 2002). K testování používáme rostliny ve fázi 4 – 6 listů. Vyhodnocení pokusu je možné za 14 dní (Mikulka a Slavíková, 2008).

- **Metoda stanovení z půdní zásoby semen**

Metoda spočívá v tom, že z půdní zásoby semen pěstujeme rostliny, u kterých zjišťujeme přítomnost rezistentních biotypů plevelů v půdě. Z podezřelé lokality se odeberou vzorky semen z hloubky 0 – 10 cm půdního profilu. Vhodné je odebrat přibližně 10 - 20 odběrů z jedné lokality, ale záleží na velikosti pozemku (Mikulka a Chodová, 2002). Odebranou zeminou se naplní kontejnery a umístí se do skleníku nebo klimaboxu. Po vzejití rostlin se v každém kontejneru určí druhy plevelů a jejich přesný počet a rostliny se ošetří herbicidem ve 2 – 3 stupňovaných dávkách. Hodnocení se provádí za 1 – 2 týdny a hodnotí se počet živých, tj. rezistentních a uhynulých, tj. citlivých rostlin (Mikulka a Slavíková, 2008).

- **Metoda agarových pěst**

Tato metoda využívá pěstování rostlin na agarovém médiu. Do tohoto média se přidává živný roztok a testovaný herbicid (Mikulka a Slavíková, 2008). Nejlépe se osvědčila kultivace rostlin ve zkumavkách nebo v Erlenmayerových baňkách o obsahu 100 ml. Podmínky této metody jsou náročné na sterilitu prostředí, ale rostliny mají možnost se vyvíjet za konstantních podmínek, které jsou vhodné pro jejich růst. Rostliny po vyklíčení vytvoří listovou plochu a herbicidy začínají ovlivňovat až fotosyntézu. Účinky herbicidů jsou patrné až po 10 – 30 dnech v závislosti na teplotě, intenzitě světla a délce dne (Mikulka a Chodová, 2002).

- **Molekulární metody**

Tyto metody jsou používány v posledních deseti letech. Jsou velmi náročné na přístrojové vybavení. Nejprve je vhodné provést biologický test, kterým ověříme rezistenci. Detekce rezistence molekulárními metodami se provádí ze zelené rostlinné hmoty. Tu můžeme odebrat přímo na stanovišti a poté provést samotnou detekci, nebo je možné rostliny uchovat zmrazením a kdykoliv se k detekci vrátit. Po odběru vzorků následuje izolace rostlinné genomické DNA. Gen odpovědný za rezistenci k dané skupině herbicidů je následně namnožen metodou PCR-Polymerázové řetězové reakce. Samotná identifikace místa mutace je určena buď štěpením genu pomocí restričních enzymů nebo analýzou sekvence genu (Mikulka a Slavíková, 2011).

- **Metoda fluorescenční**

Metoda je náročná na přístrojové vybavení a je vhodná pro specializované laboratoře. Využívá se pro testování rezistence vůči inhibitorům fotosystému II (triaziny a chlortoluron) (Mikulka a Chodová, 2002). Ze střední části listové čepele rostlin se vyříznou terčíky a jsou dány do kádinek s 1% atrazinem, nebo s H<sub>2</sub>O. Po 1 - 4 hodinách se vloží do fluorometru, kde jsou po aplikaci světla o specifické intenzitě a době trvání zjištěny křivky fluorescenční indukce (Hamouzová a kol., 2011). Citlivé plevle mají narušenou schopnost fotosyntézy a dochází u nich ke změnám ve fluorescenci (Mikulka, 2003).

- **Metoda měření rychlosti fotosyntézy**

Spolehlivá metoda, která využívá narušení fotosyntetických procesů u citlivých plevelů v přítomnosti herbicidů. Metoda se používala pro determinaci rezistence vůči triazinům (Mikulka a Slavíková, 2011). Využívá se kdykoliv během vegetace. Metoda může být destruktivní i nedestruktivní (lze měřit přímo na rostlinách). Odebraný vzorek listu se ponechá 5 min v roztoku atrazinu a následně je vložen do infračerveného plynového analyzátoru (např. LI 6000 fy LICOR, USA). Po osvětlení se měří rychlost fotosyntézy vypočtená jako spotřeba CO<sub>2</sub> na jednotku plochy za sekundu. Citlivé rostliny vykazují nižší hodnoty rychlosti čisté fotosyntézy v porovnání s rezistentními rostlinami (Mikulka a Chodová, 2002).

- **Metoda listových terčků**

Metoda využívá inhibici fotosyntézy u citlivých biotypů plevelů v přítomnosti inhibitorů PSII. Listové terčíky o průměru 0,5 cm jsou umístěny do misek s roztokem herbicidu a osvětlovány intenzitou 30 klx. Teplota nesmí přesáhnout 28 °C. V určitých intervalech se hodnotí počet terčků plavajících na povrchu (rezistentní biotyp) a těch, které klesají ke dně misky (citlivý biotyp). U terčků, které plavou na povrchu, se uvolňuje kyslík a pletivo je nadlehčováno. U terčků, které klesají ke dnu misky, je produkce kyslíku zastavena a fotosyntéza zde neprobíhá (Mikulka a Chodová, 2002).

- **Metoda stanovení nitrátoreduktázy**

Tato metoda se dříve používala pro determinaci rezistence vůči triazinům. Využívá poznatku, že při přeměně nitrátů u citlivé rostliny triazinovým herbicidem je ovlivněna aktivita nitrátoreduktázy na rozdíl od rezistentních rostlin (Mikulka a Slavíková, 2008).

- **Metoda aktivity Hillovy reakce**

Princip Hillovy reakce spočívá ve stanovení fotochemické aktivity plevelů neznámé citlivosti, která charakterizuje množství kyslíku tvořeného chloroplasty v definovaných podmínkách poté, co došlo k ozáření bílým světlem a přidání uměle vytvořeného akceptoru elektronů (Hamouzová a kol., 2011). Do uzavřené expoziční komůrky se k suspenzi chloroplastů přidá herbicid. Následně se jejich fotochemická aktivita porovnává s aktivitou chloroplastů bez herbicidu. Omezenou fotosyntetickou produkcí kyslíku vykazují citlivé rostliny oproti rezistentním (Mikulka a Chodová, 2002).

### **3.6.1 Metody stanovení rezistence u turanky kanadské**

Ke stanovení rezistence je možné využívat celou řadu metod. Populace jsou testovány na úrovni celé rostliny, enzymu, genů až nukleotidů.

- **Dose-response experimenty**

V nádobových pokusech jsou testovány rostliny, které byly vypěstovány ze semen odebraných na pozemcích, kde bylo pozorováno snížení efektu herbicidu. Populace získané z regionů v USA (Arkansas, Delaware, Ohio, Virginie, Washington) byly podrobeny různým metodám stanovení rezistence. Po ošetření dávkami glyphosate byly pozorovány různé morfologické změny u rezistentních (R) a citlivých (S) populací. Po aplikaci ve fázi dvou listů byly pozorovány přibližně stejné hodnoty GR50 u populací S a R, zatímco ve fázi listové růžice u R biotypů byly hodnoty přibližně třikrát větší než u S biotypů. U S biotypů byly první fytotoxické účinky zjištěny v meristematických pletivech, zatímco u R biotypů první symptomy byly pozorovány na listech. Za 2 - 4 týdny po ošetření účinnou látkou glyfosate, R rostliny obnovují růst a objevují se nové listy nebo nové větve od středu růžice. Bylo také pozorováno výrazné zvýšení středního počtu větví u R rostlin přežívajících ošetření v závislosti na aplikované dávce glyphosate. Pokud jde o fyziologický mechanismus rezistence, je hlavní rozdíl mezi R a S biotypem rozdíl v pohybu glyphosate v celé rostlině. Výsledky porovnání translokace glyphosate u R a S biotypů byly následující. U R biotypů byl herbicid méně translokován směrem dolů (z listů do kořenů) a více translokován směrem nahoru (z kořenů do listů) na rozdíl od S biotypů. U R biotypů byla relativní úroveň EPSPS mRNA 1,8-3,1 krát vyšší než u S biotypů. Na základě

získaných výsledků byly pozorovány tři změny u R biotypů oproti S biotypům: změna translokace herbicidu, zvýšení hladiny EPSP syntázy a vyšší rozvětvení rostlin (Dinelli a kol., 2006).

Testování reakce rostliny na zvyšující se dávku přípravku (angl. dose-response experiment) se používá pro prokázání rezistence u rostlin. Nelineární vztahy dávky a odezvy rostliny lze využít jako základní nástroj pro odhalení mechanismů rezistence a fytotoxicity. Pomocí těchto experimentů lze porovnat také vliv různých herbicidů, modifikaci účinků herbicidu způsobené prostředím nebo stupněm vývoje rostlin. Typické vztahy dávka přípravek – odezva rostliny jsou popsány křivkami různých typů. Vyšší a nižší dávky jsou důležité pro stanovení těchto šikmosti/nárůstu z křivek závislosti odezvy na dávce. Křivky závislosti odezvy na dávce mohou být využity k mnoha účelům. Používají se pro srovnání účinků různých herbicidů na různých rostlinách, účinky herbicidů v různých prostředích nebo v různých fázích vývoje (Hakansson, 2003).

V experimentech, které prováděl Dinelli a kol. (2006) byly rostliny turanky kanadské ošetřovány stupňujícími se dávkami herbicidu s účinnou látkou glyphosate. Rezistentní biotypy vykazovaly 4-4,7 x vyšší hodnotu faktoru rezistence než citlivý standard.

#### o **Stanovení akumulace šikimátové kyseliny**

Koncentrace šikimátové kyseliny v rostlinných tkáních se stanovuje pomocí plynové chromatografie (HPLC). Rostliny turanky kanadské byly pěstovány v nádobách, po dosažení růstové fáze listové růžice byly ošetřeny přípravkem s účinnou látkou glyphosate. Z každé rostliny se odebírala nadzemní biomasa dva a čtyři dny po aplikaci (Dinelli a kol., 2006). Rostliny byly skladovány v suchém ledu a šikimová kyselina byla extrahována za pomoci HCl podle metodiky Singh a Shaner (1998). Extrakce šikimátu a následná analýza byla navržena Muellerem a kol. (2003). Rozdíly mezi rezistentními a citlivými biotypy nebyly pozorovány v množství šikimátu, ale v trendu a změnách koncentrace během času, kdy u rezistentních biotypů docházelo k poklesu množství šikimátu dva a čtyři dny po aplikaci, kdežto u citlivých k nárůstu (Mueller a kol., 2003). Naopak, Chodová a kol. (2009) zjistili, že u rostlin neošetřených glyphosate, byla koncentrace kyseliny šikimátové vyšší u rostlin rezistentních než u citlivých. Po ošetření přípravkem však došlo k setření těchto rozdílů, nicméně podobně jako v práci Muellera a kol. (2003), byly pozorovány výrazné změny v koncentraci kyseliny v průběhu času.



- **Stanovení absorpce, translokace glyphosate rostlinnou**

Pro stanovení translokace glyphosate se používá radioaktivně značená účinná látka herbicidu, konkrétně [  $^{14}\text{C}$  ] – glyphosate. Rostliny byly ošetřeny tímto přípravkem a po dvou, čtyřech a osmi dnech po aplikaci, byl z každé rostliny odebrán list. Z povrchu každého listu bylo stanoveno množství neabsorbované účinné látky omytím v methanolovém roztoku. Kvantifikace byla provedena pomocí kapalínové scintilační spektroskopie (liquid scintillation spectroscopy – LLS). Glyphosate a jeho hlavní metabolit – kyselina aminomethylfosfonová byly separovány chromatograficky separovány a porovnány hodnoty jejich retardačních faktorů (RF) s komerčními standardy. Dinelli a kol. (2006) nepozorovali statisticky významné rozdíly mezi rezistentními a citlivými biotypy turanky kanadské v množství neabsorbované radioaktivity. Gonzáles-Torralva a kol. (2012) pozorovali vyšší mobilitu a pomalejší metabolizaci glyphosate u citlivých biotypů než u rezistentního.

- **PCR metody, metody využívající polymerázové řetězové reakce**

Metod využívajících PCR pro popis rezistence existuje celá řada. Většina se soustředí na nalezení genu kódujícího enzym, který je inhibován herbicidem a nalezení příslušných mutací v tomto genu, které jsou zodpovědné za rezistenci (Kaundun a kol., 2008). Dalším možným mechanismem je zvýšená exprese citlivého EPSPS (Gaines a kol. 2009). Obecný postup spočívá v extrakci DNA (event. RNA), kdy jsou odebírány vzorky rostlin před a po aplikaci glyphosate, navržení primerů, vlastní PCR a sekvencování produktů PCR (Dinelli a kol., 2006, Chodová a kol., 2009).

U rostlin je možné rezistenci vůči glyphosate potvrdit nebo vyloučit nalezením mutace v oblasti kódující gen pro EPSPS (Baerson a kol., 2002, Padgett a kol., 1991). Nandula (2010) uvádí, že dosud byly popsány tyto oblasti záměny v pozici 106 genu *epsps*: prolin – serin (*Eleusine indica*), prolin – threonin, alanin nebo serin (*Lolium multiflorum*), prolin – alanin, serin a threonin (*Lolium rigidum*). Z posledních výzkumů se zdá, že tento typ rezistence v místě účinku není u turanky kanadské běžný a častěji se setkáváme se změnami translokace účinné látky a metabolizaci na netoxické sloučeniny (Gonzáles-Torralva a kol, 2012).

### **3.7 Antirezistentní strategie uplatňovaná v oblasti s výskytem turanky kanadské rezistentní k glyphosate**

Existují oblasti, kde se zatím nenacházejí rezistentní jedinci turanky kanadské nebo se ještě u jejich populací nevyvinula rezistence k účinné látce glyphosate. Vzniku odolných biotopů je třeba předcházet preventivními opatřeními jako je antirezistentní strategie (Mikulka a Chodová, 2002). Základem antirezistentní strategie je pravidelné kontrolování míst s rozšířením turanky kanadské, střídat herbicidy s různým mechanismem účinku, používat tzv. tank-mixy (herbicidy s více účinnými látkami) (Štěpánek, 2005), dodržovat zásady použití a dávky herbicidů (Mikulka a Chodová, 2002), používat herbicidy, které nesetrvávají dlouho v půdě a nezvyšuje se jejich selekční tlak (Prokop, 2009), uplatňovat jak způsoby chemické tak i mechanické a dodržovat vhodné střídání plodin (Mikulka a Chodová, 2002).

V případě objevení rezistentních rostlin je zapotřebí provedení průzkumu. Podrobným průzkumem je zjištěna intenzita výskytu a určen počet rezistentních druhů vůči herbicidům (Mikulka a Slavíková, 2008).

Po stanovení rezistentních populací je důležité dodržovat zásady, aby nedocházelo k dalšímu vysemeňování:

- Vyloučit herbicid, vůči kterému byla potvrzena rezistence
- Pravidelné mapování výskytu rezistentních rostlin
- Použití širokého spektra herbicidů s odlišným mechanismem účinku
- Zamezit dalšímu rozšiřování na okolní pozemky
- Likvidovat zbylé plevele, aby došlo k redukci půdních zásob semen (Prokop, 2009)

U turanky kanadské nelze zabránit vzniku rezistence z důvodu spontánního vzniku mutací. Antirezistentní strategie je zaměřena nejvíce na opatření vedoucí k minimalizaci možnosti vytvoření semen u rezistentních jedinců a zabránění jejímu dalšímu šíření (Mikulka a Slavíková, 2008)

## 4. Metody

### 4.1 Metodika nádobového pokusu

#### 4.1.1 Nádobový pokus

Nádobový pokus byl založen za účelem porovnání citlivosti turanky kanadské k účinné látce glyphosate o různých koncentracích. Pokus a sběry rostlinného materiálu byly zahájeny v polovině srpna 2012. Nažky turanky kanadské byly odebírány na zvolených železničních nádražích na území České republiky. Vybrány byly rostliny poblíž kolejí nebo přímo v kolejišti, které byly zcela jistě ošetřeny herbicidním přípravkem s účinnou látkou glyphosate. Nažky byly nejdříve předčištěny a uloženy v papírových sáčcích při pokojové teplotě. K pokusům byly použity rostliny z lokalit (Tab.č.2):

**Tabulka č. 2:** Lokality odběru vzorků

Číslo	Lokalita	Číslo	Lokalita	Číslo	Lokalita
1.	Benešov	13.	Lužná u Rakovníka	25.	Praha – Smíchov
2.	Česká Lípa	14.	Mělník	26.	Praha – Vršovice
3.	České Budějovice	15.	Mladá Boleslav	27.	Praha – Vysočany
4.	Děčín	16.	Most	28.	Štětí
5.	Cheb	17.	Planá u Mariánských Lázní	29.	Tábor
6.	Chomutov	18.	Plzeň	30.	Turnov
7.	Karlovy Vary	19.	Praha – Bubny	31.	Ústí nad Labem
8.	Kladno	20.	Praha – Dejvice	32.	Veselí nad Lužnicí
9.	Kralupy nad Vltavou	21.	Praha - Hlavní nádraží	33.	Žatec
10.	Liberec	22.	Praha – Holešovice	34.	Ostrava - Hlavní nádraží
11.	Litoměřice	23.	Praha – Libeň	35.	Ostrava – Švihov
12.	Louny	24.	Praha – Radotín	36.	Opava

V červnu 2013 byl uskutečněn výsev turanky kanadské. Do květináčů o velikosti 80 x 80 x 75 mm byla použita zemina pocházející z pokusného a demonstračního pozemku ČZU, která neobsahovala rezidua žádných herbicidů ani diaspory turanky. Do jednoho květináče bylo umístěno 30-50 nažek. Květináče poté byly umístěny na pokusném a demonstračním poli podřízené Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity. Po vzejití pokusných rostlin byly rostliny vyjednoceny na konečný počet 5 jedinců na květináč.

### **4.1.2 Aplikace herbicidu**

Rostliny turanky kanadské byly ošetřeny přípravkem Roundup Rapid. Účinnou látkou je glyphosate, přípravek obsahuje 450 g účinné látky /l herbicidu. Jeho registrantem je společnost Monsanto Europe S.A./N.V. Aplikace herbicidního přípravku byla provedena dne 23. 7. 2013, kdy rostliny turanky kanadské byly ve fázi listové růžice s maximálně 8 listy. Pro aplikaci postřikové jichy byl použit laboratorní komorový postřikovač AVIKO 5, obsazený 1 tryskou Lumark typ 01E80. Aplikované dávky herbicidu byly následující: neošetřená kontrola – 0,1 l - 0,2 l - 0,4 l - 0,8 l - 1,5 l – 3 l – 6 l herbicidu / ha v dávce 200 l / H<sub>2</sub>O na ha. Rostliny byly uloženy po aplikaci herbicidu zpět na pokusné a demonstrační pole podřízené Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity.

### **4.1.3 Hodnocení účinnosti**

Měsíc po aplikaci (30 DAT) bylo provedeno vizuální hodnocení pokusných rostlin a hodnocení účinnosti. Porovnávala se neošetřená kontrola s jednotlivými dávkami herbicidu. Účinnost herbicidu byla stanovena podle metodiky EPPO. EPPO (European Plant Protection Organization) je mezivládní organizace odpovědná za mezinárodní spolupráci v oblasti přípravků na ochranu rostlin v Evropské unii a středomořském regionu. Regionální standard pro herbicidní rezistenci je uveden v dokumentu PP1/213.

### **4.1.4 Vážení čerstvé a suché nadzemní biomasy**

Dne 22. 8. 2013 byla ostříhána a stanovena hmotnost nadzemní biomasy všech rostlin (g). Nejdříve proběhlo zvažení čerstvé biomasy. Po usušení při 105° v laboratorní sušárně ULE-700 (Memmert) po dobu 2 dnů byly získány hodnoty suché biomasy.

### **4.1.5 Statistické zpracování dat**

Data byla statisticky hodnocena pomocí software R-project R 3.0.2. [www.r-project.org](http://www.r-project.org). Na základě nelineárních modelů byly sestaveny grafy a pro každý biotyp vypočteny hodnoty

GR50 (g.ha<sup>-1</sup>). GR50 je dávka glyphosate, při které dochází k redukci nadzemní biomasy o 50% oproti neošetřené kontrole. Dále byly stanoveny faktory rezistence RF jako podíly hodnot GR50 rezistentního a citlivého biotypu.

**Vzorec pro faktor rezistence:**

$$RF = \frac{GR50 R}{GR50 S}$$

- RF = faktor rezistence
- GR50 R = redukce nadzemní biomasy (growth reduction) u rezistentního biotypu
- GR 50 S = redukce nadzemní biomasy (growth reduction) u citlivého biotypu

Pro vyjádření účinnosti či hmotnosti nadzemní biomasy byly použity tyto nelineární regresní modely:

**LL. 2:** 2 - parametrický model

$$y = \frac{1}{1 + \exp(b * (\ln x - \ln ED50))}$$

**LL. 3:** 3 - parametrický model

$$y = \frac{d}{1 + \exp(b * (\ln x - \ln ED50))}$$

**LL. 4:** 4 - parametrický model

$$y = c + \frac{d-c}{1 + \exp(b * (\ln x - \ln ED50))}$$

**LL. 5:** 5 - parametrický model

$$y = c + \frac{d-c}{1 + \exp(b * (\log(x) - \log(e)))^f}$$

kde parametr  $y$  je závislá proměnná (účinnost, hmotnost nadzemní biomasy);  $x$  je nezávislá proměnná (dávka herbicidu); parametr  $b$  určuje sklon křivky; parametr  $c$  je odhad z koeficientů odpovídající spodnímu limitu; parametr  $d$  je odhad z koeficientů odpovídající hornímu limitu; parametr  $e$  je inflexní bod; hodnota GR50 nacházející se mezi spodní a horní asymptotou. Vyjadřuje dávku, při níž bylo dosaženo 50% účinnosti nebo redukce nadzemní biomasy; parametr  $f$  je horní hranice hormetického efektu. Testování bylo provedeno na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Vhodnost modelu popisujícího získaná data byla testována pomocí funkce lack-of-fit test (fce anova), na základě které byl vybrán model nejlépe popisující získaná data (2,3 či 4 - parametrický). Tato funkce porovnává použitý logaritmicke-logistický model s teoretickým lineárním modelem z hlediska reziduálního rozptylu pomocí konkrétního F testu. Uvedený lack-of-fit test byl hodnocen ve spojení s vhodným grafickým vyjádřením modelu. V případě, že rozdíl mezi oběma modely nebyl statisticky průkazný ( $p > 0,05$ ), značí to, že log- logistický model je vhodný k popisu dat.

Dále byla použita analýza rozptylu ANOVA (software Statistica ver. 12). Jako vstupní data posloužily hodnoty čerstvé biomasy a suché nadzemní biomasy každé lokality pouze v dávce doporučené výrobcem (tedy 3 l přípravku na ha) a tyto hodnoty byly vždy vztaženy k neošetřené kontrole daného biotypu. Lokality pak byly porovnány mezi sebou. V případě statisticky průkazných rozdílů, bude použit HSD Tukeyův test pro porovnání citlivosti lokalit.

## 5. Výsledky

Pro statistické hodnocení byly zvoleny dva přístupy – jeden s využitím nelineárních modelů, který umožnil odhad faktoru rezistence. Druhý přístup vychází z porovnání citlivosti populací pomocí analýzy rozptylu pouze v dávce registrované výrobcem. Oba přístupy byly použity pro získané proměnné – čerstvá a suchá nadzemní biomasa.

Reakce rostlin turanky kanadské pocházející z různých nádraží na účinnou látku glyphosate se lišila. Na základě hodnocení účinnosti herbicidní látky glyphosate u 36 biotypů turanky kanadské ze železničních nádraží v České republice byly získány tyto výsledky.

### Hodnocení čerstvé biomasy

Stanovení parametrů modelu nelineární regrese na základě dat čerstvé biomasy u herbicidu Roundup Rapid na všechny testované rostliny 30 DAT po aplikaci herbicidem je uvedeno v tabulce č. 3. Grafy byly sestaveny na základě nelineárních modelů a jsou uvedeny v příloze (Obr. č. 12, 13, 14, 15).

Vyhodnocení pořadí citlivosti u čerstvé biomasy je zobrazeno v grafu č. 1. Nejvyšší citlivost na základě hodnoty GR50 v rozmezí hodnot 0 – 100 vykazují turanky kanadské z lokalit Benešov, Česká Lípa, České Budějovice, Děčín, Cheb, Chomutov, Liberec, Plzeň, Praha - Bubny, Praha – Smíchov, Praha – Vršovice, Tábor, Turnov, Ústí nad Labem, Veselí nad Lužnicí a Opava. U lokality Karlovy Vary byla stanovena nejnižší hodnota GR50. U této populace se projevila hormeze v nízkých dávkách, proto byla stanovena nejcitlivější lokalitou Plzeň. Naopak nejvyšší hodnoty GR50 v rozmezí 300 – 350 vykazují lokality Planá u Mariánských Lázní, Praha – Radotín a Praha – Vysočany, které můžeme považovat za tolerantní vůči účinné látce glyphosate, jelikož jejich hodnoty GR50 se vzájemně neliší, avšak jsou výrazně odlišné od ostatních testovaných populací.

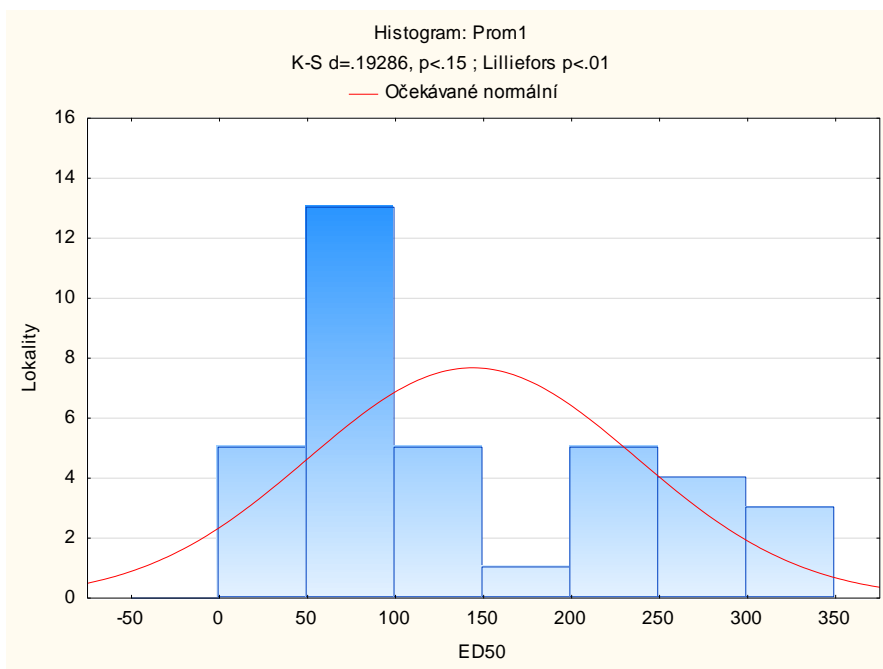
Vyhodnocení faktoru rezistence (RF) u čerstvé biomasy, který byl vypočten na základě modelu nelineární regrese je uvedeno v grafu č. 2. Biotyp z lokality Planá u Mariánských Lázní a Praha – Vysočany vykázal nejvyšší faktor rezistence 12,24. Třetí nejvyšší faktor rezistence byl 12,16, který vykázal biotyp z Prahy – Radotína.

**Tab.č. 3:** Čerstvá biomasa – výpočet parametrů a faktoru rezistence (RF) na základě modelu nelineární regrese

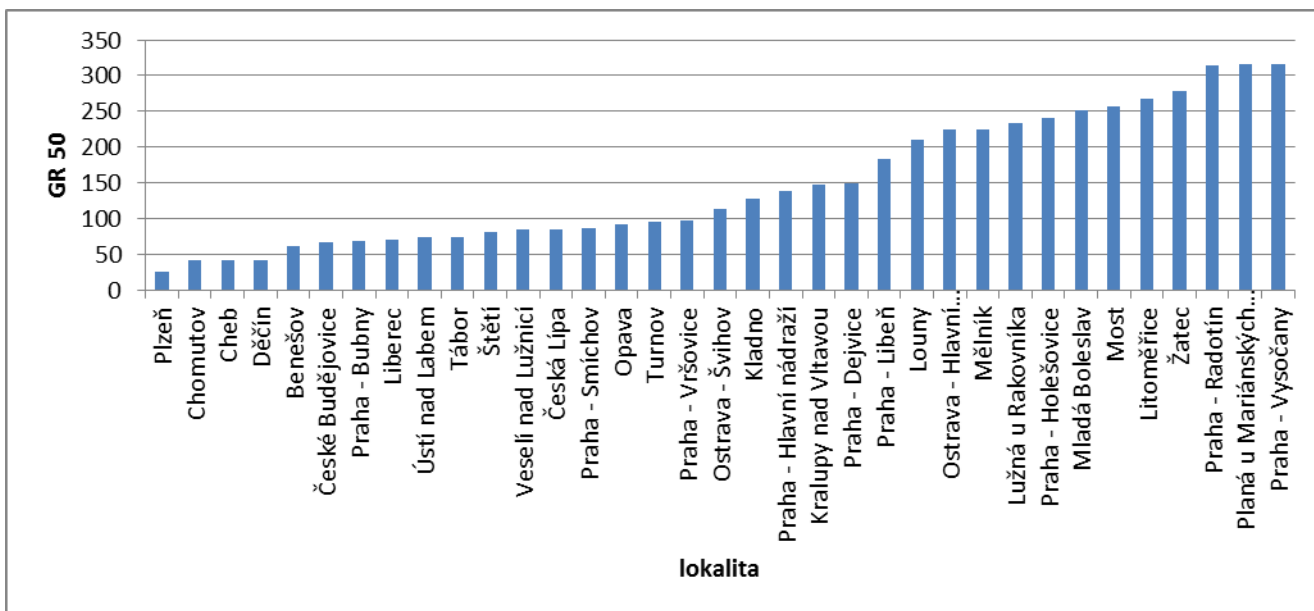
Lokalita		Model	Parametr					RF
Číslo	Nádraží		B	c	d	GR50	f	
1.	Benešov	LL.3	1,16	0	4,50	60,63	0	2,34
2.	Česká Lípa	LL.3	1,83	0	3,90	84,09	0	3,25
3.	České Budějovice	LL.3	1,90	0	4,05	65,76	0	2,54
4.	Děčín	LL.4	3,67	0,25	5,01	42,04	0	1,62
5.	Cheb	LL.3	1,09	0	4,44	41,91	0	1,62
6.	Chomutov	LL.4	2,41	0,20	3,20	40,94	0	1,58
7.	Karlovy Vary	LL.5	0,96	10,49	1,66	0,16	-37,25	-
8.	Kladno	LL.3	2,60	0	2,33	127,14	0	4,91
9.	Kralupy nad Vltavou	LL.3	1,96	0	2,52	147,07	0	5,68
10.	Liberec	LL.5	8,38	-0,13	2,67	69,49	0,09	2,68
11.	Louny	LL.3	1,37	0	2,31	209,39	0	8,09
12.	Litoměřice	LL.4	2,49	0,13	1,65	268,46	0	10,37
13.	Lužná u Rakovníka	LL.3	2,13	0	2,62	232,76	0	8,99
14.	Mělník	LL.3	2,50	0	2,14	225,25	0	8,70
15.	Mladá Boleslav	LL.3	2,62	0	2,68	251,05	0	9,70
16.	Most	LL.3	2,80	0	2,92	256,92	0	9,92
17.	Planá u Mariánských Lázní	LL.3	2,76	0	2,32	316,95	0	12,24
18.	Plzeň	LL.4	0,62	0,54	2,90	25,89	0	1,00
19.	Praha – Bubny	LL.4	1,16	0,52	3,05	68,42	0	2,64
20.	Praha – Dejvice	LL.3	2,58	0	3,13	149,35	0	5,77
21.	Praha - Hlavní nádraží	LL.3	2,20	0	2,60	138,38	0	5,34
22.	Praha – Holešovice	LL.4	5,10	0,16	2,33	241,34	0	9,32
23.	Praha – Libeň	LL.3	5,20	0	2,30	183,63	0	7,09
24.	Praha – Radotín	LL.3	8,75	0	2,14	314,90	0	12,16
25.	Praha – Smíchov	LL.3	1,44	0	2,96	86,14	0	3,33
26.	Praha – Vršovice	LL.3	2,66	0	2,42	96,68	0	3,73
27.	Praha – Vysočany	LL.3	2,76	0	2,32	316,96	0	12,24
28.	Štětí	LL.3	2,80	0	2,68	81,74	0	3,16
29.	Tábor	LL.4	13,42	0,23	2,80	74,41	0	2,87
30.	Turnov	LL.3	2,16	0	2,33	95,30	0	3,68
31.	Ústí nad Labem	LL.4	7,20	0,26	2,65	74,32	0	2,87
32.	Veselí nad Lužnicí	LL.3	2,86	0	3,15	83,74	0	3,23
33.	Žatec	LL.3	4,82	0	2,01	277,77	0	10,73
34.	Ostrava - Hlavní nádraží	LL.3	3,13	0	2,01	223,68	0	8,64
35.	Ostrava – Švihov	LL.3	1,85	0	1,56	112,41	0	4,34
36.	Opava	LL.4	2,58	0,16	2,50	91,88	0	3,55



**Graf č. 1:** Histogram citlivosti biotypů na základě vážení hmotnosti čerstvé biomasy



**Graf. č. 2:** Porovnání hodnot GR50 u jednotlivých populací turanky kanadské (na základě hmotnosti čerstvé biomasy)



**Tabulka 4:** Statistické vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými populacemi v citlivosti ke glyphosate (čerstvá biomasa, Tukey HSD test, alfa=0,05)

% redukce hmotnosti oproti neošetřené kontrole v 1N dávce, čerstvá biomasa								
Lokalita	Průměr	homogenní skupiny						
		1	2	3	4	5	6	7
Litoměřice	89,19	*****						
Praha - Vysočany	89,88	*****	*****					
Ostrava Hl. N.	90,55	*****	*****	*****				
Plzeň	90,87	*****	*****	*****	*****			
Ostrava Švihov	91,03	*****	*****	*****	*****	*****		
Lužná	91,06	*****	*****	*****	*****	*****		
Praha - Radotín	91,83	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Karlovy Vary	92,32	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Louny	92,34	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Mělník	92,42	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Praha Holešovice	92,49	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Opava	92,97	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Praha – Libeň	93,05	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Liberec	93,14	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Kladno	93,17	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Žatec	93,17	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Praha - Hl. N.	93,61	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Praha – Bubny	93,73	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Plana u M.L.	93,77	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Mlada Boleslav	93,88	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Chomutov	94,04	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Kralupy	94,89		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Praha - Dejvice	94,91		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Praha - Smíchov	95,15		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Most	95,41		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Cheb	95,48		*****	*****	*****	*****	*****	*****
Česká Lípa	95,50		*****	*****	*****	*****	*****	*****
ČeskéBudějovice	96,06			*****	*****	*****	*****	*****
Benešov	96,19			*****	*****	*****	*****	*****
Turnov	96,28				*****	*****	*****	*****
Štětí	96,53					*****	*****	*****
Ústí n L.	97,46						*****	*****
Děčín	97,55							*****
Veselí n L.	97,63							*****
Praha - Vršovice	97,70							*****
Tábor	97,71							*****

Pokud zvolíme druhý přístup, tedy pouhé porovnávání dávky přípravku doporučeného výrobcem, zjistíme, že rozdíly v redukcí čerstvé nadzemní biomasy jsou mezi jednotlivými lokalitami velmi malé (tab. 4), redukce hmotnosti se pohybovala v rozpětí 89 – 96%, nicméně v některých případech byly rozdíly statisticky významné (tab. 5). Test mnohonásobného porovnání určil 7 homogenních podskupin, do kterých lze dle citlivosti vůči účinné látce glyphosate testované biotypy rozdělit.

**Tabulka 5:** Jednofaktorová ANOVA pro proměnnou „čerstvá biomasa“

Proměnná	Součet čtverečů odchylek	Počet stupňů volnosti	Rozptyl	Testové kritérium	Hodnota pravděpodobnosti
Lokalita	775,6	35	22,16	5,397	0,000*

Porovnáním pořadí citlivostí turanky kanadské ze všech lokalit, tak jak bylo získáno z obou analýz, dospějeme k závěru, že hodnoty čerstvé nadzemní biomasy (tabulka č. 4) u turanky pocházející z nádraží Litoměřice se statisticky průkazně odlišné od všech ostatních populací a jsou ke glyfosátu nejvíce tolerantní. Mezi sedm nejtolerantnějších populací pak můžeme zařadit následující populace: Praha - Vysočany, Ostrava hl.n., Plzeň, Ostrava Švihov, Lužná, Praha – Radotín. Naopak nejcitlivější populací je lokalita Tábor.

Citlivost populací Karlovy Vary, Louny, Mělník, Praha – Holešovice, Opava, Praha – Libeň, Liberec, Kladno, Žatec, Praha - Hlavní nádraží., Praha – Bubny, Planá u Mariánských Lázní, Mladá Boleslav a Chomutov se od sebe statisticky významně neliší, ale jsou odlišné od lokalit Litoměřice, Praha – Vysočany, Ostrava hlavní nádraží, Plzeň, Ostrava Švihov, Lužná a Praha – Radotín. Další skupinou lokalit jsou Kralupy, Praha - Dejvice, Praha - Smíchov, Most, Cheb a Česká Lípa, které tvoří jednu skupinu, které se statisticky významně neliší mezi sebou, ale liší se od všech ostatních. Rozdíly získané oběma statistickými přístupy budou podrobněji diskutovány v kapitole 6 této práce.

## **Hodnocení suché nadzemní biomasy**

Tabulka č.6 zobrazuje stanovení parametrů modelu na základě dat suché nadzemní biomasy turanky kanadské po aplikaci herbicidu Roundup Rapid na všechny testované rostliny 30 dnů po jejich ošetření. Na základě nelineárních modelů byly sestaveny grafy (Obr. č. 8, 9, 10, 11 v příloze).

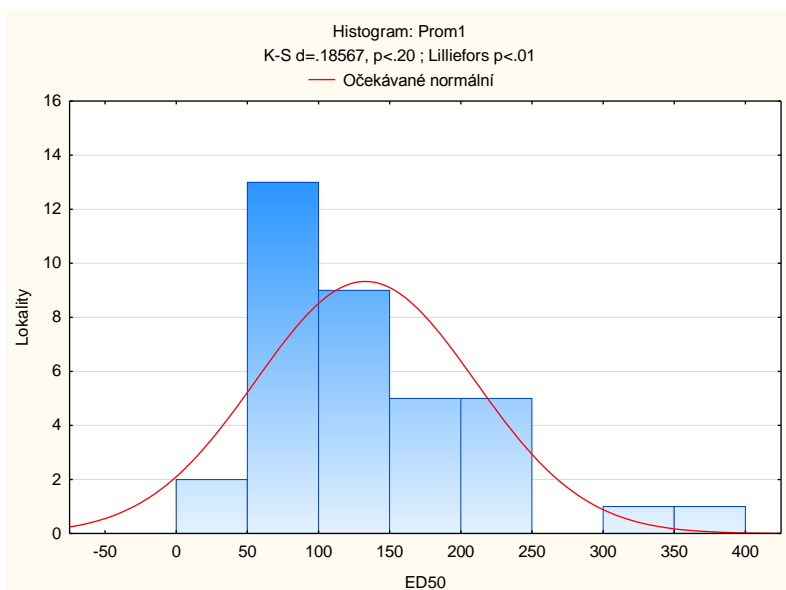
Vyhodnocení pořadí citlivosti turanky kanadské v suchém stavu je zobrazeno v grafu č.3. Nejvyšší citlivost (stanoveno na základě hodnot GR50) v rozmezí hodnot 0 – 100 vykazují lokality Benešov, Česká Lípa, České Budějovice, Děčín, Cheb, Chomutov, Karlovy Vary, Ostrava – Švihov, Opava, Štětí, Tábor, Turnov, Ústí nad Labem, Veselí nad Lužnicí, Praha – Vršovice. Naopak nejvyšší hodnoty GR50 v rozmezí 300 – 400 vykazují lokality Praha – Radotín a Litoměřice.

Vyhodnocení faktoru rezistence (RF) u suché nadzemní biomasy, který byl vypočten na základě modelu nelineární regrese je uvedeno v grafu č.4. Biotyp z lokality Litoměřice vykázal nejvyšší faktor rezistence 12,74. Druhým nejvyšší faktor rezistence byl 10,00, který vykázal biotyp z Prahy –Radotína.

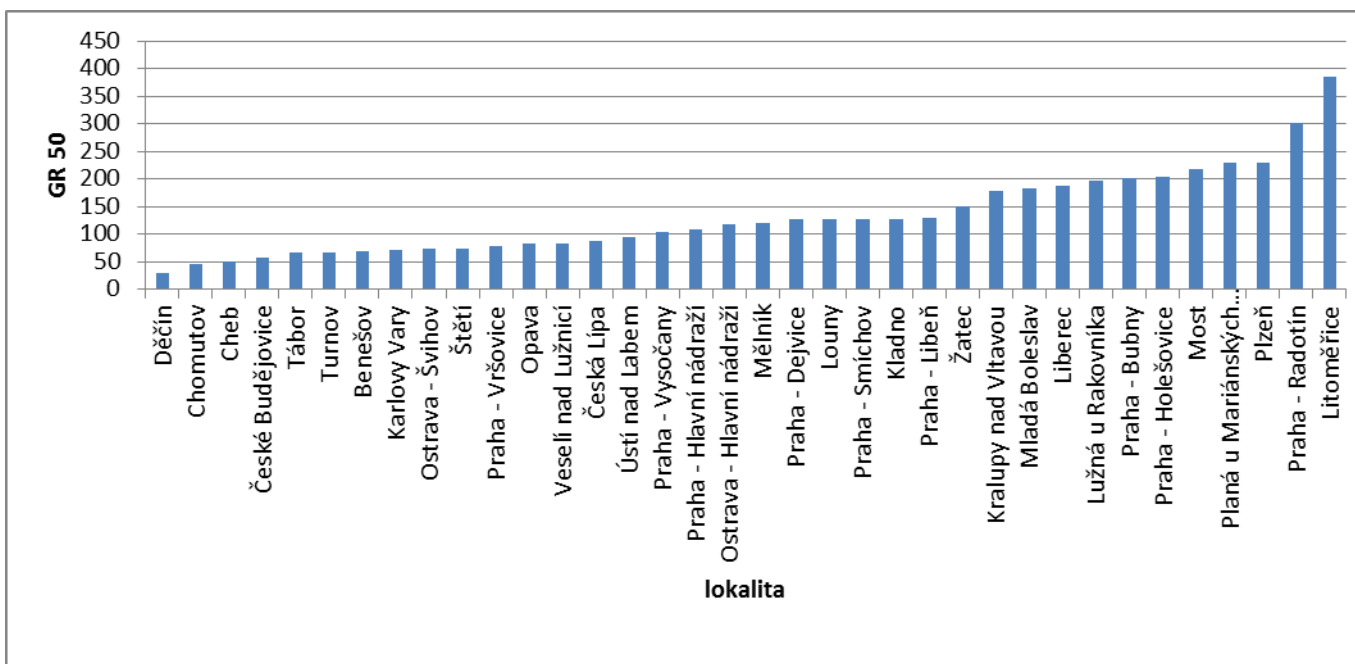
**Tabulka č. 6:** Suchá biomasa – výpočet parametrů a faktoru rezistence (RF) na základě modelu nelineární regrese

Lokalita		Model	Parametr				RF
Číslo	Nádraží		b	c	d	GR50	
1.	Benešov	LL.4	1,31	0,13	1,04	69,52	2,30
2.	Česká Lípa	LL.4	0,91	0,11	0,86	86,95	2,88
3.	České Budějovice	LL.4	1,71	0,11	0,84	58,11	1,92
4.	Děčín	LL.2	0,67	0	0	30,22	1,00
5.	Cheb	LL.4	1,30	0,13	0,92	50,32	1,67
6.	Chomutov	LL.4	3,33	0,15	0,97	45,87	1,52
7.	Karlovy Vary	LL.4	12,75	0,15	0,68	70,93	2,35
8.	Kladno	LL.4	3,67	0,12	0,70	128,05	4,24
9.	Kralupy nad Vltavou	LL.4	2,58	0,09	0,70	178,84	5,92
10.	Liberec	LL.4	1,37	0,09	0,80	187,95	6,22
11.	Louny	LL.3	0,66	0	0,87	126,82	4,20
12.	Litoměřice	LL.4	11,14	0,11	0,56	385,02	12,74
13.	Lužná u Rakovníka	LL.4	1,74	0,11	0,90	195,73	6,48
14.	Mělník	LL.4	1,68	0,11	0,82	119,15	3,94
15.	Mladá Boleslav	LL.4	1,65	0,12	0,84	183,09	6,06
16.	Most	LL.3	1,10	0	0,92	218,33	7,22
17.	Planá u Mariánských Lázní	LL.4	1,31	0,09	0,91	228,42	7,56
18.	Plzeň	LL.4	3,17	0,16	0,74	229,58	7,60
19.	Praha – Bubny	LL.4	1,86	0,16	0,74	200,60	6,64
20.	Praha – Dejvice	LL.4	1,85	0,12	0,85	126,72	4,19
21.	Praha - Hlavní nádraží	LL.4	2,46	0,11	0,76	109,57	3,63
22.	Praha – Holešovice	LL.4	2,03	0,13	0,72	204,10	6,75
23.	Praha – Libeň	LL.4	2,66	0,10	0,75	129,24	4,28
24.	Praha – Radotín	LL.4	6,85	0,17	0,73	302,44	10,00
25.	Praha – Smíchov	LL.3	0,66	0	0,87	126,83	4,21
26.	Praha – Vršovice	LL.4	2,99	0,06	0,76	78,58	2,60
27.	Praha – Vysočany	LL.4	2,84	0,14	0,67	104,53	3,46
28.	Štětí	LL.4	4,28	0,05	0,68	73,86	2,44
29.	Tábor	LL.4	5,43	0,07	0,73	66,24	2,19
30.	Turnov	LL.4	2,84	0,05	0,72	67,10	2,22
31.	Ústí nad Labem	LL.4	2,47	0,06	0,69	95,12	3,15
32.	Veselí nad Lužnicí	LL.4	2,64	0,06	0,77	82,56	2,73
33.	Žatec	LL.4	1,71	0,09	0,75	150,97	4,50
34.	Ostrava - Hlavní nádraží	LL.4	1,50	0,10	0,89	118,34	3,92
35.	Ostrava – Švihov	LL.4	4,85	0,10	0,73	73,17	2,42
36.	Opava	LL.4	2,00	0,13	0,87	81,85	2,71

**Graf č. 3:** Histogram citlivosti biotypů na základě vážení hmotnosti suché biomasy



**Graf č. 4:** Porovnání hodnot GR50 u jednotlivých populací turanky kanadské (na základě hmotnosti suché biomasy)



**Tabulka č. 8:** Statistické vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými populacemi v citlivosti ke glyphosate (suchá biomasa, Tukey HSD test, alfa=0,05)

% redukce hmotnosti oproti neošetřené kontrole v 1N dávce, suchá biomasa					
Lokalita	Průměr	homogenní skupiny			
		1	2	3	4
Praha – Vysočany	64,00	****			
Litoměřice	70,00	****	****		
Louny	71,00	****	****	****	
Praha – Radotín	77,00	****	****	****	****
Praha – Holešovice	77,26	****	****	****	****
Plzeň	78,00	****	****	****	****
Cheb	78,00	****	****	****	****
Liberec	79,00	****	****	****	****
Česká Lípa	79,00	****	****	****	****
Chomutov	80,00	****	****	****	****
Praha – Smíchov	80,00	****	****	****	****
Praha – Bubny	80,00	****	****	****	****
Kladno	80,00	****	****	****	****
Ostrava Hl. N.	80,00	****	****	****	****
Karlovy Vary	81,00	****	****	****	****
České Budějovice	81,00	****	****	****	****
Opava	81,80	****	****	****	****
Mělník	81,00	****	****	****	****
Děčín	81,00	****	****	****	****
Lužná	82,00	****	****	****	****
Plana u M.L.	82,00	****	****	****	****
Ostrava Švihov	83,00	****	****	****	****
Benešov	83,00	****	****	****	****
Mlada Boleslav	84,00	****	****	****	****
Kralupy	84,00	****	****	****	****
Praha – Dejvice	84,00	****	****	****	****
Žatec	84,00	****	****	****	****
Praha – Libeň	84,00		****	****	****
Most	87,00		****	****	****
Praha - Hl. N.	90,00			****	****
Veselí n L.	91,00			****	****
Ústí n L.	91,00				****
Štětí	92,20				****
Tábor	93,00				****
Turnov	93,00				****
Praha – Vršovice	94,00				****

Na základě porovnání citlivosti turanky kanadské ze všech lokalit pouze v registrované dávce pomocí analýzy rozptylu byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi populacemi (tab. č. 7) za vzniku 4 homogenních skupin (tab.č. 8).

**Tabulka č. 7:** Jednofaktorová ANOVA pro proměnnou „suchá nadzemní biomasa“

Proměnná	Součet čtvců odchylek	Počet stupňů volnosti	Rozptyl	Testové kritérium	Hodnota pravděpodobnosti
Lokalita	5828	35	166,5	3,189	0,000*

Porovnáme-li pořadí citlivosti turanky kanadské ze všech lokalit, tak jak bylo získáno z obou analýz, dospějeme k závěru, že v tabulce č. 8 jsou lokality Praha – Vysočany a Litoměřice statisticky průkazně odlišné od všech ostatních populací a vychází jako nejvíce tolerantní. Dalšími statisticky odlišnými populacemi jsou Ostrava hl., Plzeň, Ostrava Švihov, Lužná, Praha – Radotín, které se dostaly mezi sedm nejtolerantnějších populací. Naopak nejcitlivější populací je lokalita Praha - Vršovice.

Citlivost populací Praha – Radotín, Praha – Holešovice, Plzeň, Cheb, Liberec, Česká Lípa, Chomutov, Praha – Smíchov, Praha – Bubny, Kladno, Ostrava Hlavní nádraží., Karlovy Vary, České Budějovice, Opava, Mělník, Děčín, Lužná, Plana u Mariánských Lázní, Ostrava Švihov, Benešov, Mlada Boleslav, Kralupy, Praha – Dejvice a Žatec se od sebe statisticky významně neliší, ale jsou odlišné od lokalit Praha – Vysočany, Litoměřice a Louny.

Při sušení nadzemní biomasy dochází ke snižování rozdílů mezi hmotnostmi rostlin z ošetřených a neošetřených nádob. Výsledky lze pozovnat do jisté míry dle analýzy rozptylu, kde jsou použity hodnoty čerstvé biomasy a suché nadzemní biomasy každé lokality pouze v dávce doporučené výrobcem (3 l přípravku na ha). Tyto hodnoty jsou vztaženy k neošetřené kontrole daného biotypu. U předcházejícího přístupu, kde se využívají nelineární modely, získáme výsledky z celého rozpětí aplikovaných dávek. Z tohoto hlediska jsou do závěru použity výsledky z hodnocení suché biomasy, které se shodovaly v obou statistických metodách a bývají častěji využívány také ve vědeckých pracích.



## 6. Diskuze

Předmětem této práce nebylo stanovit mechanismus případné rezistence u turanky kanadské, pouze popsat, zda v populacích dochází vlivem selekčního tlaku glyphosate k posunu v citlivosti k této účinné látce. Jak je patrné z výsledků, existují populace, v nichž jsou někteří jedinci schopni přežít dávku 3 i 6 l/ha přípravku s obsahem glyphosate. (obr. č. 5, 6, 7 v příloze – fotka).

Adamczewski (2010) se zabýval podobným výzkumem na železničních nádražích na území Polska. V Polsku se běžně používá účinná látka glyphosate od roku 1998. Plochy železničních svršků nejsou pod kontrolou a rostliny se zde stávají čím dál tolerantnějšími. Z 36 námi testovaných populací 2 populace vykázaly vyšší hodnoty GR50 v rozmezí 300 - 400 g úč.l/ha. Rostliny z lokalit Litoměřice a Praha – Radotín můžeme považovat za tolerantní vůči účinné látce glyphosate, jelikož jsou výrazně odlišné od ostatních testovaných populací a mezi sebou se v hodnotách GR50 vzájemně neliší. Pokud porovnáme oba statistické přístupy, dojdeme k závěru, že v obou případech byla pozorována jako nejtolerantnější populace z Litoměřic. Naopak při pouhém porovnání hodnot redukce biomasy po aplikaci doporučené registrované dávky se populace, která byla na základě výpočtu parametru GR50 stanovena jako nejcitlivější (Plzeň), dostává mezi populace odolnější a za nejcitlivější bychom považovali rostliny pocházející z nádraží v Táboře. Nicméně, jak je patrné z tabulky č. 4, rozdíly mezi sledovanými hodnotami účinnosti jsou velmi malé. Je tedy nutné zdůraznit, že pokud chceme získat podrobné informace o citlivosti populace, je nezbytné pro testování použít celou škálu dávek přípravku a data podrobně vyhodnotit za pomoci modelů nelineární regrese. Sledování účinnosti pouze jedné dávky může vést ke zkresleným výsledkům.

Rezistence vůči glyphosate je nejvíce zaznamenávána ve Spojených Státech, kde jsou hojně využívány geneticky modifikované plodiny s rezistencí ke glyphosate, a proto zde také bylo provedeno mnoho studií. V roce 2003 byly ve státech Arkansas, Mississippi, Severní Karolína, Pensylvanie a v roce 2005 ve státě Kalifornie nalezeny první případy rezistence vůči glyphosate. Poslední záznam rezistence vůči glyphosate je z roku 2013 ze států Alabama a Wisconsin, kde byla potvrzena rezistence vůči glyphosate v porostech kukuřice, bavlníku a sóji. V Evropě byly první rezistentní biotypy turanky kanadské objeveny v roce 2006 ve Španělsku,

v roce 2007 v České Republice, v roce 2010 v Polsku, v roce 2011 v Portugalsku a Itálii a poté v roce 2012 v Řecku (Weedscience.com).

Dinelli a kol. (2006) zkoumal fyziologickou a molekulární podstatu citlivých a rezistentních biotypů turanky kanadské a stanovoval hodnotu GR50 podobně jako v experimentech prováděných v rámci této diplomové práce. Populace byly získané z regionů z USA (Arkansas, Delaware, Ohio, Virginie, Washington). Po aplikaci ve fázi listové růžice rezistentní biotypy vykazovaly třikrát větší hodnotu GR50 než citlivé biotypy. Po aplikaci zvýšené dávky glyphosate (více než 1× doporučená dávka) byly pozorovány různé morfologické změny u citlivých i rezistentních biotypů. U citlivých biotypů byly první fyto toxické účinky zjištěny v meristematických tkáních, zatímco u rezistentních biotypů první fyto toxické účinky byly pozorovány až v listech. Po dvou až čtyřech týdnech po aplikaci rezistentní rostliny obnovily růst a produkovaly nové listy. Bylo pozorováno významné zvýšení středního počtu větví u přežívajících rezistentních rostlin v závislosti na aplikované dávce glyphosate. Hlavním rozdílem mezi rezistentními a citlivými biotypy je rozdílná translokace glyphosate. Účinná látka glyphosate u rezistentních biotypů byla méně translokována směrem dolů (z listů do kořenů) na rozdíl od citlivých biotypů. U rezistentních biotypů byla hladina EPSPS mRNA 1,8 - 3,1 krát vyšší, než u citlivých biotypů. Na základě získaných výsledků u zkoumaných rezistentních biotypů může za rezistenci vůči glyphosate porucha translokace herbicidu a zvýšení hladiny EPSPS transkriptáz. V porovnání s vlastním experimentem tolerantní rostliny vykazovaly až sedmkrát vyšší hodnotu GR50. Na základě hodnot GR50 se u našich tolerantních populací začíná pravděpodobně uplatňovat nespecifická rezistence, kdy dochází ke změnám v translokaci herbicidu rostlinou. Pro ověření tohoto tvrzení by se musely samozřejmě provést laboratorní metody.

Další pokus provedl Recker (2012) ve Wisconsinu, kde byly nalezeny biotypy turanky kanadské v porostech kukuřice a sóji. Biotypy rezistentní vůči glyphosate byly téměř šestinásobně odolnější v porovnání s citlivými biotypy. V olivových sadech jižní Evropy se rovněž potýkají s rezistencí turanky ke glyphosate (Moreira a kol. 2007 a Urbano a kol., 2007). Calha (2011) také potvrdila v Portugalsku – Alentejo rezistentní populace turanky kanadské. González (2010) zkoumal populace turanky kanadské rostoucích v olivových hájích a citrusových sadech v jižním Španělsku. Biotypy turanky kanadské ve fázi listové růžice (6-8

listů) vykázaly hodnotu GR50 34,9 g/ha účinné látky glyphosate. Hodnoty GR50 jsou nižší ve fázi listové růžice (15,7 g úč.l./ha) ve srovnání s nejvyššími hodnotami GR50 získanými v období květu (117,5 g úč.l./ha). Tyto výsledky se shodují s polními výzkumy, kde také rostliny v raných růstových fázích jsou citlivější vůči glyphosate. Rostliny turanky kanadské ve našem experimentu byly ošetřeny ve fázi listové růžice do 8 listů. Aplikované dávky herbicidu byly v rozmezí 0,1 - 6 l herbicidu / ha v dávce 200 l / H<sub>2</sub>O na ha. Lokality Praha – Radotín a Litoměřice prokázaly nejvyšší efektivní dávku po aplikaci účinné látky glyphosate při hodnocení parametru čerstvé nadzemní biomasy. Hodnota u populace z Litoměřic byla 385,02 g úč.l./ha a u Prahy – Radotína 302,44 g úč.l./ha. U těchto lokalit je patrné, že vycházejí výrazně vyšší hodnoty GR50, než u lokalit Děčín, Chomutov a Cheb. Hodnota u lokality Děčín činila 30,22 g úč.l./ha, Chomutov 45,87 g úč.l./ha a Cheb 50,32 g úč.l./ha.

V další části byl prováděn výpočet faktoru rezistence. Podobný pokus provedl VanGesell (2001) v Delaware. Rostliny turanky kanadské v Delaware vykazovaly faktor rezistence 8 – 13 v porovnání s citlivými biotypy. V podobném rozpětí se pohybovaly i faktory rezistence získané ve vlastním experimentu, kdy biotypy vykazovaly faktor rezistence v rozmezí 1,52 - 12,24. Koger a kol. (2004) začali v roce 2002 s pokusem v Mississippi a Tennessee, kde biotypy byly pěstovány ve skleníku do fáze 5, 13 – 15 a 25 - 30 listů a aplikovány dávky herbicidu v rozmezí 0,035 až 18 kg/ha účinné látky glyphosate. Všechny biotypy vykazovaly 8 až 12 násobnou odolnost vůči glyphosate ve srovnání s citlivými biotypy. Tyto výsledky ukazují, že biotypy rezistentní vůči glyphosate jsou schopny přežít dávku až 16 kg/ha účinné látky.

Mnozí autoři považují biotypy, u nichž byl faktor rezistence vyšší než 2 za rezistentní (Moss, a kol., 1999). Je tedy diskutabilní, zda je hodnocení pomocí faktoru rezistence odpovídajícím měřítkem pro stanovení toho, zda biotyp je či není rezistentní. Tím, že hodnota faktoru rezistence je počítána jako podíl při 50 % účinnosti, můžeme dojít k závěru, že existuje rozdíl v citlivosti mezi biotypy s faktorem rezistence větším jak 10, jako tomu bylo i u testovaných populací v Delaware (VanGesell, 2001). Vždy je nutné rovněž přihlídnout k tomu, jaká byla skutečná hodnota GR50, tedy dávka při které došlo ke snížení účinnosti na 50 % a v mnoha studiích se porovnávají také GR90. Biotypy z lokalit, které dosahovaly GR50 mezi 300 – 400 můžeme nazvat tolerantními vůči účinné látce glyphosate.

Chachalis (2012) zkoumal na území Řecka relativní konkurenceschopnost glyphosate rezistentních a citlivých populací turanky kanadské. Z těchto testovaných biotypů 68% populací bylo potenciálně rezistentních. Dávky účinné látky musely být 7 - 14 krát vyšší, než u citlivých populací. Rostliny turanky kanadské byly nejvíce citlivé na herbicid ve fázi listové růžice. Citlivost vůči glyphosate je tedy závislá na růstové fázi. Klingaman a kol. (1992) také uvádí, že citlivost plevelného druhu vůči herbicidu může být do značné míry ovlivněna růstovou fází druhu v době aplikace. Na železničních nádražích se ošetřuje proti turance kanadské dle výskytu, obvykle 2x ročně. Na daném místě se mohou vyskytovat jedinci, kteří překročili optimální růstovou fázi a nejsou regulováni v nejvhodnější růstové fázi pro aplikaci, tedy listové růžici. Vytvořená semena pak mohou přispívat ke nárůstu počtu odolných jedinců v populaci a rozšiřovat se na další území.

Chodová a Mikulka (2004) již od roku 1995 pozorují zvyšující se výskyt turanky kanadské na železničních nádražích v České republice. Později začal být její výskyt dáván do souvislosti s aplikacemi glyphosate, které jsou na železnicích prováděny od r. 2000 a v současné době jsou železniční koridory ošetřovány výhradně touto účinnou látkou. Chodová a kol. (2009) u některých biotypů turanky kanadské pocházejících z pražských nádraží potvrdili sníženou citlivost ke glyphosate. Na rostliny byl opakovaně aplikován glyphosate v dávce 450 g úč./ha. Fytotoxicita glyphosate těchto rostlin po postřiku se výrazně lišila od kontrolních rostlin. Listy obou rostlinných biotopů po aplikaci herbicidu zavadly a zežloutly. U citlivých rostlin došlo během 10 dnů k jejich uschnutí, zatímco u méně citlivé populace vyrostly během několika týdnů v centru růžice nové listy. Změny v hladině kyseliny šikimové v analyzovaných rostlinách potvrdily první výskyt tolerantních rostlin turanky kanadské v České republice.

Populace testované v rámci této diplomové práce rovněž pocházely ze železničních nádraží. Na základě výsledků nádobových pokusů, lze konstatovat, že byl pozorován určitý posun v citlivosti, zejména u jedinců z lokalit Litoměřice a Praha – Radotín a jedinci pocházející z těchto nádraží přežívali dávku 3 i 6 l přípravku na ha. Ze získaných výsledků je patrný zřetelný posun v citlivosti některých biotypů turanky kanadské rostoucích na železničních nádražích. Vysokým selekčním tlakem herbicidu můžeme postupně vyselektovat biotypy s rezistencí vůči glyphosate. Dalším nebezpečím, které hrozí v případě turanky kanadské, je rozšiřování

rezistentních populací, které se mohou rozšiřovat do okolí a v některých oblastech by mohlo docházet i ke křížení s příbuznými druhy např. s *Conyza bonariensis* (Zelaya a kol., 2007).

## 7. Závěr

Na základě výsledků nádobového pokusu můžeme přijmout hypotézu, že vlivem dlouhodobého používání glyphosate došlo k vyselektování populací s vyšší úrovní tolerance k herbicidům obsahující tuto účinnou látku.

Rostliny turanky kanadské pocházející z lokalit Praha – Radotín a Litoměřice byly na základě získaných hodnot GR50 podstatně odolnější než ostatní populace. V porovnání s citlivým biotypem všechny sledované populace vykazovaly destinasobně vyšší odolnost vůči testovanému herbicidnímu přípravku. Je tedy možno přijmout i druhou hypotézu o významných rozdílech v citlivosti mezi lokálními populacemi.

Tyto odolné biotypy můžeme nazvat tolerantními vůči glyphosate, protože registrované dávky herbicidů, které jsou na železnici vyšší než v polních podmínkách, vykazují uspokojivý účinek a nelze je tedy z praktického hlediska považovat za rezistentní. Protože se však účinnost herbicidů na nejodolnější populace pohybovala pouze na úrovni 60-70 % při použití dávek registrovaných pro použití na zemědělské půdě, lze třetí hypotézu přijmout pouze pro podmínky nezemědělské půdy, nikoliv však při rozšíření těchto populací na půdu zemědělskou.

V současné době se turanka kanadská vyskytuje na našem území převážně na ruderalních a dalších synantropních stanovištích, ale také již i na zemědělské půdě, zvláště v sadech. V budoucnu může tedy hrozit nebezpečí s šířením rezistence na zemědělsky obhospodařované plochy. Na našem území není úroveň rezistence vůči glyphosate u turanky kanadské doposud vysoká. K udržení tohoto stavu by měl být kladen důraz na preventivní opatření. Je nezbytné stále monitorovat vývoj rezistence u populací turanky a snažit se zabránit jejich dalšímu rozšiřování. U nekontrolovaných populací může dojít následně k rezistenci, která by byla těžce řešitelná, obzvláště v případě mnohonásobné rezistence. Dobře zvolený způsob a strategie regulace plevelů, spolupráce vědců, výrobců herbicidů a uživatelů herbicidů je nezbytná pro úspěšné potlačování rozvoje rezistence.

## 8. Seznam literatury:

- BAERSON, S. R., RODRIGEZ, D. J., TRAN, M., FENG, Y., BIEST, A. N., DILL, G. M. 2002.** Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology*. 129. 1265–1275.
- BRADSHAW, L., PADGETTE, S. R., KIMBALL, S. L. & WELLS, B. H. 1997.** Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology*. 11. 189 – 198.
- COBY, A. H., KIRKWOOD, R. C. 2000.** Challenges for herbicide development. In: Coby A. H., Kirkwood, R. C: *Herbicides and their mechanism of action*. Sheffield Academic Press. Sheffield.
- ČAČA, Z. 1990.** Ochrana polních a zahradních plodin. Vydání druhé. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 368 s.
- DAVINE, M. D., EBERLEIN, C. V. 1997.** Physiological, biochemical and molecular aspect of herbicide resistance based on altered target sites. In: Roe, R. M., Burton, J. D., Kuhr, R. J. (eds): *Herbicide activity. Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. IOS Press. Amsterdam.
- DINELLI, G., MAROTTI, I., BONETTI, A., MINELLI, M., CATIZONE, P., BARNES, J. 2006.** Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Biotypes. Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 30-41.
- DUBOIS M., PLANCKE, M, P. 2010.** Development of glyphosate resistant weeds: situation and perspectives in France. ISBN: 978-2-905550-21-7
- DVOŘÁK, J., SMUTNÝ, V. 2003.** *Herbologie: Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. Vyd. 1. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Brno. 186 s. ISBN: 978-80-7157-732-4
- GAINES, T., PRESTON, C., SHANER, D., LEACH, J., CHISHOLM, S., BUKUN B., WARD, S., CHUPEPPER, A. S., TRANEL, P., WESTRA, P. 2009.** A novel mechanism of resistance to glyphosate in Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). In: *Abstracts of the Weed Science Society of America*. 49. 368.
- GAINES, T., PRESTON, C., LEACH, J., CHISHOLM, S., SHANER, D. L., NISSEN, S., BUKIN, B., PATZOLDT, W., TRANEL, P., WEBSTER, T. M., VENCILL, W. K., SAMMONS, D., WANG, D., WESTRA, P. 2010.** Gene Amplification Confers Glyphosate Resistance in *Amaranthus palmerii*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1007. 1029-1034.
- GONZÁLEZ-TORRALVA, F., ROJANO-DELGADO, A. M., LUQUE DE CASTRO, M. D., MUELLEDER, N., DE PRADO, R. 2012.** Two non-target mechanisms are involved in glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq) biotypes. *Journal of Plant Physiology*. 169. 1673-1679.

- HAKANSSON, S. 2003.** Weeds and Weed Management on Arable Land: An Ecological Approach. 206 s. ISBN: 0851996515
- HALFORD, N. G. 2003.** Genetically Modified Crops. Imperial College Press. London. ISBN 1-86094-353-5
- HALFORD, N. G. 2006.** Plant Biotechnology: Current and Future Applications of Genetically Modified Crops. Wiley. Chichester. ISBN 978-0-470-02181-1
- HAMOUCOVÁ, K., SOUKUP, J., JURŠÍK, M., HAMOUZ, P., VENCLOVÁ, V., KOŠNAROVÁ, P. 2011.** Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Weed Research*. 51 (2). 113-122. ISSN: 0043-1737
- HAMOUCOVÁ, K., JURŠÍK, M., KOŠNAROVÁ, P. 2012.** Rezistence plevelů vůči herbicidům. *Agrotip*. 9, 6-7.
- HEJNÝ, S., JEHLÍK, V. 1973.** Karanténní plevely Československa. Academia. Praha.
- HRON, F., KOHOUT, V. 1988.** Plevely polí a zahrad Jihočeské tiskárny, . České Budějovice. 343s.
- CHODOVÁ, D., SALAVA, J., MARTINCOVÁ, O., CVIKROVÁ, M. 2009.** Horseweed with reduced susceptibility to glyphosate found in the Czech Republic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (15). 6957-6961. ISSN 0021-8561
- JANDER, G., BAERSON, S. R., HUDAK, J.A.M., GONZALEZ, K. A., GRUYS, K. J., LAST, R. L. 2003.** Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determinate frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology*. 131. 139-146
- JEHLÍK, V. 1998.** Cizí expanzivní plevely České republiky a Slovenské republiky Academia. . Praha. 506 s. ISBN: 80-200-0656-7
- JURŠÍK, M., HOLEC, J., HAMOUZ, P., SOUKUP, J. 2011.** Plevely: biologie a regulace. Vyd. 1. Kurent. České Budějovice. 232 s. ISBN: 978-80-87111-27-7
- KAUNDUN, S. S., ZELAYA, I. A., DALE R. P., LYCETT, A. J., CARTER, P., SHARPLES K. R., McINDOE, E. 2008.** Importance of the P106S target site mutation in conferring resistance to glyphosate in a goosegrass (*Eleusine indica*) population from the Philippines. *Weed Science*. 56. 637-646.
- KLINGAMAN, T. E., KING, C. A. AND OLIVER, L. R. 1992.** Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*. 40. 227-232.
- KNEIFELOVÁ, M., MIKULKA, J. 2003.** Významné a nově se šířící plevely. *Zemědělské informace. Ústav zemědělských a potravinářských informací*. Praha. 59 s. ISBN: 80-727-1142-3
- KNEIFELOVÁ, M. 2003.** Biologie a regulace plevelů. VÚRV. Praha. 81 s. ISBN: 80-865-5533-X

- KOHOUT, V., MENTBERGER, J. 1992.** Hubíme plevele: regulace přemnožených rostlin v přírodě. 1. vyd. Laguna. Praha. 125 s. ISBN 80-900-9985-8
- KOHOUT, V. 1996.** Herbologie: plevele a jejich regulace. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 116 s.
- KOHOUT, V. 1997.** Plevle polí a zahrad. Agrospoj. Praha. 235 s.
- LORRAINE-COLWILLA, D. F., POWLES, S. B., HAWKES, T. R., PRESTON, C. 2001.** Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.). Theoretical and Applied Genetics. 102. 545-550.
- LORRAINE-COLWILLA, D. F., POWLES, S. B., HAWKES, T. R., HOLLINSHEAD, P. H., WARNER, S. A. J., PRESTON, C. 2003.** Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 74 (2). 62–72.
- LUTMAN, P. J. W., HEALTH, C. R. 1990.** Variation in the resistance of *Stellaria media* to mecoprop due to biotype, application method and 1-aminobenzotriazole. Weed Research. 30. 12-137
- MALLORY-SMITH, C., NAMUTH, D. 2011.** Overview and objectives of herbicide resistance: Mechanisms, Inheritance & Molecular Genetics.
- MIKULKA, J., SLAVÍKOVÁ, L. 2008.** Metody diagnostiky a regulace rezistentních populací plevelů vůči herbicidům: uplatněná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 39 s. ISBN: 978-80-87011-50-8
- MIKULKA, J., CHODOVÁ, D. 2002.** Hubení plevelů odolných vůči herbicidům. 3. upr. vyd. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 54 s. ISBN: 80-727-1116-4
- MIKULKA, J., CHODOVÁ, D. 2004.** Vývoj metod diagnostiky a mapování plevelů rezistentních vůči herbicidům jako součást biodiversity plevelných společenstev. Projekt NAZV QD1204.
- MIKULKA, J., KNEIFELOVÁ, M. 2005.** Plevelné rostliny: uplatněná metodika. 2. kompletně přeprac. vyd. Profi Press Praha. 148 s. ISBN: 80-867-2602-9
- MIKULKA, J., CHODOVÁ, D. 1998.** Rezistence plevelů vůči herbicidům. studijní informace. Praha. UZPI
- MIKULKA, J., CHODOVÁ, D., KOHOUT, V., MARTINKOVÁ, Z., SOUKUP, J., UHLÍK, J. 1999.** Plevelné rostliny polí, luk a zahrad. Farmář – Zemědělské listy. 151 s.
- MLÍKOVSKÝ, J., STÝBLO, P. 2006.** Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky. Praha. 76 s. ISBN: 80-86770-17-6
- MOREIRA, M. S., NICOLAI M., CARVALHO, S. J. P. and CHRISTOFFOLETI P. J. 2007.** Glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and *C. bonariensis*. Planta daninha. 25. 157-164.



- MOSS, S. R., CLARKE, A. M., BLAIR, T. N., CULLEY, M. A., READ, P. J., RYAN, M. TURNER. 1999.** The occurrence of herbicide resistant grass-weeds in the United Kingdom and a new system for designating resistance in screening assays. In: Proceedings Brighton Conference – Weeds. pp.179-184.
- MUELLER, T.C., MASSEY, J.H., HAYES, R.M., MAIN, C. L. AND C. NEAL STEWART JR. 2003.** Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51. 680-684.
- NANDULA, V. K. 2010.** Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management. Wiley. 321 s. ISBN: 04-704-1031-0
- OWEN, M. K. 2008.** Weed species shifts in glyphosate resistant crops. Pest Management Science. 64. 377-387.
- PADGETTE, S. R., RE, D. B., GASSE, C. S., EICHOLTZ, D. A., FRAZIER, R. B., HIRONAKA, C. M., LEVINE, E. B.; SHAH, D., FRALEY, R. T., KISHORE, G. M. 1991.** Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active site. Journal of Biology and Chemistry. 266. 22364–22369.
- POLLEGIONI, L., SCHÖNBRUNN, E., SIEHL, D. 2011.** Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. FEBS Journal. 2753-2766.
- POWLES, S. B., & SHANER, D. L. 2001.** Herbicide resistance in world grains. CRC press. Boca Raton, Florida, USA.
- POWLES, S. B., LORRAINE-COLWILL, D. F. 1998.** Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. Weed Science. 46. 604-607.
- POWLES, S. B. AND C. PRESTON. 2006.** Evolved glyphosate resistance in plants: Biochemical and genetic basis of resistance. Weed Technology. 20. 282-289.
- PRATLEY, J., BAINES, P., EBERBACH, P., INCERTI, M. and BROSTER, J. 1996.** Glyphosate resistance in annual ryegrass. In: Proceedings 11<sup>th</sup> Annual Conference of the Grassland Society of NSW (eds J Virgona & D Michalk). The Grassland Society of NSW. Wagga Wagga, Australia s. 122.
- PRESTON, C., WAKELIN, A. M. 2008.** Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns. Pest Management Science. 64. 372–376.
- PROCHÁZKA, S., ŠEBÁNEK, J. 1997.** Regulátory rostlinného růstu. Vyd. 1. Academia. Praha. 395 s. ISBN 80-200-0597-8
- PROKOP, M. 2009.** Riziko vzniku rezistence plevelů vůči herbicidům a opatření, jak vzniku předcházet. Rostlinolékař. 20 (6). 24-26.

- REGEHR, D. L., BAZZAZ, F. A. 1979.** The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. *Journal of Ecology*. 67. 923-933.
- SCHÖNBRUNN, E., S. ESCHENBURG, W. A. SCHUTTLEWORTH, J. V. SCHLOSS, N. AMRHEIN, J. N. S. EVANS a W. KABSCH. 2001.** Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 98. 1376-1380
- SIMARMATA, M., BUGHRARA, S. AND PENNER, D. 2005.** Inheritance of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) from California. *Weed Science*. 53 (5). 615-619.
- SINGH, B. K., SHANER, D. L. 1998.** Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology*. 12. 527-530.
- SLAVÍK, B., ŠTĚPÁNKOVÁ, J. 2004.** Květena České republiky. Vyd. 1. Academia. Praha. 767 s. ISBN 80-200-1161-7
- SOUKUP, J. 2005.** Metody regulace zaplevelení. In: Mikulka J., Kneifelová M. a kol.: *Plevelné rostliny*. Profi Press. Praha.
- STEGING, S. J., VAUGHN, K. V. 1988.** Norflurazon reduced abscised acid level in citron seedlings: A glandless isolate is more sensitive than is Flander counterpart. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 31. 269-275.
- URBANO J., BORREGO A., TORRES V., LEON J. M., JIMENEZ C., DINELLI, G. 2007.** Glyphosate resistant Hairy Fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain *Weed Technology*. 21. 396-401.
- VANC, P. 2001.** *Zahrada bez plevele*. Grada Publishing. Praha. 72 s.
- VANGESSEL, M. J. 2001.** Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science*. 49. 703-705.
- VONDRÁŠKOVÁ, Š. 2006.** Rezistence vůči glyfosátu se stále zvyšuje. *Agronavigátor*. Článek 47161.
- YU, Q., CAIRNS, A., POWLES, S. 2007.** Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta*. 225. 499-513.
- ZELAYA, I. A., OWEN, M. D. K., VANGESEEL, M. J. 2007.** Transfer of glyphosate resistance: Evidence of Hybridization in *Conyza* (Asteraceae). *American Journal of Botany*. 94 (4). 660- 673.

## **ELEKTRONICKÉ DOKUMENTY:**

**ADAMCZEWSKI, K. 2010.** International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Group G/9 resistant horseweed (*Conyza canadensis*), EPSP synthase inhibitors (G/9), Poland.

www.weedresearch.com. [cit. 2014-02-21]. Dostupné z  
<<http://www.weedresearch.com/Details/Case.aspx?ResistID=5622>>

**AGROKROM:** Herbicidy a jejich využití [online]. [cit. 2014-03-15]. Dostupné z:  
<[http://www.agrokrom.cz/texty/metodiky/radce\\_hospodare/radce\\_herbicidy\\_a\\_jejich\\_vyuziti.pdf](http://www.agrokrom.cz/texty/metodiky/radce_hospodare/radce_herbicidy_a_jejich_vyuziti.pdf)>

**AGROMANUAL:** Neselektivní herbicidy [online], www.agromanual.cz, [cit. 2014-03-07].  
Dostupné z<<http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/herbicidy/herbicid/cliophar-300-sl.html>>

**AGROVITA:** Neselektivní herbicidy [online]. www.agrovita.cz. [cit. 2014-03-07]. Dostupné z <  
<http://www.agrovita.cz/?url=pripravky/herbicidy/&detail=:5-glyfogan-480-sl>>

**AGROMANUAL:** Neselektivní herbicidy [online]. www.agromanual.cz, [cit. 2014-03-07].  
Dostupné z <<http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/herbicidy/herbicid/roundup-klasik.html>>

**ARNIKA:** Glyphosate. www.arnika.org, [cit. 2014-02-22 ]. Dostupné z<  
<http://arnika.org/glyfosat>>

**CALHA, I. 2011.** International Survey of Herbicide Resistant Weeds. GROUP G/9 RESISTANT HORSEWEED (*Conyza canadensis*), EPSP synthase inhibitors (G/9), Poland.

www.weedresearch.com. [cit. 2014-02-21].  
Dostupné z<<http://www.weedresearch.com/Details/Case.aspx?ResistID=7824>>

**E-AGRO:** Herbicidy- dominátor. www.e-agro.cz. [cit. 2014-03-05]. Dostupné z <<http://www.e-agro.cz/dominator-1-l-neselektivni-glyfosat/d-70318/>>

**GATE2BIOTECH.** www.gate2biotech.cz. [cit. 2014- 02-23]. Dostupné z  
<<http://www.gate2biotech.cz/postrehy-z-prvnich-sedmnacti-let-pestovani-transgennich-plodin/>>

**GLYPHOSATE FACTS:** Transparency on safety aspects and use of glyphosate-containing herbicides in Europe. www.glyphosate.eu. [cit. 2014-02-21]. Dostupné z <  
<http://www.glyphosate.eu/glyphosate-basics/history-glyphosate> >

**HEAP, I. M., KNIGHT, R. 2003.** A population of ryegrass tolerant to herbicide diclofopmethyl. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 48. 156, In: Tharayil-Santhakumar N: Mechanism of herbicide resistant in weeds. Dostupné z www.Weedscience.org.

**CHACHALIS, D. AND TRAVLOS I. 2012.** International Survey of Herbicide Resistant Weeds. GROUP G/9 RESISTANT HORSEWEED (*Conyza canadensis*), EPSP synthase inhibitors (G/9), Poland. www.weedresearch.com. [cit. 2014-02-21]. Dostupné z<  
<http://www.weedresearch.com/Details/Case.aspx?ResistID=5692>>

- JURSÍK, M., HAMOUZOVÁ, K., SOUKUP, J., HOLEC, J. 2011.** Rezistence plevelů vůči herbicidům a problémy s rezistentními populacemi v ČR. [www.cukr-listy.cz](http://www.cukr-listy.cz). [cit. 2014-02-15]. Dostupné z <[http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2011/PDF/123-129.pdf](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2011/PDF/123-129.pdf)>
- Mapa výskytu turanky kanadské v České republice.** [www.florabase.cz](http://www.florabase.cz). [cit. 2014-02-17]. Dostupné z: <[www.florabase.cz](http://www.florabase.cz)>
- MŽP–EKOLOGIE.** [www.mzp.cz](http://www.mzp.cz) [cit. 2014-2-17]. Dostupné z <[http://www.mzp.cz/osv/edice.nsf/881B04BF9FD9A9B3C1256FC000501538/\\$file/Ekologie\\_08.pdf](http://www.mzp.cz/osv/edice.nsf/881B04BF9FD9A9B3C1256FC000501538/$file/Ekologie_08.pdf)>
- NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER:** Glyphosate general fact sheet [online]. <http://npic.orst.edu> [cit. 2014-04-01]. Dostupné z <<http://npic.orst.edu/factsheets/glyphogen.pdf>>
- PMEP-Pesticide management education program.** <http://pmep.cce.cornell.edu>. [cit. 2014-02-06] Dostupné z <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/glyphosate-ext.html>>
- RECKER, R., STOLTENBERG, D., DAVIS, V. 2013.** A Horseweed Population in Wisconsin is Confirmed Resistant to Glyphosate. The University of Wisconsin Integrated Pest and Crop Management (IPCM) programs. [www.ipcm.wisc.edu](http://www.ipcm.wisc.edu). [cit. 23. 3. 2014]. Dostupné z <<http://ipcm.wisc.edu/blog/2013/06/a-horseweed-population-in-wisconsin-is-confirmed-resistant-to-glyphosate/>>
- ŠTĚPÁNEK, P. 2005.** Strategie minimalizující rezistenci plevelů k herbicidům [online]. 17.6.2005. [cit. 23. 3. 2014]. Dostupné z <<http://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/plevele/strategie-minimalizujici-rezistenci-plevelu-k-herbicidum.html>>
- ÚVOD DO PROBLEMATIKY MECHANIZMU PŮSOBENÍ HERBICIDŮ:** Miroslav Jursík, Josef Soukup, Josef Holec – Česká zemědělská univerzita v Praze. [www.cukr-listy.cz](http://www.cukr-listy.cz). [cit. 2014-02-04]. Dostupné z <[http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2010/PDF/14-16.PDF](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/14-16.PDF)>
- VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ.** Perspektivy použití biologického hubení plevelů pomocí dvoukřídlých s cílem omezit používání pesticidů. [www.phytosanitary.org](http://www.phytosanitary.org) [cit. 2014-02-12] Dostupné z <<http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-10-03.pdf>>
- WSSA - A Non-Profit Professional Society Promoting Research, Education, and Awareness of Weeds in Managed and Natural Ecosystems.** [www.wssa.net](http://www.wssa.net) [cit. 2014-03-01] Dostupné z <<http://www.wssa.net/weed/resistance/>>
- WSSA - A Non-Profit Professional Society Promoting Research, Education, and Awareness of Weeds in Managed and Natural Ecosystems: Herbicide Resistance and Herbicide Tolerance Definitions.** [www.wssa.net](http://www.wssa.net) [cit. 2014-03-17]. Dostupné z <<http://www.wssa.net/weed/resistance/herbicide-resistance-and-herbicide-tolerance-definitions/>>

## 9. Seznam příloh

**Obr.č 5:** Biotyp z lokality Děčín po aplikaci stupňovaných dávek účinné látky glyphosate



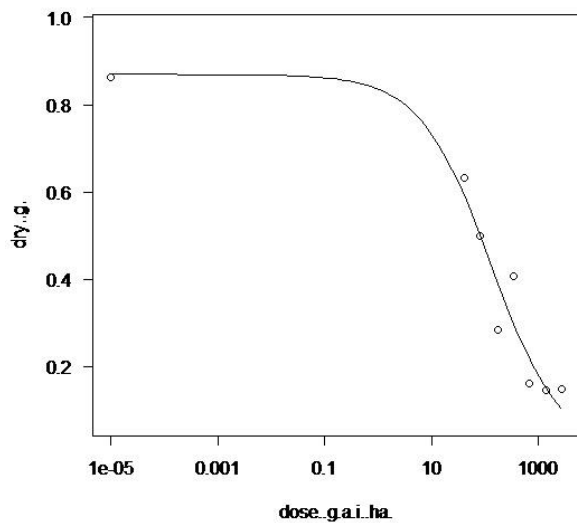
**Obr.č 6:** Biotyp z lokality Litoměřice po aplikaci stupňovaných dávek účinné látky glyphosate



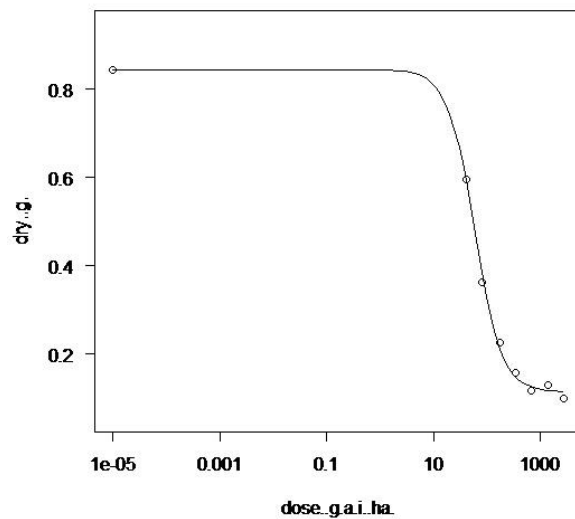
**Obr.č. 7:** Biotyp z lokality Praha – Radotín po aplikaci stupňovaných dávek účinné látky glyphosate



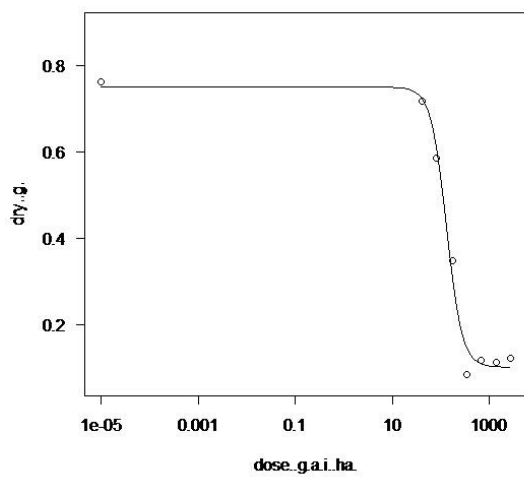
**Obr. č. 8:** Litoměřice – závislost hmotnosti suché biomasy na dávce



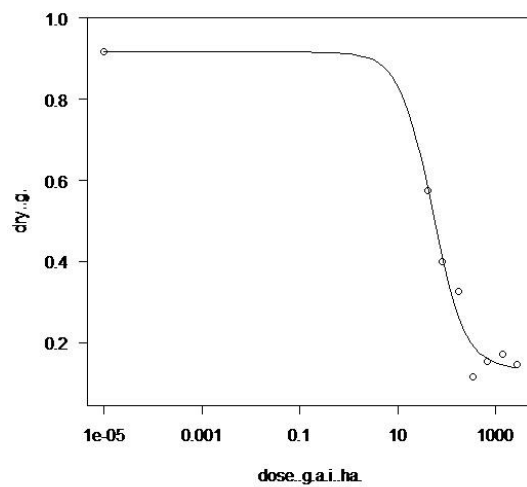
**Obr. č. 10:** Děčín – závislost hmotnosti suché biomasy na dávce



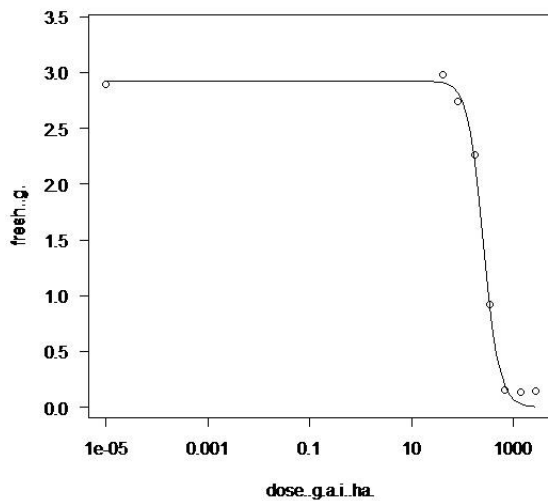
**Obr. č. 9:** Praha - Radotín – závislost hmotnosti suché biomasy na dávce



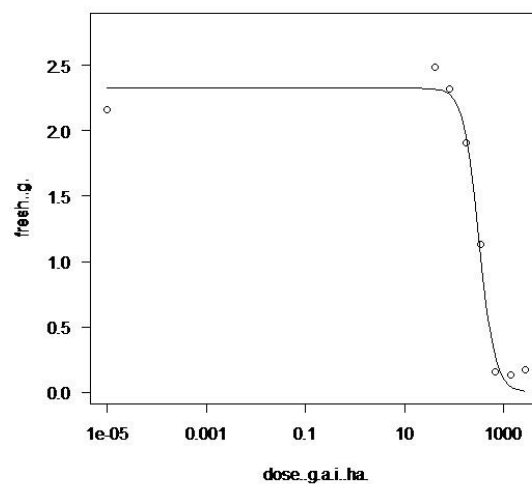
**Obr. č. 11:** Chomutov – závislost hmotnosti suché biomasy na dávce



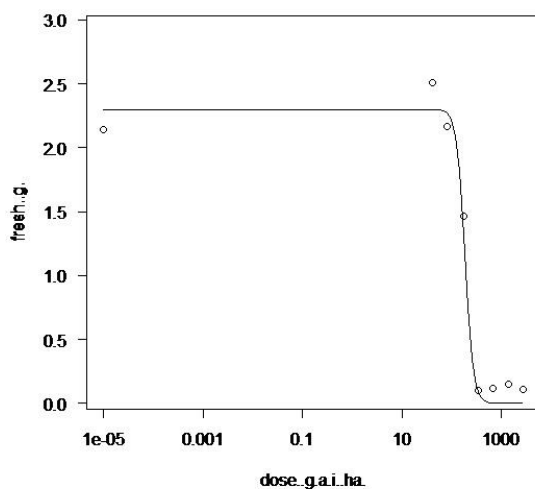
**Obr. č. 12:** Planá u Mariánských Lázní - závislost hmotnosti čerstvé biomasy na dávce



**Obr. č. 14:** Plzeň - závislost hmotnosti čerstvé biomasy na dávce



**Obr. č. 13:** Praha - Radotín - závislost hmotnosti čerstvé biomasy na dávce



**Obr. č. 15:** Chomutov - závislost hmotnosti čerstvé biomasy na dávce

