

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra ochrany rostlin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Rezistence škůdců řepky k insekticidům a možnosti  
zdokonalování integrované ochrany řepky**

**Doktorská disertační práce**

**Autor: Ing. Tomáš Hovorka**

**Školitel: prof. RNDr. Ing. František Kocourek, CSc.**

**Konzultant: Ing. Jitka Stará, Ph.D.**

**Praha 2023**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou disertační práci „**Rezistence škůdců řepky k insekticidům a možnosti zdokonalování integrované ochrany řepky**“ vypracoval samostatně pod vedením vedoucího disertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na jejím konci. Jako autor disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5. 4. 2023

---

## **Poděkování**

Chtěl bych touto cestou poděkovat mému školiteli **prof RNDr. Ing. Františku Kocourkovi, CSc.** za jeho cenné rady, doporučení a lidský přístup během celého doktorského studia. Dále bych také rád poděkoval **Ing. Jitce Staré, Ph.D.** a **Ing. Kamilu Holému, Ph.D.**, kteří mi poskytli taktéž mnoho cenných rad a inspirací. Děkuji také **Anně Macákové** a **Bc. Janě Vincikové** za jejich pomoc s laboratorními pokusy a mnoho příjemně strávených chvil. Velký dík patří také **Katedře ochrany rostlin FAPPZ-ČZU**, která mi v době studia poskytla veškerou nutnou podporu. V neposlední řadě musím také poděkovat mé **rodině**, která mě během celého studia všemi směry podporovala a stejně tak mé drahé polovičce **Bc. Lucii Pešové** za její laskavou podporu a ilustrace.

## **Abstrakt**

Disertační práce je zaměřena na získání nových poznatků o rezistenci vůči pyrethroidům u jednoho z nejdůležitějších škůdců řepky, kterým je blýskáček řepkový. Na základě nově získaných poznatků o této rezistenci jsou v disertační práci navrženy pěstební technologie s přesahem na další škůdce řepky a antirezistentní strategie, které se řídí zásadami integrované ochrany rostlin. Při komplexním pojetí integrované ochrany je také třeba vnímat dopady současného zemědělství na užitečné organismy a možnosti, jak podpořit jejich výskyt v blízkosti polí se zemědělskými plodinami. Při současném velmi úzkém spektru přípravků na ochranu proti škůdcům roste potenciál užitečných organismů. Proto je disertační práce zaměřena také na možná využití parazitoidů v ochraně proti škůdcům a možná opatření, která jejich výskyt a abundanci v zemědělských plodinách mohou zvýšit.

**Klíčová slova:** rezistence, mechanismy rezistence, řepka, škůdci, užitečné organismy, mimoprodukční plochy

## **Abstract**

This dissertation thesis aims to gain new insights into pyrethroid resistance in one of the most important pests of oilseed rape, the pollen beetle. Based on the newly acquired knowledge on this resistance, the dissertation proposes cultivation technologies with overlapping to other oilseed rape pests and anti-resistance strategies following the principles of integrated pest management. In a comprehensive approach to integrated pest management, the impacts of current agriculture on beneficial organisms and the possibilities to promote their occurrence in the vicinity of crop fields must also be considered. With the current very narrow range of pest management products, the potential for beneficial organisms is increasing. Therefore, this dissertation also focuses on the possible use of parasitoids in pest management and possible measures that can increase their occurrence and abundance in agricultural crops.

**Keywords:** resistance, resistance mechanisms, oilseed rape, pests, beneficial organisms, non-crop habitats



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle a hypotézy práce.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled .....</b>	<b>5</b>
3.1	<i>Vybrání škůdci řepky.....</i>	5
3.1.1	Blýskáček řepkový ( <i>Brassicogethes aeneus</i> (Fabricius, 1775)).....	6
3.1.2	Dřepčík olejkový ( <i>Psylliodes chrysocephalus</i> (Linnaeus, 1758)).....	9
3.1.3	Krytonosec šešulový ( <i>Ceutorhynchus obstrictus</i> , (Marsham, 1802)) .....	12
3.2	<i>Rezistence škůdců vůči insekticidům .....</i>	15
3.2.1	Mechanismy rezistence .....	16
3.2.2	Molekulární metody detekce rezistence .....	19
3.2.3	Biologické metody hodnocení rezistence.....	19
3.3	<i>Škůdci rezistentní vůči insekticidům.....</i>	20
3.3.1	Blýskáček řepkový .....	21
3.3.2	Dřepčík olejkový .....	22
3.3.3	Krytonosec šešulový.....	23
3.4	<i>Integrovaná ochrana rostlin .....</i>	23
3.5	<i>Zásady integrované ochrany rostlin.....</i>	24
3.5.1	Technologie ochrany řepky využitelné v rámci IOR .....	27
3.5.2	Přirození nepřátelé v ochraně rostlin proti škůdcům.....	28
3.5.3	Ochrana a podpora užitečných organismů .....	37
<b>4</b>	<b>Publikované práce .....</b>	<b>41</b>
4.1	<i>Rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům v České republice bez prokázání výskytu mutace typu kdr v jeho populacích.....</i>	41
4.1.1	Charakteristika problematiky .....	41
4.1.2	Metodický postup .....	42
4.2	<i>Rezistence/tolerance blýskáčka řepkového k insekticidům z pohledu proteomiky.....</i>	53
4.2.1	Charakteristika problematiky .....	53
4.2.2	Metodický postup .....	54
4.3	<i>Rozdílná atraktivita odrůd řepky jako potenciální nástroj ochrany proti blýskáčku řepkovému a krytonosci šešulovému .....</i>	65
4.3.1	Charakteristika problematiky .....	65
4.3.2	Metodický postup .....	66

4.4	<i>První záznam o výskytu lumčíka <i>Microctonus brassicae</i> v České republice a jeho potenciál jako bioagens proti dřepčíku olejkovému</i>	77
4.4.1	Charakteristika problematiky	77
4.4.2	Metodický postup	77
4.5	<i>Dočasně uměle vytvořené mimoprodukční plochy podporují výskyt parazitoidů na orné půdě</i>	85
4.5.1	Charakteristika problematiky	85
4.5.2	Metodický postup	86
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	<b>97</b>
5.1	<i>Rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům v České republice bez prokázaného výskytu mutace typu kdr v jeho populacích</i>	97
5.2	<i>Rezistence/tolerance blýskáčka řepkového k insekticidům z pohledu proteomiky</i>	98
5.3	<i>Rozdílná atraktivita odrůd řepky jako potenciální nástroj ochrany proti blýskáčku řepkovému a krytonosci šešulovému</i>	100
5.4	<i>První záznam o výskytu lumčíka <i>Microctonus brassicae</i> v České republice a jeho potenciál jako bioagens proti dřepčíku olejkovému</i>	101
5.5	<i>Dočasně uměle vytvořené mimoprodukční plochy podporují výskyt parazitoidů na orné půdě</i>	102
<b>6</b>	<b>Závěry</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>Seznam obrázků a tabulek</b>	<b>130</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae a seznam publikací autora</b>	<b>131</b>

# 1 Úvod

Řepka olejka (*Brassica napus* L.) je jednoletá plodina, která se na evropském území pěstuje již po staletí. Jedná se o vysoce výnosnou plodinu ceněnou především pro svá olejnatá semena (Scarisbrick et al. 1989; Wang et al. 2017). Olej z jejích semen je důležitým průmyslovým artiklem a je využíván v řadě odvětví jako je například potravinářství a kosmetický průmysl (Friedt & Snowdon 2010). V Evropě se spolu se slunečnicí jedná o nejvíce pěstovanou olejinu a v osevních postupech zaujímá nezastupitelné místo. Mezi její hlavní pěstitele patří Francie (1 227 tis. ha), Německo (1 088 tis. ha), Polsko (1 075 tis. ha), Rumunsko (467 tis. ha), Litva (352 tis. ha) a také Česko (344 tis. ha) (European Commission 2023). Přestože má řepka mnoho pozitivních vlastností, způsob jejího pěstování a vysoká náchylnost k napadení patogeny a škůdci přináší také řadu problémů (Menzler-Hokkanen et al. 2006; Assefa et al. 2018). Kromě ztrát na výnosech a kvalitě produktů, které jsou způsobeny chorobami a škůdci, je v současném systému jejího pěstování velkým problémem použití pesticidů (Barzman et al. 2015). Pesticidy jsou významným a někdy nezbytným nástrojem pro prevenci a potírání škodlivých organismů, ale jejich nadměrné používání vede ke škodám na životním prostředí (Simon-Delso et al. 2015), negativnímu vlivu na člověka (Ansari et al. 2014) a v neposlední řadě také k rozvoji rezistence u škodlivých organismů (Thieme et al. 2010).

Rezistence je schopnost patogenů a škůdců vyvinout si odolnost vůči chemickým prostředkům ochrany (pesticidy) a představuje nejen v případě škůdců řepky jeden z největších problémů v jejím úspěšném pěstování (Roush & Tabashnik 2012). Jedním z nejzávažnějších škůdců řepky, který způsobuje každoročně velké škody a je nutné vůči němu provádět chemická ošetření, je blýskáček řepkový (Free & Williams 1978; Ekbohm & Borg 1996; Williams 2010a). U tohoto škůdce byla napříč Evropou (Hansen 2003; Nauen et al. 2012) včetně České republiky (Seidenglanz et al. 2016a; Stará & Kocourek 2018) prokázána rezistence vůči insekticidům ze skupiny pyrethroidů, která byla způsobena jejich nadměrným a dlouhodobým užíváním (Slater et al. 2011; Nauen et al. 2012). Důležitým prostředkem, jak zabránit rozvoji a šíření rezistence, je její monitoring (Slater et al. 2011; Sparks & Nauen 2015). Ten je každoročně v ČR prováděn u populací škůdců dle stanovených metodik. Na základě výsledků monitoringu rezistence je možné vybrat účinné látky pesticidů, které lze na ochranu proti škůdcům použít. Velký problém však představuje jejich v současnosti nedostatečné spektrum (Nauen et al. 2012). V roce 2001 bylo dle

Evropské komise povoleno přes 1000 účinných látek, zatímco v roce 2009 pouhých 250 a trend je stále klesající (Barzman et al. 2015). Proto je dnes velkým problémem dodržování hlavních zásad antirezistentní strategie, jako je střídání účinných látek pesticidů z různých skupin s odlišnými mechanismy účinku (Thieme et al. 2010). Jedním z důvodů, který vede k postupnému omezování spektra pesticidů, je také celou řadou studií prokázáný negativní vliv na necílové organismy (Boatman et al. 2004; Geiger et al. 2010; Ulber et al. 2010a; Blacquiere et al. 2012; Pekár 2012; Zhang et al. 2017).

Funkční řešení těchto problémů představuje integrovaná ochrana rostlin. Dodržováním jejích zásad je důležitým mechanismem, jak předcházet problémům se škůdci včetně rezistence (Barzman et al. 2015). Tyto zásady mají mimo jiné za cíl využití šetrných pěstebních technologií a opatření, která podporují přirozené regulátory škodlivých organismů (Ortega-Ramos et al. 2022; FAO 2023). Jako strategie ochrany řepky proti škůdcům je v současné době možné využít širokého sortimentu odrůd řepky s různými vlastnostmi. Mezi tyto vlastnosti patří také různá atraktivita odrůd řepky pro škůdce, jako je barva květu, odlišná fenologie a obsah volatilních látek v rostlinách (Smart & Blight 1997; Cook et al. 2006, 2013). Odrůdových rozdílů v atraktivitě pro škůdce lze využít v ochranných obsevech řepky, kdy na kraji pozemku je zaseta atraktivnější odrůda, která škůdce láká a koncentruje. Použití pesticidů tak není nutné na celé ploše, ale pouze na kraji pozemku, čímž dojde k dostatečné regulaci populace škůdců a snížení chemických vstupů do životního prostředí (Barari et al. 2005; Cook et al. 2007; Kazda et al. 2008). Zbytek populace škůdců pak mají při zajištění vhodných podmínek schopnost regulovat jejich přirození nepřátelé: predátoři, parazitoidi a také entomopatogenní mikroorganismy.

Vhodné podmínky pro tyto organismy představují především místa, která jsou schopná jim v době nedostatku poskytnout snadno přístupnou potravu (pyl a nektar) a úkryt (Isbell et al. 2017; Marja et al. 2019). Jedná se například o remízky, zbytky přírodě blízkých stanovišť (tzv. mimoprodukční plochy) nebo také o periodicky se vyskytující místa, která nedisponují vhodnými podmínkami pro růst plodin (polní kazy) (Brose 2003; Rösch et al. 2013; González et al. 2016). Mimoprodukční plochy jsou místem, které je schopné poskytnout podmínky pro život různých druhů rostlin a na ně vázaných organismů včetně přirozených nepřátel. Tato místa také podporují biologickou rozmanitost zemědělské krajiny, k jejímuž úbytku v posledních desítkách let masivně dochází (Poschlod & Bonn 1998; Henle et al. 2008; Mupepele et al. 2021). Výskyt užitečných organismů lze také podpořit opatřeními v podobě kvetoucích biopásů uvnitř a na okraji polí nebo vhodným managementem souvratí (Hatt et al. 2018). Cílem je tedy zajistit funkční ekosystém, který

je schopný regulovat škodlivé činitele a ušetří mnoho vynaložených prostředků a síly k dosažení požadované produkce. Využití nových pěstebních technologií založených na odrůdové preferenci škůdců a podpoře přirozených nepřátel škůdců je v budoucnu vzhledem ke zužujícímu se spektru účinných látek pesticidů a šíření rezistence pravděpodobně jedinou možnou alternativou k dosažení dostatečně výnosné rostlinné produkce.

## 2 Cíle a hypotézy práce

Základním cílem disertační práce je zhodnocení míry a mechanismů rezistence jednoho z hlavních škůdců řepky, blýskáčka řepkového, vůči běžně používaným insekticidům. Dalším cílem je vyhodnocení účinnosti ostatních insekticidů vůči škůdcům řepky a navržení nových antirezistentních strategií na základě získaných dat.

Mimo vyhodnocení rezistence a účinnosti insekticidů v ochraně proti škůdcům řepky jsou dalšími cíli práce: (1) navržení alternativních způsobů ochrany řepky v podobě nových pěstebních technologií, (2) využití přirozených nepřátel v ochraně řepky proti škůdcům a mimoprodukčních ploch na zemědělské půdě, které jejich výskyt podporují.

**Hypotéza 1:** Opakovaná aplikace insekticidů ze skupiny pyrethroidů vede u blýskáčka řepkového ke vzniku rezistence jeho populací, která je podmíněna genetickou mutací typu *kdr*. **Výsledek: Výstup A (kapitola 4.1)**

**Hypotéza 2:** Za rezistencí blýskáčka řepkového vůči insekticidům stojí pravděpodobně více mechanismů rezistence. **Výsledek: Výstup B (kapitola 4.2)**

**Hypotéza 3:** Pěstební technologie řepky využívající lapacích rostlin a rozdílné atraktivitu odrůd pro škůdce se jeví jako potenciálně vhodná v rámci integrované ochrany rostlin. **Výsledek: Výstup C (kapitola 4.3)**

**Hypotéza 4:** Blanokřídlí parazitoidi jsou účinným nástrojem v ochraně řepky proti škůdcům a mimoprodukční plochy podporují jejich výskyt a diverzitu. **Výsledky: Výstup D (kapitola 4.4), Výstup E (kapitola 4.5)**

## 3 Literární přehled

### 3.1 Vybraní škůdci řepky

Škůdce řepky můžeme v České republice (ČR) rozdělit do dvou skupin, a to na škůdce řepky na podzim, kteří způsobují škody na vzcházejících porostech a přezimujících rostlinách, a na škůdce řepky na jaře (Kocourek et al. 2017, 2018a). Mezi hlavní podzimní škůdce patří dřepčík olejkový (viz kapitola 3.3.2) a mšice broskvoňová, která působí škody hlavně nepřímo, a to přenosem virových patogenů, jako jsou virus žloutenky vodnice (turnip yellows virus, TuYV), virus mozaiky vodnice (turnip mosaic virus, TuMV) a virus mozaiky květáku (cauliflower mosaic virus, CaMV) (Schliephake et al. 2000; Alford 2003; Ekbom 2010; Kocourek et al. 2017; Slavíková & Kumar 2018). Nejvýznamnější jarní škůdci řepky jsou stonkoví krytonosci, blýskáček řepkový (viz kapitola 3.3.1), krytonosec šesulový (viz kapitola 3.1.3) a bejlmorka kapustová (Veromann et al. 2006; Ekbom 2010). Jako stonkoví krytonosci jsou označováni dva druhy nosatcovitých brouků: krytonosec řepkový a k. čtyřzubý. Oba druhy poškozují stonky řepky (Obr. 1), redukují jejich růst, větvení a snižují tvorbu generativních orgánů (Kelm & Klukowski 2000; Alford 2003). Při silném napadení se napadené stonky řepky lámou a může dojít ke kompletní devastaci úrody (Kocourek et al. 2018b; Hovorka & Skuhrovec 2019). Bejlmorka kapustová je velmi malý zástupce stejnojmenné čeledi dvoukřídlého hmyzu bejlmorkovití (Diptera: Cecidomyiidae). Spolu s krytonosem šesulovým patří k významným škůdcům řepky. Poškozují šesule a lůžka, v kterých se tvoří semena (Ekbom 2010; Williams 2010a). V jedné šesuli se může vyvíjet i více než 100 larviček (Obr. 1, Kazda et al. 2008). Larvy způsobují žloutnutí, výrazné deformace a zduření šesulí, ty se posléze otevírají a vypadávají z nich semena (Kazda et al. 2010; Beránek et al. 2023).



**Obrázek 1.** Poškození řepky larvami stonkových krytonosců (vlevo) a poškození šešulí řepky bejlmorkou kapustovou (vpravo). Foto: vlevo T. Hovorka, vpravo Rostlinolékařský portál.

### 3.1.1 Blýskáček řepkový (*Brassicogethes aeneus* (Fabricius, 1775))

#### 3.1.1.1 Popis a možnosti záměny

Blýskáček řepkový je malý brouk z čeledi lesknáčkovitých (Coleoptera: Nitidulidae) s maximální velikostí v rozmezí 1,5 až 2,7 mm. Dospělci jsou černé barvy s kovově nazelenalým, vzácněji namodralým až fialovým leskem. Tykadla a nohy jsou tmavě hnědé barvy (Hůrka 2005).

V České republice se běžně na polích s řepkou můžeme setkat se sedmi dalšími druhy blýskáčků (Tóth et al. 2013) celkem v pěti rodech (Tab. 1). K záměně jednotlivých druhů může dojít poměrně snadno, identifikace je časově náročná a komplikovaná. Jednotlivé



druhy se od sebe rozeznávají na základě charakteristického ozubení vnějšího okraje předních holení (Hůrka 2005), případně podle tvaru samičího a samčího genitálu nebo na základě morfometrie v kombinaci s barevnými rozdíly (Audisio et al. 2009; Tóth et al. 2013).

**Tabulka 1.** Přehled druhů blýskáčků vyskytujících se nejčastěji na polích s řepkou v ČR.

<b>Rod</b>	<b>Druh</b>	<b>Autor popisu druhu</b>
<i>Brassicogethes</i> Audisio & Cline, 2009	<i>aeneus</i>	(Fabricius, 1775)
	<i>coracius</i>	(Sturm, 1845)
	<i>subaeneus</i>	(Sturm, 1845)
	<i>viridescens</i>	(Fabricius, 1787)
<i>Fabogethes</i> Audisio & Cline, 2009	<i>nigrescens</i>	(Stephens, 1830)
<i>Genistogethes</i> Audisio & Cline, 2009	<i>carinulatus</i>	(Förster, 1849)
<i>Meligethes</i> Stephens, 1830	<i>atratus</i>	(Olivier, 1790)
<i>Sagittogethes</i> Audisio & Cline, 2009	<i>maurus</i>	(Sturm, 1845)

### 3.1.1.2 Životní cyklus

Blýskáček řepkový má jednu generaci do roka. Dospělci přezimují v půdě, opadaném listí, na mezích nebo v přilehlých křovinách. Brzy na jaře se při oteplení (nad 10 °C) začínají objevovat první dospělci, kteří přezimovali a živí se pylem různých bylin a dřevin (Láska & Kocourek 1991; Kazda et al. 2010). Do porostů jarní i ozimé řepky hromadně přeletují v období tvorby pupat při teplotách nad 13,5 °C (Kocourek et al. 2018a). Poupata ze stran vykusují a později se živí pylem a nektarem rozvinutých květů (Kazda et al. 2008). Vajíčka jsou kladena po jednom až dvou kusech do otvorů v pupatech, které si samice vykouše (Kocourek et al. 2018a). Z vajíček se po dvou až čtyřech dnech líhnou oligopodní larvy, které se živí pylem zpočátku nerozvinutých pupat a později otevřených kvítků výhradně brukvovitých rostlin (Brassicaceae). Dorostlé larvy padají na zem a kuklí se v půdě. Posléze se z půdy líhnou dospělci, kteří se živí pylem jiných rostlin. Od července do září vyhledávají brouci úkryt pro přezimování. Celý vývoj od vajíčka k imagu trvá 20-30 dní (Beránek et al. 2023).

### 3.1.1.3 Hostitelské spektrum a příznaky poškození

Hostitelskými rostlinami larev jsou výhradně brukvovité rostliny. Dospělci se živí pylem nejrůznějších druhů kulturních i planých rostlin. Z hospodářsky významných druhů můžeme mezi hostitelské rostliny zařadit mimo řepky hořčici a také semenné porosty brukvovité zeleniny. Nová generace dospělců blýskáčka se často vyskytuje na květech máku, kde ale neškodí (Alford 2003; Kazda et al. 2010).

Přezimující dospělci škodí především na nerozvinutých poupatech řepky. Do pupat se vžirají ze strany (Obr. 2) a dokážou zcela zkonzumovat jeho vnitřek (Alford 2003). Takto poškozené poupě opadá a zůstává po něm pouze stopka, což je také typickým příznakem poškození blýskáčkem. Poškozená poupata jsou v květenství nepravidelně rozmístěna a důsledkem je asymetrické rozmístění květenství a následně i šešulí (Beránek et al. 2023).



**Obrázek 2.** Dospělec blýskáčka řepkového vžirající se do nerozvinutého poupěte. Foto: Hovorka T.

#### **3.1.1.4 Hospodářský význam**

Blýskáček řepkový je jeden z nejzávažnějších škůdců ozimé i jarní řepky a také semenných porostů brukvovité zeleniny v ČR i v Evropě (Williams 2010b; Kocourek et al. 2018a; Beránek et al. 2023). V případě jarní řepky může v mimořádných případech dojít ke ztrátě na výnosu až 80 % (Kazda et al. 2010; Beránek et al. 2023). Největší škody jsou na brukvovitých plodinách způsobeny za chladného počasí před květem, kdy dochází k pomalému rozkvétání. Nejohroženější jsou slabé a řídké porosty, které nejsou schopné počtem rostlin a květů kompenzovat ztráty (Kocourek et al. 2018a).

V ČR blýskáček škodí pravidelně každý rok. Jeho výskyt v regionech a početnost populací je však rok od roku různá. Příčinou poklesu plošné škodlivosti blýskáčka může být intenzivní ochrana řepky proti šešulovým škůdcům, která zahubí larvy blýskáčků živících se na pylu rozkvetlé řepky. Další příčinou mohou být nové odrůdy řepky s vysokým

výnosovým potenciálem, které dokážou poškozená poupata do určité míry nahradit. I přesto se každoročně proti blýskáčkovi ošetřuje 70 až 80 % ploch řepky (Kocourek et al. 2018a; Beránek et al. 2023).

### **3.1.1.5 Monitoring a ochranná opatření**

Základní metodou monitoringu dospělců blýskáčků v porostech brukvovitých plodin jsou přímé vizuální odpočty jedinců v květenstvích rostlin (Beránek et al. 2023). Podle počtu jedinců v jednotlivých květenstvích lze na základě srovnání s hodnotami prahů škodlivosti rozhodnout o ošetření porostu. Odpočty je vhodné začít včas a spojit je například s monitoringem stonkových krytonosců. Pro účely zachycení počátku migrace do porostů lze podobně jako u stonkových krytonosců použít optické lapače v podobě žlutých Mörickeho misek a žlutých lepových desek. Od počátku fáze dlouhivého růstu rostlin je vhodné provádět monitoring dospělců pomocí entomologického smýkadla v daném počtu smyků na plochu (Kocourek et al. 2018a).

V případě překročení prahu škodlivosti je vhodné přistoupit k chemickým ochranným opatřením, a to v období od prvního výskytu zelených pupat do počátku květu (Beránek et al. 2023). Vzhledem k široce rozšířené rezistenci vůči pyrethroidům není vhodné vyjma účinné látky (u přípravků dále ú.l.) etofenprox používat přípravky z této skupiny (Kocourek et al. 2020). Kromě pyrethroidů je v současné době z jiných skupin ú.l. do řepky povolen pouze acetamiprid ze skupiny neonikotinoidů a botanický insekticid azadirachtin. V případě citlivých populací blýskáčků k pyrethroidům lze ú.l. z této skupiny na ochranu řepky použít (Kocourek et al. 2018a). Přehled citlivých či rezistentních populací vůči různým přípravkům lze nalézt na stránkách Rostlinolékařského portálu, kam jsou vkládána data z každoročního monitoringu rezistence škůdců ([https://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/#rlp|so|skudci|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c77df63|rezist](https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rlp|so|skudci|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c77df63|rezist)). Vhodné je v rámci antirezistentní strategie střídat přípravky z různých skupin účinných látek s různým mechanismem účinku (Kocourek et al. 2018a; Beránek et al. 2023).

### **3.1.2 Dřepčík olejkový (*Psylliodes chrysocephalus* (Linnaeus, 1758))**

### **3.1.2.1 Popis a možnosti záměny**

Dřepčík olejkový je 4 až 5 mm velký brouk (Obr. 3). Tělo má zbarveno černě s kovově modrým odstínem. Zadní nohy jsou uzpůsobeny ke skákání, a jsou mohutné s tlustými stehny (Cox 1998; Alford 1999). Dřepčík olejkový je nejvíce rozšířeným „stonkovým“ škůdcem ozimé řepky v zemích severní Evropy s přímořským klimatem (Garbe et al. 2000). Jeho výskyt byl také zaznamenán na Blízkém východě v Asii, severní Africe, Kanadě a USA. Porosty jarní řepky nejsou tímto škůdcem napadány (Williams 2010b).

Dospělci d. olejkového jsou někdy zaměňováni s dřepčíky rodu *Phyllotreta*. Ti jsou však oproti d. olejkovému výrazně menší a v porostech řepky bývají mnohem početnější. Dřepčík olejkový má také oproti svým menším příbuzným deset tykadlových článků. Na jaře je možná záměna larev dřepčíka s larvami stonkových krytonosců, které jsou však beznohé a méně zbarvené (Kocourek et al. 2017, 2018a; Beránek et al. 2023).

### **3.1.2.2 Životní cyklus**

Dřepčík olejkový má jednu generaci do roka. Dospělci perforují listy vzešlých rostlin řepky. Je aktivní i za nízkých teplot, nemá zimní diapauzu a během zimy se v porostech mohou nacházet všechna vývojová stadia (vajíčka, larvy i dospělci). Samice kladou vajíčka na konci září ke kořenovým krčkům rostlin jednotlivě, do puklin v půdě. Při mírných zimách část brouků dokáže přezimovat a na jaře samice pokračují v kladení vajíček (Alford 2003; Williams 2010a; Kocourek et al. 2017). Vylíhlé larvy se zavrtávají do řapíku srdéčkových listů. V konečné fázi vývoje se larvy kuklí v půdě. Dospělci se líhnou na přelomu května a června (Kazda et al. 2010). Letní období s vysokými teplotami a nedostatkem srážek přečkávají dospělci v diapauze. V této fázi mají brouci omezený příjem potravy, pohybovou aktivitu a zastavený vývoj rozmnožovacích orgánů. Brouci nejčastěji tuto fázi přečkávají na mezích, loukách, keřích a stromech na okraji lesů. Letní diapauzu brouci končí začátkem září, v jiných letech až začátkem října. Dospělci naletují na porosty vzešlé řepky ozimé, kde po úživném žíru nastává páření a opětovné kladení vajíček (Cox 1998; Alford 1999).

### **3.1.2.3 Hostitelské spektrum a příznaky poškození**

Dřepčík olejkový škodí na různých přezimujících brukvovitých plodinách, z nichž hospodářsky významné škody způsobuje pouze na ozimé řepce. Jeho výskyt a škodlivost

podporuje mírné počasí na podzim a během celé zimy (Kazda et al. 2008; Beránek et al. 2023; Tixeront et al. 2023).

Dospělci dřepčků poškozují listy rostlin drobným kruhovým žírem (dírkování; Obr. 3). Vylíhlé larvy se zavrtávají do řapíků srdčkových listů, které prožirají. Žír larev v rostlinách může pokračovat do kořenového krčku a báze lodyhy. Rostliny s poškozenými srděčky snadněji vymrzají, zahnívají, listy žloutnou a mohou být náchylnější k napadení patogeny (Alford 2003). Někdy se larvy spolu se stonkovými krytonosci prožirají do lodyh řepky, ty se pak snadno lámou a praskají (Kocourek et al. 2017).



**Obrázek 3.** Poškození rostliny řepky žírem dřepčika olejkového a dva dospělí jedinci dřepčika olejkového.  
Foto: T. Hovorka.

#### **3.1.2.4 Hospodářský význam**

Rostliny, kterým larvy dřepčků poškodily srdčkové listy snadno vymrzají, listy žloutnou, vadnou a zahnívají. Později se prožrané lodyhy řepky snadno lámou a praskají. Mírné a teplé počasí na podzim a během celé zimy podporuje napadení rostlin dřepčkem (Alford 2003). Hospodářsky významné škody mohou způsobit pouze larvy koncem zimy

a na jaře (Ortega-Ramos et al. 2022; Beránek et al. 2023). Škody může způsobovat dřepčík olejkový spolu s dřepčíky rodu *Phyllotreta* na čerstvě vzešlých klíčnicích rostlinách řepky a dalších brukvovitých plodinách. V ČR se význam tohoto škůdce každoročně zvyšuje především na podzim, kvůli zákazu moření osiva řepky neonicotinoidy (Kocourek et al. 2017).

### **3.1.2.5 Monitoring a ochranná opatření**

Pro monitoring larev a dospělců dřepčíka olejkového je možné využít přímé i nepřímé metody. Z přímých metod se zjišťuje počet dospělců na 1 m řádku a následně počet larev na jednu rostlinu na jaře. Larvy se kontrolují na deseti místech pozemku. Na každém místě se odebere pět v řádku po sobě rostoucích rostlin, kterým se podélně rozřežou lodyhy a řapíky listů, v kterých se spočítají larvy dřepčíka (Kocourek et al. 2017; Beránek et al. 2023). Z nepřímých metod monitoringu se pro zjišťování letové aktivity dospělců využívají Mörickeho (žluté) misky (Walters & Lane 1994; Ortega-Ramos et al. 2022) nebo žluté lepové desky (Tixeront et al. 2023). Tyto optické lapáky se umisťují při vzcházení řepky na dvě protilehlé strany pozemku nejméně deset metrů od jeho okraje. Množství odchycených dospělců se kontroluje několikrát týdně a na jeho výsledcích lze cílit ošetření (Beránek et al. 2023).

V současné době jsou jedinou registrovanou skupinou účinných látek pesticidů v ochraně proti d. olejkovému pyrethroidy. Na řadě míst v Evropě včetně ČR však byla vůči této skupině ú.l. prokázána rezistence a jejich použití se dlouhodobě nedoporučuje (Heimbach & Müller 2013; Stará & Kocourek 2019; Willis et al. 2020). Je tak třeba klást důraz na registraci nových přípravků z jiných skupin ú.l. a také na alternativní metody ochrany rostlin, které představují využití přirozených nepřátel a různých preventivních pěstebních opatření.

## **3.1.3 Krytonosec šešulový (*Ceutorhynchus obstrictus*, (Marsham, 1802))**

### **3.1.3.1 Popis a možnosti záměny**

Krytonosec šešulový je 2–3 mm velký, šedě zbarvený brouk (Obr. 4) z čeledi nosatcovitých (Coleoptera: Curculionidae). Nohy jsou šedočerné a jeho tělo je pokryto



bělavými chloupky ve třech řadách v rýhách na krovkách (Alford 2003). Je široce rozšířen v Evropě a Severní Americe (Dosdall & Cárcamo 2011).

Dospělce k. šešulového je možné zaměnit s ostatními krytonosci vyskytujícími se v řepce, a to hlavně se stonkovými krytonosci a k. zelným. Tyto druhy se však v období výskytu dospělců k. šešulového objevují v porostech řepky již minimálně. Larvy vyskytující se v šešulích mohou být zaměněny s larvami bejlmorky kapustové. Na rozdíl od bejlmorky mají larvy k. šešulového snadno odlišitelnou světle hnědavou hlavu, jsou celkově větší a v šešulích se vyskytují soliterně. Larvy bejlmorky jsou naopak bezhlavé, bílé a v šešuli je jich vždy více (Kazda et al. 2010; Kocourek et al. 2018a; Beránek et al. 2023).



**Obrázek 4.** Dospělec krytonosce šešulového a jeho larva vyžírající tvořící se semeno v šešuli řepky. Foto: vpravo T. Hovorka, vlevo J. Kazda.

### 3.1.3.2 Životní cyklus

Krytonosec šešulový má jednu generaci do roka. Jeho larvy se vyvíjí pouze na brukvovitých rostlinách. Zimu přečkávají dospělci pod spadaným listím nebo zbytky rostlin. Do porostů řepky nalétávají přezimující dospělci v období jejího květu, při teplotách nad 15 °C. Teplé počasí v období květu podporuje jeho výskyt. Vajíčka jsou po krátkém úživném žíru kladena jednotlivě na mladé tvořící se šešule do otvoru vykousaného v jejich stěně (Lerin 1991; Williams 2010b). Po vykladení vajíčka samice zanechává na stěně šešule značkovací feromon, který brání v kladení vajíček jiné samici (Ferguson et al. 1999). Po

vylíhnutí vyžírání beznohá (apodní) larva vyvíjející se semena (Obr. 4), ale na rozdíl od bejlmorky kapustové nedochází k otevírání šesulí. Larva na konci svého vývoje opouští šesuli kruhovým otvorem a kuklí se v půdě. V červenci a srpnu se objevují brouci nové generace, kteří přezimují. Význam tohoto škůdce je v ČR prozatím menší (Beránek et al. 2023).

### **3.1.3.3 Hostitelské spektrum a příznaky poškození**

Mezi hlavní hostitelské rostliny k. šesulového patří především ozimá i jarní řepka a semenné porosty brukvovité zeleniny (Gratwick 2012; CABI 2019). Mimo kulturních plodin jsou hostitelskými rostlinami i různé brukvovité plevely, jako jsou hulevník lékařský (*Sisymbrium officinale*) nebo úhorník mnohodílný (*Descurainia sophia*) (Beránek et al. 2023).

Dospělci se vyskytují hojně v porostech řepky od počátku jejího kvetení a způsobují pouze zanedbatelné škody v podobě drobného žíru na vrcholových partiích rostlin (Kazda et al. 2008; Beránek et al. 2023). Napadené šesule lze v praxi poznat až po jejich opuštění larvou, a to podle drobného otvoru o velikosti špendlíkové hlavičky, který larva vykousala, aby se dostala ven z šesule a mohla se zakuklit v půdě. Uvnitř napadených šesulí je obvykle několik (dvě až pět) vyvíjejících se semen sežráno larvou a poblíž semen je patrný trus (Krüger 1983). Otvory v šesuli usnadňují kladení vajíček bejlmorce kapustové a také mohou sloužit jako vstupní brána pro některé patogeny řepky, jako je například *Leptosphaeria maculans* (Newman 1984).

### **3.1.3.4 Hospodářský význam**

Krytonosec šesulový je široce rozšířeným a běžně se vyskytujícím škůdcem, který většinou i přes jeho vysoký výskyt nepůsobí v porovnání s jinými škůdci tak velké škody. I tak je ale považován za významného škůdce řepky a semenných porostů brukvovitých plodin v celé Evropě, USA a Kanadě (Gratwick 2012) a ekonomicky nejvýznamnějšího škůdce napadajícího řepku v období květu (CABI 2019). V České republice jeho škodlivost postupně narůstá. V některých letech mohou při silném výskytu způsobovat škody houbové choroby šesulí, které se šíří z míst mechanického poškození dospělci a vylézajícími larvami krytonosců (Beránek et al. 2023).



### **3.1.3.5 Monitoring a ochranná opatření**

Pro monitoring výskytu dospělců k. šesulového je využívána především přímá metoda monitoringu sklepáváním dospělců z květenství na několika místech pozemku nebo transektem napříč polem v období od začátku do konce květu řepky. Takový monitoring je vhodný provádět ve třech opakováních a z počtu dospělců a rostlin je vypočítán průměr brouků na rostlinu. K monitoringu lze také využít metodu smýkaní květenství řepky. Za slunečného a bezvětrného počasí je možné dospělé přímo pozorovat a odečítat z pupenů a květenství řepky (Williams et al. 2003; CABI 2019). Všechny zmíněné metody monitoringu se provádí za slunečného a bezvětrného počasí při dopoledních teplotách vyšších než 15 °C (Williams et al. 2003; Beránek et al. 2023). K zachycení migrace dospělců do porostů lze použít i Mörickeho žluté misky s návnadou v podobě isothiokyanátů nebo podobných sloučenin, které napodobují vůni řepky, kterou jsou brouci lákáni (Smart & Blight 1997). Pro zjištění počtu larev je nutné nasbírat vyvíjející se nebo zralé šesule a rozříznout je (larvy jsou mezi semeny). Poškození lze rovněž zjistit sběrem zralých šesulí a jejich prohlídkou, zda v nich jsou přítomné výlezové otvory po larvách (CABI 2019).

Přímou chemickou ochranu je nutné cílit na dospělé, ještě před začátkem kladení vajíček samicemi. V České republice jsou proti k. šesulovému povoleny účinné látky ze skupiny pyrethroidů (lambda-cyhalothrin, deltamethrin atd.) a jedna ze skupiny neonikotinoidů (acetamiprid) (CABI 2019; Beránek et al. 2023). Početnost a škodlivost k. šesulového však většinou potlačují aplikace cílené proti jiným škůdcům, např. bejlmorce kapustové (Beránek et al. 2023).

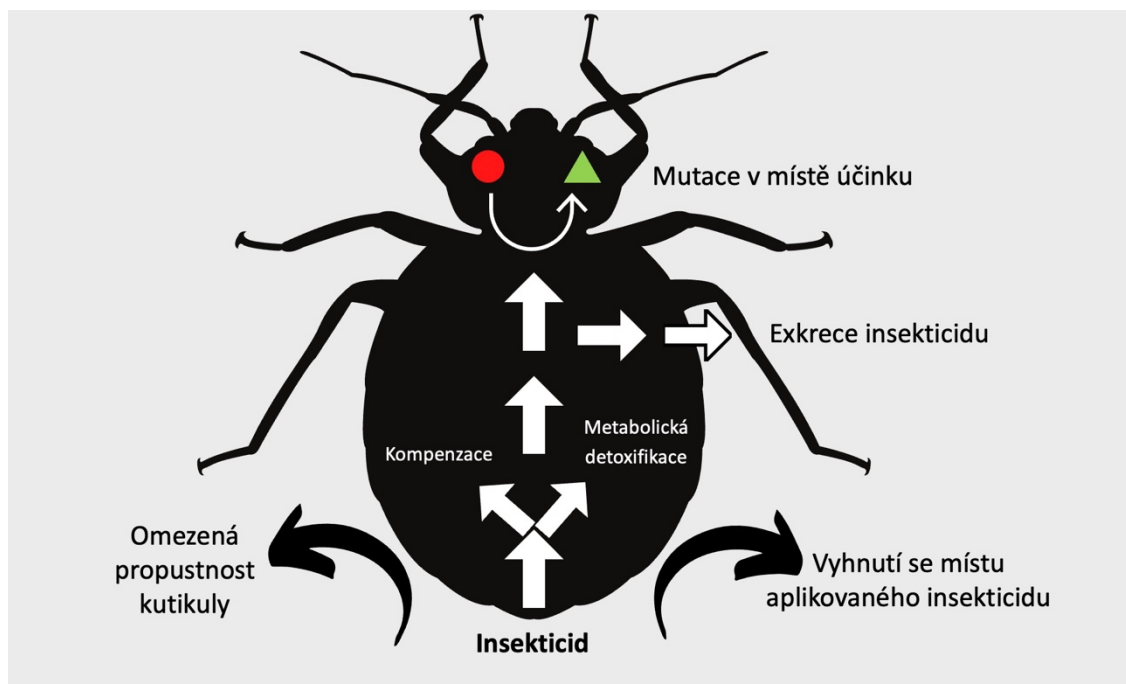
## **3.2 Rezistence škůdců vůči insekticidům**

Více jak půl století používání syntetických pesticidů v ochraně rostlin vedlo k selekci rezistence vůči zoocidům u více jak 450 druhů členovců (Georghiou & Taylor 1986; Roush & Tabashnik 2012). Ještě počátkem padesátých let nebyla rezistence členovců k ú.l. insekticidů mnohými entomology a pracovníky v zemědělství vnímána jako reálná hrozba pro ochranu zemědělských plodin (Onstad & Knolhoff 2022). V dnešní době víme, že se jedná o jeden z nejzávažnějších problémů v současném zemědělství (Knight & Norton 1989; Roush & Tabashnik 2012; Sparks & Nauen 2015). Projevem rezistence škůdců k insekticidům je jejich neúčinnost. V případě vystavení opakovanému působení jedné účinné látky insekticidu na určitou populaci škůdce po několik generací dojde k nárůstu rezistentních jedinců v populaci, následně ke ztrátám na produkci a zvýšení nákladů na

ochranu při opakované aplikaci (Zimmer & Nauen 2011b). Důvodem k nárůstu některých rezistentních populací škůdců mohou být například opakované neefektivní aplikace s nižší než registrovanou dávkou účinné látky, nedodržování zásad integrované ochrany rostlin a také zužující se sortiment povolených přípravků na ochranu rostlin. Také nárůst zájmu veřejnosti o problematiku použití pesticidů a jejich dopad na životní prostředí vyústil k legislativním změnám a omezením spektra používaných přípravků. Možností, jak zabránit nárůstu rezistence a zároveň snížit celkový dopad používaných insekticidů na životní prostředí, je využití selektivních přípravků a efektivního monitoringu rezistence pomocí biologických testů a moderních metod diagnostiky z oblasti molekulární biologie (Casida & Quistad 1998; Roush & Tabashnik 2012; Ishaaya & Horowitz 2016).

### 3.2.1 Mechanismy rezistence

U hmyzích škůdců je známo 5 hlavních mechanismů rezistence k insekticidům: (1) zvýšení metabolismu biologicky aktivních látek, tj. degradace pesticidu specifickými detoxikačními enzymy (tzv. metabolická rezistence), (2) omezená účinnost penetrace účinných látek pesticidu přes kutikulu hmyzu, (3) zvýšené vylučování účinné látky pesticidu, (4) redukce citlivosti nervového systému na místě působení insekticidu vlivem mutace genů (např. *kdr* rezistence = Knock-down rezistence), (5) rezistence podmíněná změnou chování, tj. vyhnutí se místu, kde byl insekticid aplikován ((Onstad & Knolhoff 2022); Obr. 5). U jednoho druhu hmyzu se může vyskytovat současně několik mechanismů rezistence (Obr. 6). Například u řady evropských populací blýskáčka řepkového rezistentních k účinným látkám deltamethrin, lambda-cyhalothrin a cypermethrin bylo prokázáno, že se jedná o metabolicky podmíněnou rezistenci (Zimmer & Nauen 2011b; Erban et al. 2017). Ve Švédsku a Dánsku, kde byla rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům také zaznamenána, však byla prokázána nejen metabolická rezistence, ale v roce 2010 byl u některých populací prokázán také mechanismus rezistence založený na bodové mutaci L1014F v sodném kanálu, tzv. rezistence typu *kdr* (Nauen et al. 2012). V ČR výskyt této mutace u blýskáčka řepkového nebyl dosud zjištěn. Mutace L1014F byla prokázána také u populací mšice broskvoňové rezistentních k pyrethroidům (Martinez-Torres et al. 1999). Výskyt této mutace u mšice broskvoňové v ČR se pohybuje mezi 20 a 30 % (Stará et al. - rukopis v recenzním řízení). U mšice broskvoňové byl kromě mutace L1014F prokázán také výskyt mutace M918T (*super-kdr*). Tato mutace se vyskytuje ve vazbě na mutaci L1014F (Anstead et al. 2004).

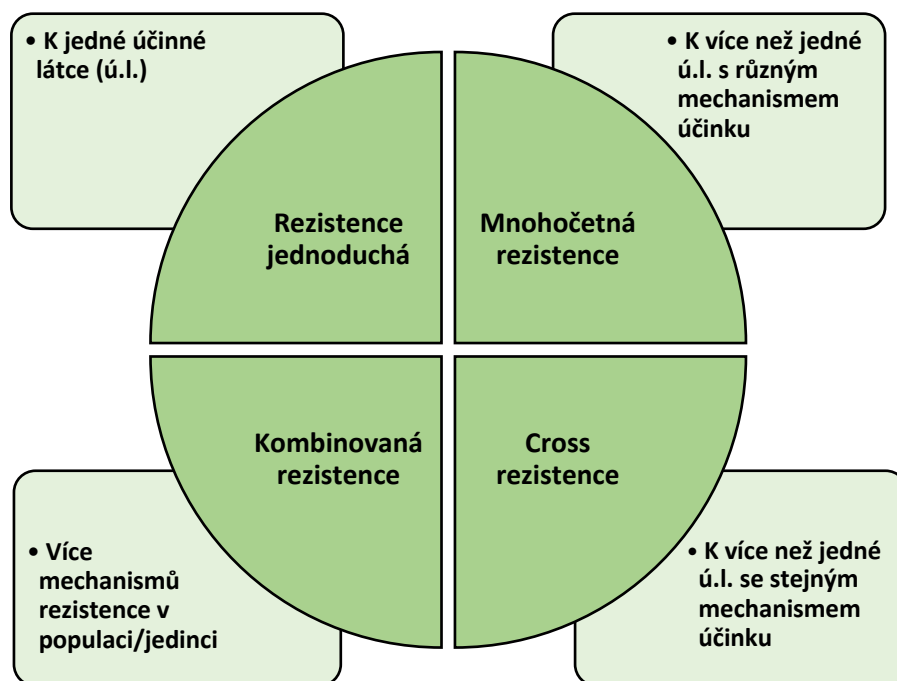


**Obrázek 5.** Schematické znázornění mechanismů rezistence u hmyzu.

Rezistence k více účinným látkám se stejným mechanismem účinku je označována jako cross-rezistence. Příkladem cross rezistence může být rezistence populace mandelinky bramborové k organofosfátům typu *kdr*. Přestože lokální populace mohla být vystavena selekčnímu tlaku jen jedné z mnoha účinných látek organofosfátů, vykazuje populace rezistenci ke všem účinným látkám organofosfátů, tedy i k těm, se kterými se populace škůdce nesetkala. Střídání přípravků ze skupiny organofosfátů na takovou rezistentní populaci tak nezajistí požadovanou účinnost (Mota-Sanchez et al. 2006). V případě rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům je situace složitější. Populace blýskáčka řepkového vystavená opakovanému ošetření například cypermethrinem bude rezistentní nejen k cypermethrinu, ale ke všem účinným látkám ze skupiny pyrethroidů s obdobnou chemickou strukturou (např. deltamethrin, lambda-cyhalothrin). Některé účinné látky ze skupiny pyrethroidů, například etofenprox a tau-fluvalinát však vykazují ještě jiné mechanismy působení než pyrethroidy typu cypermethrinu. V tomto případě tak nemusí nastat případ cross rezistence populace blýskáčka ke všem účinným látkám ze skupiny pyrethroidů (Stará & Kocourek 2018; Kocourek et al. 2020). U populací blýskáčka řepkového z ČR nebyla v období před rokem 2017 prokázána cross rezistence mezi lambda-cyhalothrinem a tau-fluvalinátem, vůči kterému byly zkoumané populace dosud citlivé (Stará & Kocourek 2018). Na větším souboru populací byl od roku 2018 prokázán nárůst

rezistence populací blýskáčka řepkového k tau-fluvalinátu (Seidenglanz et al. 2020), takže se časem vyselektovala cross rezistence mezi lambda-cyhalothrinem a tau-fluvalinátem.

Nejzávažnějším případem rezistence škůdců k zoocidům je vznik mnohočetné rezistence (multiple rezistence), tj. rezistence současně ke dvěma a více skupinám účinných látek s různým mechanismem účinku. Příkladem mnohočetné rezistence může být rezistence mandelinky bramborové současně k organofosfátům, pyrethroidům a jejich směsným přípravkům (Zichová et al. 2010), nebo rezistence obaleče jablečného k organofosfátům, juvenoidům a inhibitorům tvorby chitinu (Stará & Kocourek 2007).



**Obrázek 6.** Typy rezistence vůči insekticidům u hmyzích škůdců.

Pro některé druhy škůdců je možné v rámci antirezistentních strategií využívat princip negativní cross rezistence anebo modely fenologie škůdců zahrnující simulaci podílu rezistentních jedinců v populaci. Negativní cross rezistence (NCR = Negative Cross Resistance) je označení efektu, kdy rezistence k účinné látce s jedním mechanismem účinku se projevuje zvýšenou citlivostí k účinné látce s jiným mechanismem účinku. Příkladem může být populace blýskáčka řepkového rezistentní k pyrethroidům, která vykazuje zvýšenou citlivost k organofosfátům (Seidenglanz et al. 2017). Metabolicky podmíněná rezistence k pyrethroidům je založena na zvýšené aktivitě izoenzymů zodpovědných za degradaci molekul pyrethroidů. Stejně izoenzymy štěpí účinnou látku organofosfátu na dvě složky, z nichž jedna vykazuje mnohem větší toxicitu, než měla původní molekula účinné

látky insekticidu. Jiným příkladem negativní cross rezistence jsou populace obaleče jablečného rezistentní k organofosfátu s účinnou látkou azinphos-methyl, které vykazují zvýšenou citlivost k jiným skupinám účinných látek insekticidů (Dunley & Welter 2000).

### **3.2.2 Molekulární metody detekce rezistence**

V oblasti výzkumu rezistence škůdců k insekticidům se v posledním desetiletí dostávají do popředí molekulární metody detekce rezistence včetně proteomických metod (Van Leeuwen et al. 2020). Pomocí molekulárních metod lze detekovat bodové mutace genů, a tedy výskyt rezistentních jedinců v populaci, přičemž je možné určit, zda k mutaci došlo na obou alelách chromozomu (rezistentní homozygot RR), jedné alele (heterozygot SR) nebo zda k mutaci nedošlo ani na jedné alele (citlivý homozygot SS). Rozlišením genotypů je možné zjistit, jak vysoký je podíl rezistentních alel v populaci a jak vysoké je riziko, že citlivost k insekticidu ztratí celá populace. Molekulárními metodami Bi-PASA a RFLP byla např. prokázána v ČR rezistence mandelinky bramborové k pyrethroidům (mutace L1014F) a organofosfátům (mutace S291G) (Zichová et al. 2010). Metodou PCR lze prokázat také výskyt mutace L1014F u rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům. Pro detekci mutací L1014F a M918T, zodpovědných za rezistenci mšice broskvoňové k pyrethroidům, se používá tzv. kvantitativní PCR (qPCR) (Anstead et al. 2004). Tato metoda je založena na klasické PCR, ovšem s využitím speciálního termocykleru, který kvantifikuje sledovaný úsek DNA v reálném čase.

Kromě mutace genů může být rezistence způsobena např. zvýšenou aktivitou metabolismu, resp. aktivitou některých enzymů. Aktivitu enzymů zodpovědných za rezistenci, jako jsou např. esterázy, monooxygenázy nebo glutation-S-transferázy, umožňují měřit biochemické a proteomické metody. Tzv. metabolicky podmíněná rezistence byla prokázána u blýskáčka řepkového (Zimmer & Nauen 2011a; Erban et al. 2017; Van Leeuwen et al. 2020).

### **3.2.3 Biologické metody hodnocení rezistence**

Biologické metody hodnocení rezistence jsou základem pro provádění plošného monitoringu rezistence škůdců k insekticidům (Donnelly et al. 2016). Biologické testy jsou založeny na různých způsobech aplikace účinné látky insekticidu na různá vývojová stadia škůdců. Metody hodnocení, které zahrnují topikální aplikace (aplikace přímo na dospělce), tarsální testy a ponořovací testy, jsou vhodné zejména pro testování látek s kontaktním

účinkem. Pro účinné látky s významnými nebo převažujícími účinky požerovými se používají požerové testy, nebo ponořovací testy s živnou rostlinou, případně aplikace insekticidu na povrch nebo inkorporace do umělé diety. U insekticidů se systémovým účinkem je třeba volit jiné metody, např. aplikace insekticidu na živnou rostlinu a následnou introdukci testovaného škůdce. Rozdílnými metodami je třeba testovat látky s ovicidním a larvicidním účinkem. Biologické testy poskytnou zpravidla informaci o citlivosti testovaného vzorku populace škůdce k insekticidu ve srovnání s citlivostí laboratorního kmene. Hodnotí se mortalita ve srovnání s mortalitou citlivé populace. Úroveň rezistence hodnocená biologickými testy je vyjadřována indexem rezistence, což je poměr LC50 rezistentní populace k LC50 citlivé populace škůdce. LC50 (LD50) je koncentrace (dávka) účinné látky přípravku, která způsobuje 50% mortalitu testovaných jedinců, podobně LC90 (LD90) způsobuje 90% mortalitu testovaných jedinců (Miller et al. 2010; Donnelly et al. 2016; Kocourek et al. 2020).

### 3.3 Škůdci rezistentní vůči insekticidům

Od roku 2010 do současnosti je v databázi „[www.pesticideresistance.org](http://www.pesticideresistance.org)“ evidováno 4642 případů rezistence zjištěných u 115 druhů hmyzu. Ze škůdců na zemědělských plodinách je v Evropě nejvíce případů rezistence dokumentováno u blýskáčka řepkového (Slater et al. 2011), mšice broskvoňové (Bass et al. 2014), svilušky chmelové (Kim et al. 2006; Nicastro et al. 2010), molice bavlníkové (Horowitz et al. 2020), mandelinky bramborové (Mota-Sanchez et al. 2006) a záředníčka polního (Zhao et al. 2006). V posledních 5 letech se objevila rezistence také u krytonosce šešulového, krytonosce čtyřzubého a dřepčíka olejkového (Heimbach & Müller 2013; Stará & Kocourek 2019). V našich podmínkách je rezistence škůdců monitorována od roku 2017 v rámci expertní činnosti „Plošný monitoring rezistence vybraných škůdců vůči účinným látkám pesticidů na území ČR“. Monitoring je zaměřen na sledování výskytu rezistence u blýskáčka řepkového, krytonosce šešulového, dřepčíka olejkového, dřepčíků rodu *Phyllotreta*, záředníčka polního a mandelinky bramborové. V ČR byla zjištěna rezistence u blýskáčka řepkového k pyrethroidům (Stará & Kocourek 2018), u záředníčka polního k pyrethroidům (Kovaříková et al. 2017), u dřepčíka olejkového k thiaklopridu (Stará & Kocourek 2019), u mandelinky bramborové k organofosfátům a pyrethroidům (Zichova et al. 2010) a k některým neonicotinoidům (Stará & Kocourek 2019) a u mšice broskvoňové k pyrethroidům a karbamátům (Stará et al. rukopis v recenzním řízení). V ČR byla také

dokumentována rezistence obaleče jablečného k organofosfátům a inhibitorům tvorby chitinu (Stará & Kocourek 2007) a k bakulovirům (Zichová et al. 2013).

### 3.3.1 Blýskáček řepkový

V Evropě a také v České republice byla již řadou studií prokázána rezistence populací blýskáčků vůči pyrethroidům (Delorme et al. 2002; Slater et al. 2011; Stará & Kocourek 2018). Rezistence b. řepkového k pyrethroidům není omezena na jednotlivé účinné látky, ale zahrnuje celou chemickou třídu pyrethroidních insekticidů. V ČR byla prokázána rezistence vůči ú.l. lambda-cyhalothrin, deltamethrin a cypermethrin, ale v různých regionech existují významné rozdíly v citlivosti k jednotlivým účinným látkám (Kocourek et al. 2018a, 2020; Beránek et al. 2023). Navzdory těmto faktům jsou pyrethroidy stále široce používanou skupinou ú.l. pesticidů (Zimmer & Nauen 2011a). Kromě pyrethroidů existuje také riziko výskytu rezistence vůči neonikotinoidům. V ČR byly zaznamenány první výskyty rezistentních a vysoce rezistentních populací vůči ú.l. acetamiprid. K selekci této rezistence přispívá také rozšíření ochrany stejných účinných látek na šešulové škůdce. K ochraně proti blýskáčkům a krytonoscům je tak třeba přistupovat komplexně a volbu přípravků přizpůsobit výskytu konkrétních škůdců v porostu. Prozatím nebyla u blýskáčka prokázána mnohočetná rezistence mezi pyrethroidy a neonikotinoidy (lambda-cyhalothrin x acetamiprid). Taktéž nebyla zatím zjištěna mnohočetná rezistence mezi pyrethroidy a organofosfáty (Kocourek et al. 2018a; Beránek et al. 2023).

#### 3.3.1.1 Mechanismy rezistence vůči pyrethroidům

U blýskáčka řepkového jsou známy dva hlavní mechanismy rezistence vůči pyrethroidům: 1) zvýšená detoxikace, která je částečně způsobena aktivitou monooxygenázy cytochromu P450 (Scott 1999) a 2) rezistence typu *kdr*, která vede ke snížení neuronální citlivosti k pyrethroidům (Scott 2019). Bylo prokázáno, že oxidativní degradace pyrethroidů cytochromem P450 dependentními monooxygenázami (Zimmer & Nauen 2011a; Erban & Stara 2014; Zimmer et al. 2014) a esterázami (Philippou et al. 2011; Zamojska et al. 2013) hraje významnou roli v mechanismu rezistence blýskáčků k pyrethroidům. Nové transkriptomické údaje taktéž prokázaly dva hlavní mechanismy spojené s rezistencí vůči pyrethroidům v evropských populacích b. řepkového, tj. zvýšenou detoxikaci jedním nebo více cytochromy P450 a modifikaci cílového místa působení insekticidu (Zimmer et al. 2014). Mechanismus modifikace cílového místa působení

insekticidu, konkrétně mutace L1014F, byla nalezena jako první u druhu *Musca domestica* (Williamson et al. 1996) a byla také identifikována v populacích b. řepkového z jižní Skandinávie a v jedné populaci z Německa (Nauen et al. 2012). Alely s mutací typu *kdr* byly nalezeny ve vzorcích z jižní části Švédska, které rovněž obsahovaly citlivé genotypy. Je zajímavé, že mutace *kdr* chyběla u vysoce rezistentních populací ze severního Švédska a chyběla také u většiny testovaných populací z jiných evropských zemí (Nauen et al. 2012). U blýskáčků rezistentních vůči ú.l. esfenvalerát z Polska bylo také identifikováno několik dalších mutací s možnými účinky na interakci pyrethroidů s místem jejich účinku (Wrzesińska et al. 2014).

### 3.3.2 Dřepčík olejkový

Hlavní a nejúčinnější metodou ochrany řepky proti dřepčíkům bylo do roku 2016 moření osiva neonikotinoidy, a to především ú.l. thiametoxam (Maienfisch et al. 2001). Kvůli obavám z jejich vedlejších účinků na necílové organismy (včely a další bezobratlí živočichové) bylo jejich používání od roku 2013 v EU zakázáno (Blacquiere et al. 2012; European commission 2013; Kocourek et al. 2017). Od této doby jsou jedinými registrovanými insekticidy pro ošetření řepky proti d. olejkovému pyrethroidy, vůči kterým je však již prokázána rezistence (Heimbach & Müller 2013; Willis et al. 2020). První případy rezistence dřepčíka vůči pyrethroidům jako důsledek jejich dlouhodobého používání byly dokumentovány již v roce 2009 v Německu (Zimmer et al. 2014) a později také ve Velké Británii (Højland et al. 2015). Od roku 2018 je také v České republice znám trend v poklesu účinnosti pyrethroidů. Byly zaznamenány první tři rezistentní populace dřepčíků vůči lambda-cyhalothrinu z okolí Brna. Jedná se o ohnisko, ve kterém může dojít k rychlému šíření rezistence (Kocourek 2019). Plošný monitoring rezistence prováděný v letech 2017 a 2018 potvrdil také neúčinnost přípravků na bázi neonikotinoиду thiakloprid (Biscaya 240 OD). I když neonikotinoidní přípravky nejsou na dřepčíka olejkového přímo registrovány, je potřebné citlivost tohoto škůdce k těmto insekticidům monitorovat, neboť se v porostech s neonikotinoidy setkávají (díky společným aplikacím proti více škůdcům) a je nutné s jejich nízkou citlivostí k těmto látkám počítat (Kocourek & Stará 2016; Kocourek 2019; Stará & Kocourek 2019).



### 3.3.3 Krytonosec šešulový

V Evropě, a to především v Německu, byla u k. šešulového zaznamenána rezistence vůči pyrethroidům, která je pravděpodobně výsledkem jejich dlouhodobého užívání (Heimbach & Müller 2013). Podobně byla také v ČR u řady populací k. šešulového zaznamenána rezistence k pyrethroidům. Mimo pyrethroidů je z území Čech již známa rezistence vůči neonikotinoidům (ú.l. acetamiprid), která má potenciál šíření napříč ČR (Beránek et al. 2023). Každoročně je podobně jako u jiných škůdců řepky prováděn plošný monitoring rezistence, jehož výsledky jsou uveřejněny v podobě map rezistence na Rostlinolékařském

portálu:

[https://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/?key=%22f50546d2ac767ccc6ca48bbc1a1c86de%22#r1p|so|skudci|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c71fb3d|rezist.](https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22f50546d2ac767ccc6ca48bbc1a1c86de%22#r1p|so|skudci|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c71fb3d|rezist.)

## 3.4 Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin (IOR), je systém ochrany, využívající všechny ekonomicky, ekologicky a toxikologicky přijatelné metody pro udržení škodlivých organismů pod prahem škodlivosti, s přednostním využitím přirozených nepřátel jako omezujících faktorů (Kazda et al. 2008, 2010; Kocourek et al. 2018a; FAO 2023). Mimo této definice existuje mnoho jiných, které jsou však v zásadě podobné. Pro srovnání je podle evropské legislativy IOR definována takto: „Pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují ohrožení lidského zdraví nebo životního prostředí. Integrovaná ochrana rostlin klade důraz na růst zdravých plodin při co nejmenším narušení zemědělských ekosystémů a podporuje přirozené mechanismy ochrany před škodlivými organismy“ (Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009).

V návaznosti na ustanovení § 5 zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů (dále „zákon“) vstoupila v roce 2014 v účinnost vyhláška č. 205/2012 Sb. O obecných zásadách integrované ochrany rostlin (dále „vyhláška“). Touto skutečností došlo k naplnění zákonných povinností českých zemědělců využívat obecné zásady integrované ochrany rostlin v praxi a současně k možnosti uložení sankce v případě jejich prokázání neplnění. V rámci pravidelných kontrol je tak prováděn monitoring stavu IOR, který se stal doplňkem

ke kontrolám Cross Compliance (kontrola dodržování souboru základních požadavků, které jsou podkladem nárokování režimu přímých plateb v zemědělství), jak pro oblast evidence spotřeby přípravků na ochranu rostlin, tak pro oblast kontroly hnojiv (Prudil 2020). Pro dodržování IOR byly stanoveny zásady, kterými by se pěstitelé měli řídit.

### 3.5 Zásady integrované ochrany rostlin

Integrovaná ochrana rostlin zahrnuje osm zásad, z nichž první je dále členěna do šesti dalších dílčích zásad. Mezi tyto zásady se dle Zákona č. 326/2004 Sb. - Zákon o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů 2004; Kazdy et al. 2008; Harašty et al. 2015; Barzmana et al. 2015 a Prudila 2020 řadí:

#### 1. Soubor preventivních opatření a metod:

##### 1.1 Střídání plodin

- Představuje pravidelné střídání a časový odstup zhoršujících a zlepšujících plodin a také prostorová izolace bloků se stejnými plodinami včetně zařazování meziplodin. Dodržováním těchto postupů lze předcházet výpadkům výnosů a zajistit půdní úrodnost bez navyšování vstupů.

##### 1.2 Vhodné pěstitelské postupy

- Jsou jimi především různá opatření jako protierozní opatření, opatření proti zhutňování půd, využívání posklizňových zbytků a vedlejších produktů živočišně výroby jako zdrojů živin pro rostliny a také zařazení různých meziplodin do osevních postupů.

##### 1.3 Pěstování odolných nebo tolerantních odrůd a používání certifikovaného osiva a sadby

- Výběrem odrůd, které vykazují odolnost vůči určitému spektru škodlivých organismů nebo abiotickým vlivům lze předejít nadbytečnému používání pesticidů a také zajistit potravinovou bezpečnost (odrůdy rezistentní vůči houbám rodu *Fusarium*). Zvláště doporučené je vybírat odrůdy ze seznamu doporučených odrůd (SDO), kde jsou odrůdy testované v podmínkách ČR.
- Pěstitelé by měli dávat přednost osivu s garantovanými parametry kvality, která nejsou zdrojem původců chorob přenosných osivem a plevelů.

#### 1.4 Vyvážené hnojení, vápnění a odvodňování

- Vyvážené hnojení stojí na základech dodržování vhodných pěstitelských postupů. Cílem je zajistit, aby nebyla půda jednostranně vyčerpávána. Je také nutné na základě agrochemického zkoušení půd doplňovat do půdy některé prvky (fosfor a draslík), které jsou z půdy vyčerpány. Správné a vyvážené hnojení kromě obecné kondice rostlin ovlivňuje také jejich odolnost vůči patogenům a škůdcům.
- Vápnění je nutné provádět pravidelně především kvůli jevu postupného okyselování půd, kdy jsou z půdy vyplavované bazické ionty (přírodně a vlivem minerálních hnojiv).

#### 1.5 Hygienická opatření pro zamezení šíření škodlivých organismů

- Představuje především využití certifikovaného a zdravého osiva, které není zdrojem původců chorob a plevelů. Je vhodné vybírat osivo od firem, které disponují kvalitním technickým zázemím pro skladování a ošetřování (moření) osiva.

#### 1.6 Ochrana a podpora užitečných organismů

- Pomocí různých opatření představující údržbu a tvorbu mimoprodukčních ploch vytvářet vhodná prostředí pro život přirozených nepřátel škůdců. Opatření zahrnují například tvorbu a údržbu květnatých okrajů a travinobylinných lemů, vegetačních pásů, pestrých úhorů, remízků, mezí atd. Řada z těchto opatření je podporována dotačními tituly.

### 2. Monitorování výskytu škodlivých organismů včetně využívání systémů předpovědi (prognózy) a systémů varování a včasné diagnózy

- Monitoring škodlivých organismů představuje využití příslušných metod pro zachycení výskytu škodlivého organismu. V případě škůdců je prováděn např. monitoring pomocí lepových desek a žlutých misek.
- Prognóza výskytu (škůdců) stanovuje s předstihem nejčastěji na začátku vegetačního období riziko výskytu škodlivých organismů (počty přezimujících stádií škůdců, odběry půdy atd.).
- Signalizace určuje nejvhodnější termín pro začátek ošetření a bere v úvahu intenzitu výskytu a nejvhodnější dobu pro ochranná opatření.

### 3. Rozhodování o provedení ošetření podle objektivizace rizik výskytu a prahů škodlivosti (kritického počtu) ve srovnání s výskytem škodlivého organismu na poli

- Ošetření by mělo být provedeno pouze v případě překročení prahu škodlivosti výskytu daného škodlivého organismu na pozemku s plodinou. Rozhodnutí o ošetření je nutné stavět na skutečných datech z monitoringu v kombinaci s předpovědními modely (meteorologické, sumy efektivních teplot atd.).
4. Preference všech nechemických prostředků a metod před chemickými, pokud uspokojivě zajistí ochranu před škodlivými činiteli
- Nechemické prostředky ochrany rostlin v sobě obsahují celou řadu mechanických a fyzikálních metod regulace škodlivých organismů (plečkování, vláčení, netkaná textilie atd.) technologických postupů a skupin přípravků na bázi mikro a makroorganismů nebo přírodních extraktů.
  - Tato zásada v sobě skrývá také biologickou ochranu s využitím přirozených nepřátel škůdců a také použití přípravků na bázi biologicky aktivních preparátů (*Bacillus thuringiensis*, *Pythium oligandrum* atd.)
5. Výběr přípravků na ochranu rostlin selektivních ke škůdcům, s co nejmenšími vedlejšími účinky pro lidské zdraví, na přirozené nepřátele a další necílové organismy a životní prostředí
- V případě rozhodnutí o použití přípravků na ochranu rostlin by měla být dána přednost účinným látkám, které mají co nejmenší vedlejší účinky, rychle se rozkládají, jsou bezpečné pro životní prostředí včetně člověka, působí pouze na škodlivé činitele (jsou selektivní) a je u nich nízké riziko vzniku rezistence.
6. Používání pesticidů a dalších prostředků ochrany rostlin v nezbytném rozsahu pouze profesionálními uživateli
- Přípravek pro profesionální použití může být distribuován pouze osobám, které jsou držiteli osvědčení o odborné způsobilosti pro nakládání s přípravky 2. stupně. O zařazení přípravků do kategorie pro profesionální použití rozhoduje na základě posouzení jeho nebezpečných vlastností ministerstvo zdravotnictví.
  - Profesionálním uživatelem přípravků na ochranu rostlin se rozumí dle § 2 zákona o rostlinolékařské péči osoba, včetně obsluhy, techniků, zaměstnavatelů a samostatně výdělečných osob, která používá přípravky na ochranu rostlin v rámci svých profesních činností jak v oblasti zemědělství, tak v jiných odvětvích.
7. Uplatňování antirezistentních strategií
- Představuje postupy, které se využívají jako prevence vzniku rezistence. Základními postupy jsou snížení opakovaných aplikací pesticidů jednou účinnou látkou v průběhu jedné sezóny, střídání a kombinování účinných látek v zákonné mezi,

aplikace přípravků v optimálních termínech pro potlačení výskytu škodlivého organismu s využitím metod prognózy a signalizace a dodržování doporučených dávek zvolených přípravků.

#### 8. Ověřování úspěšnosti ochranných opatření

- Představuje vyhodnocení účinnosti opatření, která byla v daném roce provedena. Například v určitém odstupu vyhodnotit aplikaci hnojiv a pesticidů v porostu a zaznamenat uvažované vlivy, které mohou sloužit jako vodítko pro rozhodování v dalším roce. V závěru sezóny by měly být zhodnoceny jak všechny úspěchy, tak i neúspěchy a hledána zdůvodnění dosažených výsledků.

### 3.5.1 Technologie ochrany řepky využitelné v rámci IOR

#### 3.5.1.1 Ochranné obsevy a atraktivita odrůd řepky

Základním předpokladem pro využití ochranných obsevů je fakt, že škůdci (nejen) řepky osidlují porost od jeho okraje, tedy jejich nejvyšší hustota bývá několik desítek metrů od okraje pozemku. Směrem ke středu pozemku dochází ke snižování hustoty populací škůdců a tento jev se někdy nazývá jako „okrajový efekt“ (Murchie et al. 1999; Kazda et al. 2008). Podstatou ochranných obsevů řepky je obsetí obvodu pozemku několikametrovým pruhem pro škůdce atraktivnější lapací plodiny, na které se během jara koncentruje jejich výskyt. Na tento pruh je pak možné cílit příslušnou ochranu místo plošné aplikace na celý pozemek (Kazda et al. 2008). Tato strategie a její principy využívající manipulace s chováním hmyzu je nazývána „push-pull“ (přilákej a odpuzuj). Strategie "push-pull" zahrnuje behaviorální manipulaci s hmyzími škůdci (a také s jejich přirozenými nepřáteli) prostřednictvím integrace podnětů, které působí tak, že chráněný zdroj (řepka) je pro škůdce neatraktivní nebo nevhodný (push), zatímco je láká k atraktivnímu zdroji (pull) v podobě obsevu, odkud jsou škůdci následně odstraněni. Tato strategie je postavena na využití primárně netoxických metod v podobě biologických prostředků ochrany rostlin a je tak užitečným nástrojem pro programy integrované ochrany proti škůdcům snižující vstupy pesticidů do životního prostředí (Cook et al. 2007). Jistou modifikací strategie „push-pull“ je technologie nazývaná „attract and kill“ (přilákej a zabij) využívající taktéž lapacích rostlin nebo syntetických feromonů a volatilních látek, které přilákají škůdce na dané místo, kde je následně cílena chemická ochrana syntetickými insekticidy (Barari et al. 2005).

Pro obsevy pozemků lze v rámci uplatnění těchto strategií používat kombinace ozimé řepice (*Brassica rapa*) s jarní řepkou. Řada škůdců řepky preferuje jako hostitelskou

rostlinu řepici před samotnou řepkou a taktéž dříve kvetoucí jarní řepku (Dosdall & Kott 2006). Možné je také využití kombinace rané a pozdní ozimé odrůdy řepky s odlišnou fenologií. Významnou roli v atraktivitě jednotlivých odrůd pro škůdce hraje také barva květů řepky, čemuž se prozatím nevěnovala přílišná pozornost, ačkoliv atraktivita různých barev (pastí) pro škůdce byla mnohokrát zkoumána (Cook et al. 2006, 2013). Vyšlechtění nových linií řepky se změněnou barvou květů řepky může být další směr řešení ochrany nejenom s blýskáčkem řepkovým, ale i krytonoscem šešulovým a překonání narůstajících problémů s rezistencí těchto škůdců k pesticidům. Budoucnost šlechtění řepky je také zaměřena na rezistenci odrůd vůči škůdcům například v podobě transgenních rostlin a editací jejich genů metodou CRIPR Cas9 a také využití iRNA hybridů (Cook et al. 2013).

### 3.5.2 Přirození nepřátelé v ochraně rostlin proti škůdcům

Za přirozené nepřátele škůdců jsou považovány organismy, které jim škodí do takové míry, že vážně snižují jejich životaschopnost a mohou způsobit i jejich smrt (Honěk et al. 2021). Přirození nepřátelé škůdců jsou predátoři, paraziti, parazitoidi a také entomopatogenní mikroorganismy, které jsou původci nemocí škůdců. Predátoři, paraziti a parazitoidi jsou na svého hostitele (škůdce) vázáni svým vývojem nebo jim škůdce slouží jako potrava. Definice a příklady vzájemných vztahů jsou s příklady uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2.** Vztahy mezi přirozenými nepřáteli a škůdci.

	<b>Predátor</b>	<b>Parazit</b>	<b>Parazitoid</b>
<b>Definice</b>	loví a konzumuje jiné živočichy	organismus existenčně závislý na svém hostiteli, kterého většinou nezabíjí, smrt hostitele by ohrozila jeho samého	organismus zpravidla se vyvíjející na jednom hostiteli, kterého na konci svého vývoje usmrtí
<b>Příklad</b>	larvy a dospělci slunéček larvy pestřenek konzumují mšice, střevlíci, zlatoočky	blecha, pijavice, veš, některé parazitické hlístice	<b>blanokřídli</b> parazitoidi (lumci, lumčící, chalcidky), kladou vajíčka např. do mšic, ze kterých se líhnou larvy konzumující svého hostitele zevnitř, až ho nakonec zabijí <b>dvoukřídli</b> (kuklicovití), vnitřní parazitoidi různého hmyzu

#### 3.5.2.1 Entomopatogenní mikroorganismy

Mimo predátorů, parazitů a parazitoidů hrají významnou roli v životních cyklech škůdců (hmyzu) také entomopatogenní mikroorganismy (obecně „choroby“ hmyzu). Mezi tyto organismy se řadí viry, bakterie a houbové patogeny (Rod et al. 2005). Tyto organismy

jsou běžně přítomné v přírodě a řada z nich je také využívána k průmyslové výrobě přípravků na ochranu rostlin, jejichž jsou účinnou součástí (Honěk et al. 2021).

Příkladem z řad virů využívaných v ochraně rostlin například proti bělásku zelnému (*Pieris brassicae*) nebo obaleči jablečnému mohou být bakuloviry (Sood et al. 2010; Rodriguez et al. 2012). Mezi ty patří rod *Alphabaculovirus*, který infikuje škůdce z řádu motýlů. Dalšími příklady jsou *Gammabaculovirus*, který infikuje hmyz z řádu blanokřídlých a *Deltabaculovirus* jenž infikuje především dvoukřídlý hmyz. Bakuloviry vyvolávají u škůdců dvě onemocnění zvaná granulóza a polyedróa (Rodriguez et al. 2012; Plotnikov et al. 2020).

Škůdci jsou také hostiteli celé řady houbových patogenů (Plotnikov et al. 2020). Spontánně nebo jako součást biopreparátů se vyskytuje například entomopatogenní houba *Beauveria bassiana*. Tato houba napadá přes 150 druhů hmyzu, u kterých vyvolává onemocnění zvané bílá muskaritida. Dalšími z mnoha příkladů jsou houby *Metarhizium anisopliae*, které je původcem zelené muskaritidy u brouků a motýlů, nebo *Entomophthora planchoiana*, která se vyskytuje v koloniích mšic. K podpoře výskytu entomopatogenních hub přispívá omezené používání syntetických fungicidů v ochraně proti houbovým chorobám rostlin. Jejich výskyt je také vyšší, pokud se pole s pěstovanými plodinami nachází v dostatečné blízkosti neovlivněných přírodních ekosystémů s výskytem přirozených hostitelů hub (Rod et al. 2005). Na regulaci některých škodlivých druhů háďátek se podílejí nematofágní houby (např. *Drechlerella brochopaga*, *Zoophagus pectosporus*, *Monacrosporium elliposporum* nebo *Arthrobotrys oligospora*). Ty produkují atraktanty, které lákají háďátka do jejich lepivých pastí. Houbové pasti na háďátka mohou mít různou strukturu a také funkci. Kořist těchto hub je chytána například pomocí stahujících se hyf (podobné pastím typu ok), lepkavých sítí nebo lepkavými nafouklými buňkami. Před vstupem houbových vláken do těla háďátek vypouštějí houby často různé toxiny a narkotizační látky, které způsobí znehybnění kořisti a její snazší konzumaci (Rod et al. 2005; Koukol 2014; Hrouda 2023)

### **3.5.2.2 Predátoři**

Z podstaty definice jsou predátoři volně žijící organismy, které jsou obvykle větší než jejich kořist a k dokončení svého vývoje potřebují několik jedinců své kořisti (Begon et al. 1986; Claro et al. 2009). Podobně jsou predátoři škůdců zemědělských plodin v převážné většině dravci, kteří se živí požitím většího počtu kořisti (škůdců), kterou zabíjejí. Většina predátorů není na rozdíl od parazitoidů úzce specializována na jednoho hostitele. Polyfágní

predátoři napadají velký počet druhů kořisti, nejsou ani specializováni na určitý vývojový stupeň své kořisti a také není výjimkou, že se někteří živí i rostlinnou potravou (např. semena, pyl) (Alford 2003; Williams 2010a). Největší význam pro regulaci populací škůdců mají z polyfágních predátorů s kousacím ústním ústrojím v polních podmínkách brouci z čeledí střevlíkovitých (Carabidae), drabčíkovitých (Staphylinidae) a páteříčkovitých (Cantharidae). Dalšími významnými polyfágními predátory jsou druhy ploštic, které disponují bodavě-savým ústním ústrojím. Řada druhů ploštic se živí výhradně živočišnou či rostlinnou potravou a některé druhy také jejich kombinací (Kromp 1999; Büchs 2003; Honěk et al. 2008). Dalšími polyfágními druhy predátorů jsou pavouci (Araneae) a draví roztoči (Acarina). Mezi specializované predátory s užším výběrem kořisti jsou z řádu brouků druhy z čeledi slunéčkovitých (Coccinellidae), z řádu dvoukřídlých druhy z čeledi pestřenkovitých (Syrphidae) a dravých bejlomorek (Cecidomyiidae), jejichž hlavní kořistí jsou mšice. Dalšími specializovanými predátory jsou zástupci z řádu síťokřídlých z čeledi zlatoočkovitých (Chrysopidae, např. *Chrysopa carnea*) a denivkovitých (Hemerobiidae, např. rod *Micromus*), kteří se živí mšicemi, třásněnkami, sviluškami a také vajíčky nebo malými larvami jiného hmyzu (Büchs 2003; Honěk et al. 2008; Honěk et al. 2021).

### **3.5.2.3 Parazitoidi**

Parazitoidy lze rozdělit do různých skupin na základě určitých kritérií, jak je uvedeno na Obrázku 7. Druhově nejbohatší skupinou parazitoidů zemědělských škůdců je blanokřídlý hmyz (Hymenoptera), zejména z čeledi lumkovitých (Ichneumonidae), lumčíkovitých (Braconidae) a nadčeledi chalcidek (Chalcidoidea) (Ferguson et al. 2010). Další druhově bohatá skupina parazitoidů je z řádu dvoukřídlých, zejména z čeledi kuklicovitých (Tachinidae) (Grenier 1988).





Obrázek 7. Rozdělení parazitoidů dle různých kritérií.

### 3.5.2.3.1 Lumkovití (Hymenoptera: Ichneumonidae)

Čeď lumkovitých je v České republice druhově nejbohatší čeledí hmyzu a tím pádem i parazitoidů (Obr. 9). Lumkovití jsou významnými parazitoidy zemědělských a lesních škůdců. Jeden druh škůdce může být hostitelem až pro několik desítek druhů lumků. Larvy lumků jsou parazitoidy vajíček, larev a kukel motýlů, brouků, dvoukřídých, blanokřídých, méně často druhů z dalších řádů hmyzu a pavouků (Goulet & Huber 1993; Holý & Zeman 2018; Holý 2020). Hostitelé lumků jsou známi pouze u nejškodlivějších druhů škůdců. Příkladem mohou být *Diadegma fenestrata* a *D. semiclausum*, kteří jsou larválními parazitoidy jednoho z nejvýznamnějších škůdců brukvovitých plodin západníka polního. Parazitace larev západníka dosahuje v případě těchto dvou druhů parazitoidů v polních podmínkách až 48 %. Kukly stejného škůdce bývají až v 30 % parazitovány lumky *Diadromus collaris* a *D. subtilicornis* (Haye et al. 2021). Lumci jsou ale také častými parazitoidy (hyperparazitoidy) jiných užitečných organismů, čímž mohou snižovat jejich účinnost (Holý 2019).

### 3.5.2.3.2 Lumčíkovití (Hymenoptera: Braconidae)

Lumčíkovití jsou spolu s lumkovitými v ČR druhově velmi početnou skupinou blanokřídých parazitoidů (Obr. 9). Mezi jejich hlavní hostitele patří především motýli, brouci, dvoukřídli a polokřídli (Wharton 1993; Goulet & Huber 1993; Achterberg 2016; Yu et al. 2016). V přírodě i v kulturní krajině patří lumčíci mezi významné regulační mechanismy škodlivého hmyzu a řada druhů je využívána pro biologickou ochranu rostlin (Goldson et al. 1992; McNeill et al. 2002; Sarfraz et al. 2005; Paranhos et al. 2019).

### 3.5.2.3.2.1 Lumčíkovití využívání v ochraně rostlin

Mezi nejvýznamnější lumčíkovité, kteří se používají v ochraně rostlin, se řadí především podčeledi Aphidiinae (mšicomaři) parazitující na mšicích (Aphididae), Alysiinae parazitující dvoukřídlé (Diptera) a Microgastrinae, kteří se vyvíjejí na housenkách motýlů (Lepidoptera).

Rod *Aphidius* z čeledi Aphidiinae je v Evropě zastoupen více než 40 druhy (Achterberg 2016; Yu et al. 2016) a v ochraně rostlin ve sklenicích se využívají dva z nich. Teplomilnější *A. colemani* pochází ze Středomoří a Střední Asie a parazituje menší druhy mšic (např. mšice broskvoňová, m. řešetláková, m. bavlníková, m. maková) (Starý 1975; Bohatá 2023). Dalším druhem je *A. ervi*, který pochází z Evropy a je větší než předchozí druh, díky čemuž je schopný parazitovat větší druhy mšic (např. kyjatka osenní, k. zahradní, k. hrachová, k. travní) (Starý 1974; Bohatá 2023). Uvedené druhy byly záměrně šířeny do různých částí světa již od konce 70. let 20 století a spolu s nimi byly s různou úspěšností introdukovány i druhy *Aphidius eadyi* či *A. smithi* (Cameron & Walker 1989). Samičky mšicomarů jsou schopné za svůj život naklást až 300 vajíček a jejich larvy se vyvíjejí jednotlivě ve všech stádiích mšic 10-20 dní v závislosti na teplotě (Wei et al. 2005). Asi týden od naklazení vajíček se parazitované mšice přestávají hýbat, larva vykousne otvor v parazitované mšici a spřádá kokon, pomocí kterého je mšice připevněna k listu. Larva se v kokonu zakuklí a tím způsobí, že se mšice nafoukne v kožovitou šedou až béžovou mumii (Obr. 8.), ze které se po několika dnech prokouše ven kulovitým otvorem dospělec (Starý 1970; Bohatá 2023). V České republice je registrována celá řada biopreparátů obsahujících jednotlivé druhy mšicomarů *Aphidius colemani* nebo *A. ervi* a jeden směsný preparát od firmy BIOCONT LABORATORY, spol. s r.o., který obsahuje z 85 % mšicomary: *Aphidius colemani* (20 %), *A. ervi* (15 %), *Ephedrus cerasicola* (10 %) a *Praon volucre* (40 %) a 15 % produktu tvoří také mšicovník *Aphelinus abdominalis* (Chalcidoidea) (BIOCONT 2023; Ministerstvo zemědělství 2023). Chalcidka *A. abdominalis* se používá společně s mšicomary pro posílení účinku biologického preparátu. Dravé samičky jsou významnými predátory prvních dvou instarů mšic. Kožovité mumie, které vzniknou po parazitaci *A. abdominalis*, mají následně černou barvu (Bohatá 2023). Všechny nabízené preparáty obsahují mumie mšic a používají se od počátečních fází napadení rostlin. V závislosti na druhu mšicomara a napadení je aplikováno 0,15-4 ks/m<sup>2</sup> plochy skleníku. Úspěšnost parazitace mšic je u mšicomarů dobře kontrolovatelná v porostu díky viditelným mumiím (eAgri 2023).



**Obrázek 8.** Mšicomar podčeledi Aphidiinae a nafouklé mumie mšic s otvorem po vylíhnutí parazitoida.  
Foto: T. Hovorka.

Naproti tomu lumčiči rodu *Dacnusa* z podčeledi Alysinae se vyvíjejí ve svém hostiteli skrytě až do líhnutí dospělců z kukel jejich dvoukřídých hostitelů vrtalek (Diptera: Agromyzidae). Rod *Dacnusa* je v Evropě zastoupen více než 70 druhy (Achterberg 2016; Yu et al. 2016). Lumčík *D. sibirica* je využíván v biologické ochraně proti larvám vrtalek *Lyriomyza* spp. a *Chromatomyia syngenesiae*, které škodí ve sklenicích na plodové zelenině a okrasných rostlinách. Samičky *D. sibirica* vyhledávají larvy vrtalek nejprve podle pachy trusu a následně po nalezení napadeného listu najdou larvu poklepáváním tykadel do listu. Do larev hostitelské vrtalky nakladou samičky vždy jen jedno vajíčko. Za život naklade samička 60-90 vajíček. *D. sibirica* se vyvíjí v larvách vrtalek, které nezabíjí. Poslední instar vrtalek opustí rostlinu a kuklí se pod napadenými rostlinami či v zemi. *Dacnusa sibirica* se kuklí až ve svém hostiteli, ze kterého se prokouše ven. Optimální podmínky pro vývoj parazitoida je 20 až 30 °C a délka jeho vývoje se pohybuje od 13 do 16 dní. Při nižších teplotách 12-15 °C trvá vývoj parazitoida 32 až 78 dní (Hendrikse et al. 1980; Bohatá 2023). V ČR jsou pro biologickou ochranu registrovány dva produkty obsahující dospělé *D. sibirica*. Preparát MINUSA (BIOCONT LABORATORY, spol. s r.o.) obsahuje pouze lumčíka *D. sibirica* a jeho použití je vhodné na začátku sezóny při nízkých populačních hustotách vrtalek a teplotách 15-20 °C. Preparát Dacnusa-Mix-System (Biobest N.V.) obsahuje navíc 10 % parazitických vosiček *Diglyphus isaea* (Chalcidoidea), které zvyšují účinnost preparátu při vyšší populační hustotě vrtalek a také při teplotách nad 20 °C. Oba

preparáty se aplikují 3x v intervalu 7 dní v dávce 2,5 ks/ 10 m<sup>2</sup> plochy skleníku (eAgri 2023).

Lumčící rodu *Cotesia* (Microgastrinae) jsou v Evropě zastoupeni více než 90 druhů a jsou mezi nimi hospodářsky významné druhy, které regulují výskyt škůdců z řádu motýlů (Lepidoptera) (Achterberg 2016; Yu et al. 2016). Nejčastějšími hostiteli rodu *Cotesia* jsou bekyně (Lymantriinae), můry čeledi Noctuidae, běláskovití (Pieridae), záředníčkovití (Plutellidae) či travaříkovití (Crambidae). Celosvětově rozšířený druh *Cotesia glomerata* parazituje housenky řady bělásků, zejména běláška zelného (*Pieris brassicae*) a řepového (*P. rapae*). Vývoj *C. glomerata* je však v housenkách pomalý a housenka hyne až ke konci 5. instaru, což vede k velkému poškození listů hostitelské rostliny. Pro biologickou ochranu je vhodnějším druhem *C. rubecula*, díky kterému je příjem potravy parazitovaných housenek snížen a housenky hynou začátkem 4. instaru. Nejúspěšnější byla introdukce čínské populace *C. rubecula*, která se v oblasti Nové Anglie nejlépe adaptovala, a dokonce vytlačila dříve introdukovaný druh *C. glomerata* (Herlihy et al. 2012). Dalším druhem, u kterého je více než 40 let studována účinnost, je *C. flavipes*, jehož inundativní aplikace pomáhá v Jižní Americe regulovat významného škůdce cukrové třtiny *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Baimey et al. 2020). Životní cyklus je podobný jako u druhu *Cotesia glomerata*. Samička klade krátce po páření 20–60 vajíček do hostitelské housenky. Larvy opouští tělo hostitelské housenky za 15 až 20 dní a kuklí se v její blízkosti. Celkový vývoj od vajíčka do dospělce trvá v závislosti na teplotě 22–30 dní. Na začátku sezóny je parazitace housenek nízká, ale narůstá a koncem sezóny může být až 60–75 % (Nouhuys 2015). Vzhledem k obrovské diverzitě a mnoha nepopsaným druhům lumčíkovitých je možné očekávat, že bude jejich využití a význam v ochraně rostlin stoupat.

### **3.5.2.3.3 Chalcidky (Hymenoptera: Chalcidoidea)**

Zástupci nadčeledi Chalcidoidea jsou převážně vaječnými parazitoidy jiných druhů hmyzu, jako jsou brouci, motýli a dvoukřídlí. Jedná se většinou o velmi malé zástupce (i méně jak 0,5 mm), jejichž diagnostika je značně obtížná. Většina chalcidek má průhledná křídla s velmi redukovanou žilnatinou a jejich tělo je často kovově-zeleně zbarvené (Obr. 9.; Goulet & Huber 1993). Mezi komerčně úspěšně využívané chalcidky patří zástupci čeledi *Trichogrammatidae*. V případě, že se v blízkosti pole nachází přírodě blízký ekosystém, který vyhovuje nejen těmto chalcidkám, dokáží druhy *Trichogramma evanescens* a *T. brassicae* parazitovat až v 90 % vajíček některých škodlivých druhů

motýlů. Tyto dva druhy se také uměle množí a jsou poměrně hojně využívány v ochraně rostlin před motýlími škůdci (Rod et al. 2005; Honěk et al. 2008).



**Obrázek 9.** Nejdůležitější blanokřídlí parazitoidi: A) lumek (Ichneumonidae), B) lumčík (Braconidae) podčeledi Microgastrinae C) chalcidka čeledi Torymidae. Foto: T. Hovorka.

#### **3.5.2.4 Parazitoidi vybraných škůdců řepky**

##### **3.5.2.4.1 Parazitoidi blýskáčka řepkového**

Mezi hlavní parazitoidy blýskáčků patří nejen v ČR blanokřídlý hmyz (Hymenoptera). Parazitována mohou být jak vajíčka, tak především larvy. Jedná se hlavně o druhy z čeledí lumkovitých (Ichneumonidae) a lumčíkovitých (Braconidae) (Williams 2010b).

Vajíčka a larvy blýskáčka řepkového jsou v Evropských podmínkách parazitována nejméně devíti druhy parazitoidů. Všechny patří mezi larvální endoparazity (Nilsson 2003; Alford 2003). Parazitace larev blýskáčka může být jedním z hlavních faktorů ovlivňující populační dynamiku tohoto škůdce a její procento se v podmínkách střední Evropy pohybuje v průměru mezi 25–50 %. Mezi nejvýznamnější druhy parazitující na larválních



stádiích blýskáčka patří *Phradis interstitialis*, *Phradis marionellus* a *Tersilochus heterocerus* (Ulber et al. 2010b).

Nálet přezimujících jedinců jednotlivých druhů do porostů řepky se liší v závislosti na průběhu počasí jednotlivých let, regionu, slunečním svitu a vývojovém stádiu parazitovaného škůdce. Dospělci *P. interstitialis* nalétávají do porostů řepky obvykle dříve než zbylé dva druhy, a to od začátku do poloviny dubna (Ulber & Nitzsche 2006; Williams 2006). Samice tohoto druhu preferují ke kladení vajíček larvy prvního instaru hostitele (Nilsson 2003). Dospělci *P. marionellus* a *T. heterocerus* obvykle migrují do porostů řepky počátkem kvetení na přelomu dubna a května (Ulber & Nitzsche 2006). Samice vyhledávají ke kladení larvy druhého instaru hostitele (Nilsson 2003). Tito parazité patří mezi koinobionty tzn., že napadená larva hostitele může pokračovat ve svém vývoji za přítomnosti parazitoida. Vajíčko parazitoida uvnitř hostitelské larvy začíná s vývojem ve chvíli, kdy hostitel dokončuje svůj vývoj a je připraven na kuklení v půdě. Přezimují dospělci v půdě v kukelní komůrce blýskáčka vedle zbytku hostitelské larvy (Ulber et al. 2010b).

#### **3.5.2.4.2 Parazitoidi dřepčíka olejkového**

V Evropě bylo do současné doby známo pět blanokřídlých parazitoidů dřepčíka olejkového. Tito parazitoidi patří do čeledi lumkovitých (*Tersilochus microgaster*, *Aneulicis melanaria*), lumčíkovitých (*Diospilus morosus*, *D. oleraceus*) a nadčeledi chalcidek (*Trichomalus lucidus*) napadají larvy tohoto škůdce (Williams 2010b).

Z parazitoidů napadajících dospělé dřepčíka olejkového byl do současné doby znám pouze jediný druh *Microctonus melanopus*, který byl ve Velké Británii a Francii vychován z dospělců dřepčíka. Informace o jeho biologii a taxonomickém zařazení jsou však sporné a nelze jejich správnost podle dostupných zdrojů ověřit (Williams 2010b; Jordan et al. 2020). Navíc jsou u tohoto druhu uváděni jako jeho hlavní hostitelé brouci z čeledi nosatcovitých (krytonosec zelný; krytonosec šesulový; krytonosec čtyřzubý a další) (Yu et al. 2016).

#### **3.5.2.4.3 Parazitoidi krytonosece šesulového**

Krytonosec šesulový je hostitelem nejméně 31 druhů blanokřídlých larválních parazitoidů, z nichž tři nejdůležitější druhy, *Trichomalus perfectus*, *Stenomalina gracilis* a *Mesopolobus morys* patří do čeledi kovověnkovitých (Chalcidoidea: Pteromalidae) (Williams et al. 2003). Tyto tři druhy jsou uváděny jako klíčové pro biologickou regulaci

tohoto škůdce (Ulber et al. 2006). Úroveň parazitace dosahuje až 50 % (Ulber et al. 2010b).

Předpokládá se, že všichni tři uvedení parazitoidi napadající larvy k. šešulového mají podobný vývojový cyklus. Nejpodrobněji byl studován druh *T. perfectus* (Williams 2003) na jehož příkladě je uveden životní cyklus. Tento ektoparazitoid má jednu generaci do roka. Do porostů naletuje dva až čtyři týdny po náletu hostitele. Samička klade po jednom vajíčku do larev hostitele přítomných v šešulích. Tento druh patří mezi idiobionty, to znamená, že hostiteli nedovoluje dokončit vývojový cyklus. Z vajíčka se po jednom až čtyřech dnech líhne larva, která se zevně živí na hostitelské larvě po dobu sedmi až deseti dnů. Kuklí se v šešuli vedle zbytků hostitelské larvy. Přezimují pravděpodobně pouze samičky. Dospělci nové generace se na řepce vyskytují až do sklizně (Ulber et al. 2010b).

### 3.5.3 Ochrana a podpora užitečných organismů

Ochrana a podpora užitečných organismů spočívá především v zachování prostředí pro jejich vývoj a přežívání. Jedná se o komplex opatření, která zvyšují biologickou rozmanitost rostlin a živočichů v okolí pozemků s pěstovanými plodinami (Landis 2017). Obecně platí, že s rostoucí biologickou rozmanitostí roste také úroveň regulačních mechanismů v ekosystému (Altieri 1999). Základem pro podporu biodiverzity v polních plodinách jsou kromě používání pouze nezbytné chemické ochrany a selektivních pesticidů opatření, která navyšují druhovou rozmanitost rostlinných druhů, na nichž je hmyz silně závislý (Isbell et al. 2017; Marja et al. 2019). Diverzita hmyzích druhů odpovídá počtu rostlinných druhů rostoucích na dané lokalitě. Na těchto rostlinách je závislé široké spektrum herbivorního hmyzu, na nichž se vyvíjí komplex druhů predátorů a parazitoidů, kteří se následně významně podílí na regulaci populací škůdců (Letourneau et al. 2011; Moreira et al. 2016; Hoffmann et al. 2020).

Příkladem, jak podpořit výskyt přirozených nepřátel škůdců a dalších užitečných organismů, je poskytnutí snadno dostupné a energeticky bohaté potravy ve formě pylu a nektaru (Obr. 10). Zdrojem této potravy jsou například nektarodárné biopásy, které lze vysévat na okrajích polí nebo v případě velkých půdních bloků jimi rozdělit pole na více částí (Hatt et al. 2018). Nektarodárné biopásy je také možné zakládat na pozemcích nebo jejich částech, kde nebylo v minulých letech dosaženo chtěného výnosu. Další možností zvýšení biodiverzity v blízkosti polí je management souvratí. Na těchto plochách je možné vynechat ošetření herbicidy nebo přímo dosévat některé druhy kvetoucích rostlin (svazenka vratičolistá, hořčice bílá, pohanka obecná) (Talašová 2018). Pozitivní vliv nektarodárných biopásů a využití kvetoucích rostlin pro podporu užitečných organismů včetně opylovačů

byl prokázán řadou českých (Šrámková et al. 2014; Talašová 2018; Talašová et al. 2018) i zahraničních studií (Haaland et al. 2011; Tschumi et al. 2015; Wood et al. 2015; Hoffmann et al. 2018, 2020).



**Obrázek 10.** Kvetoucí pohanka v blízkosti dozrávajícího pole s řepkou poskytující užitečným organismům snadno dostupnou a energeticky bohatou potravu ve formě pylu a nektaru. Foto: T. Hovorka.

Významnou roli v podpoře výskytu užitečných organismů hrají také mimoprodukční plochy na nebo v blízkosti polí (Bianchi et al. 2006; Albrecht et al. 2020). Tyto plochy mohou být buď trvalé (živé ploty, travnaté okraje polí nebo zbytky polopřirozených biotopů jako jsou lesy a travnatá stanoviště) nebo dočasné (Rösch et al. 2013; Ernoult et al. 2013; González et al. 2016). Dočasné mimoprodukční plochy zahrnují kromě jiných také polní kazy (defekty). Polní kazy jsou dočasně se vyskytující plochy na polích s plodinami, na kterých nejsou vlivem různých faktorů příznivé podmínky pro růst pěstované plodiny. Příčinou vzniku takovýchto ploch mohou být sezónní záplavy části pozemku, nedostatek vláhy a živin v půdě nebo disturbance způsobená zvěří (Brose 2003; Seidl et al. 2020). Tyto plochy mohou být vhodným prostředím pro růst časné spontánní vegetace (např. kvetoucí plevelle), která následně poskytuje ostatním živočichům, jako jsou ptáci, hmyz (opylovači, parazitoidi a hmyzí predátoři) a pavoukovci, vhodné prostředí pro život (Dainese et al.



2019). Hmyzu mohou polní kazy se spontánní vegetací poskytnout v počátcích jeho vývoje nebo při nedostatku živin potravu v podobě pylu a nektaru. Hrají tak důležitou roli spolu s trvalými mimoprodukčními plochami v jinak uniformní zemědělské krajině (Wäckers 2004).



## 4 Publikované práce

Hlavní a korespondenční autoři všech vědeckých článků uvedených v disertační práci, na kterých není autor disertace uveden jako jeden z nich, vyjádřili v elektronické korespondenci souhlas s jejich využitím pro účely sepsání a obhajoby disertační práce.

### 4.1 Rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům v České republice bez prokázání výskytu mutace typu *kdr* v jeho populacích

**Výstup A:** Hovorka T, Kocourek F, Horská T, Stará J. 2021. Widespread resistance of pollen beetles to pyrethroids in Czechia with no evidence for *kdr* mutation. Crop Protection 145:105648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105648> (IF 3,036)

#### Příspěvní autora:

Autor provedl jak sběr materiálu v terénu, tak praktické biologické pokusy v laboratoři včetně molekulární metody detekce rezistence. Podílel se hlavní měrou na analýze dat a na sepsání finální verze rukopisu práce včetně vypořádání připomínek recenzentů.

#### 4.1.1 Charakteristika problematiky

Blýskáček řepkový je jeden z nejzávažnějších škůdců řepky napříč Evropou. Přestože je rezistence k pyrethroidům dobře známým a široce rozšířeným problémem, insekticidy z této skupiny stále zůstávají hlavním prostředkem ochrany řepky před tímto škůdcem. Od roku 1999, kdy byly zaznamenány první případy rezistence populací blýskáčka k pyrethroidům ve Francii, se rezistence šíří Evropou a mezi roky 2006 a 2008 byla poprvé dokumentována i v České republice. Od té doby se na našem území rezistence k pyrethroidům významně rozšířila. Proto je důležité testovat rezistentní populace blýskáčků k pyrethroidům na citlivost k účinným látkám jiných skupin insekticidů a hledat tak v rámci antirezistentní strategie náhradu za již nefungující pyrethroidy. Mechanismus, jakým rezistence v ČR vznikla, nebyl dosud znám a záznamy ze Skandinávie a Německa naznačují, že by příčinou mohla být mutace typu *kdr* (L1014F) v genu pro sodný kanál. Další příčinou/mechanismem způsobující rezistenci k pyrethroidům by mohla být zvýšená metabolická detoxifikace, kterou částečně zapříčiňuje cytochrom P450 monooxidáza. Zjištění či vyloučení mechanismu rezistence je důležité k zastavení jejího šíření a

přízpusobení ochrany řepky v rámci antirezistentní strategie. Cílem této studie bylo zjistit míru rezistence lokálních populací blýskáčka řepkového k pyrethroidům a její vývoj v čase a prostoru. Dalšími cíli byl screening rezistentních populací blýskáčků k pyrethroidům na výskyt mutace L1014F a vyhodnocení citlivosti těchto populací vůči insekticidům s jiným mechanismem účinku, než mají insekticidy ze skupiny pyrethroidů.

#### 4.1.2 Metodický postup

Lokální populace b. řepkového v počtu 1000 dospělců na lokalitu, byly sbírány pomocí entomologického smýkadla během období kvetení řepky na jaře. Dospělci blýskáčků byli přepraveni do laboratoře v izolátorech, kde byla broukům k dispozici potrava v podobě několika květenství řepky. Dospělci blýskáčků byli před začátkem laboratorního pokusu uloženi po dobu 48 h v klimaboxu se světelným režimem 16 h světlo: 8 h tma a teplotou 5 °C. Pro biologické testy byli použiti pouze vizuálně zdraví jedinci.

Pro populace blýskáčků byly použity tzv. lahvičkové testy IRAC č. 11 (pyrethroidy), č. 21 (neonikotinoidy), č. 25 (organofosfáty) a č. 27 (oxadiaziny). Pro každou skupinu účinných látek insekticidů bylo v závislosti na mechanismu účinku a formulaci naředěno odpovídající množství koncentrací v rozmezí 0 % (kontrola) až 200 % polní dávky účinné látky. Ředění účinných látek bylo provedeno v acetonu s výjimkou přípravku Biscaya 240 OD (nejprve rozpuštěn v destilované vodě a následně doplněn požadovaný objem acetonem). Jako kontrolní byl použit čistý roztok acetonu. Pro účely testů byly použity skleněné lahvičky (P-lab, CZ) s porézními stěnami a vnitřní ploše 32,4 cm<sup>2</sup>. Do každé lahvičky bylo aplikováno 520 µl určité koncentrace účinné látky (v případě kontroly čistý aceton). Pro každou koncentraci včetně kontrolních bylo použito třech opakování. Lahvičky byly následně při pokojové teplotě otáčeny na válcovém ohřívači, dokud nebyl roztok zcela odpařen. Následně bylo do každé lahvičky umístěno 10 dospělců blýskáčků. Hrdlo lahvičky bylo uzavřeno prodyšnou tkaninou. Lahvičky byly s dospělci blýskáčků umístěny do exsikátorů (20 °C, 60% vlhkost) a po 24 h byla hodnocena mortalita blýskáčků.

Hodnocení mortality dospělců bylo provedeno po vysypání brouků z lahvičky doprostřed kruhové výseče z filtračního papíru o průměru 8 cm. Po vysypání byli spočítáni mrtví a těžce postižení jedinci. Za vážně postižené jedince byli považováni ti, kteří nedokázali během 1 minuty opustit kruhovou výseč. Výsledek hodnocení byl vyjádřen jako procento mortality a byla provedena korekce na mortalitu v kontrolní neošetřené variantě podle Abbotta (1925), tj.  $A = [(P-C)/(100-C)]*100$ , kde A je výsledná mortalita v ošetřené variantě po korekci, P je mortalita v ošetřené variantě před korekcí a C je mortalita

v kontrolní neošetřené variantě. Mortalita byla počítána jako podíl součtu mrtvých a postižených brouků z celkového počtu hodnocených brouků. Pokud byla mortalita v kontrolní variantě vyšší než 20 %, bylo nutné pokus zopakovat. Přeživší jedinci testu IRAC č. 11 (pyrethroidy) byli v případě koncentrace 100 % a výše zamrazeni pro účely molekulární detekce rezistence.

Výsledná data z biologických testů byla zpracována v programu XLSTAT 2019 (Addisoft, NY, USA) probitovou analýzou. Pro výpočet cross-rezistence mezi účinnými látkami byla použita Pearsonova korelační analýza.

Z přeživších jedinců biologického testu IRAC č. 11 byla izolována DNA pomocí izolačního kitu NucleoSpin DNA Insect Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo). Pro účely zjištění přítomnosti mutace typu *kdr* byla použita klasická PCR (polymerázová řetězová reakce) s primery Py-KDR-F a Py-KDR-R dle Nauen et al. (2012). V případě úspěšné amplifikace požadovaných úseků DNA byly vzorky odeslány na sekvenaci (Macrogen, Amsterdam, Nizozemsko). Výsledné sekvence byly analyzovány a upraveny v programu BioEdit sequence alignment editor (verze 7. 2. 5).



Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cropro](http://www.elsevier.com/locate/cropro)

## Widespread resistance of pollen beetles to pyrethroids in Czechia with no evidence for *kdr* mutation

Tomáš Hovorka<sup>a,b</sup>, František Kocourek<sup>a</sup>, Tereza Horská<sup>a</sup>, Jitka Stará<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Crop Research Institute, Drnovská 507, Prague 6 Ruzyně, 16106, Czech Republic<sup>b</sup> Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Plant Protection, Kamýcká 129, Praha-Suchbát, 165 00, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Brassicogethes aeneus*  
*kdr* mutation  
 Pyrethroid resistance  
 Sodium channel

## ABSTRACT

The pollen beetle *Brassicogethes aeneus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Nitidulidae) is one of the most important pests in oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Moench) in Czechia. Wide-spread resistance development to pyrethroids in pollen beetle populations was documented in many European countries, including Czechia. The susceptibilities of 10 local pollen beetle populations originating from 10 localities in Czechia to *lambda*-cyhalothrin, *tau*-fluvalinate, thiacloprid, indoxacarb and chlorpyrifos were evaluated in 2017–2020 using glass vial bioassays. A high level of resistance to *lambda*-cyhalothrin was recorded in all the evaluated populations of the pollen beetle. The proportion of the populations resistant to *tau*-fluvalinate varied between years from 30% to 60%, and in 2018 and 2020, all the tested populations were classified as resistant. Despite the high level of resistance to pyrethroids, a *kdr* mutation known to cause resistance in the pollen beetle was not detected in any of the 244 tested individuals. In 2017–2020, the first local populations of the pollen beetle with decreased susceptibility to thiacloprid occurred. The LD<sub>50</sub> of thiacloprid exceeded the field application dose in 100% and 90% of populations in 2018 and 2020, respectively. All the tested populations were susceptible to indoxacarb and chlorpyrifos. Cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid and between *tau*-fluvalinate and thiacloprid was found using data from 2017 to 2020. No cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate was detected.

## 1. Introduction

The pollen beetle, *Brassicogethes aeneus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Nitidulidae), is one of the most important pests in oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* Moench) throughout Europe (Williams, 2004). Synthetic pyrethroids are the main control agents of this pest despite the occurrence of resistance (Heckel, 2012). Pyrethroid resistance in pollen beetles was first reported in France in 1999 (Détourné et al., 2002) and subsequently in Sweden (Ekbon and Kuusk, 2001) and other countries (Derron et al., 2004; Hansen, 2003; Heimbach et al., 2010; Kazachkova et al., 2007; Tiilikainen and Hokkanen, 2008). Pollen beetle pyrethroid resistance monitoring carried out in 2008 confirmed that pyrethroid resistance is widespread in Europe and concluded the spread of resistance to Eastern Europe (Slater et al., 2011). The resistance of the pollen beetle to pyrethroids has also been documented in Czech pollen beetle populations (Spitzer et al., 2020; Stará and Kocourek, 2018). Pollen beetle resistance to pyrethroids is not limited to

individual compounds; rather, it includes the whole chemical class of pyrethroid insecticides (Hansen, 2003; Wegorek et al., 2011; Zamojska et al., 2013) although some pyrethroids, such as *tau*-fluvalinate and etofenprox, seem to be less affected by cross-resistance (Zimmer and Nauen, 2011a). However, a decrease in susceptibility of pollen beetles to etofenprox was observed in Germany (Heimbach et al., 2010). No changes in the level of resistance to etofenprox were reported from Czechia in the 2009–2017 period, while the mortality data showed low efficacy of this compound against the pollen beetle (Spitzer et al., 2020; Stará and Kocourek, 2018). Regarding the low frequency of etofenprox application by Czech farmers, it seems that the low efficacy of etofenprox is not a result of developed resistance but of naturally higher tolerance of pollen beetles to this compound.

Research has shown that even those populations classified as highly resistant to pyrethroids did not show lower susceptibility to neonicotinoid thiacloprid, suggesting a complete lack of cross-resistance (Zimmer and Nauen, 2011b). Similarly, no cross-resistance between

\* Corresponding author. Crop Research Institute, Drnovská 507, Prague 6 Ruzyně, CZ 161 06, Czech Republic.

E-mail addresses: [hovorka@vurv.cz](mailto:hovorka@vurv.cz) (T. Hovorka), [kocourek@vurv.cz](mailto:kocourek@vurv.cz) (F. Kocourek), [terezahorska@vurv.cz](mailto:terezahorska@vurv.cz) (T. Horská), [stara@vurv.cz](mailto:stara@vurv.cz) (J. Stará).

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105648>

Received 8 December 2020; Received in revised form 31 March 2021; Accepted 3 April 2021

Available online 10 April 2021

0261-2194/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

pyrethroids, organophosphates (e.g., chlorpyrifos) and oxadiazines (e.g., indoxacarb) was demonstrated (Seidenglanz et al., 2017; Zamojska, 2017).

It is important to note the different criteria used for classifying pollen beetle resistance to pyrethroids and neonicotinoids. The existing IRAC classification scheme for thiacloprid is based on percentage mortality scored at 200% of the recommended field dose in a glass vial (Kaiser et al., 2018). Populations with mortality higher than 95% are considered highly susceptible. This is related to the fact that thiacloprid is intrinsically less active than pyrethroids and organophosphates (Zimmer and Nauen, 2011b). Therefore, this classification scheme seems to be lenient in comparison with the IRAC classification scheme for pyrethroids presented in IRAC susceptibility test method 011 (IRAC Test methods, 2020). Nevertheless, a slight decrease in the susceptibility of several populations to thiacloprid was reported from Denmark, Germany (Kaiser et al., 2018) and from Czechia (Spitzer et al., 2020).

To date, no decrease in pollen beetle susceptibility to chlorpyrifos or indoxacarb has been observed. Hence, following the banning of thiacloprid and chlorpyrifos by the EU (European Commission, 2020a, 2020b), neonicotinoid acetamiprid and oxadiazines remain the only two alternatives to control pyrethroid-resistant pollen beetle populations in Czechia in the near future.

Two main mechanisms of pyrethroid resistance are known: i) increased metabolic detoxification, which is due in part to cytochrome P450 monooxygenase activity (Scott, 1999), and ii) knockdown resistance (*kdr*), which leads to a reduction in neuronal sensitivity to pyrethroids (Scott, 2019). It was proven that oxidative degradation of pyrethroids by cytochrome P450-dependent monooxygenases (Erban and Stara, 2014; Zimmer and Nauen, 2011a; Zimmer et al., 2014a) and esterases (Philippou et al., 2011; Zamojska et al., 2013) plays a role in the resistance mechanism of pollen beetles to pyrethroids. De novo transcriptome data proved two major mechanisms associated with pyrethroid resistance in European pollen beetle populations, i.e., enhanced

detoxification by one or more cytochrome P450 and modification of the target site (Zimmer et al., 2014b). The target site mechanism, namely, the L1014F mutation, was identified in pollen beetle samples from southern Scandinavia and in one population from Germany (Nauen et al., 2012). The *kdr* alleles were found in samples from the southern part of Sweden that also contained susceptible genotypes, while the *kdr* mutation was absent in highly resistant populations from northern Sweden and in the majority of tested populations from other European countries (Nauen et al., 2012).

The aim of this study was to i) evaluate the level of pyrethroid resistance in the pollen beetle with regard to the origin of samples and year of sample collection, ii) determine the incidence of *kdr* mutation L1014F in pyrethroid-resistant populations from Czechia, and iii) evaluate the level of susceptibility of pyrethroid-resistant populations to insecticides from groups with different modes of action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sampling of insects

Samples of pollen beetle adults from 10 selected localities in Czechia were collected from commercial winter oilseed rape fields in 2017–2020, which are situated in the main growing regions of winter oilseed rape in Czechia (Fig. 1). Samples of local pollen beetle populations were collected from selected localities every year (Fig. 1). The size of the area of collection over 4 years ranged from 500 to 1000 ha.

Pollen beetle adults were collected using entomological sweep nets during April and May. The sampling period began when green buds appeared on plants and lasted for the duration of oilseed rape flowering (BBCH 55–69). The dates of sampling were different for the individual localities. A minimum of 1000 specimens per population of adult pollen beetles were collected. The beetles were transferred to a laboratory in an entomological net with several inflorescences (as food) placed in a

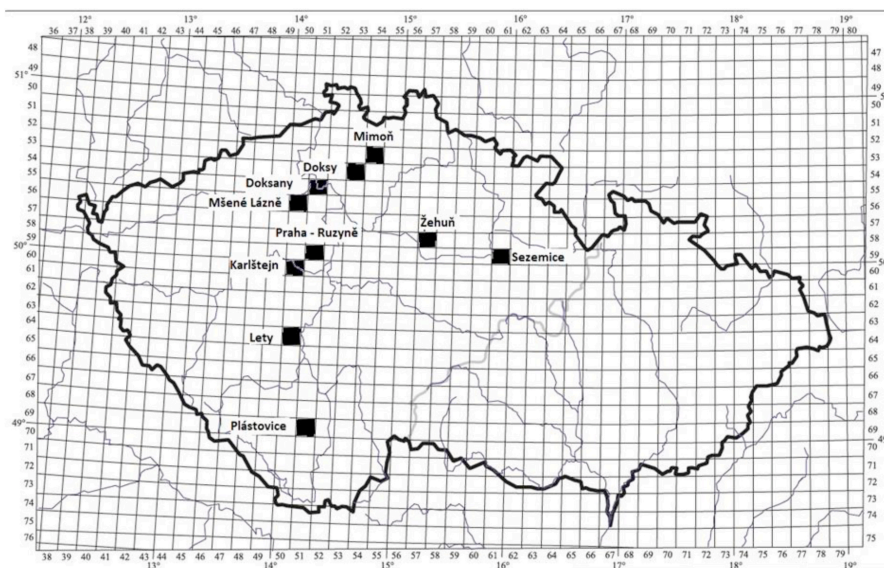


Fig. 1. Selected localities for adult pollen beetle sampling during 2017 and 2020: Praha-Ruzyně (50°5'15.925"N, 14°17'55.740"E), Karlštejn (49°55'22.589"N, 14°9'10.705"E), Doksany (50°27'23.685"N, 14°9'40.964"E), Žehuň (50°8'6.468"N, 15°17'34.499"E), Sezemice (50°3'58.297"N, 15°51'8.989"E), Doksý (50°34'17.760"N, 14°38'53.159"E), Lety (49°30'48.173"N, 14°6'5.284"E), Mšené-lázně (50°21'46.433"N, 14°7'17.190"E), Plástovice (49°4'21.208"N, 14°17'58.552"E) and Mimoň (50°39'14.181"N, 14°43'51.152"E) (Map source: Czech Entomological Society).

Styrofoam box. Before the start of the bioassay, the adult beetles were stored at 5 °C. The beetles were tested for resistance within 1–2 days after collection. Only the insects that had good fitness were used for the bioassay.

## 2.2. Bioassay

IRAC adult vial tests (IRAC Test methods, 2020) no. 011 (pyrethroids), no. 021 (neonicotinoids), no. 025 (organophosphates) and no. 027 (oxadiazines) were used to conduct the bioassays in 2017–2020. Technical-grade class II pyrethroid (*lambda*-cyhalothrin, 97% purity), class I pyrethroid (*tau*-fluvalinate, 95% purity), organophosphate (chlorpyrifos, 98% purity) and oxadiazine (indoxacarb, 95% purity) were obtained from Sigma-Aldrich (CZ). Biscaya 240 OD (240 g thiacloprid per L of solution) was used as the neonicotinoid thiacloprid formulated product. Stock solutions of Biscaya 240 OD were prepared by dissolving 140.4 mg of Biscaya 240 OD formulation (containing 32.4 mg of thiacloprid) in 2 mL of distilled water and subsequently adjusting the volume to 100 mL with acetone. All further dilutions were made with acetone. The doses recommended in Czechia for the field application were calculated assuming that the highest recommended dose of a commercial product in 400 L of water is used per hectare. The field application doses for *lambda*-cyhalothrin (7.5 g/ha (=0.075 µg/cm<sup>2</sup>)), *tau*-fluvalinate (48 g/ha (=0.48 µg/cm<sup>2</sup>)), thiacloprid (72 g/ha (=0.72 µg/cm<sup>2</sup>)), chlorpyrifos (300 g/ha (=3.0 µg/cm<sup>2</sup>)) and indoxacarb (25.5 g/ha (=0.255 µg/cm<sup>2</sup>)) were used as the doses for the experiments. Four doses of pesticides, which were prepared by dilutions with acetone, were used to generate data for calculating dose-response curves (Table S1, Supplemental data).

The glass vials (P-lab, CZ, internal surface area: 32.4 cm<sup>2</sup>) were filled with 520 µL of insecticide and rotated on a vial roller at room temperature until the acetone was completely evaporated. Subsequently, beetles were transferred into each vial. Three replicates were used, and a minimum of 10 beetles were used for each replication of each insecticide dose. The control vials included pure acetone. The vials were incubated under controlled conditions at 20 °C and 60% relative humidity with a 16:8 h light:dark photoperiod. The number of severely affected beetles (i.e., dead and moribund) was counted after 24 h.

## 2.3. Data analysis

The bioassay data were analysed by probit analysis using a dose-effect analysis in XLSTAT 2019 (Addinsoft, NY, USA). The doses of insecticides were ln-transformed. The lethal doses (LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub>) were fitted with 95% confidence limits. The LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values were calculated for each subpopulation separately and for the populations combined in individual years. Due to the high efficacy of indoxacarb and chlorpyrifos bioassay, the resistance ratio (RR) values were calculated only for *lambda*-cyhalothrin, *tau*-fluvalinate and thiacloprid. Because no population susceptible to *lambda*-cyhalothrin was found, the resistance ratio was calculated by dividing the LD<sub>50</sub> (LD<sub>90</sub>) of each population by the LD<sub>50</sub> (LD<sub>90</sub>) of the susceptible population Praha-Ruzyně, 2009, which had an LD<sub>50</sub> of 0.21 g/ha and an LD<sub>90</sub> of 1.91 g/ha (Seidenglanz et al., 2016b). Moreover, the susceptibility of the tested populations to *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate was evaluated by the IRAC classification scheme for pyrethroids (Zimmer and Nauen, 2011b), and the susceptibility to thiacloprid was evaluated based on percentage mortality scored at 200% of the recommended field dose (Kaiser et al., 2018). The pollen beetle mortality in each bioassay was corrected using Abbott's formula (Abbott, 1925). The mean pollen beetle mortality of the field populations exposed to 100% of the recommended dose (for *lambda*-cyhalothrin, *tau*-fluvalinate, thiacloprid and indoxacarb) and 10% of the recommended dose (for chlorpyrifos) of the field application dose was compared. A Kruskal-Wallis test was used to compare the pollen beetle mean mortality at 100% resp. 10% of the field application dose of pesticides in particular monitoring years and localities. Multiple

pairwise comparisons using the Steel-Dwass-Critchlow-Fligner procedure/two-tailed test were performed as post hoc tests. A Pearson correlation was used to analyse the cross-resistance (Zimmer and Nauen, 2011a) between i) LD<sub>50</sub> of *lambda*-cyhalothrin and that of *tau*-fluvalinate, indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos ii) LD<sub>50</sub> value of *tau*-fluvalinate and that of indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos.

## 2.4. Molecular assays

Selected surviving beetles after bioassays from 2018 to 2020 were used for molecular detection of *kdR* resistance (L1014 mutation). Total DNA of 244 individual pollen beetles from 10 localities was extracted using a NucleoSpin DNA Insect Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). From the total number of analysed individuals, 166 and 78 individuals survived the 100% or higher field application doses of *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate, respectively. Adults of surviving beetles were individually homogenized in 100 µL of elution buffer (5 mM Tris/HCl, pH 8.5) with 3 mm steel beads in Type D NucleoSpin for 15 min with a Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA). The isolated DNA was stored at -20 °C.

The 139-bp fragment of the pollen beetle para-type sodium channel gene was then PCR amplified using forward and reverse primers Py-KDR-F and Py-KDR-R (Nauen et al., 2012).

Amplification of the fragment was performed with an MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA). In a 25 µL total volume, the PCR mixture contained 16.1 µL of nuclease-free water, 2.5 µL of 10X Dream Taq Buffer (including 20 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 µL of dNTP mixture (25 mM), 0.2 µL of Dream Taq DNA Polymerase, 2 µL of forward and reverse primers (10 µM), and 32 ng (2 µL) of template DNA per reaction. The following amplification conditions were used: 3 min at 94 °C; 45 cycles of 50 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, and 30 s at 72 °C; followed by a final extension for 5 min at 72 °C and a 4 °C hold. The PCR product was visualized on an agarose gel with the addition of SYBR® Safe DNA gel stain and sequenced (Macrogen, Amsterdam, Netherlands). The sequences were assembled with the BioEdit sequence alignment editor, version 7.2.5 (Hall, 1999).

## 3. Results

### 3.1. Mortality

The mean mortality, the maximum mortality and the variability in mortality between populations (expressed as the standard deviation) are presented in Table 1. All the tested pollen beetle populations were

**Table 1**  
Mean pollen beetle mortality (%) at 100% of the field application dose (mean from all the samples), standard deviation (SD) and maximum mortality (max) from all of the samples.

Active substance		2017	2018	2019	2020	Kruskal-Wallis test
<i>lambda</i> -cyhalothrin	mean <sup>a</sup>	48.0 <sup>ab</sup>	36.9 <sup>a</sup>	55.7 <sup>b</sup>	46.1 <sup>ab</sup>	KW-H <sub>30, 3</sub> =
	SD	18.2	19.5	17.0	16.7	16.563 p =
	max	80.0	90.9	83.3	80.0	0.001
<i>tau</i> -fluvalinate	mean <sup>a</sup>	89.7 <sup>c</sup>	77.4 <sup>b</sup>	98.6 <sup>d</sup>	52.7 <sup>a</sup>	KW-H <sub>30, 3</sub> =
	SD	13.2	15.7	4.4	26.9	70.695 p <
	max	100	100	100	88.9	0.0001
thiacloprid	mean <sup>a</sup>	76.2 <sup>bc</sup>	42.2 <sup>a</sup>	82.1 <sup>c</sup>	61.6 <sup>b</sup>	KW-H <sub>30, 3</sub> =
	SD	21.7	21.0	15.2	27.1	45.196
	max	100	100	100	100	P < 0.0001
indoxacarb	mean <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	99.4 <sup>a</sup>	KW-H <sub>30, 3</sub> =
	SD	0	0	0	2.29	6.05 p = 0.109
	max	100	100	100	100	
chlorpyrifos**	mean	100	100	100		x
	SD	0.00	0.00	0.00		
	max	100	100	100		

<sup>a</sup> Values with different letters within each line are significantly different; \*\*10% of the field application dose tested (30 g/ha).



highly susceptible to chlorpyrifos and indoxacarb. The maximum mortality for chlorpyrifos and indoxacarb was 100% every year (Table 1). The lowest mean mortality was observed for *lambda*-cyhalothrin, for which the maximum mortality in particular years ranged from 80.0 to 90.9% (Table 1). The maximum mortality for *tau*-fluvialinate ranged from 88.9% to 100%, whereas the maximum mortality for thiacloprid was 100% every year (Table 1). High variability in the mean mortality was recorded for *tau*-fluvialinate and thiacloprid. The highest mean mortality of pollen beetles was observed for *lambda*-cyhalothrin, *tau*-fluvialinate and thiacloprid in 2019, and the lowest mean mortality was found for *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid in 2018 and for *tau*-fluvialinate in 2020 (Table 1). The mortality in the control variant in the bioassays ranged from 0% to 16.1%.

### 3.2. Pyrethroid resistance throughout Czechia

The susceptibilities of pollen beetles to pyrethroid active substances in different years expressed as composite log-dose probit models with LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values and slopes are presented in Table 2. The LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values of *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvialinate obtained from different local populations are shown in Table S2 and Table S3 (Supplemental data), respectively.

For *lambda*-cyhalothrin, the highest average LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values were obtained in 2018 (Table 2). The high LD<sub>90</sub> values were consistent with the low mortality of beetles after the application of *lambda*-cyhalothrin at a 100% field application dose (Table 1). Using the IRAC pyrethroid resistance classification scheme, 41.7% of populations evaluated in 2017–2020 were resistant (between 50% and 90% of affected beetles in 100% recommended field application dose), and 58.3% were highly resistant (less than 50% of beetles affected in 100% recommended field application dose) to *lambda*-cyhalothrin (Table S2, Supplemental data). The RRs calculated from the LD<sub>50</sub> values showed that the evaluated populations were 6.81-fold–104.76-fold less susceptible to *lambda*-cyhalothrin than the reference population originating from Praha-Ruzyně in 2009.

The *tau*-fluvialinate LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> average values differed significantly between years and fluctuated between years without any trend

**Table 2**

The composite log-dose probit mortality data for *lambda*-cyhalothrin, *tau*-fluvialinate, indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos obtained from the bioassay on the pollen beetles collected during 2017–2020.

Year	n	LD <sub>50</sub>	95% CL	LD <sub>90</sub>	95% CL	Slope ± SE
<i>lambda</i> -cyhalothrin						
2017	8	6.18 <sup>a</sup>	5.29–7.20	53.3 <sup>b</sup>	42.6–68.9	1.37 ± 0.06
2018	10	11.3 <sup>b</sup>	9.87–12.9	92.9 <sup>c</sup>	75.9–117	1.42 ± 0.07
2019	9	5.50 <sup>a</sup>	4.98–6.29	34.5 <sup>a</sup>	28.8–42.5	1.63 ± 0.08
2020	10	5.81 <sup>a</sup>	5.04–6.64	35.9 <sup>ab</sup>	30.1–44.1	1.66 ± 0.09
<i>tau</i> -fluvialinate						
2017	8	8.23 <sup>b</sup>	7.13–9.46	46.9 <sup>b</sup>	38.3–59.5	1.70 ± 0.09
2018	10	11.8 <sup>c</sup>	10.3–13.3	72.6 <sup>c</sup>	60.5–89.6	1.64 ± 0.08
2019	9	4.11 <sup>a</sup>	3.56–4.70	21.8 <sup>a</sup>	18.2–27.0	1.79 ± 0.11
2020	10	19.8 <sup>d</sup>	16.7–23.5	253 <sup>d</sup>	191–354	1.19 ± 0.07
Indoxacarb						
2017	8	0.02 <sup>a</sup>	0.01–0.02	0.35 <sup>ab</sup>	0.27–0.46	0.94 ± 0.07
2018	10	0.09 <sup>b</sup>	0.08–0.10	0.54 <sup>b</sup>	0.46–0.65	1.65 ± 0.08
2019	9	0.03 <sup>a</sup>	0.02–0.03	0.26 <sup>a</sup>	0.20–0.37	1.31 ± 0.09
2020	10	0.46 <sup>c</sup>	0.36–0.56	4.19 <sup>c</sup>	3.38–5.37	1.36 ± 0.08
Thiacloprid						
2017	8	20.9 <sup>b</sup>	18.1–24.0	138 <sup>a</sup>	112–175	1.57 ± 0.08
2018	10	72.1 <sup>d</sup>	63.7–82.3	472 <sup>c</sup>	362–662	1.59 ± 0.11
2019	9	12.8 <sup>a</sup>	11.1–14.7	98.6 <sup>b</sup>	81.3–123	1.46 ± 0.07
2020	10	29.4 <sup>c</sup>	25.3–34.0	260 <sup>b</sup>	205–348	1.39 ± 0.08
Chlorpyrifos						
2017	8	0.21 <sup>a</sup>	0.18–0.24	1.48 <sup>c</sup>	1.21–1.89	1.52 ± 0.09
2018	9	0.21 <sup>a</sup>	0.19–0.22	0.43 <sup>a</sup>	0.39–0.48	4.11 ± 0.25
2019	8	0.22 <sup>a</sup>	0.20–0.24	0.62 <sup>b</sup>	0.52–0.77	2.89 ± 0.22

50% lethal dose (LD<sub>50</sub>; g/ha); 90% lethal dose (LD<sub>90</sub>; g/ha); confidence limits (95% CL; g/ha); regression slopes with the standard error (SE).

(Table 2). The higher LD<sub>90</sub> values obtained in 2018 and 2020 (Table 2) corresponded well with the lower mortality of beetles recorded in 2018 and 2020 after application of *tau*-fluvialinate at a 100% field application dose (Table 1). The LD<sub>90</sub> values exceeded the field application dose of *tau*-fluvialinate in 54% of cases. Of the populations evaluated in the period from 2017 to 2020, only 21.6% were classified as susceptible (100% and <100% of beetles affected by 20% and 100% field application dose) and the rest of populations were classified more or less resistant to *tau*-fluvialinate (Table S3, Supplemental data). The RRs calculated from the LD<sub>50</sub> values showed that the evaluated populations were 2.67-fold–89.8-fold less susceptible to *tau*-fluvialinate than the reference population originating from Doksany in 2019 (Table S3, Supplemental data).

### 3.3. Pollen beetle population sensitivity to indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos

The sensitivities of pollen beetles to indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos in particular years expressed as composite log-dose probit models with LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values and slopes are presented in Table 2.

The indoxacarb LD<sub>50</sub> values calculated for particular populations were very low. The LD<sub>90</sub> values were lower than the 100% field application dose of 25.5 g/ha in all the populations (Table S4, Supplemental data). No decrease in susceptibility to indoxacarb was observed in the 2017–2020 period.

For thiacloprid, the average LD<sub>50</sub> values differed significantly between years (Table 2). The LD<sub>90</sub> values in most of the populations and years (Table S5, Supplemental data) and the average LD<sub>90</sub> values in all the years (Table 2) exceeded the 100% field application dose of thiacloprid (72 g/ha). Using the IRAC classification scheme for thiacloprid, from 2017 to 2020, 43.2% of the analysed populations were found to be highly susceptible (95–100% of beetles affected by 200% field recommended dose). The RRs calculated from the LD<sub>50</sub> values showed that in the 2017–2020 period, the evaluated populations were from 1.27-fold to 44.0-fold less susceptible to thiacloprid than the reference population Praha-Ruzyně in 2017 (Table S5, Supplemental data).

The average LD<sub>50</sub> values for chlorpyrifos and the 95% CL did not differ among the three years of the experiment, whereas the average LD<sub>90</sub> values did differ significantly (Table 2). In all cases, the LD<sub>90</sub> values were lower than the 100% field application dose of 300 g/ha for chlorpyrifos, indicating no shift in the susceptibility of pollen beetles to chlorpyrifos in the 2017–2020 period (Table S6, Supplemental data).

### 3.4. Variation in pollen beetle susceptibility to insecticides between years and cross resistance between insecticides

The LD<sub>90</sub> values of *lambda*-cyhalothrin exceeded the field application dose in all the evaluated populations and years (Table S2, Supplemental data). The LD<sub>50</sub> values of *lambda*-cyhalothrin exceeded the field application dose mainly in 2017 and 2018, while in 2019 and 2020, they exceeded the field application dose in only 22% and 10% of populations, respectively (Table S2, Supplemental data). According to these findings, the intensity of pollen beetle resistance to *lambda*-cyhalothrin in 2019 and 2020 decreased.

The LD<sub>90</sub> values of *tau*-fluvialinate exceeded the field application dose mainly in 2018 and 2020 (Table S3, Supplemental data). This result indicates an increase in the intensity of pollen beetle resistance to *tau*-fluvialinate in 2018 and 2020. In almost all populations and years, the LD<sub>50</sub> values of *tau*-fluvialinate were below the recommended field application dose.

The LD<sub>90</sub> of thiacloprid exceeded the recommended field application dose, mainly in 2018 and 2020 (Table S5, Supplemental data). This indicates an increase in the intensity of pollen beetle resistance to thiacloprid in 2018 and 2020. The LD<sub>50</sub> of thiacloprid exceeded the recommended field application dose mainly in 2018 and 2020 (Table S5, Supplemental data).

Pollen beetle susceptibility to indoxacarb and chlorpyrifos did not vary between years (Tables S4 and S6, Supplemental data).

Statistically significant correlations were found between *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid and between *tau*-fluvalinate and thiacloprid. No cross-resistance was observed between *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate (Tables 3 and 4).

### 3.5. Incidence of *kdr* mutation in pyrethroid-resistant pollen beetle individuals

The L1014F mutation was not found in any of the 244 sequenced individuals obtained from 2018 to 2020. Two silent nucleotide polymorphisms in the coding sequence of the sodium channel were found (Table 5). First, a C/G shift at position 364 of the nucleotide sequence was found. This shift was in a total of 21 samples. Second, a C/T shift was found at position 462 of the nucleotide sequence. This silent nucleotide polymorphism was found in a total of 46 samples (Table 5).

## 4. Discussion

### 4.1. Resistance of the pollen beetle to pyrethroids

The first pollen beetle populations resistant to *lambda*-cyhalothrin in Czechia were documented in 2008 (Slater et al., 2011). Since then, the proportion of resistant populations has increased (Seidenglanz et al., 2016a, 2016b; Stará and Kocourek, 2018), and the last population sensitive to *lambda*-cyhalothrin in Czechia was recorded in 2012 (Seidenglanz et al., 2016a). However, not only great insensitivity to *lambda*-cyhalothrin but also great variability in resistance levels to the insecticide were observed in Czech pollen beetle populations in the 2009–2015 period (Seidenglanz et al., 2016a, 2016b; Stará and Kocourek, 2018). The peak of pollen beetle *lambda*-cyhalothrin resistance was observed in 2013 (Seidenglanz et al., 2016b; Stará and Kocourek, 2018), when an interruption in the very fast continual decline in pollen beetle susceptibility to pyrethroids was recorded. From 2014 to 2017, a stagnation of the pollen beetle mortality level after application of *lambda*-cyhalothrin was documented (Spitzer et al., 2020; Stará and Kocourek, 2018). This stagnation was probably a result of insect resistance management, i.e. reduced use of pyrethroids by farmers and shift to using of neonicotinoids, mainly thiacloprid. From 2014 to 2019, thiacloprid and *tau*-fluvalinate have been the most frequently used insecticides in Czechia. These insecticides were applied during flowering, at the peak of the occurrence of pollen beetle larvae, to control *Ceutorhynchus obstrictus* and *Dassineura brassicae*. According to the data presented in this study, the stagnation of pollen beetle resistance to pyrethroids was also confirmed from 2017 to 2020 (Table S2, Supplemental data and Fig. 2).

Compared with other European countries, the development of *lambda*-cyhalothrin resistance in Czechia has been similar but occurred with a delay of several years. Heimbach and Müller (2010) recorded a dramatic decline in susceptible samples in Germany from 2005, with a peak of resistance in 2011. In Sweden, resistance to pyrethroid insecticides in pollen beetles began to occur in 2001 and peaked in 2010 (Riggi et al., 2016). This finding confirms the spread of resistant pollen beetles in Europe (Slater et al., 2011).

**Table 3**  
Cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate, indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos.

	<i>tau</i> -fluvalinate	indoxacarb	thiacloprid	chlorpyrifos
Observations	36	25	36	17
Pearson	0.070	-0.110	0.456	0.028
P	0.686	0.599	0.005	0.916
R <sup>2</sup>	0.005	0.012	0.208	0.001
Significant	no	no	yes	no

**Table 4**

Cross-resistance between *tau*-fluvalinate and indoxacarb, thiacloprid and chlorpyrifos.

	indoxacarb	thiacloprid	chlorpyrifos
Observations	25	37	17
Pearson	0.213	0.347	-0.086
P	0.306	0.035	0.742
R <sup>2</sup>	0.046	0.121	0.007
Significant	no	yes	no

After incidence of resistance to *lambda*-cyhalothrin and deltamethrin, the use of other pyrethroids, mainly *tau*-fluvalinate and etofenprox, has increasing in Germany and Czechia (Heimbach and Müller, 2010; Stará and Kocourek, 2018). Similarly, the increasing use of *tau*-fluvalinate followed the decreasing efficacy of *lambda*-cyhalothrin in Denmark (Hansen, 2003). The extent of resistance to *tau*-fluvalinate in Denmark and Germany was less than that to *lambda*-cyhalothrin (Heimbach and Müller, 2010; Hansen, 2003). The susceptibility of pollen beetles to *tau*-fluvalinate in our study was much higher than that to *lambda*-cyhalothrin, with high variation between years (Table 1, Fig. 2). According to Heimbach and Müller (2010), no clear cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and the pyrethroids etofenprox and *tau*-fluvalinate was detected. Similarly, we did not find any cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate (Table 3). However, Seidenglanz et al. (2020) found a moderate level of cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate.

The resistance ratio (RR) calculations for *tau*-fluvalinate and thiacloprid were related to the lowest LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values that had been recorded for pollen beetle collections from 2017 to 2020. The RR calculations for *lambda*-cyhalothrin were related to a sensitive pollen beetle population in Praha-Ruzyně in 2009 (Seidenglanz et al., 2016b). This population was more sensitive than all the other populations tested in 2017–2020 and showed a shift in susceptibility to *lambda*-cyhalothrin in the same region from 2009 to 2020.

### 4.2. Resistance of the pollen beetle to thiacloprid

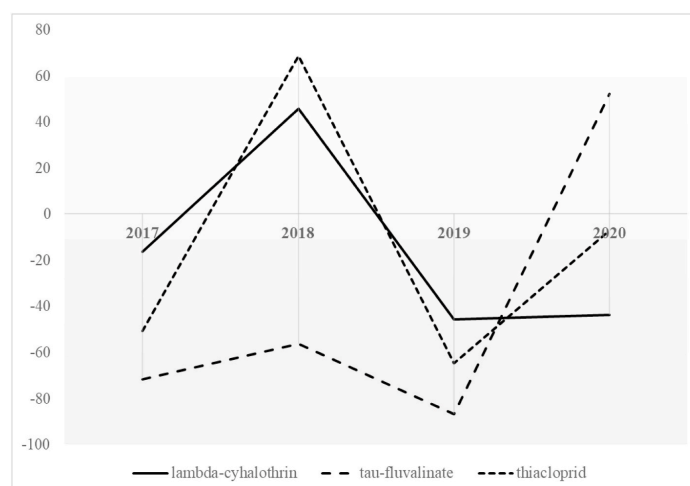
According to our data, the LD<sub>50</sub> values for thiacloprid obtained from the evaluation of 10 local Czech populations in 2017–2020 ranged from 3.52 to 142 g/ha and showed the next shift in pollen beetle susceptibility. In 26 cases, the LD<sub>50</sub> was higher (Table S5, Supplemental data) than the LD<sub>50</sub> of the German strain no. 50–10 with the lowest sensitivity of 20 g/ha (Zimmer and Nauen, 2011b). Most of the populations with increased LD<sub>50</sub> values of thiacloprid were recorded in 2018. The average LD<sub>50</sub> value (40.3 g/ha) exceeded 5 times the baseline mean value of thiacloprid (8 g/ha) obtained by combining composite data from 2009 to 2010 (Zimmer and Nauen, 2011b). In 2018 and 2020, pollen beetle resistance to thiacloprid reached a level of resistance comparable to that of both pyrethroids (*lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate). Decreased susceptibility to thiacloprid was related to resistance to *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate, as shown by the correlation analysis (Tables 3 and 4) and by the increasing trend of resistance in 2018 and 2020 (Tables S2, S3, and S5, Supplemental data).

### 4.3. Susceptibility of pollen beetles to indoxacarb and chlorpyrifos

During the monitoring of pollen beetle susceptibility to insecticides from 2017 to 2020, the mortality of all populations reached 100% when exposed to chlorpyrifos. Similar results were obtained by Spitzer et al. (2020), Seidenglanz et al. (2017) and Wegorek et al. (2011). In all cases, the LD<sub>90</sub> values were even lower than the 10% field application dose of chlorpyrifos (30 g/ha), indicating no shift in susceptibility of pollen beetles to chlorpyrifos in the 2017–2020 period. Wegorek and Zamojska (2008) reported a strong negative cross-resistance between pyrethroids and chlorpyrifos in Central Europe. This negative cross-resistance,

**Table 5**  
Silent nucleotide polymorphisms found in the coding sequence of the sodium channel isolated from the sampled pollen beetles in 2018–2020.

Year	Total number of sequences	C/G polymorphism	Percentage (%) of C/G polymorphism in total samples	C/T polymorphism	Percentage (%) of C/T polymorphism in total samples
2018	87	4	4.6	22	25.3
2019	75	9	12.0	12	16.0
2020	82	8	9.8	12	14.6



**Fig. 2.** Difference (%) in the average LD<sub>50</sub> value per year from the average LD<sub>50</sub> value.

especially between chlorpyrifos and *lambda*-cyhalothrin, was also determined in Czech (Moravian) populations of pollen beetles by Seidnglanz et al. (2017). However, the use of the insecticide chlorpyrifos was prohibited in 2020 (European Commission, 2020b). Despite its high effectiveness on pollen beetles, it is no longer possible to use this active ingredient in the protection of oilseed rape against this pest.

The pollen beetles in our study also showed a lack of resistance to indoxacarb in all years of monitoring. High susceptibility to indoxacarb was also proven in Polish pollen beetle populations, while cabbage seed weevils were resistant to indoxacarb and susceptible to the pyrethroid deltamethrin (Zamojska, 2017). Regarding the lack of records of resistance to indoxacarb in pollen beetle populations, there is still nothing known about the resistance mechanism to indoxacarb in this pest. Cytochrome P450-dependent monooxygenases (Zimmer and Nauen, 2011a; Wegorek et al., 2011; Zimmer et al., 2014a) and esterases (Philippou et al., 2011; Zamojska et al., 2013) were proven to participate in the resistance of pollen beetles to pyrethroids. Since pollen beetle populations highly resistant to pyrethroids are still highly susceptible to indoxacarb (Zamojska, 2017, Tables S2, S3 and S4 in Supplemental data in this study), another mechanism of resistance to indoxacarb, in addition to the mechanism of resistance to pyrethroids, can be expected.

#### 4.4. Target site and metabolic resistance in pyrethroid-resistant pollen beetles

In our study, the *knr* mutation, which causes the L1014 mutation in voltage-sensitive sodium channels (VSSCs), was not found in 166 and 78 individuals surviving the application of 100% or higher field application doses of *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvalinate in the bioassay, respectively. The occurrence of *knr* mutations in pyrethroid-resistant pollen beetles in Europe was first reported by Nauen et al. (2012).

These authors were successful in detecting the L1014F mutation in populations collected in Denmark and Sweden only. Additionally, a single heterozygous beetle carrying the L1014F mutation from northern Germany was reported in this study (Nauen et al., 2012). Another European study by Wrzesińska et al. (2014) confirmed the lack of the *knr* type mutation in Polish pollen beetle populations.

According to the results of Nauen et al. (2012), the presence of the *knr* mutation in Danish samples seems to be connected with pollen beetle resistance to *tau*-fluvalinate, which is less affected by the metabolic resistance mechanism. Danish farmers switched to *tau*-fluvalinate because it seemed to retain better efficacy under field conditions. Hence, the continued application of *tau*-fluvalinate may have contributed to the selection for target site resistance in these populations (Nauen et al., 2012).

Two silent mutations, a C/G shift at position 364 and a C/T shift at position 462 of the nucleotide sequence (Table 5), were also detected in the samples analysed by Nauen et al. (2012). Wrzesińska et al. (2014) found 18 heterozygous nucleic acid substitutions, among which six caused an amino acid change. They also determined the three-dimensional structure of these amino acid changes in the VSSCs and revealed that some of these changes may slightly influence the protein structure. This change in the protein structure could then affect the docking efficiency of some insecticides, such as esfenvalerate, which also belongs to the pyrethroid family.

Currently, it is known that active substances, such as *lambda*-cyhalothrin, deltamethrin and cypermethrin are mainly affected by the metabolic resistance mechanism, which is caused by elevated levels of cytochrome P450 (Nauen et al., 2012; Zimmer and Nauen 2011a). The role of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase in the detoxification of pyrethroid deltamethrin was also proven in Czech pollen beetle populations (Erban et al., 2017).

The putative synergic action of target-site mutations and enhanced detoxification in pyrethroid resistance in insects has been studied by Samantsidis et al. (2020) in transgenic *Drosophila* lines. Genotypes expressing pollen beetle Cyp6BQ23 and bearing the *kdr* L1014F mutation displayed an almost multiplicative RR. However, these combined genotypes significantly increased the developmental time of pollen beetles. Hence, combinations of target sites and P450 resistance loci might be unfavourable in field populations in the absence of insecticide selection. The combination of metabolic resistance and *kdr* mutation is extremely rare in pollen beetle populations, supporting the fitness cost theory (Nauen et al., 2012). We can expect that the presence of *kdr* mutations in pollen beetle populations with metabolic resistance mechanisms is so scarce that it is nearly undetectable in small samples. Hence, in the bioassay in our experiment, the high resistance level of pollen beetles to pyrethroids in the absence of the *kdr* mutation supports the existence of a metabolic mechanism of resistance in Czech pollen beetle populations, as presented in the study of Erban et al. (2017).

#### 4.5. Changes of insect resistance management strategies

Until 2020, rotation insecticides from three groups of active substances (oxadiazines, neonicotinoids and pyrethroids) was a base of the antiresistant strategy. Results of our study documenting fast selection of pollen beetle resistance to *tau*-fluvinalinate and decreasing sensitivity to thiacloprid. At the same time, stable and high sensitivity to indoxacarb was proved. Changes in antiresistant strategies are proposed for the regions with decreased pollen beetle sensitivity to *tau*-fluvinalinate. To prevent the injuries of oilseed rape, indoxacarb is recommended for the application before flowering. Acetamiprid aimed against *Ceutorhynchus obstructus* and *Dassineura brassicae* with a side effect on pollen beetle larvae and adults is recommended for the application during flowering.

#### 5. Conclusion

A high level of resistance to *lambda*-cyhalothrin was recorded in all 10 evaluated populations of the pollen beetle in 2017–2020. In the same period, the first local populations of pollen beetles with decreased susceptibility to thiacloprid were observed. Cross-resistance between *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid and between *tau*-fluvinalinate and thiacloprid was proven. The high variability in the resistance to thiacloprid and *tau*-fluvinalinate between years was documented in populations from the same localities. Low efficacy of etofenprox to pollen beetles and high susceptibility to indoxacarb and chlorpyrifos were observed throughout the period in which pollen beetle resistance to insecticides developed in Czechia. Beginning in 2021, important changes in pollen beetle control are expected to depend on changes in the spectrum of insecticides. Following the restriction of organophosphates and thiacloprid, only two efficient insecticides, indoxacarb and acetamiprid, will be available for the control of pollen beetles in the near future. Monitoring the susceptibility of pollen beetles to insecticides will be an important part of insect resistance management strategies. The registration of new insecticides with new modes of action for the control of pests in oilseed rape is important for solving the problem of pollen beetle resistance and for reducing the impact of resistance on crop yields and the economic effectiveness of oilseed rape production.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, institutional support no. MZE RO0418 and project no.

QK1820081. We would like to thank Marcela Komínková and Petr Komínek for their help with molecular assay optimization.

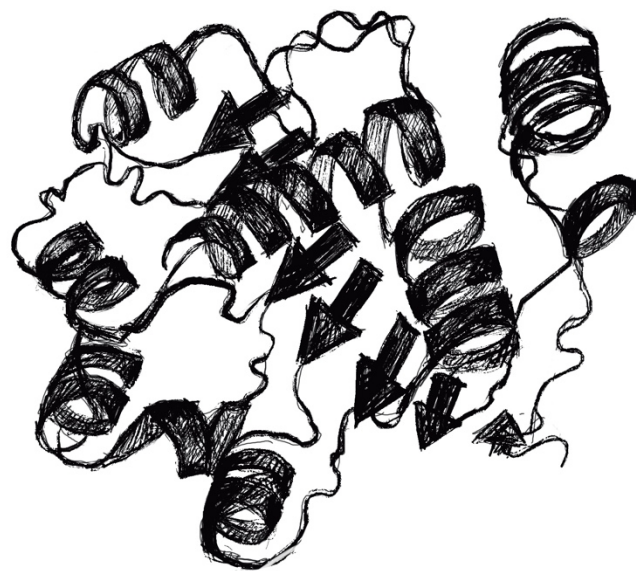
#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105648>.

#### References

- Abbott, W.S., 1925. Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- Derron, J.O., Le Clech, E., Bezençon, N., Goy, G., 2004. Résistance des melligèthes du colza aux pyréthrinoides dans le bassin lémanique. *Rev. Suisse Agric.* 36, 237–242.
- Détourné, D., Delorme, R., Ballanger, Y., 2002. Résistance des melligèthes du colza: bilan de trois années d'enquête. AFPP Sixième Conférence Internationale Sur les Ravageurs En Agriculture, 4-6 Décembre 2002. AFPPP, Montpellier (Paris).
- Ekbom, B., Kuusk, A.K., 2001. Pollen beetles (*Meligethes aeneus*) and resistance against pyrethroids. *Vaxtskyddsnotiser* 65, 39–42 (Swedish with English summary).
- Erban, T., Harant, K., Chalupnikova, J., Kocourek, F., Stara, J., 2017. Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: an in-depth proteomic study employing a transcriptome database. *Journal of Proteomics* 150, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.09.016>.
- Erban, T., Stara, J., 2014. Methodology for glutathione S-transferase purification and localization in two-dimensional gel electrophoresis performed on the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *J. Asia Pac. Entomol.* 17, 369–373.
- European Commission, 2020a. Commission Implementing Regulation (EU) 2020/23 of 13 January 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance thiacloprid, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011 (Text with EEA relevance). *Orkesterjournalen* L 8, 8–11, 2020b.
- European Commission, 2020b. Commission Implementing Regulation (EU) 2020/18 of 10 January 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance chlorpyrifos, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011 (Text with EEA relevance). *Orkesterjournalen* L 7, 14–16, 2020.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hansen, L.M., 2003. Insecticide-resistant pollen beetles (*Meligethes aeneus* F.) found in Danish oilseed rape (*Brassica napus* L.) fields. *Pest Manag. Sci.* 59, 1057–1059. <https://doi.org/10.1002/ps.737>.
- Heckel, D.G., 2012. Insecticide resistance after silent spring. *Science* 337, 1612–1614. <https://doi.org/10.1126/science.1226994>.
- Heimbach, U., Müller, A., Thieme, T., 2010. Monitoring of Pollen Beetle Pyrethroid Resistance from 2005 to 2010. *Julius-Kühn-Archiv*.
- IRAC Test methods, 2020. IRAC approved test methods. <https://irac-online.org/methods/>. (Accessed 11 October 2020).
- Kaiser, C., Jensen, K.-M.V., Nauen, R., Kristensen, M., 2018. Susceptibility of Danish pollen beetle populations against *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid. *J. Pest. Sci.* 91, 447–458. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0856-x>.
- Kazachkova, N., Meijer, J., Ekbom, B., 2007. Genetic diversity in pollen beetles (*Meligethes aeneus*) in Sweden: role of spatial, temporal and insecticide resistance factors. *Agric. For. Entomol.* 9, 259–269. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2007.00345.x>.
- Nauen, R., Zimmer, C.T., Andrews, M., Slater, R., Bass, C., Ekbom, B., Gustafsson, G., Hansen, L.M., Kristensen, M., Zebitz, C.P., 2012. Target-site resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus* F. *Pesticide biochemistry and physiology* 103, 173–180.
- Philippou, D., Field, L.M., Wegorek, P., Zamojska, J., Andrews, M.C., Slater, R., Moores, G.D., 2011. Characterising metabolic resistance in pyrethroid-insensitive pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) from Poland and Switzerland. *Pest Manag. Sci.* 67, 239–243.
- Riggi, L.G., Gagic, V., Bommarco, R., Ekbom, B., 2016. Insecticide resistance in pollen beetles over 7 years – a landscape approach. *Pest Manag. Sci.* 72, 780–786. <https://doi.org/10.1002/ps.4052>.
- Samantsidis, G.-R., Panteleri, R., Denecke, S., Kounadi, S., Christou, I., Nauen, R., Douris, V., Vontas, J., 2020. 'What I cannot create, I do not understand': functionally validated synergism of metabolic and target site insecticide resistance. *Proc. Biol. Sci.* 287 <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0838>, 20200838.
- Scott, J.G., 2019. Life and death at the voltage-sensitive sodium channel: evolution in response to insecticide use. *Annu. Rev. Entomol.* 64, 243–257.
- Scott, J.G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 757–777.
- Seidenglanz, M., Bajerová, R., Kolařík, P., Hrudová, E., Havel, J., Tánčík, J., Ruseňáková, M., Bokor, P., Kocourek, F., Stará, J., Víchová, L., Safár, J., 2020. The correlation between the susceptibilities to *lambda*-cyhalothrin and *tau*-fluvinalinate in Czech and Slovak pollen beetle populations. *Zemdirbyste-Agriculture* 107, 359–366. <https://doi.org/10.13080/z-a.2020.107.046>.
- Seidenglanz, M., Poslušná, J., Kolařík, P., Rotrekl, J., Hrudová, E., Tóth, P., Havel, J., Plachká, E., Tánčík, J., Hudec, K., 2017. Negative correlations between the

- susceptibilities of Czech and Slovak pollen beetle populations to lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl in 2014 and 2015. *Plant Soil Environ.* 53, 108–117.
- Seidenglanz, M., Poslušná, J., Rotrekl, J., Kolařík, P., Hrudová, E., Tóth, P., Havel, J., Bernardová, M., 2016a. *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) resistance to lambda-cyhalothrin in the Czech republic in 2012 and 2013. *Plant Protect. Sci.* 51, 94–107. <https://doi.org/10.17221/40/2014-PPS>.
- Seidenglanz, M., Poslušná, J., Rotrekl, J., Kolařík, P., Hrudová, E., Tóth, P., Havel, J., Spitzer, T., Bernardová, M., 2016b. Changes in meligethesaeus (Coleoptera: Nitidulidae) susceptibility to lambda-cyhalothrin in the Czech republic between 2009 and 2011. *Plant Protect. Sci.* 51, 13–32. <https://doi.org/10.17221/34/2014-PPS>.
- Slater, R., Ellis, S., Genay, J., Heimbach, U., Huart, G., Sarazin, M., Longhurst, C., Müller, A., Nauen, R., Rison, J.L., 2011. Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Manag. Sci.* 67, 633–638.
- Spitzer, T., Bílovský, J., Matusínský, P., 2020. Changes in resistance development in pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* F.) to lambda-cyhalothrin, etofenprox, chlorpyrifos-ethyl, and thiacloprid in the Czech Republic during 2013–2017. *Crop Protect.* 135 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105224>, 105224.
- Stará, J., Kocourek, F., 2018. Seven-year monitoring of pyrethroid resistance in the pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* F.) during implementation of insect resistance management. *Pest Manag. Sci.* 74, 200–209.
- Tiilikainen, T.M., Hokkanen, H.M., 2008. Pyrethroid resistance in Finnish pollen beetle (*Meligethes aeneus*) populations—is it around the corner? *EPPO Bull.* 38, 99–103.
- Wegorek, P., Zamojska, J., 2008. Current status of resistance in pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to selective active sub[1]stance of insecticides in Poland. *EPPO Bull.* 38, 91–94.
- Wegorek, P., Zamojska, J., Mrówczyński, M., 2011. High resistance to pyrethroid insecticides in the Polish pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.): the role of oxidative metabolism. *Phytoparasitica* 39, 43–49.
- Williams, I.H., 2004. Advances in Insect Pest Management of Oilseed Rape in Europe. In: Ishaaya, I., Horowitz, R. (Eds.), *Insect Pest Management*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 181–208.
- Wrzesińska, B., Czerwoniec, A., Wiecezorek, P., Wegorek, P., Zamojska, J., Obrepalska-Stepłowska, A., 2014. A survey of pyrethroid-resistant populations of *Meligethes aeneus* F. in Poland indicates the incidence of numerous substitutions in the pyrethroid target site of voltage-sensitive sodium channels in individual beetles. *Insect Mol. Biol.* 23, 682–693. <https://doi.org/10.1111/imb.12112>.
- Zamojska, J., 2017. Differences in susceptibility of the cabbage seed weevil (*Ceutorhynchus assimilis* Payk.) (Coleoptera: Curculionidae) and the pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) (Coleoptera: Nitidulidae) to indoxacarb and deltamethrin and resistance mechanisms of the cabbage seed weevil to indoxacarb. *Phytoparasitica* 45, 407–418.
- Zamojska, J., Wegorek, P., Mrówczyński, M., 2013. Susceptibility level of the pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to selected pyrethroids in Poland, and resistance mechanisms of the pest to deltamethrin. *J. Plant Protect. Res.* 53.
- Zimmer, C.T., Bass, C., Williamson, M.S., Kausmann, M., Wölfel, K., Gutbrod, O., Nauen, R., 2014a. Molecular and functional characterization of CYP6BQ23, a cytochrome P450 conferring resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 18–29.
- Zimmer, C.T., Maiwald, F., Schorn, C., Bass, C., Ott, M., Nauen, R., 2014b. A de novo transcriptome of European pollen beetle populations and its analysis, with special reference to insecticide action and resistance. *Insect Mol. Biol.* 23, 511–526.
- Zimmer, C.T., Nauen, R., 2011a. Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 264–272.
- Zimmer, C.T., Nauen, R., 2011b. Pyrethroid resistance and thiacloprid baseline susceptibility of European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) collected in winter oilseed rape. *Pest Manag. Sci.* 67, 599–608.





## 4.2 Rezistence/tolerance blýskáčka řepkového k insekticidům z pohledu proteomiky

**Výstup B:** Kocourek F, Stara J, Sopko B, Talacko P, Harant K, Hovorka T, Erban T. 2021. Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicoglyphus (Meligethes) aeneus*. *Journal of Proteomics* **233**:104086. DOI: [10.1016/j.jprot.2020.104086](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104086). (IF 3,855).

### Příspěvní autora:

Autor provedl sběr materiálu v terénu a biologické pokusy v laboratoři. Dále autor přispěl v průběžných komentářích a opravách manuskriptu jemu příslušných částí. Autor se nepodílel na proteomickém a statistickém vyhodnocení dat.

### 4.2.1 Charakteristika problematiky

Rezistence vůči insekticidům je jedním z nejzávažnějších problémů bránící úspěšné produkci zemědělských plodin. Pochopení jejích mechanismů je důležité pro úspěšnou ochranu plodin proti škůdcům, a to zejména v rámci integrované ochrany plodin. U populací blýskáček v Evropě bylo potvrzeno několik známých mechanismů rezistence. Jedním z těchto mechanismů je mutace typu *kdr* v genu pro sodný kanál způsobující rezistenci k pyrethroidům. Dalším příkladem také způsobující rezistenci k pyrethroidům je nadměrná produkce detoxifikačního enzymu cytochrom P450. Mimo tyto známé mechanismy existují i další „skryté“ epigenetické faktory, které mohou přirozeně stát za tolerancí blýskáček vůči insekticidům. Mechanismus vedoucí k rezistenci blýskáček vůči insekticidům může být vrozený, díky přítomnosti proteinů reagujících na stres jako například „pathogenesis-related proteins“. Tyto proteiny mohou být brouky využívány k přežití jak v přirozeném prostředí, tak v polních podmínkách v reakci na insekticidy. Již dříve byl u účinné látky deltamethrin ze skupiny pyrethroidů díky změnám v genové expresi prokázán epigenetický základ tolerance/rezistence. Cílem této studie bylo pomocí proteogenomického přístupu identifikovat nové markery pro porozumění mechanismů tolerance/rezistence u blýskáčka řepkového. Díky identifikaci těchto markerů lze potenciálně cílit ochranu rostlin proti vzniku nebo projevu tolerance/rezistence vůči insekticidům u populací blýskáček.

#### 4.2.2 Metodický postup

V roce 2017 bylo na lokalitě Chlumeč nad Cidlinou o rozloze 50 ha nasbíráno pomocí entomologického smýkadla přibližně 1000 jedinců dospělých blýskáčků řepkových. Dospělci blýskáčků byli přepraveni do laboratoře v polystyrenových izolátorech, kde byla broukům k dispozici potrava v podobě několika květenství řepky.

Pro účely proteomické analýzy byli použiti brouci kteří 1) nebyli ošetřeni v laboratoři žádnou ú.l.; 2) přežili ošetření 100% polní dávkou lambda-cyhalothrinu; 3) přežili ošetření 200% dávkou thiaklopridu; 4) přežili ošetření kombinace 100% polní dávky lambda-cyhalothrinu a 200% dávky thiaklopridu, který byl aplikován po jednodenní selekci lambda-cyhalothrinem.

Biologické testy probíhaly 24 h po sběru blýskáčků. Dospělci blýskáčků byli před začátkem laboratorního pokusu uloženi po dobu 10 min v 5 °C kvůli snížení jejich aktivity. Pro biologické testy byli použiti pouze vizuálně zdraví jedinci. Biologické testy na citlivost vůči lambda-cyhalothrinu a thiaklopridu probíhaly na základě metodik IRAC č. 11 a modifikované metodice IRAC č. 21. Porézní skleněné lahvičky o vnitřní ploše 46,7 cm<sup>2</sup> byly naplněny 750 µl roztoku dané účinné látky a ponechány na válcovém ohříváči, dokud se tekutina nevypařila (ředění a detailnější popis biologických testů viz. Výstup A). Deset dospělců blýskáčků bylo ve 25 opakováních pro každou účinnou látku a čistý aceton (kontrola) převedeno do skleněných lahviček. Lahvičky s brouky byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 22 °C, 60% relativní vlhkosti a světelném režimu 16:8 h světlo:tma. Po uplynutí 24 hodin byla hodnocena mortalita. Deset přeživších brouků v pěti opakováních po ošetření lambda-cyhalothrinem a thiaklopridem bylo uloženo při -80 °C pro další biochemické analýzy. Deset přeživších brouků v 15 opakováních z ošetření lambda-cyhalothrinem bylo přeneseno do skleněných lahviček s thiaklopridem a inkubováno za kontrolovaných podmínek při 22 °C a 60% relativní vlhkosti vzduchu s fotoperiodou 16:8 h světlo:tma po dobu následujících 24 h. Po 24 h byla vyhodnocena mortalita brouků. Deset přeživších brouků z ošetření a kontrolní varianty v pěti opakováních bylo uloženo při -80 °C pro další biochemické analýzy. Mrtví a těžce postižení brouci z každého ošetření během pokusů byli vyřazeni. Počet těžce postižených brouků byl stanoven po 24 h. Vyhodnocení účinku bylo provedeno pomocí softwaru CompuSyn.

Pro profilaci proteinů a měření jejich relativního množství byla použita analýza label-free nLC-MS/MS (LC=Liquid chromatography; MS=Mass spektrometry). Pro analýzu bylo vybráno celkem 20 vzorků (čtyři ošetření x pět vzorků brouků). Jeden vzorek brouků sestával z deseti jedinců blýskáčků. Zmrazení brouci byli umístěni do homogenizátoru



Potter-Elvehjem (KartellLabware, Noviglio, Itálie) a byl přidán 1 ml 100 mM triethylamoniumbikarbonátového pufru (TEAB; Fluka, Sigma-Aldrich) obsahujícího 2 % w/v deoxycholátu sodného (SDC; BioXtra, Sigma-Aldrich). Vzorky byly homogenizovány na ledu, a poté centrifugovány při 4 °C a 3000 ×g po dobu 10 minut. Byl odebrán alikvotní podíl 150 µl, který byl zpracován a analyzován pomocí nLC-MS/MS s využitím hmotnostního spektrometru Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Data byla pro účely výpočtu nahrána na místní server. Data byla prohledána pomocí vyhledávače Andromeda a analyzována a kvantifikována pomocí algoritmů bez značkové kvantifikace (LFQ=label-free quantification of proteins) v programu MaxQuant v1.6.3.4. Enzymová specifita trypsinu byla nastavena jako C-terminální Arg a Lys zbytků. MethylThio byla fixní modifikace, zatímco N-terminální acetylace proteinu a oxidace methioninu byly variabilní modifikace. Parametr FDR (false discovery rate) byl nastaven na 1 % pro proteiny i peptidy. Data byla prohledávána ve vlastní databázi. Původním zdrojem pro vytvoření proteinové databáze byl de novo transkriptom a proteinové sekvence byly analogické těm, které byly použity v předchozích studiích. Zde jsme však provedli anotaci šestirámcových přeložených transkriptů v programu Blast2GO 5 (Biobam, Valencie, Španělsko) proti podskupině Arthropoda v databázi NCBI nr, která byla k dispozici v cloudu Blast2GO 21. října 2019. Intenzity LFQ 20 nLC-MS/MS cyklů byly vyhodnoceny v programu Perseus v1.6.2.3. Před podrobnou analýzou dat jsme odstranili potenciální běžné kontaminanty, shody identifikované pouze modifikačním místem a reverzní shody. Byly odfiltrovány shody proteinů, které měly méně než tři pozitivní výsledky mezi všemi 20 vzorky. Soubor dat byl log<sub>2</sub>-transformován a pomocí histogramů bylo zkontrolováno normální rozdělení dat před a po redukci souboru dat. Chybějící hodnoty byly nahrazeny na základě normálního rozdělení a normalizovány prostřednictvím Z-skóre. Soubor dat byl zpracován pomocí Spearmanovy korelace pořadí. Umělý rozptyl v rámci skupiny (S0) byl nastaven na 0,1 jak pro FDR s vysokou spolehlivostí 0,01, tak pro FDR s nízkou spolehlivostí 0,05. Umělý rozptyl v rámci skupiny (S0) byl nastaven na 0,1 pro FDR s vysokou spolehlivostí 0,01. Významné shody FDR s vysokou spolehlivostí byly poté použity k identifikaci markerů s nejvyšší důležitostí. Kromě toho jsme znovu vyhodnotili data pomocí stejné vyhledávací databáze, která byla použita v předchozí studii, v níž byli blýskáčci ošetřeni deltamethrinem. Z-skóre normalizovaných dat mezi přeživšími, kteří byli ošetřeni deltamethrinem, a kontrolami bylo zkoumáno pomocí t-testu s FDR 0,01 a S0 0,1. Výsledek byl použit k porovnání shody markerů v této studii s markery v předchozí studii.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicoglyphes (Meligethes) aeneus*

Frantisek Kocourek<sup>a</sup>, Jitka Stara<sup>a</sup>, Bruno Sopko<sup>a</sup>, Pavel Talacko<sup>b</sup>, Karel Harant<sup>b</sup>, Tomas Hovorka<sup>a,c</sup>, Tomas Erban<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Crop Research Institute, Drnovska 507/73, Prague 6-Ruzyně CZ-161 06, Czechia

<sup>b</sup> Proteomics Core Facility, Faculty of Science, BIOCEV, Charles University, Prumyslova 595, Vestec CZ-252 42, Czechia

<sup>c</sup> Faculty of Agrobiological Sciences, Department of Plant Protection, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha-Suchbátka CZ-165 00, Czechia

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Label-free proteomics  
Epigenetics  
Thiacloprid  
Deltamethrin  
*lambda*-cyhalothrin  
Multiresistance

### ABSTRACT

The pollen beetle is a major pest of oilseed rape. Although various resistance mechanisms have been identified, such as *kdr* (mutation in the sodium channel) and metabolic resistance (CYP overexpression), other “hidden” factors also exist. Some studies have stressed the importance of epistasis as a genetic background. The combination of *kdr* and metabolic resistance appears to be unfavorable under field conditions in the absence of pesticide selection. The regulation of detoxification enzymes can play an important role, but we highlight different detoxification markers compared to those emphasized in other studies. We also stress the importance of studying the role of markers identified as pathogenesis-related protein 5-like (PR5; upregulated by insecticides) and highlight the role of RNA (DEAD-box) helicases (downregulated by insecticides). Thus, we suggest the importance of epigenetic drivers of resistance/tolerance to pesticides. The key results are similar to those of our previous study, in which deltamethrin treatment of the pollen beetle was also investigated by a proteogenomic approach. Indeed, the mechanism leading to resistance of the pollen beetle may be an innate mechanism that the pollen beetle can also employ in natural habitats, but under field conditions (pesticide exposure), this mechanism is used to survive in response to insecticides.

**Significance:** Pesticide resistance is a serious problem that hampers the successful production of crops. Understanding the mechanisms of insecticide resistance is highly important for successful pest control, especially when considering integrated pest management. Here, using a proteogenomic approach, we identified novel markers for understanding pollen beetle resistance to pesticides. In addition, future studies will reveal the role of these markers in the multiresistance of pollen beetle populations. We highlight that the proteins identified as PR5, which are known to occur in beetles and are similar to those in plants, may be responsible for tolerance to multiple stresses. In addition, our results indicate that the RNA helicases that exhibited changes in expression may be the epigenetic drivers of multiresistance. The nature of these changes remains an open question, and their relevance in different situations (responses to different stresses) in natural habitats in the absence of pesticides can be proposed.

### 1. Introduction

Crop or plant protection products (PPPs) are important factors necessary for the high production required to feed the current and still growing population and to address consumption growth [1]. However, pesticide resistance hampers the sustainability of pest control. Strong selective pressures can lead to the rapid development of pesticide resistance, and the speed of resistance development is linked to the

evolutionary origins of adaptations [2]. There is a need to understand the mechanisms of pesticide action and effects on the target organism, including potential resistance. The limiting factor in the use of almost all pesticides is the selection of strains resistant to the selecting or pressuring compounds, as well as pests that are cross-resistant to other pesticides with the same target [3]. The potential of the development of resistance to pesticides acting on different targets, which can be called multiple resistance, remains an open question.

\* Corresponding author at: Proteomics and Metabolomics Laboratory, Crop Research Institute, Drnovska 507/73, Prague 6-Ruzyně CZ-16106, Czechia.  
E-mail address: [arachnid@centrum.cz](mailto:arachnid@centrum.cz) (T. Erban).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104086>

Received 18 September 2020; Received in revised form 15 December 2020; Accepted 20 December 2020

Available online 27 December 2020

1874-3919/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Brassicogethes aeneus* (previously known as *Meligethes aeneus*) (Coleoptera: Nitidulidae) can cause substantial losses of up to 80% in oilseed rape (*Brassica napus*) [4], which is one of the most important cultivated crops worldwide [5]. Two decades of effective and “relatively” problem-free control of the pollen beetle by pyrethroids were disrupted by the first reports of resistance in a study from France [6]. Resistance has been confirmed in other countries [7], and investigations of the mechanism have commenced. Knockdown resistance (*knr*) to pyrethroids caused by an amino acid substitution in the voltage-gated sodium channel (VGSC) was detected [8]. Another mechanism recognized as being responsible for pyrethroid resistance is overexpression of the cytochrome P450 (CYP) CYP6BQ23 [9–11]. Combinations of multiple mechanisms of resistance, such as *knr* and hyperfunction of CYP, can appear unfavorable for various insect pests under field conditions in the absence of pesticide selection. Therefore, the importance of epistasis as the genetic background of the populations has been stressed [12,13]. In this regard, pollen beetle dispersal and recolonization of fields from natural habitats are also important [14]. A proteomic study has provided deep insight into the response of the pollen beetle to deltamethrin treatment [15]. In addition to the complexity of the response to deltamethrin treatment, the epigenetic basis of pyrethroid resistance was indicated. Indeed, we previously indicated alternative splicing (production of different protein isoforms) in addition to changes in epigenetic markers (regulators) in the pollen beetle due to deltamethrin treatment. Thus, although a change in DNA is not observed, alterations in gene expression can be reflected in increased tolerance/resistance to pesticides [15]. Wide-scale observations of the response to pesticide treatments can indicate various adaptations leading to increased pesticide tolerance, which can, however, be of different types.

In the field, the common practice for pollen beetle control is increased application of insecticides throughout the season [16,17]. There are a number of other insect pests of rapeseed, such as cabbage stem flea beetle, cabbage seed weevil, cabbage stem weevil, rape stem weevil and brassica pod midge [18]; thus, in practice, the pollen beetle can also be threatened by treatments primarily used for different targets. In addition, some PPPs contain more active substances with different insecticidal targets (such as NURRELE D, which combines chlorpyrifos and cypermethrin) [19]. This strategy should increase the efficacy compared to the use of only one PPP, but in practice, insecticides of different groups can be used in tank mixes. Zimmer and Nauen [7] indicated in bioassays of pollen beetles from different countries the resistance to the pyrethroid *lambda*-cyhalothrin, but they negated the cross-resistance with thiacloprid, which is commonly used in rapeseed and against the pollen beetle [7]. The importance of understanding the efficacy of pyrethroids and the neonicotinoid thiacloprid is illustrated in a study from Denmark, which showed regional differences in pollen beetle resistance to *lambda*-cyhalothrin and general susceptibility to thiacloprid [20]. The efficacy of PPPs containing *lambda*-cyhalothrin was lower than that of PPPs with thiacloprid or *tau*-fluvalinate, and the former was observed to be noneffective for overwintering pollen beetles [17]. In Czechia, pollen beetle resistance to pyrethroids has been documented, although *knr* was not detected. In addition, the low cross-resistance between the ester-type pyrethroid *lambda*-cyhalothrin and nonester etofenprox was indicated in Czechia [21]; however, in Germany, the efficacy of etofenprox decreased rapidly from 2008 to 2017 [22]. Etofenprox or *tau*-fluvalinate is more efficient in the control of pollen beetles compared to other pyrethroids, including *lambda*-cyhalothrin, alpha-cypermethrin and deltamethrin [17,21,23,24]. The sensitivity to various pyrethroids is also of importance for nontargets, for example, honey bees and bumblebees exhibit higher tolerance to *tau*-fluvalinate than to most other pyrethroids, especially type II pyrethroids, although *tau*-fluvalinate is also a type II pyrethroid [25]. The effect appears to be the opposite of that in pollen beetle, since *tau*-fluvalinate has been observed to be more effective, as mentioned above. Thus, there can be various mechanisms of tolerance/resistance that can be affected by the structure and class of the pyrethroid in the context of

pollen beetle resistance to pyrethroids. Some mechanisms may be undiscovered or underestimated or can even differ among populations. A proteogenomic study on a model pollen beetle population indicated that the mechanism of resistance to pyrethroids could be caused by various or combined actions of detoxification enzymes, but it was also indicated that the resistance could be based on epigenetic stress-responsive proteins, such as pathogenesis-related proteins [15]. The mechanism of tolerance to thiacloprid or its combination with a pyrethroid is unknown, but because pollen beetle tolerance to thiacloprid was also indicated in Czechia (unpublished results; this study), it is important to identify the response or mechanism leading to survival after treatment.

In this study, we performed a model experiment in which we selected tolerant pollen beetles from a model population by high-dose applications of three different treatments: *lambda*-cyhalothrin, thiacloprid, and their combination. The high-throughput proteogenomic analysis enabled us to select novel markers for understanding resistance mechanisms with potential applicability in resistance targeting. Our data indicate the multiresistance adaptations of the selected pollen beetle population to pesticide treatments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological samples

Biological samples of the pollen beetle measured using nLC-MS/MS in this study were collected in 2017 from Chlumec nad Cidlinou, Czechia (N 50°7.72035', E 15°28.36585'). The size of the area of collection was 50 ha. Approximately 1000 specimens of adult pollen beetles were collected using a sweep net on 26th April and transported in a Styrofoam box to the laboratory. Before the start of the bioassay, the beetles were stored at +5 °C for approximately 10 min to reduce their activity and facilitate handling of the beetles during the bioassay. The beetles were fed oilseed rape flowers. The beetles were tested in the bioassay 1 day after collection. Only insects capable of quick, coordinated movement were used for the experiments. Briefly, for the proteomic analysis, pools of beetles that (i) were not treated with pesticides in the laboratory or (ii) survived the treatment with *lambda*-cyhalothrin (~100% recommended field concentration), (iii) thiacloprid (~200% recommended field concentration) or (iv) *lambda*-cyhalothrin (~100% recommended field concentration) and thiacloprid (~200% recommended field concentration) sequentially applied prior to the 1-day selection by *lambda*-cyhalothrin were used. The recommended field concentrations were derived from the active substance present in the PPPs containing *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid. For the nLC-MS/MS analysis, 5 pools were used, each consisting of 10 individual beetles as independent replicates. Note that we also used the proteomic data of controls and deltamethrin treatment survivors from our previous study [15], and these data were reevaluated.

Technical-grade *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to treat the beetles. The insecticides were diluted with acetone to concentrations of 18.8 mg L<sup>-1</sup> and 360 mg L<sup>-1</sup> for *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid, respectively. The used rates were selected based on the preliminary results of the bioassay, in which they both caused approximately 50% pollen beetle mortality. These rates corresponded to concentrations of 7.5 g ha<sup>-1</sup> and 144 g ha<sup>-1</sup>, i.e., 100% and 200% of the field-recommended concentrations of *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid, respectively. IRAC method no. 11 [26] and modified IRAC method no. 21 [27] were used to test the susceptibility of pollen beetles to *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid, respectively. Glass vials with an internal surface area of 46.7 cm<sup>2</sup> (P-Lab, Prague, Czechia) were used as test containers. Glass vials were filled with 750 µL of solution and rotated at room temperature until the acetone was completely evaporated. Ten beetles in 25 replicates were transferred to glass vials with *lambda*-cyhalothrin, thiacloprid or pure acetone as a control treatment. The vials were incubated under controlled conditions at 22 °C and 60% RH with a 16:8 h light:dark photoperiod. After 24 h,

beetle mortality was evaluated. Ten surviving beetles in five replicates from *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid treatments were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further biochemical analysis. Ten surviving beetles in 15 replicates from the *lambda*-cyhalothrin treatment were transferred to glass vials with thiacloprid and incubated under controlled conditions at  $22^{\circ}\text{C}$  and 60% RH with a 16:8 h light:dark photoperiod for the next 24 h. After 24 h, beetle mortality was evaluated. Ten surviving beetles from the treatments and control in five replicates were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further biochemical analysis. The dead and moribund beetles from each treatment during the experiments were discarded. The number of severely affected beetles (i.e., dead and moribund) was determined after 24 h. Effect evaluation was carried out using CompuSyn software [28,29].

## 2.2. Label-free nLC-MS/MS analyses

Overall, 20 (4 treatments  $\times$  5 biological samples consisting of pooled beetles) samples were prepared for the nLC-MS/MS analysis. One biological sample consisted of 10 pooled individuals of pollen beetles. The frozen beetles were placed in Potter-Elvehjem homogenizers (Kartell Labware division, Noviglio, Italy), and 1 mL of 100 mM triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB; Fluka, Sigma-Aldrich) containing 2% w/v sodium deoxycholate (SDC; BioXtra, Sigma-Aldrich) was added. The samples were homogenized on ice and then centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  and  $3000 \times g$  for 10 min. An aliquot of 150  $\mu\text{L}$  was taken, processed and analyzed using nLC-MS/MS employing an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) as described elsewhere [30].

The data were uploaded to a local server for computation. The data were searched using the Andromeda search engine [31] and analyzed and quantified with label-free quantification (LFQ) algorithms in MaxQuant v1.6.3.4 [32]. The enzyme specificity of trypsin was set as C-terminal Arg and Lys residues. MethylThio was the fixed modification, while N-terminal protein acetylation and methionine oxidation were variable modifications. The false discovery rate (FDR) parameter was set to 1% for both proteins and peptides. The data were searched against an in-house database. The original source for the creation of the protein database was a de novo transcriptome [11], and the protein sequences were analogous to those used in our previous study [15]. However, here, we performed annotation of the 6-frame translated transcripts in Blast2GO 5 (Biobam, Valencia, Spain) against the Arthropoda subset of the NCBI nr database available in the Blast2GO cloud on 21st October 2019.

## 2.3. Evaluation of the LFQ data

The LFQ intensities of the 20 nLC-MS/MS runs were evaluated in Perseus v1.6.2.3 [33]. Before detailed data analysis, we removed potential common contaminants, hits identified only by a modification site and reverse hits. Protein hits that had fewer than three positives among all 20 samples were filtered out. The dataset was log<sub>2</sub>-transformed, and the normal distribution of the data before (Fig. S1A) and after (Fig. S1B) reducing the dataset was inspected through histograms. Missing values were replaced based on a normal distribution (width: 0.3; downshift: 1.8; total matrix) and normalized through the Z-score. The dataset was processed using Spearman rank correlation. The artificial within-group variance ( $S_0$ ) [34] was set to 0.1 for both a high-confidence FDR of 0.01 and a low-confidence FDR of 0.05. The significant hits of the high-confidence FDR were then used to identify the markers of highest importance.

In addition, we re-evaluated the data using the same search database that was used in our previous study, in which pollen beetles were treated with deltamethrin [15]. The Z-score normalized data between survivors receiving deltamethrin treatment and controls were examined using a *t*-test with FDR of 0.01 and  $S_0$  of 0.1. The result was used to compare the correspondence of markers in this study with those in a previous study

[15].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Overall results of the proteogenomic analysis

Currently, there is no available annotated genome for the pollen beetle. Thus, in this study, we used sequences retrieved from a transcriptome [11], similar to the method applied in our previous proteogenomic study. However, unlike that study, in which we annotated the identified proteins manually [15], we prepared the search database through automated BLASTp [35] annotation of the six-frame translated transcripts. Our in-house database for data search contained 45,540 blasted sequences out of a total of 168,384 examined sequences. An overview illustrating the annotation details and similarity with other organisms is provided in the Supplementary material (Figs. S2–S4). A search of the nLC-MS/MS results for 20 samples provided a dataset consisting of 3857 protein hits. Filtering rows (protein hits) with fewer than 3 positive values from this dataset narrowed the dataset to 2477 protein hits (Table S1), which were further processed. A general overview of the differences among the four proteomes is provided as a heatmap (Fig. 1A) and a PCA (Fig. 1B). Briefly, these visualizations indicate the following: (i) the proteomes of survivors after the *lambda*-cyhalothrin, thiacloprid and *lambda*-cyhalothrin with subsequent thiacloprid treatments differed considerably from those of untreated beetles; (ii) the thiacloprid and *lambda*-cyhalothrin treatments produced different proteomic changes, but in some aspects, the changes appeared to be similar; and (iii) the proteomes of the surviving beetles after *lambda*-cyhalothrin and subsequent thiacloprid treatment changed in a different direction from the changes observed when the pesticides were used individually, but it is difficult to exactly predict whether the resulting effect could be considered synergic, additive or antagonistic. For example, Liu et al. [36] reported, based on biotests conducted in the silkworm *Bombyx mori*, an additive effect from the combination of *lambda*-cyhalothrin and the neonicotinoid imidacloprid, despite most of the different combinations with pesticides that they tested being evaluated as synergic, and the effect of the chlorantraniliprole and imidacloprid mixture was evaluated as antagonistic [36]. To reveal the level of impact of the pesticides from our proteomic data, it was necessary to inspect changes in the protein markers or their groups (next section). Indeed, the survival data for combined *lambda*-cyhalothrin/thiacloprid in CompuSyn indicated an additive effect (Fig. 2).

### 3.2. Markers connected to survival after different pesticide treatments

To identify markers that might indicate the mechanisms responsible for survival of the pollen beetles, we performed a Spearman rank correlation analysis of proteome changes. The significant results (Table 1; for the complete results, see Table S1) in any of the three groups of survivors after treatments relative to the control untreated group of beetles clearly indicated that the lowest number of significant markers, that is, only one marker (Section 3.3), could be retrieved after thiacloprid treatment (THI in Table 1) and that the additional population selection by thiacloprid treatment after *lambda*-cyhalothrin (C  $\rightarrow$  T compared to CYH in Table 1) increased the number of significantly changed markers compared to treatment with *lambda*-cyhalothrin alone (CYH in Table 1). Twenty protein hits that were significant in both CYH and C  $\rightarrow$  T indicated that their change induced by *lambda*-cyhalothrin still occurs after the subsequent treatment with thiacloprid. Thus, this group of markers can be considered useful in the combined resistance to both pesticides. The group of 22 retrieved proteins that were significant in only the CYH treatment can be considered important or specific for *lambda*-cyhalothrin treatment, since this set of proteins was less important after the subsequent selection by thiacloprid. Finally, the group of 65 proteins that was significant in only the C  $\rightarrow$  T treatment can be considered to be induced or amplified by the pesticide interaction.

The resulting effect of the sequential use of these two insecticides appears to be additive, since the markers changed (increased or decreased) to some extent after both thiacloprid (THI) and *lambda*-cyhalothrin (CYH) treatment. Indeed, our assumption of the additive effect supports the results of biotest analyses (Fig. 2). The retrieved significant markers in C → T were generally amplified after the sequential use of *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid. These results together indicate that the tolerance to *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid in the tested population of pollen beetles had a collective basis. Overall, the number of significant markers was different for different treatments because most of the markers changed to different extents compared to the control. Thus, the indicated collective basis of resistance was present at a different level in each treatment due to different active substances and dosages.

Below, we provide the key markers that we selected to be the cause of resistance to the high doses of the tested pesticides. From the results in Table 1, it is apparent that detoxification enzymes were not found to be the major drivers (the corresponding changes in abundance were not among the highest) of survival under high doses of pesticides. Indeed, we stress that this result is valid for the stage at which the analysis was performed. We observed similarities to our previous study, which indicated the existence of new markers [15]. In further sections, we highlight those markers that we selected to be the most important for future investigations.

### 3.3. Pathogenesis-related protein 5-like/thaumatin-like proteins

When we considered the high-confidence (FDR = 0.01) results (Table 1), we found that the only significant marker after thiacloprid treatment-mediated selection was pathogenesis-related protein 5-like (PR5-like; Locus\_1055\_Transcript\_1\_1\_4). Importantly, this marker was also significant after the other two pesticide treatments (CYH and C → T). The abundance of another PR5-like isoform (Locus\_12694\_Contig1\_2) significantly increased after the deltamethrin treatment (Table S2), although in the dataset from our previous study [15], the

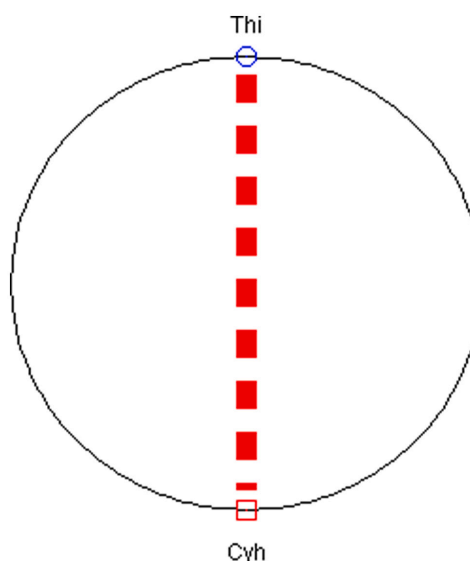


Fig. 2. Graphical representation of the CompuSyn analysis of survival data for the combined *lambda*-cyhalothrin/thiacloprid effect. The dashed red line clearly indicates the positive additive effect. A positive synergistic effect, if found, would be represented as a solid red line, and negative effects would be denoted in blue; however, these effects were not observed. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

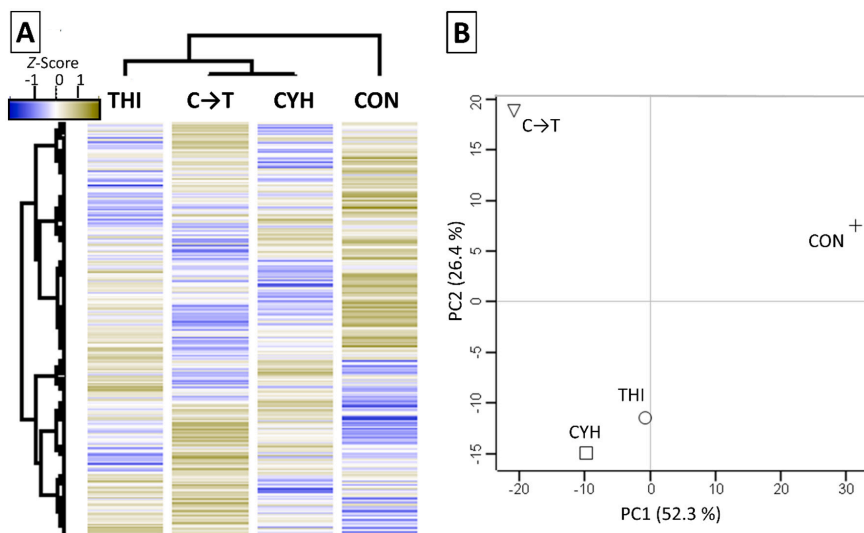


Fig. 1. Heatmap and PCA demonstrating the proteomic differences among the four analyzed treatments. A resulting (A) heatmap and (B) PCA were generated from the normalized and averaged (median) Z-score data. Both presentations indicate that the pollen beetles selected by the pesticide treatments differ from those in the control (CON) and that the survivors after thiacloprid (THI) treatment differ more from those selected by *lambda*-cyhalothrin (CYH) alone and beetles selected by *lambda*-cyhalothrin followed by thiacloprid (C → T). Moreover, thiacloprid treatment showed a weaker effect on proteomic changes compared to *lambda*-cyhalothrin treatment.

**Table 1**  
Significant (FDR of 0.01) protein markers obtained using Spearman rank correlation analysis.

C → T			CYH			THI			Fasta headers (only first header is provided; selected markers are in bold)
Sig.	-Log p	Dif.	Sig.	-Log p	Dif.	Sig.	-Log p	Dif.	
Yes	<b>7.01</b>	<b>2.42</b>	Yes	<b>5.37</b>	<b>1.95</b>	Yes	<b>6.44</b>	<b>2.10</b>	<b>Locus_1055_Transcript_1_1_4_pathogenesis-related protein 5-like</b>
Yes	4.30	2.42	Yes	3.62	1.77		3.02	1.65	Locus_511_Contig44_1 Paramyosin, long form
Yes	3.29	2.30	Yes	4.18	1.66		3.08	1.51	Locus_3137_Contig3_1 filamin-A isoform X3 ...
Yes	4.30	2.24	Yes	4.14	1.86		2.57	1.75	Locus_6122_Transcript_6_11_5 leucine-rich repeat-containing protein let-4 ...
Yes	3.23	2.14	Yes	3.82	1.75		4.06	2.02	Locus_364_Contig19_4 titin-like isoform X2
Yes	4.28	2.10	Yes	4.95	2.06		4.61	2.08	Locus_364_Contig19_5 titin isoform X3 ...
Yes	3.90	2.09	Yes	4.13	2.22		2.70	1.47	Locus_2123_Transcript_48_60_4 myosin heavy chain, muscle isoform X2 ...
Yes	5.19	2.05	Yes	3.75	1.95		1.54	1.22	Locus_259_Contig25_4 myosin heavy chain, muscle
Yes	4.05	1.98	Yes	4.22	2.11		3.02	1.77	Locus_493_Contig1_1 apical junction molecule isoform X5
Yes	<b>5.01</b>	<b>-1.81</b>	Yes	<b>6.54</b>	<b>-2.42</b>		<b>4.45</b>	<b>-1.92</b>	<b>Locus_3467_Transcript_27_64_1 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20-like ...</b>
Yes	4.55	-1.85	Yes	4.71	-2.27		2.83	-1.72	Locus_164_Contig2_2 lipid storage droplets surface-binding protein 1-like isoform X1
Yes	3.64	-1.86	Yes	3.95	-2.06		4.03	-2.11	Locus_10285_Contig1_2 probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 ...
Yes	3.44	-1.88	Yes	3.52	-2.12		1.84	-1.29	Locus_1409_Contig1_1 39S ribosomal protein L28, mitochondrial
Yes	<b>4.74</b>	<b>-1.90</b>	Yes	<b>4.57</b>	<b>-2.20</b>		<b>5.79</b>	<b>-2.13</b>	<b>Locus_2319_Contig9_3 ATP-dependent RNA helicase p62-like ...</b>
Yes	3.48	-1.97	Yes	3.60	-1.89		2.86	-1.94	Locus_23210_Contig1_1 26S proteasome regulatory subunit 6A-B
Yes	4.20	-2.08	Yes	5.07	-2.27		2.89	-1.35	Locus_6758_Contig1_1 insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
Yes	4.46	-2.17	Yes	4.10	-1.68		2.43	-1.84	Locus_2325_Contig10_2 probable phosphoserine aminotransferase ...
Yes	3.41	-2.23	Yes	3.97	-1.69		2.69	-1.56	Locus_5216_Contig1_4 hypoxia up-regulated protein 1
Yes	<b>5.36</b>	<b>-2.24</b>	Yes	<b>3.45</b>	<b>-1.97</b>		<b>6.02</b>	<b>-1.88</b>	<b>Locus_2319_Transcript_70_169_2 ATP-dependent RNA helicase p62-like ...</b>
Yes	6.23	-2.34	Yes	5.06	-2.15		4.01	-1.66	Locus_4047_Contig1_6 acyl-CoA Delta(11) desaturase-like ...
	2.99	1.49	Yes	5.07	2.33		4.10	1.98	Locus_79_Contig9_1 protein anoxia up-regulated isoform X4
	2.75	1.84	Yes	3.96	2.26		2.11	1.22	Locus_4737_Contig1_4 serine protease 55-like ...
	1.73	1.43	Yes	4.12	2.19		2.45	1.31	Locus_1129_Transcript_2_2_1 slit homolog 3 protein-like
	2.92	1.69	Yes	4.59	2.19		3.43	1.77	Locus_5590_Contig1_2 B1 protein-like ...
	1.18	1.04	Yes	4.01	2.18		3.21	1.72	Locus_79_Contig7_1 protein anoxia up-regulated isoform X3
	0.91	0.67	Yes	4.45	2.17		4.44	1.87	Locus_19042_Contig1_4 B1 protein-like
	1.74	1.44	Yes	3.89	2.13		2.91	1.51	Locus_3307_Contig3_2 gelsolin-like isoform X1 ...
	1.43	1.37	Yes	3.50	2.05		3.10	1.73	Locus_10599_Contig1_3 B1 protein-like
	1.90	1.27	Yes	3.60	2.03		2.80	1.76	Locus_4489_Contig2_5 transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
	1.53	1.35	Yes	3.99	1.90		0.92	0.78	Locus_2188_Transcript_66_143_4 paxillin isoform X1 ...
	1.31	1.55	Yes	3.74	1.73		2.32	1.08	Locus_514_Contig24_1 putative cysteine proteinase CG12163
	2.22	1.90	Yes	3.73	1.50		3.63	1.86	Locus_4052_Contig13_1 probable isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial isoform X2 ...
	2.45	-1.41	Yes	4.55	-1.58		1.59	-1.65	Locus_364_Contig5_5 26S proteasome regulatory subunit 6B
	0.00	0.00	Yes	3.75	-1.61		3.57	-1.46	Locus_5265_Transcript_3_6_2 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 ...
	1.25	-1.19	Yes	5.91	-1.78		1.25	-1.09	Locus_4072_Transcript_2_21_3 tumor protein D52 ...
	1.67	-1.33	Yes	3.72	-1.79		0.64	-0.71	Locus_3817_Contig11_3 NADP-dependent malic enzyme isoform X1 ...
	<b>3.03</b>	<b>-1.83</b>	Yes	<b>3.63</b>	<b>-2.05</b>		<b>0.64</b>	<b>-0.56</b>	<b>Locus_2319_Contig3_2 homocysteine S-methyltransferase 1-like</b>
	3.17	-1.76	Yes	4.06	-2.24		2.24	-1.58	Locus_3405_Contig13_6 Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1-like Protein ...
	<b>2.25</b>	<b>-1.32</b>	Yes	<b>4.81</b>	<b>-2.33</b>		<b>2.10</b>	<b>-1.05</b>	<b>Locus_13322_Transcript_1_3_3 ester hydrolase C11orf54 homolog isoform X2</b>
	1.70	-1.11	Yes	4.22	-2.35		1.91	-1.12	Locus_1209_Contig1_6 endoplasmic
	2.90	-1.62	Yes	5.25	-2.39		2.12	-1.08	Locus_6187_Contig2_2 mitochondrial-processing peptidase subunit alpha ...
	1.73	-0.80	Yes	3.85	-2.44		1.46	-0.75	Locus_2572_Contig7_4 Lysosomal aspartic protease ...
Yes	4.15	2.49		1.82	1.02		2.03	1.10	Locus_2377_Transcript_28_47_2 tropomyosin-2 isoform X13 ...
Yes	4.01	2.42		2.45	1.07		1.55	0.90	Locus_2508_Contig2_6 tropomyosin-1 ...
Yes	3.81	2.42		2.19	1.18		1.69	0.98	Locus_4542_Transcript_27_63_2 tropomyosin-1, isoforms 33/34 isoform X1 ...
Yes	3.90	2.40		2.44	1.38		2.56	1.41	Locus_7953_Contig1_5 laminin subunit alpha
Yes	3.79	2.39		1.70	1.01		2.21	0.95	Locus_5358_Contig3_6 coronin-6;Locus_5358_Contig2_5 coronin-6
Yes	3.68	2.38		2.29	1.22		1.61	1.05	Locus_3817_Contig5_1 NADP-dependent malic enzyme ...
Yes	3.80	2.35		1.97	1.30		1.18	0.92	Locus_2823_Transcript_71_125_4 troponin T, skeletal muscle isoform X6 ...
Yes	3.60	2.34		1.56	1.06		1.46	1.16	Locus_5297_Contig4_2 PDZ and LIM domain protein 3 isoform X2 ...
Yes	3.90	2.33		2.47	1.50		3.52	1.63	Locus_2597_Contig9_3 ras-related protein Rab-23 ...
Yes	4.72	2.33		2.84	1.59		2.74	1.63	Locus_2562_Contig1_5 ATP synthase subunit gamma, mitochondrial ...
Yes	4.34	2.30		1.20	0.75		1.05	0.66	Locus_9567_Contig2_1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC109544647 ...
Yes	4.58	2.30		1.18	0.93		1.24	0.71	Locus_5368_Contig1_2 microtubule-associated protein 1A isoform X2 ...
Yes	3.76	2.30		1.42	0.93		1.59	1.19	Locus_19089_Contig1_4 cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 ...
Yes	4.25	2.29		3.18	1.99		2.52	1.20	Locus_2110_Contig9_2 obscurin isoform X4
Yes	3.97	2.29		1.87	1.25		2.04	1.15	Locus_3482_Contig5_3 spectrin beta chain isoform X1 ...
Yes	3.74	2.29		2.16	1.35		1.68	1.20	Locus_511_Contig46_3 delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial
Yes	3.99	2.27		2.92	1.33		1.08	0.66	Locus_7526_Contig2_4 protein msta-like ...
Yes	3.53	2.24		2.77	1.47		1.01	0.82	Locus_6911_Contig2_3 PREDICTED: uncharacterized protein LOC109595226 ...
Yes	3.97	2.22		0.88	0.64		1.26	0.71	Locus_2959_Transcript_36_60_2 spectrin alpha chain isoform X1
Yes	3.91	2.21		1.25	0.94		0.84	0.77	Locus_13577_Contig1_4 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7 ...
Yes	3.55	2.21		3.16	1.90		2.18	1.17	Locus_5235_Contig2_6 PDZ and LIM domain protein Zasp isoform X1 ...
Yes	3.61	2.21		3.39	1.86		2.50	1.49	Locus_259_Contig29_2 myosin heavy chain, muscle ...
Yes	4.14	2.21		3.39	1.04		1.39	1.23	Locus_4_Contig2_3 lamin Dm0-like ...
Yes	3.59	2.20		2.95	1.78		3.34	1.96	Locus_6061_Transcript_4_7_6 UNC93-like protein
Yes	3.92	2.20		2.41	1.66		1.73	1.23	Locus_2494_Contig2_5 alpha-actinin, sarcomeric isoform X1 ...
Yes	3.83	2.19		1.31	0.52		0.41	0.38	Locus_2538_Contig4_2 flightin ...
Yes	3.24	2.18		2.88	1.79		2.86	1.79	Locus_511_Transcript_258_305_4 paramyosin, long form-like ...
Yes	3.40	2.17		0.50	0.29		1.23	0.61	Locus_6964_Contig5_5 failed axon connections isoform X1 ...
Yes	4.50	2.14		3.03	1.54		2.16	1.65	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

C → T			CYH			THI			Fasta headers (only first header is provided; selected markers are in bold)
Sig.	-Log p	Dif.	Sig.	-Log p	Dif.	Sig.	-Log p	Dif.	
Yes	3.91	2.14	1.18	0.78		1.21	1.02		Locus_4526_Contig3.5 transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein-like isoform X2 ...
Yes	4.10	2.11	2.21	1.23		1.89	1.55		Locus_5765_Contig2.1 PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC109601562 ...
Yes	3.89	2.09	2.19	1.70		1.82	0.88		Locus_18888_Contig1.3 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial
Yes	3.36	2.08	1.27	0.96		1.18	1.15		Locus_4634_Contig1.1 Actin, muscle ...
Yes	3.41	2.07	3.02	1.77		1.52	1.10		Locus_6175_Transcript_16_19_2 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha isoform X9
Yes	3.20	2.07	2.37	1.62		2.07	1.48		Locus_95_Contig10.6 ADP,ATP carrier protein ...
Yes	4.65	2.05	1.82	1.53		3.39	1.87		Locus_3907_Contig5.2 annexin B9 isoform X1 ...
Yes	3.44	1.94	1.29	0.80		0.44	0.50		Locus_23210_Contig1.2 26S proteasome regulatory subunit 6A-B
Yes	3.37	1.91	0.21	0.25		0.46	0.35		Locus_8470_Transcript_1_1_3 sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2
Yes	3.52	1.89	0.17	0.21		0.72	0.69		Locus_4635_Contig1.5 limbic system-associated membrane protein-like isoform X1 ...
Yes	3.71	1.89	1.74	0.77		0.15	0.23		Locus_7914_Contig1.5 ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
Yes	3.35	1.82	0.27	-0.23		2.20	1.18		Locus_4287_Contig4.3 neuronal calcium sensor 2 ...
Yes	3.46	1.79	2.76	1.75		2.65	1.88		Locus_7825_Transcript_11_11_2 F-actin-capping protein subunit alpha ...
Yes	3.57	1.78	0.06	-0.05		0.19	0.26		Locus_8481_Contig2.2 PREDICTED: uncharacterized protein LOC109597034 ...
Yes	3.65	1.75	0.90	0.78		1.61	1.56		Locus_2610_Contig6.3 myosin regulatory light chain 2 ...
Yes	3.96	1.69	2.09	1.27		0.52	0.69		Locus_8111_Contig2.6 phosphoglycerate mutase 1
Yes	3.95	1.62	3.06	1.55		0.94	1.14		Locus_6661_Contig1.3 muscle M-line assembly protein unc-89-like isoform X1
Yes	3.70	1.52	0.41	0.51		3.64	1.81		Locus_12746_Contig1.2 protein deglycase DJ-1
Yes	3.43	-1.64	2.97	-1.77		1.75	-1.67		Locus_5543_Contig4.1 probable salivary secreted peptide ...
Yes	3.37	-1.77	0.12	0.07		3.31	-1.66		Locus_2645_Transcript_24_24_6 importin-5;Locus_2645_Contig5.6 importin-5
Yes	3.78	-1.83	2.95	-1.50		2.41	-1.92		Locus_3921_Contig1.6 very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase
Yes	4.07	-1.88	1.85	-1.30		1.02	-0.95		Locus_2325_Transcript_102_160_1 probable phosphoserine aminotransferase ...
Yes	4.77	-1.90	1.84	-1.47		1.26	-1.09		Locus_514_Contig22.6 seipin ...
Yes	3.80	-1.95	2.49	-1.33		2.14	-1.81		Locus_1039_Contig1.5 endoplasmic reticulum resident protein 44 ...
Yes	4.60	-1.97	3.35	-2.15		1.98	-1.00		Locus_5258_Contig3.1 glycolipid N-tetradecanoyltransferase 1 ...
Yes	3.54	-1.98	2.25	-1.64		3.20	-2.05		Locus_6758_Contig1.2 insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
Yes	3.24	-1.98	1.02	-0.58		0.60	-0.67		Locus_7147_Contig1.6 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12
Yes	3.30	-2.04	3.27	-1.60		1.21	-1.11		Locus_3920_Contig6.3 protein transport protein Sec24C ...
Yes	4.59	-2.06	1.49	-0.79		2.00	-1.67		Locus_6558_Contig3.3 putative serine protease K12H4.7 ...
Yes	3.87	-2.09	2.11	-1.63		2.66	-0.90		Locus_5625_Contig3.2 fatty acid synthase-like
Yes	4.39	-2.17	3.07	-1.71		3.09	-1.83		Locus_3486_Contig5.2 protein sel-1 homolog 1 isoform X1 ...
Yes	3.55	-2.19	2.39	-1.63		2.01	-1.49		Locus_2493_Transcript_24_40_3 elongation factor 1-gamma ...
Yes	3.95	-2.22	3.25	-1.40		2.18	-1.73		Locus_3152_Contig3.5 clustered mitochondria protein homolog isoform X1 ...
Yes	3.35	-2.27	2.44	-1.76		2.22	-1.38		<b>Locus_2319_Contig16.1 ATP-dependent RNA helicase p62-like ...</b>
Yes	4.51	-2.40	1.66	-1.00		1.99	-1.00		Locus_2577_Contig14.2 dnaJ homolog subfamily A member 2-like ...
Yes	5.08	-2.43	2.92	-1.66		3.94	-1.69		Locus_2316_Contig11.2 heat shock 70 kDa protein cognate 4
									Locus_4854_Contig2.2 mitochondrial uncoupling protein 4 ...

Only high-confidence (FDR = 0.01) results are shown. The data processed using Spearman rank correlation were normalized through the Z-score. The full list of identified protein markers with at least three positives among all 20 samples analyzed using nLC-MS/MS, low-confidence results (FDR = 0.05) and high-confidence results (FDR = 0.01), and details on the protein IDs and FASTA headers are given in Table S1. Legend: Sig. – Significant; Dif. – Difference of the treatment compared to the control treatment.

PR5-like isoform Locus\_1055\_Transcript\_1\_1\_4 was not significantly changed (Table S2). Thus, different PR5-like can change with different pesticide treatments or pollen beetle populations. The PR5 protein is a thaumatin family protein (TLP) according to CCDs. PR5 proteins are well known to be responsive to abiotic and biotic stress, including disease resistance in plants, but they were also identified as being important in fungi and animals. In addition, these proteins appear to be universal among eukaryotes [37–39]. We emphasized that PR5 is responsive to deltamethrin pesticide treatment in our previous study [15]. This study indicates that it would be interesting to examine the role of PR5/TLRs-like in response (resistance/tolerance) to pesticides. The role of PR5/TLRs in multiple resistance or at least their role in tolerance to stress can be proposed. Finally, note that additional thaumatin-like proteins were identified using the proteogenomic approach in our studies (this study and [15]). For instance, we found significant change for Locus\_13237\_Contig1\_1 thaumatin-like protein 1 (Table S2), although significant change was not observed due to the three treatments measured in this study (Table 1; Table S1).

#### 3.4. Detoxification enzymes: the putative ester hydrolase C11orf54

The resistance markers considered to be of common interest are

potent detoxification enzymes of different classes that are generally overexpressed under pesticide treatment. In this study, we found a high-confidence (FDR = 0.01) significantly changed (decreased) abundance of the ester hydrolase C11orf54 homolog (Locus\_13322\_Transcript\_1\_3\_3) after *lambda*-cyhalothrin treatment. Although esterases were previously shown to play only a limited role in some populations [40,41], their detoxification potency should not be underestimated, because if the ester bond is cleaved, pyrethroids should be deactivated. This is important because the nonester pyrethroid etofenprox has been observed to be more efficient in the control of pollen beetle than the ester pyrethroids that include *lambda*-cyhalothrin, *alpha*-cypermethrin and deltamethrin [21,23,24]. The role of esterases in the tolerance/resistance to ester pyrethroids might be considered generally to be disruption of the ester bond, which is, however, different from the effect if the target is a nonester pyrethroid.

#### 3.5. Detoxification enzymes: CYPs

One of the detoxification enzyme types generally considered to be a key participant in detoxification and pesticide resistance is CYPs. Despite being different from esterases (Section 3.4), CYPs are not limited to the ester bond present in the ester pyrethroids; it is necessary to



consider their supposed high specificity toward any target. Thus, different CYPs can contribute to tolerance/resistance to various pesticides within just a single class. In this regard, it is important that no CYP was significant among the high-confidence (FDR = 0.01) markers presented in Table 1. However, it is notable that CYP9Z40 was significant at the low-confidence level (FDR = 0.05; see CYP9Z40\_2 cytochrome P450 9e2-like in Table S1), and its abundance was higher in all three treatments compared to the control. Previous studies showed CYP6BQ23 to be highly upregulated at the transcript level [10,11]. However, in our dataset, CYP6BQ23 was not on the list of proteins after the data were filtered (Table S1), despite it being in the database search list. In our previous study [15], deltamethrin treatment did not significantly change the abundance of CYP6BQ23 in survivors compared to the control, but its abundance was lower in the dead/tremor beetles [15]. Thus, the lower abundance of CYP6BQ23 in individual insects that did not overcome deltamethrin treatment may be one of the factors playing a role in pollen beetle resistance to pyrethroids [15]. Reanalysis of the data from the previous proteogenomic study (Table S2) confirmed that in that experiment, CYP6BQ23 did not significantly change in survivors of deltamethrin treatment compared to the control; however, the deltamethrin treatment increased the abundance of another CYP, denoted as CYP9Z42 or cytochrome P450 9e2-like (See Table S2). Thus, there is a similarity with the abovementioned CYP9Z40, and according to the proteomic results, we can highlight these CYPs or similar CYPs.

Overall, in the explanation of why we did not find CYP6BQ23 to be important in driving the resistance in our experiments, it is appropriate to consider the following factors. Transcriptomic and proteomic data can provide different results due to differing durability of proteins and transcripts, the post transcription machinery and post translational modifications [42,43]. The results can be affected by the experimental design; however, there can still be poor or no correlations between transcriptomic and proteomic data, even when the data are obtained under same conditions [43]. Further, it is important to consider that the key factors could differ among different populations of pollen beetles. Thus, populations can differ in their responses and abundances of transcripts and proteins, including isoforms, due to different phenotypes, which is an effect closer to the proteome than to the transcriptome or genome [44].

### 3.6. Epigenetic markers in resistance/tolerance

Among the various mechanisms of resistance in pollen beetle, we previously stressed the potential of epigenetic mechanisms in the resistance/tolerance to pesticides [15]. Epigenetic processes may also importantly affect the development of insecticide resistance; however, a report subsequent to our study indicated that relevant knowledge of the epigenetic role in insecticide resistance is scarce [45]. For example, the epigenetic mechanism by which hypomethylation is connected to atrazine removal in a paddy crop has been indicated [46]. In this regard, O-methyltransferase in yeast cells was indicated as facilitating atrazine metabolism and elimination [47]. Indeed, the changes in proteins affected methylation after deltamethrin treatment of pollen beetles, as we have previously indicated [15]. Here, we stress that homocysteine S-methyltransferase 1-like was significant after *lambda*-cyhalothrin treatment (Table 1). Indeed, the key factor among the epigenetic markers in this study that we highlight is the DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20-like (DEAD20) and three isoforms of the ATP-dependent RNA helicase p62-like (Rm62) (Table 1). In general, RNA helicases are associated with the lifespan of RNAs. RNA helicases are involved in gene expression and function as drivers of mRNA processing to translationally active mRNAs [48–50]. The change in DEAD-box helicases has been linked to the stress response [50–52]. Indeed, *Drosophila* Rm62 is also a conserved ATP-dependent RNA helicase DEAD-box protein [53]. Here, we observed the downregulation of these RNA helicases after pesticide treatment compared to the control, and the results in Table 1 are significant for CYH and/or C → T. The downregulation of DEAD20/Rm62

by deltamethrin treatment in pollen beetles has previously been observed [15]. The regulation of DEAD-box helicases as epigenetic markers can be a key factor in the response to multiple stresses. Whether or how these markers are linked to the other observed changes, especially the upregulation of PR5 due to pesticide exposure, remains an open question.

## 4. Conclusions

In this study, we demonstrate the use of a high-throughput proteogenomic approach to identify markers that could play key roles in the resistance/tolerance of pollen beetles to different pesticides. Here, we used *lambda*-cyhalothrin and thiacloprid treatments and their sequential use. The results indicated an additive effect when the pollen beetle population was selected with *lambda*-cyhalothrin and further treated with thiacloprid. The results indicated that proteins identified as PR5 could play an important role in the resistance/tolerance to pyrethroid and/or neonicotinoid treatment. Furthermore, we identified an epigenetic background for the response to pesticide treatment. In addition to PR5, we highlight the role of RNA helicases (DEAD-box proteins) as drivers of pesticide tolerance, which is similar to the result of our previous study in which pollen beetles were treated with deltamethrin. We also show that there is a metabolic connection to survival, but we identified markers of lower significance and/or different markers (different CYPs; esterase) compared to other studies. This conclusion is similar to that of our earlier proteogenomic study. This may be due to differences in biological experiments as well as observations at the proteome level. Our data indicate multiresistance adaptations to pesticide treatments. The mechanisms appear to be regulated by epigenetic drivers; however, the details need to be further explained. Accordingly, this study indicates the importance of studying the genetic background of the populations (epistasis).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104086>.

### Availability of data and materials

The accession number for the raw nLC-MS/MS runs reported in this paper is MassIVE MSV000086597 (doi: 10.25345/C5D50Z). Furthermore, we provide the entire “combined/txt” folder from MaxQuant data processing and the protein database used for the search (45540seq\_blast2go\_fasta) for download.

### Declaration of competing interest

The authors declare that there are no competing financial interests.

### Data availability

The accession number for the raw nLC-MS/MS runs reported in this paper including “combined/txt” folder from MaxQuant and search database is MassIVE MSV000086597 (doi: 10.25345/C5D50Z).

### Acknowledgment

We thank Martin Markovic and Julie Chalupnikova for providing valuable assistance.

### Author contributions

F.K. and J.S. conceived and designed the biological study. T.H. and F.K. performed the biological experiment. P.T. and K.H. performed mass spectrometry analysis. B.S. performed the CompuSyn analysis and prepared Fig. 2. T.E. wrote the main manuscript, performed annotations, evaluated the data and prepared the figures and tables. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

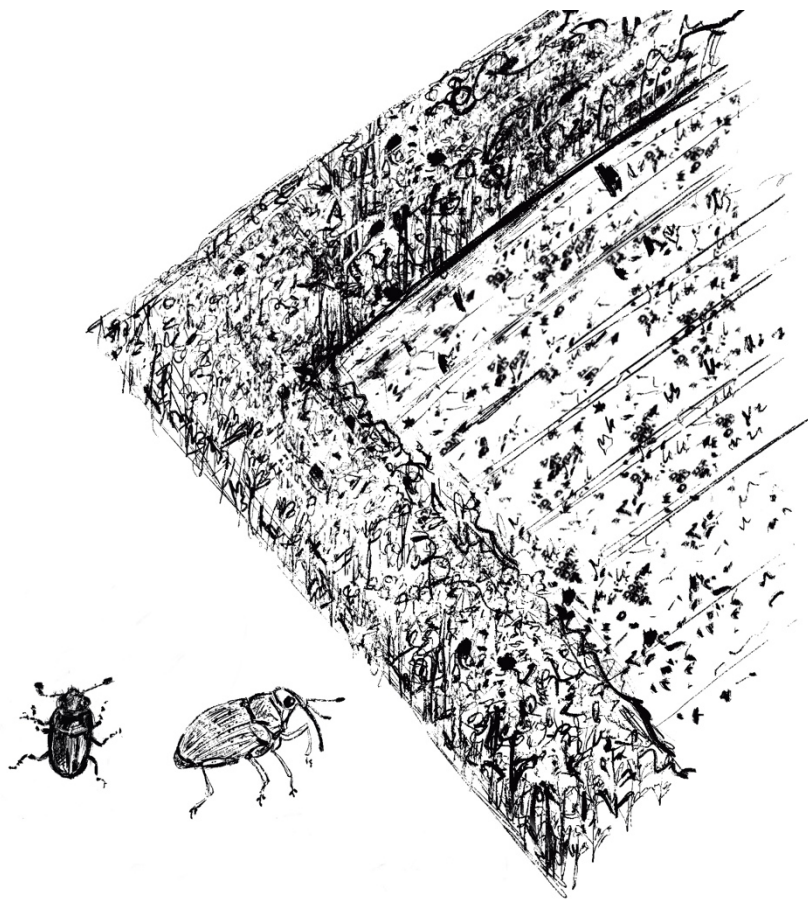


## Funding

This study was supported by grant No. QK1820081 from NAZV, which is the Grant Agency of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (<http://eagri.cz/>).

## References

- [1] H.C. Godfray, J.R. Beddington, I.R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J.F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S.M. Thomas, C. Toulmin, Food security: the challenge of feeding 9 billion people, *Science* 327 (2010) 812–818.
- [2] N.J. Hawkins, C. Bass, A. Dixon, P. Neve, The evolutionary origins of pesticide resistance, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 94 (2018) 135–155.
- [3] J.E. Casida, Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 609–619.
- [4] L.M. Hansen, Economic damage threshold model for pollen beetles (*Meligethes aeneus* F.) in spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) crops, *Crop Prot.* 23 (2004) 43–46.
- [5] W. Friedt, J. Tu, T. Fu, Academic and economic importance of *Brassica napus* rapeseed, in: S. Liu, R. Snowdon, B. Chaloub (Eds.), *The Brassica napus Genome*, Springer Nature Switzerland, Cham, 2018, pp. 1–20.
- [6] Y. Ballanger, D. Detourne, Pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) insecticide resistance on winter oilseed rape: conclusions after a twelve-year monitoring, in: AFPP – Neuvieme Conference internationale sur les ravageurs en agriculture Montpellier – 26 et 27 Octobre 2011, AFPP, Alfortville, 2011, pp. 131–140 (in French with English summary).
- [7] C.T. Zimmer, R. Nauen, Pyrethroid resistance and thiacloprid baseline susceptibility of European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) collected in winter oilseed rape, *Pest Manag. Sci.* 67 (2011) 599–608.
- [8] R. Nauen, C.T. Zimmer, M. Andrews, R. Slater, C. Bass, B. Ekbohm, G. Gustafsson, L. M. Hansen, M. Kristensen, C.P.W. Zebitz, M.S. Williamson, Target-site resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus* F., *Pestic. Biochem. Physiol.* 103 (2012) 173–180.
- [9] C.T. Zimmer, R. Nauen, Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae), *Pestic. Biochem. Physiol.* 100 (2011) 264–272.
- [10] C.T. Zimmer, C. Bass, M.S. Williamson, M. Kaussmann, K. Wolfel, O. Gutbrod, R. Nauen, Molecular and functional characterization of CYP6BQ23, a cytochrome P450 conferring resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45 (2014) 18–29.
- [11] C.T. Zimmer, F. Maiwald, C. Schorn, C. Bass, M.-C. Ott, R. Nauen, A *de novo* transcriptome of European pollen beetle populations and its analysis, with special reference to insecticide action and resistance, *Insect Mol. Biol.* 23 (2014) 511–526.
- [12] G.-R. Samanitsidis, R. Panteleri, S. Denecke, S. Kounadi, I. Christou, R. Nauen, V. Douris, J. Vontas, ‘What I cannot create, I do not understand’: functionally validated synergism of metabolic and target site insecticide resistance, *Proc. Biol. Sci.* 287 (2020), 20200838.
- [13] M.C. Hardstone, J.G. Scott, A review of the interactions between multiple insecticide resistance loci, *Pestic. Biochem. Physiol.* 97 (2010) 123–128.
- [14] A.S. Juhel, C.M. Barbu, P. Franck, J. Roger-Estrade, A. Butier, M. Bazot, M. Valantin-Morison, Characterization of the pollen beetle, *Brassicoglyphus aeneus*, dispersal from woodlands to winter oilseed rape fields, *PLoS One* 12 (2017), e0183878.
- [15] T. Erban, K. Harant, J. Chalupnikova, F. Kocourek, J. Stara, Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: an in-depth proteomic study employing a transcriptome database, *J. Proteome* 150 (2017) 281–289.
- [16] D.M. Richardson, Summary of findings from a participant country pollen beetle questionnaire, *EPPD Bull.* 38 (2008) 68–72.
- [17] M. Brandes, U. Heimbach, B. Ulber, Effects of thiacloprid, tau-fluvalinate and lambda-cyhalothrin on overwintered pollen beetles (*Brassicoglyphus aeneus* (Fabricius)) and their offspring in oilseed rape, *Arthropod Plant Interact.* 12 (2018) 823–833.
- [18] I.H. Williams, The major insect pests of oilseed rape in Europe and their management: an overview, in: I.H. Williams (Ed.), *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*, Springer, Dordrecht, 2010, pp. 1–43.
- [19] K. Ratajczak, H. Sulewska, G. Szymanska, New winter oilseed rape varieties – seed quality and morphological traits depending on sowing date and rate, *Plant Prod. Sci.* 20 (2017) 262–272.
- [20] C. Kaiser, K.-M.V. Jensen, R. Nauen, M. Kristensen, Susceptibility of Danish pollen beetle populations against lambda-cyhalothrin and thiacloprid, *J. Pest. Sci.* 91 (2018) 447–458.
- [21] J. Stara, F. Kocourek, Seven-year monitoring of pyrethroid resistance in the pollen beetle (*Brassicoglyphus aeneus* F.) during implementation of insect resistance management, *Pest Manag. Sci.* 74 (2018) 200–209.
- [22] M. Brandes, U. Heimbach, Pyrethroid resistance of insect pests of oilseed rape in Germany, *IOBC-WPRS Bull.* 136 (2018) 69–72.
- [23] R. Smatas, V. Makunas, I. Brazauskienė, E. Petraitiene, Sensitivity of pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to insecticides with different modes of action and their efficacy in the field conditions, *Zemdirbyste-Agriculture* 99 (2012) 197–202.
- [24] V. Makunas, I. Brazauskienė, R. Smatas, Resistance of *Meligethes aeneus* to pyrethroids in Lithuania, *Zemdirbyste-Agriculture* 98 (2011) 431–438.
- [25] S. Wu, Y. Nomura, Y. Du, B.S. Zhorov, K. Dong, Molecular basis of selective resistance of the bumblebee B1Na<sub>1</sub> sodium channel to tau-fluvalinate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 12922–12927.
- [26] IRAC, IRAC Susceptibility Test Method 011 (Version 3, June 2009), Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), 2009. <https://irac-online.org/methods/meligethes-aeneus-adults/>. Accessed date: 8 December 2020.
- [27] IRAC, IRAC Susceptibility Test Method 021 (Version 3.4, October 2011), Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), 2011. <https://irac-online.org/methods/pollen-beetle-adults/>. Accessed date: 8 December 2020.
- [28] T.-C. Chou, Preclinical versus clinical drug combination studies, *Leuk. Lymphoma* 49 (2008) 2059–2080.
- [29] T.-C. Chou, Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method, *Cancer Res.* 70 (2010) 440–446.
- [30] T. Erban, B. Sopko, P. Talacko, K. Harant, K. Kadlikova, T. Halesova, K. Riddellova, A. Pekas, Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis, *J. Proteome* 196 (2019) 69–80.
- [31] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R.A. Scheltema, J.V. Olsen, M. Mann, Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 1794–1805.
- [32] J. Cox, M.Y. Hein, C.A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ, *Mol. Cell. Proteomics* 13 (2014) 2513–2526.
- [33] S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M.Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox, The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data, *Nat. Methods* 13 (2016) 731–740.
- [34] V.G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 5116–5121.
- [35] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [36] Y. Liu, H. Zhang, F. He, X. Li, H. Tan, D. Zeng, Combined toxicity of chlorantraniliprole, lambda-cyhalothrin, and imidacloprid to the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 22598–22605.
- [37] R.G.J. Shatters, L.M. Boykin, S.L. Lapointe, W.B. Hunter, A.A. Weathersbee, Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa, *J. Mol. Evol.* 63 (2006) 12–29.
- [38] B. Petre, I. Major, N. Rouhier, S. Duplessis, Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar, *BMC Plant Biol.* 11 (2011) 33.
- [39] G.R. Faillace, A.C. Turchetto-Zolet, F.L. Guzman, L.A. de Oliveira-Busatto, M. H. Bonadese-Zanettini, Genome-wide analysis and evolution of plant thaumatin-like proteins: a focus on the origin and diversification of osmotins, *Mol. Gen. Genomics* 294 (2019) 1137–1157.
- [40] D. Philippou, L.M. Field, P. Wegorek, J. Zamojska, M.C. Andrews, R. Slater, G. D. Moore, Characterising metabolic resistance in pyrethroid-insensitive pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) from Poland and Switzerland, *Pest Manag. Sci.* 67 (2011) 239–243.
- [41] J. Zamojska, P. Wegorek, M. Mrowczynski, Susceptibility level of the pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to selected pyrethroids in Poland, and resistance mechanisms of the pest to deltamethrin, *J. Plant Prot. Res.* 53 (2013) 89–95.
- [42] P.S. Hegde, I.R. White, C. Debouck, Interplay of transcriptomics and proteomics, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 647–651.
- [43] S. Haider, R. Pal, Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data, *Curr. Genomics* 14 (2013) 91–110.
- [44] A.P. Diz, M. Martinez-Fernandez, E. Rolan-Alvarez, Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype, *Mol. Ecol.* 21 (2012) 1060–1080.
- [45] A.-M. Oppold, R. Muller, Epigenetics: a hidden target of insecticides, *Adv. Insect Physiol.* 53 (2017) 313–324.
- [46] L.Y. Ma, N. Zhang, J.T. Liu, X.Y. Zhai, Y. Lv, F.F. Lu, H. Yang, Uptake of atrazine in a paddy crop activates an epigenetic mechanism for degrading the pesticide in plants and environment, *Environ. Int.* 131 (2019) 105014.
- [47] Y.C. Lu, S.J. Feng, J.J. Zhang, F. Luo, S. Zhang, H. Yang, Genome-wide identification of DNA methylation provides insights into the association of gene expression in rice exposed to pesticide atrazine, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18985.
- [48] C.F. Bourgeois, F. Mortreux, D. Auboeuf, The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 426–438.
- [49] E. Jankowsky, M.E. Fairman, RNA helicases – one fold for many functions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 316–324.
- [50] S. Barak, N.S. Yadav, A. Khan, DEAD-box RNA helicases and epigenetic control of abiotic stress-responsive gene expression, *Plant Signal. Behav.* 9 (2014), e977729.
- [51] P. Kant, S. Kant, M. Gordon, R. Shaked, S. Barak, STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate *Arabidopsis* responses to multiple abiotic stresses, *Plant Physiol.* 145 (2007) 814–830.
- [52] P. Linder, E. Jankowsky, From unwinding to clamping – the DEAD box RNA helicase family, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 505–516.
- [53] InterPro, ATP-Dependent RNA Helicase DEAD-Box, Conserved Site: IPR000629: RNA-Helicase DEAD-Box\_CS, EMBL’s European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Hinxton, 2020. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR000629/>. Accessed date: 30 August 2020.



### 4.3 Rozdílná atraktivita odrůd řepky jako potenciální nástroj ochrany proti blýskáčku řepkovému a krytonosci šešulovému

**Výstup C:** Hovorka T, Saska P, Stará J, Kocourek F. 2021b. Attractiveness of oilseed rape cultivars to *Brassicoglyphus aeneus* and *Ceutorhynchus obstrictus* as a potential control strategy. *Plant, Soil and Environment* **67** (2021):608–615. DOI: [10.17221/367/2021-pse](https://doi.org/10.17221/367/2021-pse). (IF 2,328)

#### Příspěvní autora:

Autor provedl sběr vzorků v terénu, identifikaci materiálu v laboratoři a přípravu dat pro statistické zpracování. Podílel se hlavní měrou na sepsání finální verze rukopisu práce včetně vypořádání připomínek recenzentů. Autor se nepodílel na statistickém zpracování dat.

#### 4.3.1 Charakteristika problematiky

Řepka olejka patří nejen v České republice k základním a nejvíce pěstovaným plodinám. V osevních postupech současného zemědělství zaujímá nezastupitelné místo jak z hlediska jejích zlepšujících vlastností pro půdu, tak z hlediska výnosového a ekonomického pro její pěstitele. Úspěch pěstování řepky v dnešní době značně závisí na použití pesticidů proti škodlivým organismům. Pesticidy však nejsou většinou aplikovány ve správný čas tak, aby efektivně potlačily škodlivý organismus, což vede často k jejich nadužívání a v důsledku také ke vzniku rezistence. Problém rezistence je značný hlavně u hmyzích škůdců řepky. Příkladem může být blýskáček řepkový, u kterého byla díky jejich nadužívání prokázána vysoká míra rezistence k pyrethroidům a také snížená citlivost vůči ú.l. thiaklopid. Nadužívání a nesprávná aplikace pesticidů vede také k úbytku biologické rozmanitosti v zemědělské krajině. Možnostmi, jak minimalizovat množství používaných pesticidů a jejich dopad na necílové organismy mohou být změny ve vlastnostech odrůd řepky a také změny v pěstebních technologiích. Příkladem může být modifikace barvy květu, která významně ovlivňuje chování hmyzu vázaného na řepku. Cílem této práce bylo v maloplošných polních pokusech zjistit preferenci blýskáčka řepkového a krytonosce šešulového pro bílé a žlutě kvetoucí odrůdy řepky s rozdílnou fenologií. Na základě výsledků preferencí škůdců navrhnout potenciální využití bílé kvetoucí odrůdy řepky

v rámci pěstební technologie „push-pull“ (např. využití lapacích/atraktivních rostlin na okraji pole).

### 4.3.2 Metodický postup

Polní pokusy probíhaly v jarním období v letech 2015-2018 na experimentálních pozemcích Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i v Praze-Ruzyni. Pro simulaci typického osevního postupu v intenzivní zemědělské krajině byl zvolen osevní postup řepka-obilniny-řepka-obilniny. Řepka byla tedy na stejném pozemku každý druhý rok. Tři pokusné parcely, každá o velikosti 0,4 ha, se nacházejí v blízkosti ovocných sadů (převážně jabloně) a polí s okopaninami. Pro účely experimentu byly vybrány tři odrůdy řepky, dvě žlutě kvetoucí s odlišnou fenologií: DK Exssence (časnější) a DK Sensei (pozdnější) a jedna bíle kvetoucí odrůda s pozdnější fenologií: Witt. Pokusná pole byla ponechána bez insekticidního ošetření, což umožnilo přirozené osídlení porostů hmyzem. Agrotechnické zásahy byly obvyklé se standartním herbicidním ošetřením na podzim preemergentně i postemergentně.

Jako modelové druhy škůdců, kteří jsou lákáni barvou květu a fenologií řepky, byly zvoleni blýskáček řepkový a krytonosec šešulový. Pro odběr vzorků hmyzu byly na všech parcelách zvoleny dvě metody: přímý odpočet jedinců (pouze blýskáček) a sběr pomocí entomologického smýkadla (oba druhy). Odběry vzorků v rámci parcel byly opakovány pro každou odrůdu řepky. Přímé odpočty blýskáčků probíhaly každý rok (2016-2018) od jejich prvního výskytu ve žlutých miskách (monitoring první letové aktivity). Brouci byli sklepáváni z 25 náhodně vybraných rostlin v rámci každé odrůdy na kus bílého papíru a následně byl zapsán jejich počet. Počet dnů s odečty se lišil v rámci každé sezóny s ohledem na délku kvetení řepky. Odběry vzorků metodou smýkání byly prováděny od půlky dubna do konce května v závislosti na délce kvetení řepky. Smýkání probíhalo pouze za dobrého počasí (slunečno/polojasno a teplota  $>10$  °C), kdy je aktivita hmyzu nejvyšší. Každý vzorek pocházel ze 75 smyků (25 smyků x 3 opakování) na každé odrůdě. Označené nasbírané vzorky byly ihned transportovány do laboratoře a zamrazeny v platových sáčkách ( $-32$  °C) dokud nebyly rozebrány. V laboratoři byly vzorky následně rozebrány a spočítáno zastoupení škůdců na jednotlivých odrůdách. Pro identifikaci druhů bylo využito stereomikroskopu a příslušné literatury.

Data z přímých odpočtů byla zpracována pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Data z odběrů pomocí smýkání byla analyzována s využitím zobecněných lineárních modelů (GLMs). Procentuální rozdíl v početnosti škůdců mezi jednotlivými odrůdami byl odhadnut

na základě zobecněného modelu se smíšeným efektem s negativním binomickým rozdělením chyb (balíček lme4). Významnost termínů odběru vzorků byla posouzena na základě testu poměru pravděpodobnosti  $X^2$  (balíček car). Veškeré analýzy byly provedeny v prostředí programu R.

## Attractiveness of oilseed rape cultivars to *Brassicogethes aeneus* and *Ceutorhynchus obstrictus* as a potential control strategy

TOMÁŠ HOVORKA<sup>1,2\*</sup>, PAVEL SASKA<sup>3</sup>, JITKA STARÁ<sup>2</sup>, FRANTIŠEK KOCOUREK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Integrated Crop Protection against Pests, Crop Research Institute, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Function of Invertebrate and Plant Biodiversity in Agrosystems, Crop Research Institute, Prague, Czech Republic

\*Corresponding author: [hovorkarl@gmail.com](mailto:hovorkarl@gmail.com)

**Citation:** Hovorka T., Saska P., Stará J., Kocourek F. (2021): Attractiveness of oilseed rape cultivars to *Brassicogethes aeneus* and *Ceutorhynchus obstrictus* as a potential control strategy. *Plant Soil Environ.*, 67: 608–615.

**Abstract:** The abundances of two pests, pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* (Fabricius, 1775)) and cabbage seed weevil (*Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham, 1802)), were measured before flowering and in the full bloom of oilseed rape cultivars with different phenologies (two yellow-flowering: DK Exsistence (the earliest), DK Sensei (the latest) and one white-flowering in time between yellow-flowering cultivars), and the differences in their abundance in the selected cultivars were determined in plot experiments during 2015–2018. No significant differences in pollen beetle and cabbage seed weevil occurrence were observed between the cultivars in the pre-flowering period, but during flowering, the two yellow-flowering cultivars were more attractive than the white-flowering cultivar for both pests. In the white-flowering cultivar, 57% and 69% reductions in the pollen beetle and cabbage seed weevil populations, respectively, were found relative to the two with yellow flowers. Thus, the use of white-flowering cultivar (less attractive, later flowering) as the main crop and the yellow-flowering cultivar (more attractive, earlier flowering) at field edges, with the width of the one-track line, could serve as a strategy to manage oilseed rape pests during flowering. This control strategy which combines more and less attractive oilseed rape cultivars may contribute to a reduction in the use of pesticides and their negative impact on the environment.

**Keywords:** *Brassica napus* L.; push-pull strategy; pest management; insecticide; trap crops

Agriculture is currently one of the sectors undergoing major changes in terms of crop protection based on synthetic pesticides (Long et al. 2016). It is necessary to adapt cultivation technologies and strategies for pest control with a narrower spectrum of insecticides in crops grown at large scales, such as oilseed rape (*Brassica napus* L.), one of the most important oilseed crops in Europe (Kaasik et al. 2014). The expansion of its cultivation in Europe over the past three decades has created ideal conditions for increasing pest population densities and damages caused by crop pests. The pollen beetle

(PB, *Brassicogethes aeneus* (Fabricius, 1775)) and the cabbage seedpod weevil (CSW, *Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham, 1802)) are considered members of the major oilseed rape pests in the spring.

Overwintering PB adults colonise fields during the green bud phenological stage of oilseed rape plants (BBCH 51–57). The greatest damage caused by PB adults occurs during the cold weather period in the spring when buds begin to flower (BBCH 57–60). Feeding damage to flower buds caused by adults, or rarely also by larvae, can lead to abscission and subsequent pod-less stalks (Williams and Free 1979,

Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. RO0418.

<https://doi.org/10.17221/367/2021-PSE>

Šedivý 1993). The damage caused by adult PBs can be higher on spring-sown oilseed rape cultivars than on autumn-sown rape cultivars. Pollen beetle adults also cause damage to other cruciferous crops grown for seed, such as white mustard and cabbage (Alford et al. 2003).

In Europe, the CSW is a less significant pest of oilseed rape than in North America (Cárcamo et al. 2001). Overwintering adults migrate to oilseed rape during the flowering stages (BBCH 61–65), and warm weather during the flowering period (BBCH 61–65) supports their occurrence. Females lay eggs singly in a hole bitten in the wall of young pods (Lerin 1991), and after hatching, larvae feed on the developing seeds (Williams 2010).

For almost two decades, PB populations in Europe have been effectively controlled by synthetic pyrethroid insecticides, but in 1999, the first report of pyrethroid resistance in PB was documented in France (Derron et al. 2004). Subsequently, pyrethroid-resistant PB populations were detected in 18 European countries (Slater et al. 2011), including Czech Republic (Stará and Kocourek 2018, Hovorka et al. 2021). The risks of increased damage caused by the CSW could be due to the increased resistance of CSW to pyrethroids and neonicotinoids. Cabbage seedpod weevil resistance to acetamiprid was locally documented in Poland in 2009 and 2010 (Zamojska and Węgorok 2014), and resistance to pyrethroids was reported in Germany (Heimbach and Müller 2013). Although there is strong evidence of pyrethroid resistance among populations of the PB (Slater et al. 2011, Spitzer et al. 2020) and CSW (Heimbach and Müller 2013) across Europe, pyrethroids remain the main control agents for these pests. Insecticides are routinely applied to large areas of monocultural crops, frequently without prior screening for the presence of pests (Williams 2010). One of the most recent surveys of insecticide usage in Europe have shown that oilseed rape usually receives between one and four applications; however, it is not unusual for this crop to receive five applications (Menzler-Hokkanen et al. 2006, Richardson 2008). Innovative integrated pest management (IPM) approaches to control these pests is necessary to decrease yield losses and to slow the development of resistance to insecticides (Skellern and Cook 2018). With increasing crop damage caused by the PB and CSW, demand by farmers for new management strategies for these pests also is increasing (Williams 2010).

One of these potential innovative approaches for oilseed rape could be the push-pull control strategy.

This control strategy can be defined as a behavioral manipulation method that uses repellent (push) and attractive (pull) stimuli to direct the movement of pests or beneficial insects for pest management (Foster and Harris 1997, Cook et al. 2007). Stimuli that can be used for insect behavioral manipulation include visual and semiochemical cues. These stimuli can be combined with other population-reducing methods, including insecticide application, with a preference for biologically based or selective products (Nalyanya et al. 2000, Zhang et al. 2013). Control strategies against pests, such as the push-pull strategy, have been developed in many areas of pest management. However, despite the problems associated with the development of resistance, chemical control is still preferred in many situations by farmers, because for the time being, there is no other way to protect large scale grown crops like oilseed rape effectively (Cook et al. 2007).

The use of trap crops is an example of a stimulus that attracts (pull) pests. Trap crops divert pest pressure from the main crop because they are more attractive to the pests (Hokkanen 1991, Shelton and Badenes-Perez 2006) and can be plants of a preferred growth stage, cultivar or species. For example, when used as a trap crop, turnip rape (*Brassica rapa* L.) significantly reduced the abundance of the PB in spring-sown oilseed rape compared to that in plots without this trap crop (Cook et al. 2004, Hokkanen and Menzler-Hokkanen 2018). Selective or biological insecticides can be used to reduce pest populations in trap crops. Turnip rape is known to be the preferred host for several oilseed rape pests, as it is for the PB (Barari et al. 2005), and growth stage-related visual and olfactory stimuli are at least partly responsible for the increased preference by pests (Cook et al. 2006). Another example of the push-pull control strategy (in addition to trap crops) is the use of oilseed rape cultivars with different flower (i.e., petal) colours and their different preferences by pests. The high attractiveness of yellow petal colour in oilseed rape for some pests, including the PB and CSW, is well known (Láska et al. 1986, Buechi 1990). However, only a few studies have reported the attractiveness of other petal colours for oilseed rape pests, with their potential to manipulate the location of herbivores or pollinators of oilseed rape and reduce subsequent infestation by pests (Cook et al. 2006, 2013). Cook et al. (2006) reported that blue petals were the least attractive, compared to the yellow, white and red petals, and these results were supported by the use of



sticky traps, with blue and black traps being the least attractive. Additionally, Cook et al. (2013) reported that red and blue petals of oilseed rape plants were less attractive than yellow and white petals in their experiments with dyed flowers. In both experiments, white petals were the second most attractive for the overwintering PB after yellow.

The aim of our work was to determine in field experiments the preference of PB and CSW by direct counts and sweep netting for white- or yellow-flowering cultivars with different phenologies (two yellow-flowering: DK Exssence (earlier), DK Sensei (latest) and one white-flowering in time between yellow-flowering cultivars). Based on obtained results to propose the potential use of the white-flowering cultivar in a push-pull-based control strategy.

## MATERIAL AND METHODS

**Field trials.** The experiments were carried out in the experimental fields of the Crop Research Institute in Prague (50°05'16.5"N, 14°17'56.0"E, elevation of 345 m a.s.l.) in the spring periods from 2015–2018. The whole region belongs to the temperate climate zone, with an average annual temperature of 7.9 °C

and average annual precipitation of 472 mm. The main soil unit is a modal brown soil that is clayey loam and is on a subsoil formed mainly of loess and marlstone.

To simulate the crop rotation system frequently used in Czech Republic, the crop sequence in the experimental fields was as follows: oilseed rape-cereals-oilseed rape-cereals. Thus, oilseed rape was grown in the same field every second year. The experimental fields were located within potatoes-cereals fields and apple orchards (Figure 1). Plots of oilseed rape were separated within a field with 10 m belt of nectar-rich, mainly Leguminosae, plants. No brassicas were planted in the belt of nectar-rich plants.

Winter oilseed rape cultivars were sown on three experimental plots (one plot for each cultivar) at a rate of 400 000 seeds per ha with a Wintersteiger plot seeder (Wintersteiger Sägen GmbH, Arnstadt, Germany). Two yellow-flowering cultivars (DK Exssence and DK Sensei) and one white-flowering cultivar (Witt) were used for the trial (Figure 1).

The two yellow-flowering cultivars of oilseed rape were each sown on a 0.2 ha plot; the white-flowering cultivar was sown on a 0.4 ha plot. Hence, the area

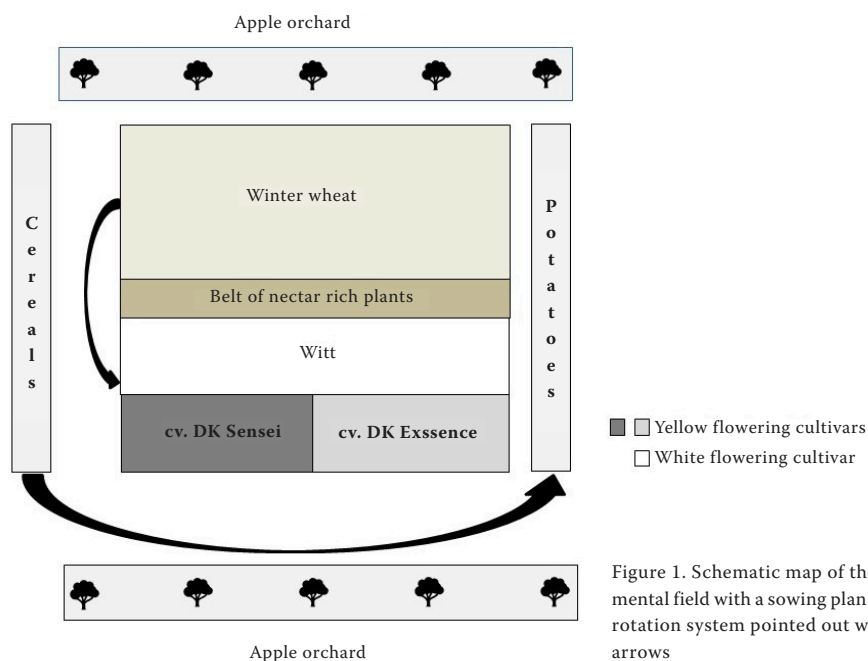


Figure 1. Schematic map of the experimental field with a sowing plan and crop rotation system pointed out with black arrows



<https://doi.org/10.17221/367/2021-PSE>

of yellow-flowering cultivars was in total 0.4 ha as the white-flowering cultivar. The plots were left untreated by insecticide, permitting natural infestation by the PB and CSW. Fertilisers (autumn: 40 kg N/ha of UREA<sup>stabil</sup>, Agra a.s., Střelské Hoštice, Czech Republic; spring: 80 kg N/ha of UREA<sup>stabil</sup>, Agra a.s., Střelské Hoštice, Czech Republic with StabilureN<sup>®</sup>, Agra a.s., Střelské Hoštice, Czech Republic) and herbicides (only in autumn: Butisan<sup>®</sup> Complete (2.25 L/ha), Stratos<sup>®</sup> Ultra (1.2 L/ha) + Dash<sup>®</sup> HC (1.2 L/ha), BASF, Prague, Czech Republic and Galera (0.35 L/ha), Dow AgroSciences s.r.o., Prague, Czech Republic) were added as in conventional operating conditions to all cultivars the same way. Two methods of insect sampling, direct counting and sweep netting, were performed in all experimental plots. The samplings of evaluated insects were replicated within a single plot of each cultivar.

**Plant material.** The yellow-flowering cv. DK Exssence (Monsanto Technology LLC, St. Louis, USA) is a pollen-fertile hybrid with low glucosinolate and erucic acid contents. This cultivar has earlier phenology than the other cultivars (DK Sensei and Witt) used in this experiment, so it flowered first. The other yellow-flowering cultivar, DK Sensei (Monsanto Technology LLC, St. Louis, USA), is a half-dwarf pollen-fertile hybrid with minimal erucic acid and glucosinolate contents. The DK Sensei cultivar is the latest-flowering of the cultivars used in this experiment. The white-flowering cultivar, Witt (Seed Service CZ, Inc.), has plants of an intermediate-range. The phenology of this cultivar is later than that of DK Exssence but earlier than that of DK Sensei. The cv. Witt starts flowering approximately one week after cv. DK Exssence and one week before cv. DK Sensei.

### Insect sampling

**Direct counts of the pollen beetle.** Adult PBs were counted directly from oilseed rape inflorescences in 2016, 2017 and 2018. The beetles from randomly selected plants from each cultivar were beaten down by shaking of the plant from inflorescences onto a sheet of white paper and counted. The total number of beetles from 25 plants of each cultivar was evaluated in the spring during each census. One person collected the samples to ensure these were consistent. The number of censuses varied across years and depended on the duration of the flowering period (2016, 5 censuses; 2017, 7; 2018, 6). The sampling was done at the same time, regardless of

the stage development of particular cultivars. The sampling started after the first collection of PB in yellow water traps. The first census began during BBCH 51 and lasted until BBCH 65. The counts were summed and averaged per plant.

**Pest sampling by sweep netting.** Adult PBs and CSWs were sampled from mid-April until mid-May in 2015, 2016 and 2018 and throughout May in 2017. Five (2015, 2016) and four (2017, 2018) censuses were performed in the period from BBCH 57 to BBCH 65. Insects were sampled on shine or partly cloudy skies at temperatures higher than 10 °C using an entomological sweep net (perimeter 100 cm). Each sample consisted of 75 sweeps in total (25 sweeps with 3 repetitions) on each cultivar. In the yellow flowering cultivars, the first repetition was performed 5 m from the edge of the plot, followed by the second in the middle of the plot and the third repetition 5 m from the edge adjacent to the neighbouring cultivar. Collected samples of insects were then transferred into labelled plastic bags and frozen (−32 °C) until identification. In the laboratory, adult PBs and CSWs were identified and counted using an Olympus SZX7 stereomicroscope (Tokyo, Japan). Pollen beetles were identified according to Kirk-Spriggs (1996), and CSW were identified according to Miller (1956).

**Statistical analysis.** Since we had only the data from visual counts of PBs on plants averaged per plant and census, we analysed the data using analysis of variance in R version 3.6.1 (R Team 2019), with a log-transformed response variable and cultivar, year (categorical) and their interaction as explanatory terms.

The sweep data were analysed using generalised linear models (GLMs) for the PB and CSW. Based on prior inspection of the residuals, we used a negative binomial error distribution with a log link function (R package MASS), which was superior to the Poisson distribution. The initial model included the cultivar, year (categorical) and their interaction as the explanatory variables and counts of the respective taxonomic group as response variables. The significance of the terms was assessed based on a likelihood ratio  $\chi^2$  test (R package car). The percentage difference in the abundance between the cultivars was estimated from a generalised mixed-effect model with a negative binomial error distribution (R package lme4; ref), with cultivar as a fixed effect and a random intercept for the year of sampling. The inclusion of the random effect was justified by a  $\Delta AIC > 2$ , which differed from the value in the corresponding fixed-effect model.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Direct counts of pollen beetle.** At oilseed rape stages BBCH 51–65, the abundance of PBs per plant evaluated by direct quantification of inflorescences varied across the years ( $F_{2,45} = 4.697$ ,  $P = 0.014$ ) but not with the cultivar used ( $F_{2,45} = 1.027$ ,  $P = 0.366$ ). Averaged across the cultivars, the abundance per plant increased from 2016 (mean  $\pm$  standard error;  $2.65 \pm 0.37$ ) and 2017 ( $3.57 \pm 0.61$ ) to 2018 ( $10.58 \pm 2.33$ ). According to the Czech Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, the threshold number of PB adults on oilseed rape is 3 adults per plant or inflorescence (less than 3 adults/plant: low abundance, 3–10 adults/plant:

intermediate abundance, 10 adults/plant and higher: high abundance). Across the study years and cultivars, an average of  $5.66 \pm 0.94$  individuals per plant were reported through visual counts. The abundance of PBs (average number of beetles per plant) on the three cultivars of oilseed rape on various Julian dates over three years (2016, 2017 and 2018) is presented in Figure 2. Our results show that the PB was not able to distinguish the oilseed rape cultivars used in this study before flowering, but from the beginning of flowering, the PB preferred the yellow-flowering cultivars with the highest mean predicted abundance found for cv. Exssence (116.37, 95% CI: 48.42–280.03) over the white-flowering cv. Witt (50.55, 95% CI: 21.08–122.94).

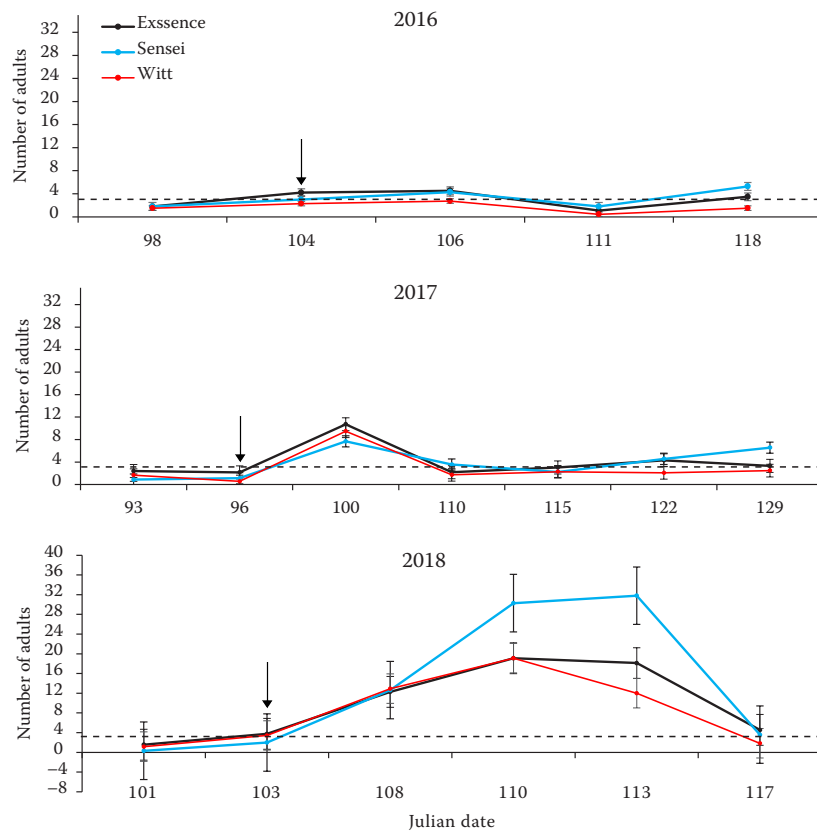


Figure 2. The abundance of *Brassicogethes aeneus* (average number of beetles per plant *via* direct counting = *y*-axis) on three cultivars of oilseed rape over three years (2016–2018) on Julian dates (*x*-axis) associated with BBCH 51–65. The arrows show the optimal treatment dates for the pollen beetle based on the abundance exceeding the threshold (shown by the dashed line)

<https://doi.org/10.17221/367/2021-PSE>

Table 1. The effects of oilseed rape cultivar and year of sampling on the abundance of pollen beetle and cabbage seed weevil on flowers (generalised linear model with negative binomial distribution). The significance of the terms was assessed based on a likelihood ratio  $\chi^2$  test

Term	Likelihood ratio	df	P
<b>Pollen beetle</b>			
Cultivar	20.29	2	< 0.001
Year	101.24	3	< 0.001
Cultivar $\times$ year	10.78	6	0.095
<b>Cabbage seed weevil</b>			
Cultivar	44.08	2	< 0.001
Year	78.84	3	< 0.001
Cultivar $\times$ year	6.56	6	0.363

**Sweep netting of the pollen beetle.** Just before and during flowering (BBCH 57–65), the abundance of the PB (as evaluated by sweep netting) in all cultivars was low in 2015 (1 623 adults in total), intermediate in 2016 (2 250 adults) and 2017 (2 050 adults) and high in 2018 (9 717 adults). Data from sweep netting demonstrated that adult PBs were able to discriminate between flowering oilseed rape cultivars and that the response to a particular cultivar was constant across the years included in this study (Table 1). The highest

mean predicted abundance was found for cv. Exssence (116.37, 95% CI: 48.42–280.03), followed by cv. Sensei (100.40, 95% CI: 41.80–241.69), but the observed decrease in abundance (14%) was not significant ( $z = -0.78$ ,  $P = 0.44$ ). The cv. Witt with white flowers attracted significantly fewer individuals (50.55, 95% CI: 21.08–122.94; 57% reduction compared to cv. Exssence;  $z = -4.29$ ,  $P < 0.001$ ) than the two cultivars with yellow flowers. The overall variation in the abundance among the cultivars and across the years is shown in Figure 3A. The preference of the PB for yellow-flowering oilseed rape cultivars over white-flowering oilseed rape cultivars is also described by Giamoustaris and Mithen (1996), who stated that the abundance of the PB was approximately 50% lower on white-flowering oilseed rape than on yellow-flowering oilseed rape. Cook et al. (2013) found using different methodology (dye flowers with a water solution of food colouring) that a white-flowering cultivar was as attractive to the PB as the same cultivar with yellow petals, but plants with red and blue petals were significantly less attractive. The high incidence of PBs on white flowers in the study by Cook et al. (2013) was interpreted as a consequence of their high UV reflectance. Döring et al. (2012) found that the number of PBs caught in red, blue, white, grey or black water traps (Petri dishes, diameter 14 cm) in comparison to yellow and green, where was the

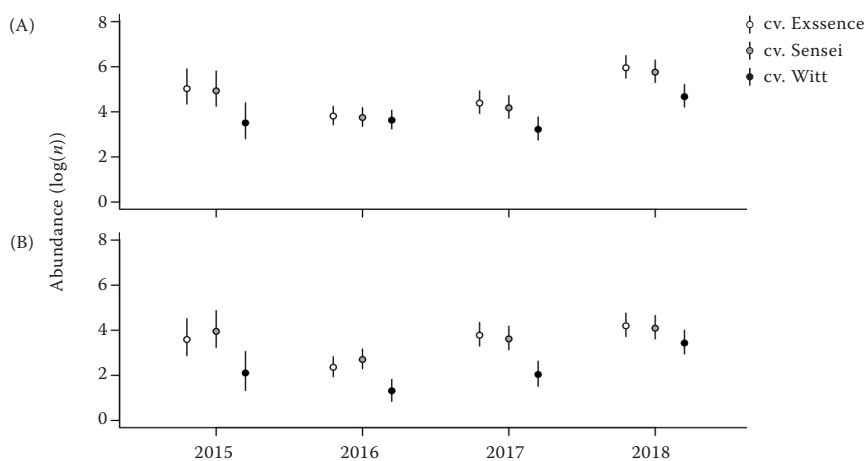


Figure 3. The abundance of (A) *Brassicogethes aeneus*, and (B) *Ceutorhynchus obstrictus* collected on three cultivars of oilseed rape over four years of sampling by sweep netting. The points represent the predicted mean abundance, and the vertical lines represent the 95% confidence intervals as predicted by a GLM (negative binomial distribution) ( $n = 5$  for 2015,  $n = 18$  for 2016,  $n = 12$  for 2017 and 2018)

highest number of beetles caught, was generally very low. These results support our study and proposed control strategy, which is listed below.

**Sweep netting of the cabbage seedpod weevil.** In the flowering period of oilseed rape (BBCH 61–65), the response of adult CSWs to the oilseed rape cultivars was very similar to that of the PB (Table 1). The mean density on cv. Exssence was 32.29 individuals (95% CI: 13.81–76.10), and the 10% increase in abundance on cv. Sensei (mean predicted abundance: 35.49, 95% CI: 15.23–83.91) was not significantly different from that on cv. Exssence ( $z = 0.47$ ,  $P = 0.64$ ). The CSW was less abundant on cv. Witt (mean predicted abundance: 10.00, 95% CI: 4.25–23.59; 69% reduction compared to cv. Exssence;  $z = -5.69$ ,  $P < 0.001$ ) than on the two cultivars with yellow flowers. The overall variation in abundance among the cultivars and across the years is shown in Figure 3B. In Canada, white mustard (*Sinapis alba* L.) was used in canola breeding for resistance to CSW damage (Dosdall and Kott 2006). Some canola genotypes that showed greater resistance to the CSW had different chemical compositions and glucosinolate contents in the pod developing seeds. The effectiveness of using trap crops to control the CSW was investigated in southern Alberta, Canada (Cárcamo et al. 2007). In one study, turnip rape flowered approximately one week earlier than the main crop, oilseed rape, and effectively concentrated CSWs, allowing them to be controlled with pyrethroid insecticide to prevent their movement into the main crops (Cárcamo et al. 2007).

In conclusion, knowledge about the relative attractiveness of oilseed rape cultivars to the PB and CSW can be utilised in pest control strategies adjusted for particular cultivars based on the push-pull strategy (Cook et al. 2007). At the beginning of immigration into oilseed rape fields, the PB prefers plants in the bud formation phase and neglects phenologically delayed plants or cultivars. Hence, it is recommended to sow cultivars with the earliest onset of bud formation on the marginal strips of a field. Acceleration of the phenophase of oilseed rape at field edges can be achieved by earlier sowing, reducing the doses of morphoregulators and lower dosing of nitrogen-based fertilisers. We propose that the cultivar preferred by the pest should be sown along the edges of a field with a width of a one-track line (approx. 24 m), which corresponds to the area of the sprayers used in this study. The cultivar less preferred by pests (i.e., the white-flowering cultivar) should be sown inside the plot. In plots larger than 20 ha, it is recommended to establish

one or more central strips of the preferred cultivar, preferably in the longitudinal direction of the field.

In our four-year trial, we found that oilseed rape cultivars of different colours and phenologies have different attractiveness for PBs and CSWs. These findings can be used as a part of a push-pull control-based strategy. This can lead to a reduction in a limited range of pesticides and, as a result, protect natural enemies, which are important in pest population reduction. This control strategy, which considers cultivar differences, works together with other approaches in an IPM system.

**Acknowledgement.** We would like to thank our laboratory and field workers, especially Jana Vinciková and Anna Macáková, for their help during our experiments.

## REFERENCES

- Alford D.V., Nilsson C., Ulber B. (2003): Insect pests of oilseed rape crops. In: Alford D.V. (ed.): Biocontrol of Oilseed Rape Pests. 1<sup>st</sup> Edition. Oxford, Blackwell Science Ltd, 9–43. ISBN: 9780632054275
- Barari H., Cook S.M., Clark S.J., Williams I.H. (2005): Effect of a turnip rape (*Brassica rapa*) trap crop on stem-mining pests and their parasitoids in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *BioControl*, 50: 69–86.
- Buechi R. (1990): Investigations on the use of turnip rape as trap plant to control oilseed rape pests. *Bulletin SROP*, 13: 32–39.
- Cárcamo H.A., Dosdall L., Dolinski M., Olfert O., Byers J.R. (2001): The cabbage seedpod weevil, *Ceutorhynchus obstrictus* (Coleoptera: Curculionidae) – a review. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 98: 201–210.
- Cárcamo H.A., Dunn R., Dosdall L.M., Olfert O. (2007): Managing cabbage seedpod weevil in canola using a trap crop – a commercial field scale study in western Canada. *Crop Protection*, 26: 1325–1334.
- Cook S.M., Watts N.P., Hunter F., Smart L.E., Williams I.H. (2004): Effects of a turnip rape trap crop on the spatial distribution of *Meligethes aeneus* and *Ceutorhynchus assimilis* in oilseed rape. *Bulletin IOBC/WPRS/SROP*, 27: 199–206.
- Cook S.M., Smart L.E., Martin J.L., Murray D.A., Watts N.P., Williams I.H. (2006): Exploitation of host plant preferences in pest management strategies for oilseed rape (*Brassica napus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 221–229.
- Cook S.M., Khan Z.R., Pickett J.A. (2007): The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52: 375–400.
- Cook S.M., Skellern M.P., Döring T.F., Pickett J.A. (2013): Red oilseed rape? The potential for manipulation of petal colour in control strategies for the pollen beetle (*Meligethes aeneus*). *Arthropod-Plant Interactions*, 7: 249–258.

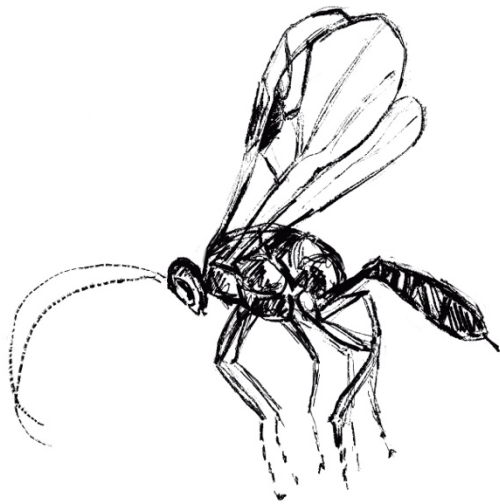
<https://doi.org/10.17221/367/2021-PSE>

- Derron J.O., Le Clech E., Bezençon N., Goy G. (2004): Résistance des méligèthes du colza aux pyrèthrinoides dans le bassin lémanique. *Revue Suisse d'Agriculture*, 36: 237–242.
- Döring T.F., Skellern M., Watts N., Cook S.M. (2012): Colour choice behaviour in the pollen beetle *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Physiological Entomology*, 37: 360–378.
- Dosdall L.M., Kott L.S. (2006): Introgression of resistance to cabbage seedpod weevil to canola from yellow mustard. *Crop Science*, 46: 2437–2445.
- Foster S.P., Harris M.O. (1997): Behavioral manipulation methods for insect pest-management. *Annual Review of Entomology*, 42: 123–146.
- Giamoustaris A., Mithen R. (1996): The effect of flower colour and glucosinolates on the interaction between oilseed rape and pollen beetles. In: Städler E., Rowell-Rahier M., Bauer R. (eds): Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Insect-Plant Relationships. Switzerland, June 24–30, 206–208. ISBN 978-94-009-1720-0
- Heimbach U., Müller A. (2013): Incidence of pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany. *Pest Management Science*, 69: 209–216.
- Hokkanen H.M.T. (1991): Trap cropping in pest management. *Annual Review of Entomology*, 36: 119–138.
- Hokkanen H.M.T., Menzler-Hokkanen I. (2018): Developing ecostacking techniques for pollen beetle management in oilseed rape. *Arthropod-Plant Interactions*, 12: 767–777.
- Hovorka T., Kocourek F., Horská T., Stará J. (2021): Widespread resistance of pollen beetles to pyrethroids in Czechia with no evidence for kdr mutation. *Crop Protection*, 145: 105648.
- Kaasik R., Kovács G., Kaart T., Metspalu L., Williams I.H., Veromann E. (2014): *Meligethes aeneus* oviposition preferences, larval parasitism rate and species composition of parasitoids on *Brassica nigra*, *Raphanus sativus* and *Eruca sativa* compared with on *Brassica napus*. *Biological Control*, 69: 65–71.
- Kirk-Spriggs A.H. (ed.) (1996): Pollen Beetles: Coleoptera: Kateretidae and Nitidulidae: Meligethinae. London, Royal Entomological Society London, 1–150. ISBN: 9780901546807
- Láska P., Zelenková I., Bicik V. (1986): Colour attraction in species of the genera: *Delia* (Diptera, Anthomyiidae), *Ceutorhynchus*, *Meligethes* and *Phyllotreta* (Coleoptera: Curculionidae, Nitidulidae, Chrysomelidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 83: 418–424.
- Lerin J. (1991): Influence of host plant phenology on the reproduction of the rape weevil, *Ceuthorrhynchus assimilis* Payk. *Journal of Applied Entomology*, 111: 303–310.
- Long T.B., Blok V., Coninx I. (2016): Barriers to the adoption and diffusion of technological innovations for climate-smart agriculture in Europe: evidence from the Netherlands, France, Switzerland and Italy. *Journal of Cleaner Production*, 112: 9–21.
- Menzler-Hokkanen I., Hokkanen H.M.T., Buchs W., Klukowski Z., Luik A., Nilsson C., Ulber B., Williams I.H. (2006): Insect problems in European oilseed rape cultivation, and how to deal with them: the OSR farmers' perspective. *Bulletin IOBC/WPRS/SROP*, 29: 91–94.
- Miller F. (1956): Rod *Ceutorhynchus* Germar 1824 – krytonosec. In: Rozsypal J., Kratochvíl J. (eds.): *Agricultural Entomology*. 1<sup>st</sup> edition. Prague, Československá Akademie Věd, 580–599. (In Czech)
- Nalyanya G., Moore C.B., Schal C. (2000): Integration of repellents, attractants, and insecticides in a "push-pull" strategy for managing German cockroach (Diptera: Blattellidae) populations. *Journal of Medical Entomology*, 37: 427–434.
- Richardson D.M. (2008): Summary of findings from a participant country pollen beetle questionnaire. *EPP0 Bulletin*, 38: 68–72.
- Šedivý J. (1993): Variation in the population density of pollen beetles (*Meligethes aeneus*) in winter rape. *Ochrana Rostlin – UZPI (Czech Republic)*, 29: 9–15.
- Shelton A.M., Badenes-Perez F.R. (2006): Concepts and applications of trap cropping in pest management. *Annual Review of Entomology*, 51: 285–308.
- Skellern M.P., Cook S.M. (2018): The potential of crop management practices to reduce pollen beetle damage in oilseed rape. *Arthropod-Plant Interactions*, 12: 867–879.
- Slater R., Ellis S., Genay J.-P., Heimbach U., Huart G., Sarazin M., Longhurst C., Müller A., Nauen R., Rison J.L., Robin F. (2011): Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Management Science*, 67: 633–638.
- Spitzer T., Bílovský J., Matusínský P. (2020): Changes in resistance development in pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* F.) to lambda-cyhalothrin, etofenprox, chlorpyrifos-ethyl, and thiacloprid in the Czech Republic during 2013–2017. *Crop Protection*, 135: 105224.
- Stará J., Kocourek F. (2018): Seven-year monitoring of pyrethroid resistance in the pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* F.) during implementation of insect resistance management. *Pest Management Science*, 74: 200–209.
- Williams I.H. (2010): The major insect pests of oilseed rape in Europe and their management: an overview. In: Williams I.H. (ed.): *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Heidelberg, Springer Netherlands, 1–43. ISBN: 978-90-481-3983-5
- Williams I.H., Free J.B. (1979): Compensation of oil-seed rape (*Brassica napus* L.) plants after damage to their buds and pods. *The Journal of Agricultural Science*, 92: 53–59.
- Zamojska J., Węgorzek P. (2014): Preliminary studies on the susceptibility level of *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae) to acetamiprid and chlorpyrifos in Poland and resistance mechanisms of the pest to acetamiprid. *Journal of Insect Science*, 14: 1–6.
- Zhang Z.Q., Sun X.L., Luo Z.X., Gao Y., Chen Z.M. (2013): The manipulation mechanism of "push-pull" habitat management strategy and advances in its application. *Acta Ecologica Sinica*, 33: 94–101.

Received: August 17, 2021

Accepted: October 6, 2021

Published online: October 19, 2021



## 4.4 První záznam o výskytu lumčíka *Microctonus brassicae* v České republice a jeho potenciál jako bioagens proti dřepčíku olejkovému

**Výstup D:** Hovorka T. 2022. First record of *Microctonus brassicae* in Czechia, a potential biological control agent against a primary oilseed rape pest. *Journal of Entomological and Acarological Research* **54**: 1. DOI: [10.4081/jea.2022.10047](https://doi.org/10.4081/jea.2022.10047). (SJR 0,18)

### Přispění autora:

Autor provedl praktickou část i sepsání finální verze manuskriptu.

#### 4.4.1 Charakteristika problematiky

Dřepčík olejkový (*Psylliodes chrysocephala* Linnaeus, 1758) patří po zákazu moření osiva řepky neonicotinoidy opět mezi její nejvýznamnější škůdce, a to především kvůli škodám, které způsobuje na podzim. V České republice se význam tohoto škůdce spolu se zužujícím se spektrem vhodných přípravků na ochranu řepky v podzimním období každoročně zvyšuje. Vzhledem k těmto okolnostem je vhodné hledat alternativní možnosti ochrany řepky proti tomuto škůdci, což může představovat například podpora výskytu přirozených nepřátel škůdce. Jedním z těchto užitečných organismů je i lumčík druhu *Microctonus brassicae* (Haeselbarth 2008). Tento druh parazitoida byl prozatím zjištěn z polních populací d. olejkového pouze ve Velké Británii. Do této doby je to jediný známý druh parazitoida dospělců d. olejkového a v jeho životním cyklu hraje spolu s ostatními parazitoidy (larválními) pravděpodobně významnou roli. Cílem této práce bylo zjištění výskytu tohoto potenciálně využitelného parazitoida v biologické ochraně na území České republiky. Dále bylo cílem práce shrnout současné poznatky o bionomii, taxonomickém zařazení a identifikaci tohoto parazitoida.

#### 4.4.2 Metodický postup

Pro sběr materiálu byla vybrána dvě místa v oblasti středních Čech (Šlapanice, Unhošť), která se nachází v intenzivně obhospodařované zemědělské krajině. Ke sběru dospělců dřepčíka olejkového bylo využito entomologického smýkadla. Brouci byli sbíráni na konci září na polích s ozimou řepkou a přilehlých polích s kvetoucí hořčicí. Z každé lokality bylo vybráno 50 jedinců, kteří byli následně chováni v laboratorních podmínkách. Chov probíhal v entomologických izolátorech z perforované textilie. Jako potrava byla broukům

poskytnuta předpěstovaná řepka nebo kedlubna. Brouci byli chováni v kontrolovaných světelných a teplotních podmínkách s režimem: den 16 h (22 °C) / noc 8 h (20 °C). Chovy byly kvůli líhnutí parazitoidů kontrolovány třikrát týdně. Vylíhnutí parazitoidi byli usmrceni octanem ethylnatým. Část parazitoidů byla následně nalepena na entomologické štítky nebo uchována v lihu pro případnou identifikaci pomocí barcodingu. Morfologické určení parazitoidů bylo provedeno dle dostupné literatury a originálních popisů druhů. Pro shrnutí dosavadních znalostí o tomto druhu a jemu příbuzných druzích parazitoidů bylo využito dostupné literatury.



## ENTOMOLOGY

**First record of *Microctonus brassicae* in Czechia, a potential biological control agent against a primary oilseed rape pest**

T. Hovorka

*Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic***Abstract**

After the ban on treating oilseed rape seeds with neonicotinoids in European Union, cabbage stem flea beetles (*Psylliodes chrysocephala* Linnaeus, 1758) again became one of its main pests. In Czechia, the impact of this pest increases every year, given with the narrowing spectrum of suitable insecticides and growing damage to oilseed rape plants in autumn. Based on this scenario, it is appropriate to look for alternative options to control oilseed rape pests. One option could be supporting beneficial organisms. One of these organisms is the hymenopteran braconid parasitoid *Microctonus brassicae* (Haeselbarth, 2008), which parasitizes adult cabbage stem flea beetles. Its occurrence has now been confirmed

outside Great Britain in Czechia and continental Europe respectively. Five male specimens of *M. brassicae* emerged from 50 collected adults of cabbage stem flea beetle by sweep netting from two localities in central Bohemia. This parasitoid of adult cabbage stem flea beetles and its larval parasitoids probably play an important role in the life cycle and population dynamics of this pest. Current knowledge about the biology, taxonomic classification and identification of this parasitoid is summarized in this paper.

**Introduction**

The cabbage stem flea beetle (CSFB), *Psylliodes chrysocephala*, Linnaeus 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae), is currently a major pest of winter oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* M.) in Europe (Heimbach and Müller, 2013; Stará and Kocourek, 2019). Under central European conditions, this pest has one generation within a year (Williams, 2010). Adults feed on cotyledons and stems or perforate the first true leaves of emerging oilseed rape plants and other cruciferous crops (Kaufmann, 1941).

To keep the CSFB below the harmful threshold, only preparations with the active substance lambda-cyhalothrin or other pyrethroid insecticides (deltamethrin and cypermethrin) can currently be used in Czechia (Stará and Kocourek, 2019). However, the use of pyrethroids should not be continuous to avoid selection of resistant populations, as is now the case in Great Britain (Willis *et al.*, 2020). Neonicotinoid insecticides such as thiacloprid, which have been traditionally used, have shown to be insufficiently effective under Czech conditions. During 2015–2018, at least two populations of CSFBs (Prague and Potehy) showed tolerance to thiacloprid. Nevertheless, neonicotinoids are no longer directly approved for protection against CSFBs in European union (Stará and Kocourek, 2019). Thus, with the growing importance of this pest and the narrowing range of usable insecticides, farmers' interest in new CSFB control options is also growing. Given these circumstances, it is necessary to obtain more knowledge about the life cycle of this pest, its natural enemies (parasitoids) and their biology to create a supporting strategy for this important natural regulation system, which in the future could remain the only option for CSFB control. Before proceeding with chemical protection, it is appropriate to use agrotechnical preventive measures, such as sowing in well-prepared soil in the agrotechnical period. With this preventative measure, farmers can achieve evenly grown vegetation. Maintaining the dynamic growth of plants by growth regulators and balancing the nutritional state of soil also have a

Correspondence: Tomáš Hovorka, Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha-Suchbát, CZ 165 00, Czech Republic.  
Tel.: +420.723996999.  
E-mail: hovorkarl@gmail.com

Key words: Parasitoid; Oilseed rape; Cabbage stem flea beetle; Braconidae; Natural enemy.

Acknowledgements: I would specifically like to thank Dr. Jiří Skuhrovec for motivating me, providing useful comments and helping compile this article. I also thank to the Department of Plant Protection at the Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources at the Czech University of Life Sciences, Prague for financial support of this research.

Contributions: The authors contributed equally.

Conflict of interest: The authors declare no potential conflict of interest.

Received for publication: 18 August 2021.

Accepted for publication: 28 January 2022.

©Copyright: the Author(s), 2022

Licensee PAGEPress, Italy

*Journal of Entomological and Acarological Research* 2022; 54:10047  
doi:10.4081/jea.2022.10047

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 4.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

positive effect (Gendy and Marquard, 1989). Despite these direct precautions, ecosystem services provided by beneficial organisms at essentially no cost can be used (Polasky, 2008). These organisms include hymenopteran larval and adult pest parasitoids. These organisms can be attracted to fields by creating a suitable environment for them, such as flowering belts at the edge of a field or properly maintained landscape elements (e.g., draws and borders) that provide shelter and food. The reward for farmers can be maintaining pest populations below the harmful level and, consequently, decreasing the amount of chemicals applied to their fields (Hatt *et al.*, 2018).

To date, only five parasitoids of CSFBs larvae have been identified in Europe (Ulber *et al.*, 2010). These larval parasitoids belong to the Ichneumonidae and Braconidae families within the Hymenopteran order, and one species of larval hymenopteran parasitoid belongs to the Chalcidoidea superfamily. Of the parasitoids attacking adult CSFBs, two species, *Microctonus melanopus* (Ruthe, 1856) and *M. brassicae* (Haeselbarth, 2008), has been identified to date. The species of *M. melanopus* was raised from adult CSFBs in Great Britain and France. However, its biology and taxonomic classification is unclear (Ulber *et al.*, 2010). In addition, this species is considered to be a parasitoid of some weevil species (Coleoptera: Curculionidae; *Ceutorhynchus assimilis* Paykull, 1792 (Harmon and McCaffrey, 1997); *C. obstrictus* Marsham, 1802 (Fox *et al.*, 2004); *C. pallidactylus* Marsham, 1802 (Tobias, 1971); *C. leprieuri* Brisot, 1881 (Fulmek, 1968); and *Hypera meles* Fabricius, 1792 (Tobias, 1986)).

To date, the only confirmed parasitoid of adult CSFBs is *Microctonus brassicae* (Haeselbarth, 2008). This species was described in 2008 by E. Haeselbarth from Great Britain as a *Perilitus brassicae*, and in 2016, Gavin R. Broad transferred it to the genus *Microctonus* (Wesmael, 1835). The only occurrence of this parasitoid has been documented in Great Britain, where it was raised from collected adult CSFBs from three localities in Norfolk County. The accuracy of its morphological identification was also genetically confirmed by Jordan *et al.* (2020) by the barcoding method.

The aim of this work was to determine the presence of *Microctonus brassicae* in Czechia for future research on this potential biological control agent.

## Materials and Methods

Adult cabbage stem flea beetles were collected by sweep netting from two Czech field sites within the central Bohemia region at the end of September 2020 (Šlapanice GPS: 50.3216647N, 14.1097611E and Unhošť GPS: 50.0833436N, 14.1017786E localities; date of collection: 25.9.2020). Adult CSFBs were collected from winter oilseed rape and adjacent white mustard. Fifty individuals from each locality were maintained on potted oilseed rape (variety DK Exsistence) or kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) in insect breeding cages (35×35×60 cm) with microperforated textile cover (Entosphinx Ltd, Czechia) in rooms with controlled environments at an L16 (22°C): D8 (20°C) photothermoperiod. Beetle colonies were checked three times a week for parasitoid emergence.

Upon emergence, wasps were collected with an exhaustor into a 100 ml polyethene bottle (Entosphinx Ltd, Czechia) that was used to kill the wasps with 1 ml of 99.7% ethyl acetate (Penta Ltd, Czechia). Some wasp specimens were also collected and preserved in 99% ethanol (Penta Ltd, Czechia) for future molecular analysis. Collected specimens in polyethene bottles were then glued on the entomological labels and morphologically identified under an Olympus SZX7

binocular microscope (Olympus Czech Group Ltd, Czechia) using a key by Haeselbarth (2008) and description by Jordan *et al.* (2020).

## Results

### The emerged parasitoids

The first adult wasp was detected within the beetle colonies maintained under controlled conditions approximately 2 months after collection (10.12.2020). Another four individuals hatched from the CSFBs during the following 20 days. All five individuals were identified as males.

### Identification of *Microctonus brassicae*

All emerged wasp specimens were identified as *Microctonus brassicae* (Haeselbarth, 2008). This is the first report on this parasitic wasp species from Czechia and continental Europe. The species belongs to the hymenopteran parasitic family Braconidae. Together with Ichneumonidae, these families form one of the most species-rich families within Hymenoptera. In nature and in man-made ecosystems (agrocenoses), they are important natural regulators of pests. *M. brassicae* is further classified in the subfamily Euphorinae and the genus *Microctonus*. This subfamily is one of the many subfamilies (236 species known in Europe; de Jong Yde *et al.*, 2021) within the Braconidae family and contains several small species parasitizing not only Coleoptera but also Hemiptera, Neuroptera, Psocoptera, Orthoptera and Hymenoptera (Quicke, 2015; Yu *et al.*, 2016).

Male and female of *M. brassicae* are different in colour. According to Jordan *et al.* (2020), females are orange to brown, and males are predominantly black with yellow-brown legs (Figures 1 and 2). Females have 21 flagellomeres, while males have 25 to 26 flagellomeres. The mean size of the body from the head to the last metasomal segment is usually 2.5 mm in diameter, with the males being slightly larger (mean body length in males: 2.6 mm, females: 2.3 mm; Jordan *et al.*, 2020). The genus *Microctonus* is characterized by two fused cells (submarginal and discal) in the front wing and an elongated first metasomal tergite (Figures 1 and 2) (Haeselbarth, 2008; Jordan *et al.*, 2020).

### Life-cycle

*Microctonus brassicae* is a solitary koinobiont endoparasitoid. Females lay their eggs on the pronotum or elytra, which is the most preferred site, but mouthparts and the tip of adult CSFB abdomens can also be chosen. The larva hatches from the egg and, after entering the body of the host, feeds on the haemolymph for most of its larval development (Jordan *et al.*, 2020). Once the larva reaches its last (fifth) stage of development, it leaves the host's body through its anus and seeks shelter (mostly underground), where it pupates in a silk cocoon (Figure 3). The adult then hatches from the cocoon (Quicke, 2015). The time to complete the whole lifecycle from oviposition in the CSFB to enclosion of the adult took on average 43.5 days (Jordan *et al.*, 2020). It is currently unknown whether adult CSFBs survive when parasitoid larvae leave their bodies. However, it is known that the larva of the parasitoid feeding on the body of the CSFB significantly affects its behaviour and, in the later stages of its development, the level of CSFB host plant (cruciferous plant) consumption. Cabbage stem flea beetle adults are sterile due to the presence of parasitoid larvae (Jordan *et al.*, 2020), which also occurs in other species of the *Microctonus* genus (Loan and Holdaway, 1961). This fact can highly affect the future population density of pests if strongly parasitized. Thus, we will focus on this problem in the future in more detail.

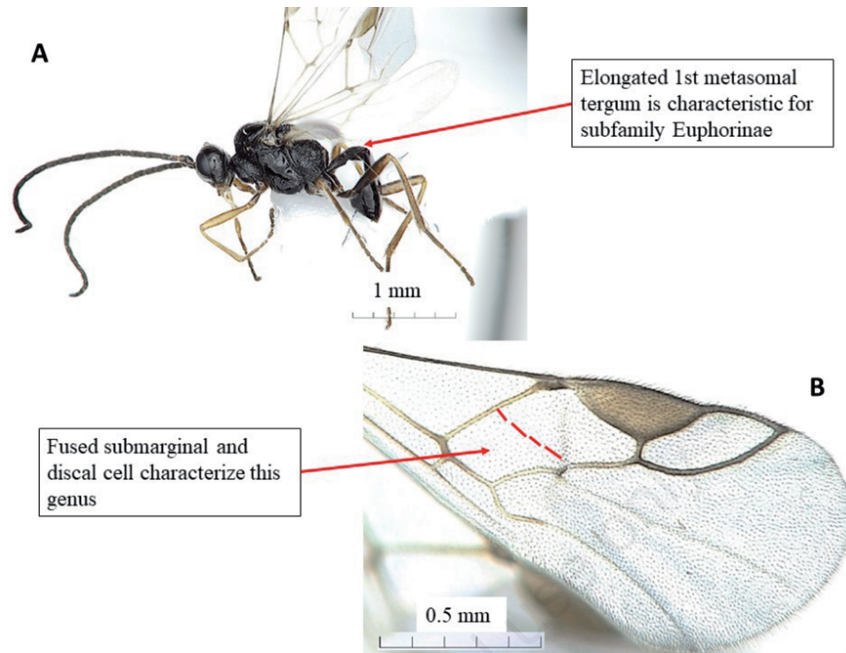


Figure 1. *Microctonus brassicae* male emerged from the CSFB adult (Šlapanice locality 2020): A) Overall view B) detail of fore wing venation.

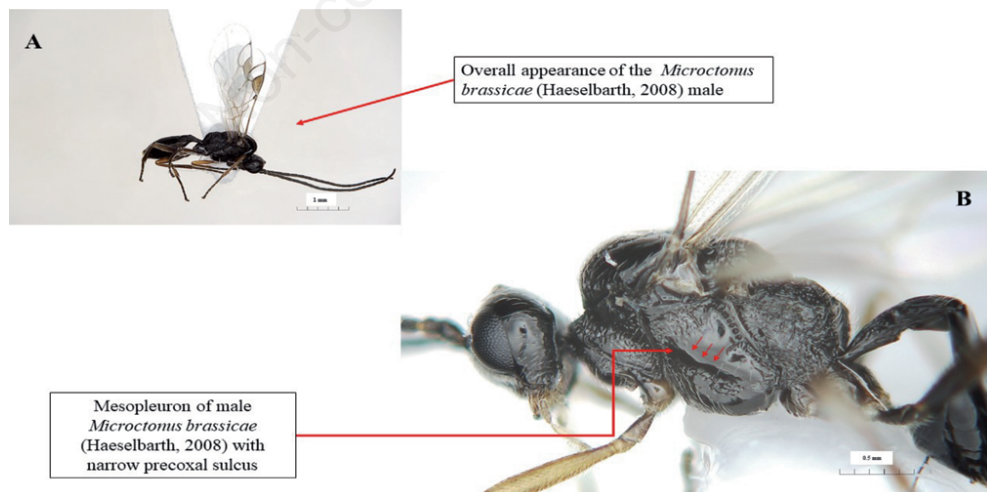


Figure 2. Male of *Microctonus brassicae*: A) Whole specimen B) Detail of Mesopleuron.

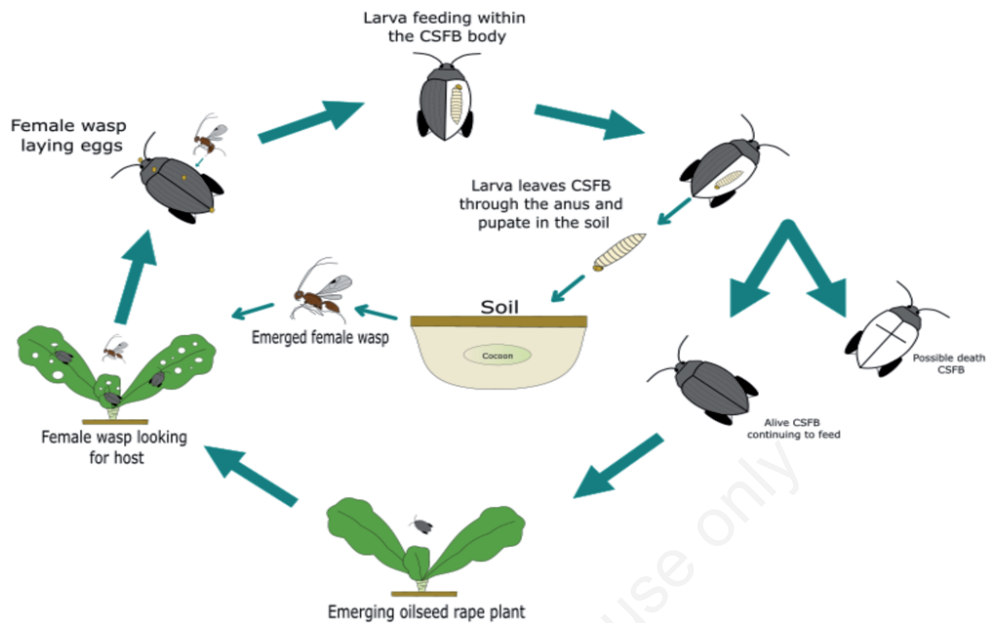


Figure 3. Life cycle of *Microctonus brassicae* and its host cabbage stem flea beetle.

## Discussion and Conclusions

Braconid wasps of the genus *Microctonus* have been successfully used for the biological control of pests (Aeschlimann, 1983; Barratt *et al.*, 2007). Two species can serve as an example: *M. aethioides* (Loan, 1975) and *M. hyperodae* (Loan, 1974). These two species were successfully introduced into New Zealand as a biological control agent of two weevil pests (*Sitona discoideus* Gyllenhal, 1834, and *Listronotus bonariensis* Kuschel, 1955) in alfalfa pastures and graminaceous crops. For both species of parasitoids, the average parasitisation rate was over 50% (Prestidge *et al.*, 1991; Kean and Barlow, 2000). Similar results were obtained by Jordan *et al.* (2020) from Great Britain in the case of *M. brassicae* parasitoids of CSFBs in oilseed rape. This study by Jordan *et al.* (2020) served as a template for this and future research. The laboratory experiments with CSFBs exceeded the average parasitisation rate by over 44%. The study also described in more detail the life cycle of this parasitoid and the possibilities of breeding and reproducing in captivity. The protocol for breeding this parasitoid in captivity, which has been successfully described, indicates the possibility of its use for biological control of cruciferous crops against CSFBs in the future. However, it is necessary to optimize laboratory breeding for the conditions in Czechia and then to test the functionality of this bioagent in practice. Another possibility of using this parasitoid in the protection of cruciferous plants outside the laboratory is the release of parasitized adult CSFBs back into nature. However, it is necessary to accurately identify parasitized adults and determine the degree of parasitism of CSFB populations (Jordan *et al.*, 2020) across Czechia.

In this article, the first report of the occurrence of the parasitoid *M. brassicae* from Czechia and continental Europe is presented. The report on its occurrence shows that due to the great distance between Great Britain and Czechia and the likely widespread distribution of this species, there is potential for its use in the biological control of oilseed rape against CSFBs.

## References

- AESCHLIMANN J., 1983 - Sources of importation, establishment and spread in Australia, of *Microctonus aethioides* Loan (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Sitona discoideus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). - Aust. J. Entomol. 22: 325-331.
- BARRATT B., FERGUSON C., BIXLEY A., CROOK K., BARTON D., JOHNSTON P.D., 2007 - Field parasitism of nontarget weevil species (Coleoptera: Curculionidae) by the introduced biological control agent *Microctonus aethioides* Loan (Hymenoptera: Braconidae) over an altitude gradient. - Environ. Entomol. 36: 826-839.
- DE JONG YDE V.M., VERNER M., DE PLACE B.P., LOS WOUTER S.F., NICOLAS B., CLAIRE B., PRZEMEK CH., STLOUKAL E., GREGOR H., WETZEL F., (editors) 2021 - Fauna Europaea-all European animal species on the web [online]. - Website <https://fauna-eu.org/> [accessed 20th June 2021].
- FOX A.S., SHAW S.R., DOSDALL L.M., LEE B., 2004 - *Microctonus melanopus* (Ruthe) (Hymenoptera: Braconidae), a

- parasitoid of adult cabbage seedpod weevil (Coleoptera: Curculionidae): Distribution in southern Alberta and female diagnosis. - J. Entomol. Sci. 39: 350-361.
- FULMEK L., 1968 - Parasitinsekten der Insektengallen Europas. - Beiträge zur Entomologie= Contrib. Entomolo. 18: 719-952.
- GENDY A., MARQUARD R., 1989 - Studies on the Effect of Nitrogen Fertilization and Growth Regulators on Seed Yield and Some Quality Criteria of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) - Eur. J. Lipid Sci. Tech. 91: 353-357.
- HAESSELBARTH E., 2008 - Zur Braconiden-Gattung *Perilitus* Nees 1818. 3. Beitrag: die Arten ohne ausgebildetem ersten Cubitus-Abschnitt (Hymenoptera, Braconidae). Biologienzentrum Linz. - Linzer Biologische Beiträge 1013-1152.
- HARMON B.L., MCCAFFREY J.P., 1997 - Parasitism of Adult *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Microctonus melanopus* (Hymenoptera: Braconidae) in northern Idaho and eastern Washington. - J. Agr. Entomol. 14(1): 55-59.
- HATT S., UYTENBROECK R., LOPES T., CHEN J.L., PIQUERAY J., MONTY A., FRANCIS F., 2018 - Effect of flower traits and hosts on the abundance of parasitoids in perennial multiple species wildflower strips sown within oilseed rape (*Brassica napus*) crops. - Arthropod-Plant Int. 12: 787-797.
- HEIMBACH U., MÜLLER A., 2013 - Incidence of pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany: Pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany. - Pest Manag. Sci. 69: 209-216.
- JORDAN A, BROAD GR, STIGENBERG J, HUGHES J, STONE J., BEDFORD I., PENFIELD S., WELLS R., 2020 - The potential of the solitary parasitoid *Microctonus brassicae* for the biological control of the adult cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala*. - Entomol. Exp. Appl. 168: 360-370.
- KAUFMANN O., 1941 - Zur Biologie des Rapserdflohes (*Psylliodes chrysocephala* L.). - Z. Pflanzenk. Pflanzen. 51: 305-324.
- KEAN J.M., BARLOW N.D., 2000 - Long-term assessment of the biological control of *Sitona discoideus* by *Microctonus aethiopoulos* and test of a model. - Biocontrol Sci. Techn. 10: 215-221.
- LOAN C., HOLDAWAY F., 1961 - *Microctonus aethiops* (Nees) auct. and *Perilitus rutilus* (Nees) (Hymenoptera: Braconidae), European parasites of *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). - Can. Entomol. 93: 1057-1079.
- NOYES J.S., 2021 - Universal Chalcidoidea Database [online]. - Website <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/chalcidooids/> [accessed 21<sup>st</sup> June 2021].
- POLASKY S., 2008 - What's nature done for you lately: measuring the value of ecosystem services. - Choices 23: 42-46.
- PRESTIDGE R., BARKER G., POTTINGER R., 1991 - The economic cost of Argentine stem weevil in pastures in New Zealand. In: Proceedings of the Forty Fourth New Zealand Weed and Pest Control Conference - Palmerston North, New Zealand: 165-170.
- QUICKE D.L.J., 2015 - The braconid and ichneumonid parasitoid wasps: biology, systematics, evolution and ecology. 1 ed. - UK: John Wiley & Sons: 1-733.
- STARÁ J., KOCOUREK F., 2019 - Cabbage stem flea beetle's (*Psylliodes chrysocephala* L.) susceptibility to pyrethroids and tolerance to thiacloprid in the Czech Republic. - PloS One 14(9): e0214702.
- TOBIAS V.I. 1986 - Identification of the insects of European USSR. In: Opređelitel Nasekomych Evropejskoi Tsasti SSSR 3, Peredpontdatokrylye 4. Opr. Faune SSSR. 1 ed. USSR.
- TOBIAS V.I., 1971 - Review of the Braconidae (Hymenoptera) of the U.S.S.R. - Trudy Vsesoyuznogo Entomologicheskogo Obshchestva 54: 156-268.
- ULBER B., WILLIAMS I.H., KLUKOWSKI Z., LUIK A., NILSSON C. 2010 - Parasitoids of oilseed rape pests in Europe: key species for conservation biocontrol. In: Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests. 1 ed. - Dordrecht, Netherlands: 45-76.
- WILLIAMS I.H., 2010 - The Major Insect Pests of Oilseed Rape in Europe and Their Management: An Overview. In: Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests. 1 ed. - Netherlands: 1-43.
- WILLIS CE, FOSTER SP, ZIMMER CT, ELIAS J, CHANG X., FIELD L.M, WILIAMSON M., DAVIES T.G.E., 2020 - Investigating the status of pyrethroid resistance in UK populations of the cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). - Crop Prot. 138: 105316.
- YU D., VAN ACHTERBERG C., HORSTMANN K., 2016 - Taxapad 2016 - World Ichneumonoidea 2015. Taxonomy, biology, morphology and distribution. USB flash drive. Nepean, Ontario, Canada.





## 4.5 Dočasně uměle vytvořené mimoprodukční plochy podporují výskyt parazitoidů na orné půdě

**Výstup E:** González E, Štrobl M, Janšta P, Hovorka T, Kadlec T, Knapp M. 2022. Artificial temporary non-crop habitats support parasitoids on arable land. *Biological Conservation* **265**:109409. DOI: [10.1016/j.biocon.2021.109409](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109409). (IF 7,497)

### Příspěvní autora:

Autor přispěl ke kompletaci článku především identifikací nasbíraného entomologického materiálu, a to konkrétně jedinců z čeledi parazitických blanokřídlých lumčíkovitých (Hymenoptera: Braconidae). Podílel se také na zpracování sekvenačních dat. Dále autor přispěl ke kompletaci finální verze manuskriptu. Autor se nepodílel na statistickém zpracování dat.

### 4.5.1 Charakteristika problematiky

Na celém světě se zemědělská krajina postupně stala jednotvárnou s převahou pouze pár druhů velkoplošně pěstovaných plodin. Díky tomu je úspěšná produkce plodin silně závislá na agrochemikáliích, jako jsou různé pesticidy a hnojiva. Důsledkem těchto faktů je v takovéto krajině velmi nízká míra biodiverzity, která je existenčně závislá na přítomnosti mimoprodukčních ploch, které organismům poskytují mimo jiné potravu, úkryt a místo na přezimování. Výhodou mimoprodukčních ploch je kromě pozitivního vlivu na biodiverzitu také podpora ekosystémových služeb v podobě predátorů a parazitoidů škůdců plodin. Tvorba a udržování mimoprodukčních ploch, jako jsou květnaté pásy podél a uvnitř polí, pozitivně působí na výskyt přirozených nepřátel, kteří mohou sloužit jako biologická ochrana proti škůdcům. Zatímco trvalé a obhospodařované mimoprodukční plochy mají dobře známá pozitiva, dočasné mimoprodukční plošky uvnitř polí s plodinami (polní kazy) nebyly z hlediska podpory biodiverzity a ekosystémových služeb prakticky studovány.

Jednou z hlavních a nejdůležitějších velkoplošně pěstovaných plodin je ve střední a severní Evropě řepka olejka. Právě v řepce se v praxi polní kazy poměrně frekventovaně vyskytují. Řepka je od začátku až do konce svého růstu napadána řadou škůdců, jako je dřepčík olejkový, stonkovi krytonosci, blýskáček řepkový, krytonosec šešulový a bejlmorka kapustová. Ochrana řepky je u většiny těchto škůdců, díky výskytu rezistentních populací a malému sortimentu účinných látek insekticidů v dnešní době velmi

komplikovaná. Polní kazy vyskytující se v řepce mohou díky nabídce heterogenních zdrojů poskytovat ideální prostředí pro podporu výskytu přirozených nepřátel škůdců, jako jsou někteří parazitoidi, kteří mohou sloužit jako bioagens.

Cílem této práce bylo zjistit 1) jak dočasné mimoprodukční plochy, jejich pozice v rámci pole (okraj, střed) a výsev kvetoucích bylin vzájemně ovlivňují druhovou bohatost, abundanci a druhové složení parazitoidů v různých růstových fázích řepky; 2) jestli dočasné mimoprodukční plochy pozitivně ovlivňují klíčové druhy parazitoidů; 3) zda přítomnost kvetoucích rostlin na mimoprodukčních plochách podporuje výskyt a početnost klíčových parazitoidů.

#### 4.5.2 Metodický postup

Studie byla provedena v severozápadních Čechách v roce 2018 na pěti vybraných polích s intenzivním pěstováním ozimé řepky. Studovaná pole s řepkou byla od sebe v průměru vzdálena 3,4 km a kompozice okolní krajiny sestávala z produkčních ploch, trávníků a drobných lesních ostrůvků. Na každé studované ploše byla sledována tři různá prostředí: 1) kontrolní plocha s ozimou řepkou; 2) plocha bez řepky ponechána přirozené sukcesi 3) plocha bez řepky osetá vičencem ligrusem (*Onobrychis vicifolia*). Na každém poli bylo celkem 6 studovaných ploch o výměře 18 x 18 m s každým typem prostředí. Velikost těchto ploch odpovídá přirozeně se v praxi vyskytujícím polním kazům. U každého typu prostředí byla vždy jedna plocha na okraji pole a druhá uvnitř cca 60 m od okraje. Studované plochy byly konvenčně obhospodařovány tak, jako zbytek pole (běžné agrotechnické zásahy včetně insekticidních ošetření).

Dospělci parazitoidů byli sbíráni pomocí žlutých a bílých misek naplněných vodou se smáčedlem. Misky byly umístěny na dřevěné tyči ve výši vegetace, exponovány po dobu 48 h a následně vybrány. Mimo pasivního sběru bylo dvakrát během sezóny (kvetení a zrání řepky) využito sběru pomocí entomologického smýkadla (50 smyků na zkoumanou plochu). Veškerý nasbíraný materiál z obou metod sběru byl uchován v 96% ethanolu s příslušným označením zkoumané plochy.

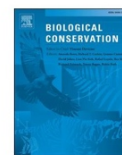
Veškerý nasbíraný materiál z řádu blanokřídlých (Hymenoptera) byl v laboratoři s využitím literatury roztríděn na co nejmenší taxonomické jednotky (nadčeď, čeď, rod či druh). Podrobná identifikace druhů v rámci čeledí byla provedena specialisty na danou čeď. V případě, že podrobná identifikace nebyla možná, byli jedinci určeni do rodu, tribu nebo podčeledi a v rámci těchto jednotek roztríděni na tzv. morphospecies. Pro nejvíce



početné druhy, u kterých nebyla možná morfologická identifikace, byla druhová příslušnost určena pomocí barcodingu.

Pro každý typ plochy a období odběru vzorků byl zkombinován hmyz sebraný pomocí smýkání a obou druhů misek. Ke zjištění druhově specifických reakcí dominantních druhů parazitoidů na neoseté plochy byly vybrány ty druhy, jejichž početnost byla v celkovém vzorku vyšší než 2,5 %. Tímto vznikla podskupina sestávající z 9 dominantních druhů. Dostupnost květů byla v obou obdobích sběru materiálu na neosetých plochách odhadnuta vizuálně a byla stanovena stupnice od 0 (žádné kvetoucí rostliny) do 3 (kvetoucí rostliny na celé ploše).

Pro zjištění efektu typu ploch, pozice ploch v rámci pole, vlivu fenologie řepky na soubor parazitoidů, celkové druhové bohatosti a početnosti parazitoidů byly použity zobecněné mixované lineární modely (GLMMS). Podobně byly tyto modely použity také k vyhodnocení vztahu mezi nabídkou kvetoucích rostlin a parazitoidy (data pouze z neosetých ploch a ploch s vičencem). Pro analýzu, jak je složení parazitoidů ovlivněno typem prostředí (ploch), dobou odběru vzorků a pozicí ploch v rámci pole bylo provedeno nemetrické mnohorozměrné škálování (NMDS) a permutovaná analýza variance (Permanova). Obě analýzy byly provedeny v rámci balíčku *vegan* v softwaru R. Pro zjištění, zda jsou některé druhy parazitoidů úzce vázané na určitý typ prostředí (plochu) byla využita „Indicator Species Analyses“ v rámci balíčku *indicspecies* v softwaru R.



## Artificial temporary non-crop habitats support parasitoids on arable land

Ezequiel González<sup>a,b</sup>, Martin Štrobl<sup>a</sup>, Petr Janšta<sup>c</sup>, Tomáš Hovorka<sup>a,d</sup>, Tomáš Kadlec<sup>a</sup>, Michal Knapp<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague - Suchbátol, 165 00, Czech Republic

<sup>b</sup> Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)- Universidad Nacional de Córdoba (UNC)- CONICET, Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba FCEPYN, Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA Córdoba, Argentina

<sup>c</sup> Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Plant Protection, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Prague - Suchbátol 165 00, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Agri-environmental schemes  
Agricultural landscape  
Biodiversity conservation  
Ecosystem services  
Oilseed rape  
Parasitoids

### ABSTRACT

Non-crop habitats are important to support biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes. Whereas perennial and managed non-crop habitats have known benefits, temporary non-crop patches within arable fields (field defects) have been poorly studied. We created artificial field defects (unsown patches) in oilseed rape (*Brassica napus* L.) fields and evaluated their effects on parasitoid assemblages at two crop growth stages. Moreover, we compared unmanaged patches with those sown with flowering plants (*Onobrychis vicifolia*) and crop controls and analyzed the influence of position within the field (edge or interior), and total flower availability. Altogether, we found almost 200 morphospecies of hymenopteran parasitoids (140 in unsown patches, 147 in *Onobrychis* patches, and 81 in controls), including important enemies of crop pests. Species richness and abundance were higher on both types of unsown patches than in controls but were not affected by *Onobrychis* sowing. The differences between unsown patches and controls were larger during oilseed ripening, suggesting that these temporary habitats can offer important resources during crop senescence. Parasitoid species composition differed between controls and unsown patches, indicating that species not linked to the crop could also benefit from these habitats. Finally, unsown patches with higher flower availability supported higher species richness, total abundance, and abundance of three key species during OSR flowering. Thus, newly created unmanaged habitats have the potential to increase biodiversity despite their small size, although increasing flower resources can boost their benefits. Unsown patches can be easily created by switching-off sowing, facilitating their adoption by farmers. Future studies on pest control levels and comparisons with other agri-environmental schemes would help to elucidate the cost-benefit of unsown patches.

### 1. Introduction

Throughout the world, agricultural landscapes have become extremely simplified and dominated by a small number of crops that are planted in large fields (Tschamtko et al., 2005; Ramankutty et al., 2018). In addition, there is a strong dependence on external agrochemical inputs, such as fertilizers and pesticides (Gliessman, 2015). In consequence, biodiversity in these landscapes is often reduced and the occurrence of many species strongly depends on the presence of non-crop habitats (Landis, 2017). Therefore, maintaining and creating semi-natural habitats is important to support biodiversity in intensively

managed agricultural landscapes (Ekroos et al., 2014).

Natural enemies of crop pests provide the valuable ecosystem service of biological control for agriculture (Hajek and Eilenberg, 2018). Many species of natural enemies depend, at some point of their life cycles, on the resources provided by non-crop habitats, such as alternative hosts or prey, refuges, overwintering sites, and flowering plants (Bianchi et al., 2006). Therefore, natural enemies are benefited by higher proportions of semi-natural habitats at the landscape scale (Chaplin-Kramer et al., 2011; González et al., 2020a; Kovács et al., 2019) and the creation of non-crop habitats such as flower strips at the local scale (Tschumi et al., 2016), which can in turn enhance pest control, at least near these

\* Corresponding author at: Department of Ecology, Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, Praha – Suchbátol 165 00, Czech Republic.

E-mail address: [knapp@fzp.czu.cz](mailto:knapp@fzp.czu.cz) (M. Knapp).

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109409>

Received 4 August 2021; Received in revised form 12 November 2021; Accepted 20 November 2021

Available online 4 December 2021

0006-3207/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

habitats (Albrecht et al., 2020).

Non-crop habitats within intensively managed agricultural landscapes can be either perennial or ephemeral. Perennial non-crop habitats include linear corridors such as hedgerows and grassy field edges (Albrecht et al., 2020; Ernoult et al., 2013) or patches of the original semi-natural ecosystems that persist after habitat loss and fragmentation such as forests (González et al., 2016) and grasslands (Rösch et al., 2013). Ephemeral non-crop habitats include, among others, natural field defects, which are temporary patches within agricultural fields where crop vegetation is poorly developed due to waterlogging, drying out, nutrient deficiencies or animal perturbations (Brose, 2003a, 2003b; Seidl et al., 2020). Early-successional, spontaneous vegetation can colonize these patches making them a potentially suitable habitat for many insect and bird species. The importance of perennial non-crop elements for biodiversity and ecosystem services (ES) provision by insects is well-known (Dainese et al., 2019). However, the role of field defects to support beneficial insects has been rarely studied. While carabid beetles can avoid field defects with low vegetation cover or heterogeneity (Brose, 2003a; Seidl et al., 2020), they still provide similar or slightly lower levels of pest and weed control within defects compared to the surrounding crop areas (González et al., 2020b). Recently, Knapp et al. (2022) shown that artificial field defects (unsown patches) can support various pollinators, true bugs and spiders, however, their effects on parasitoids are still unclear.

Oilseed rape (OSR; *Brassica napus* L.) is one of the most important crops in Central and Northern Europe (Eurostat, 2021), and field defects are frequently observed in OSR fields (González et al., 2020b; Seidl et al., 2020). Throughout its phenology, OSR is attacked by multiple insect pests, such as stem and seed weevils, pollen and flea beetles, and midges (Alford, 2003). These pests are attacked by diverse natural enemies, among else various parasitoids that can significantly reduce their populations (Ulber et al., 2010). Different parasitoid species overwinter on the ground of both OSR and non-crop habitats and colonize new winter OSR fields in spring, where they find their hosts and reproduce. In summer, OSR begins to ripen and the new generation of parasitoids emerge from their hosts. At this point of their cycles, most parasitoid species feed on flowers, which increases their longevity (Wäckers, 2004). Therefore, field defects could benefit parasitoid communities, especially when flowering plants are present.

Here, we performed a manipulative experiment in which we created artificial field defects (hereafter, unsown patches) within conventional OSR fields to investigate their influence on parasitoid assemblages. Furthermore, we compared unmanaged patches (where vegetation grew spontaneously) with patches sown with flowering plants (*Onobrychis vicifolia* Scop.; Fabaceae) and OSR controls. Specifically, we had three main questions: 1) How do unsown patches, their relative position within fields, and the sowing of flowering plants affect parasitoid species richness, abundance, and species composition in different growth stages of OSR?; 2) Are key parasitoids of OSR pests benefitted by unsown patches?; 3) Does flower availability within unsown patches enhance parasitoid assemblages and the abundance of key parasitoid species?

We predicted that more parasitoid species and individuals will be found in unsown patches than in control plots due to the presence of heterogeneous resources. This effect will be particularly high in patches located in the field edge, given that this location facilitates colonisation from adjacent habitats, and in summer, when OSR begin to ripen and non-crop habitats offer alternative resources. Moreover, we expected that patches sown with flowering plants (hereafter, *Onobrychis* patches) will have higher abundance and species richness of parasitoids than unmanaged patches due to the provision of additional floral resources. Finally, we predicted that flower availability will be positively related to parasitoid richness and abundance, as nectar sources represent a highly relevant food resource for most parasitoid species.

## 2. Methods

### 2.1. Study sites and experimental design

The study was conducted in 2018, in an intensive agricultural landscape in the north of the Czech Republic (Fig. 1a; 50.5468°–50.5970°N, 14.2537°–14.2989°E). The study area covered ca. 20 km<sup>2</sup> and has a moderately continental climate with an average annual precipitation of 500–650 mm and an average annual temperature of 7–10 °C (Czech Hydrometeorological Institute [WWW Document], 2020). Within this area, we chose five fields (area 13.3–33.9 ha; altitude 285–385 m.a.s.l.) intensively cultivated with winter OSR. Fields were separated by 3.4 km on average (range: 0.6–5.9 km). The soils of the selected fields were leptosols, cambisols, fluvisols, and chernozems (VUMOP, 2020). The composition of the surrounding landscape was similar at all fields (dominated by arable fields, with grassland and forest patches interspersed). All the fields were sown with winter OSR in September 2017.

Within each field, we selected three different habitat types: control OSR plots (henceforth ‘control’) and two types of unsown patches that were created by destroying OSR plants in early spring. The first type of unsown patches was left unmanaged and followed a successional process of colonization by weeds (henceforth ‘unsown patch’), whereas *Onobrychis* patches were sown using a mix of mechanized and hand sowing with *O. vicifolia* in early April. *O. vicifolia* is a legume plant that is frequently used as fodder and in flower strips to attract beneficial insects in agricultural landscapes (Piffner and Wyss, 2004). Within every field, we established a total of six study plots (squares of 18 × 18 m; Figs. 1b; A1), one plot of each habitat type at the edge (with one side directly neighboring the adjacent habitat) and one at the interior (ca. 60 m from the edge). The selected size of the unsown patches is within the size range of naturally occurring field defects in the region (from 10 to 66 m in diameter; Seidl et al., 2020). Four fields neighbored a grassland and one a deciduous forest, but exploratory analyses indicated that neighboring semi-natural habitat type did not have strong influences on parasitoid assemblages. Due to the dry weather conditions, the density of *Onobrychis* plants was low and both types of unsown patches were dominated by spontaneous plants such as *Thlaspi arvense*, *Chenopodium* sp., *Atriplex* sp., *Polygonum arenastrum*, *Tripleurospermum inodorum*, *Euphorbia helioscopia*, *Lactuca serriola*, and *Avena fatua* (Fig. A1). Farmers managed unsown patches conventionally, as the rest of the fields. A combination of Nurelle® 130 and Rapid® insecticides were applied by spraying during autumn and spring (four and three times, respectively), but no insecticide applications were performed at least two weeks before each sampling occasion. Note that our artificial field defects were established in areas with environmental conditions suitable for optimal crop growth, which differs from natural field defects which commonly occur in extreme conditions (Brose, 2003a; Seidl et al., 2020).

### 2.2. Data collection

Adult parasitoids were sampled using pan traps and sweep-netting in two periods during different OSR phenological stages. The first sampling period was in mid-May, during OSR mass flowering (henceforth ‘flowering’, BBCH stage 65), and the second period was in mid-June during the beginning of the OSR ripening stage (henceforth ‘ripening’, BBCH 80–85). As more parasitoid individuals and species can be collected using pan traps from different colours, a combination of white and yellow pan traps was used (Larsen et al., 2014). Pan traps were plastic dishes (diameter 25 cm, depth 4 cm) filled with saline solution with a few drops of detergent (Jar; UFI: KPQO-R0RU-800Y-F4FV). One pan trap of each colour was placed in the middle of each plot, on top of wooden poles that were adjusted at the height of the surrounding vegetation, and left exposed for 48 h. To sample parasitoids on the vegetation, we swept the vegetation throughout each plot making 50 sweeps using a 35 cm



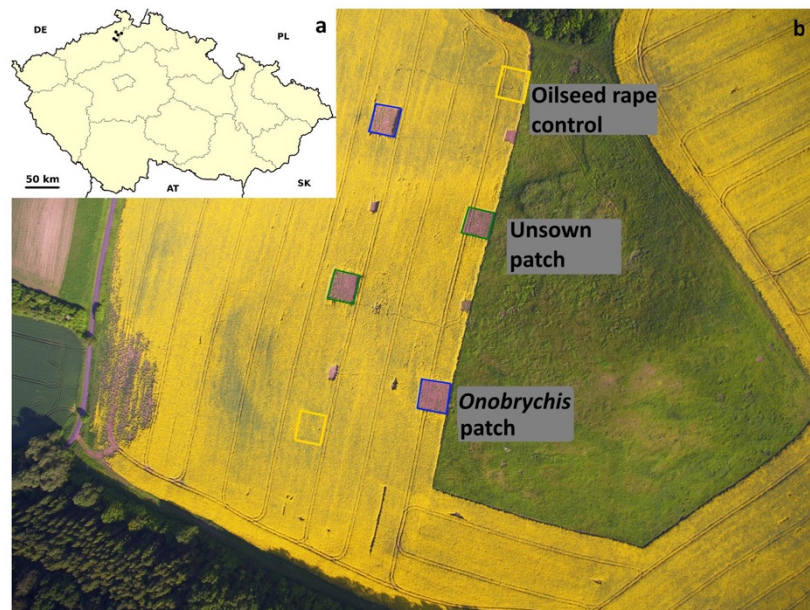


Fig. 1. Study sites location and experimental design. a) Location of the study sites (black dots) in the north of the Czech Republic. b) Example of an OSR field showing the experimental plots ( $18 \times 18$  m squares) at edge and interior locations. Unsown patches are shown in blue, *Onobrychis* patches in green and oilseed rape controls in yellow. Note that the field also has a natural field defect in the lower-left corner. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

diameter sweeping net. Sweep-netting was performed on the same days at all fields and within the days when pan traps were exposed, during favourable weather conditions for insect activity (sunny days with no rainfalls or strong winds). All the captured arthropods were preserved in separate plastic zip bags with 95% ethanol.

At the laboratory, all the specimens of Hymenoptera collected in each sample were sorted to superfamily and family levels using keys (Goulet and Huber, 1993) and individuals from groups with known parasitoid habits were further identified to the species level using specific literature (Table A1; Alford, 2007; Gibson et al., 1997; Starý and Lukáš, 2009; Tobias et al., 1986). We focused only on species from Hymenoptera, as parasitoids from other orders are usually not relevant for the main OSR pests (Alford, 2007). Specialists on the main Hymenoptera families performed the identification and in the case of species with sexual dimorphism, data from males and females were merged for the analyses. When identification to the species level was not possible, individuals were classified to genus, tribe, or subfamily and, within those categories, to morphospecies. Nevertheless, for the most abundant species that were not possible to identify using keys, we identified them through barcoding (Appendix A1).

For each habitat type and sampling period, we combined the insects collected by sweep-netting and both colours of pan traps for further analyses. To investigate species-specific responses of dominant parasitoid species to unsown patches, we selected those whose abundance was higher than 2.5% of the total abundance, resulting in a subset of nine species (see results and Table A1).

Flower availability during both sampling periods was estimated visually on unsown patches and *Onobrychis* patches. Flower availability was assessed using a continuous quantitative scale from 0 (no flowering plants) to 3 (flowering plants present throughout the whole area of the patch).

### 2.3. Statistical analyses

To analyse the effects of habitat type, position within fields, and OSR phenology on parasitoid assemblages, total species richness and abundance (total number of species and individuals per sampling plot) were used as response variables in generalised linear mixed models (GLMMs) with a negative binomial error distribution and a log link, due to overdispersion in the data. The independent variables in the analyses were habitat type (OSR control, unsown patch, and *Onobrychis* patch), sampling period (OSR flowering and ripening), position within fields (edge and interior), and all two-way interactions between these three variables. Field ID was used as a random factor to model the nested structure of the experiment. To evaluate the effects of habitat type, position, and sampling period on the dominant parasitoid species, we calculated the total abundance of these species and used them as response variables in GLMMs with the same independent and random variables as above.

To evaluate the relationship between flower availability and parasitoids, we used only the data from unsown patches and *Onobrychis* patches. Total species richness and abundance, as well as the abundance of the dominant species, were used as response variables in GLMMs with a negative binomial error distribution. Flower availability, sampling period and their interaction were the independent variables, whereas field ID and habitat type nested within field were included as random variables.

For analyses, we started with a full model including all the predictors and the tested two-way interactions. Non-significant interactions were removed from the models, but the main experimental factors (habitat type, sampling period, and position for the first group of analyses; flower availability and sampling period for the second group) were always retained, reflecting our experimental design. Tukey's post hoc tests were performed to identify significant differences among habitat types,

sampling periods, and positions within fields. In order to test for spatial autocorrelation, we performed Moran's I tests using the residuals of the models and the spatial coordinates of each sampling plot. Spatial autocorrelation was not significant for any of the response variables ( $p > 0.05$  in all cases). All the analyses were performed with the software R, version 3.5.1 (R Core Development Team, 2015), using the packages *lme4* (Bates et al., 2007), and *emmeans* (Lenth et al., 2019). Model assumptions and spatial autocorrelation were checked using the package *DHARMa* (Hartig, 2021) and figures of models' predictions and raw data were created with the package *ggeffects* (Lüdtke, 2018).

Finally, we also analyzed how the species composition of parasitoid assemblages was influenced by habitat type, sampling period, and position within the field. To this end, we performed an NMDS (Non-Metric Multi-Dimensional Scaling; Kruskal, 1964) and a PerMANOVA (Anderson, 2001). To minimize the influence of the dominant species, log-transformed species abundance data ( $\log N + 1$ ) was used to calculate the Bray-Curtis dissimilarity index. Both analyses were done using the package *vegan* (Oksanen et al., 2007) in the software R. An Indicator Species Analysis with the R package *indicspecies* (De Caceres and Jansen, 2016) was performed to determine if there were any parasitoid species closely linked to particular habitat types.

### 3. Results

#### 3.1. Parasitoid assemblages on unsown patches and OSR

We collected a total of 5586 individuals, representing 7 superfamilies, 20 families, and 192 species of Hymenoptera (20 identified to the species level, 61 morphospecies identified to the genus level, and 111 morphospecies identified to a higher taxonomic level; Table A1). Of these, 140 species were collected in unmanaged unsown patches, 147 in *Onobrychis* patches, and 81 in OSR controls. The most abundant species were Helconinae sp. 1 (Braconidae; 12.4% of the total abundance), *Trichomalus perfectus* (Pteromalidae; 11.6%), *Mesopolobus morys* (Pteromalidae; 9.6%), *Diaeretiella rapae* (Braconidae; 5.6%), *Pseudotorymus* sp. 1 (Torymidae; 4.3%), Eulophidae sp. 1 (Eulophidae; 4.2%), *Omphale clypealis* (Eulophidae; 3.3%), *Dacnusa* sp. 1 (Braconidae; 3.3%), and *Pediobius metallicus* (Eulophidae; 2.6%). Some of these dominant species are known parasitoids of OSR pests. *T. perfectus* and *M. morys* are among the main parasitoids of the cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus obstructus*). *D. rapae* attacks the cabbage aphid (*Brevicorne brassicae*). *O. clypealis* and *Pseudotorymus* are commonly found parasitizing the brassica pod midge (*Dasineura brassicae*). Several genera of the subfamily Helconinae are parasitoids of pollen beetles (*Brassicogethes* spp.), although our identification level does not allow us to confirm if Helconinae sp. 1 is among them. Similarly, Tersilochinae are also key parasitoids of pollen beetles, but they were represented by only few

individuals in our samples. Finally, *Pediobius metallicus* and *Dacnusa* spp. are reported as parasitoids of leaf miners and could be attacking some incidental OSR pests such as the cabbage leaf miner (*Phytomyza rufipes*) and *Scaptomyza* spp. (Drosophilidae). Other known parasitoids of OSR pests are highlighted in Table A1.

For total species richness we found an interaction between habitat type and sampling period (Table 1). During OSR flowering, species richness was marginally higher in unsown patches and *Onobrychis* patches than in OSR controls. During OSR ripening, significantly more species than during OSR flowering were collected, and the number of species collected in both types of unsown patches was more than two times higher than in OSR controls (Fig. 2a). Habitat type, sampling period, and their interaction were also linked to total abundance (Table 1). During OSR flowering, the highest numbers of individuals were collected in unsown patches, intermediate numbers in *Onobrychis* patches, and the lowest numbers in OSR controls. During OSR ripening, parasitoids in OSR controls were least abundant, comparable to their numbers found in unsown patches during OSR flowering, whereas the number of individuals in both types of unsown patches was on average five times higher (Fig. 2b). Neither species richness nor abundance differed between edge and interior positions. Additional models performed to evaluate the patterns obtained with each sampling method indicated similar effects of habitat type and sampling period for all methods, with some variations on the significance of the interaction between these two variables (Table A2; Fig. A2).

The species composition of parasitoids was also affected by habitat type, sampling period, and their interaction, which explained 37.7% of the variance in the assemblages (Table A3). The NMDS shows that OSR control plots are separated from unsown patches and *Onobrychis* patches along the first axis, whereas the samples from spring and summer are separated along the second axis (Fig. 3). Furthermore, differences in the variability among samples reveal the interaction between habitat type and sampling period: similarity among unsown plots is higher during OSR ripening than during OSR flowering (Fig. 3). The Indicator Species analysis revealed that 30 species were strongly associated with habitat types (Table A4). One species (Tersilochinae sp. 1, Ichneumonidae) was an indicator of unsown patches, three species were indicators of *Onobrychis* patches (*Pachyneuron* sp. 1; *Pediobius* sp. 2; Eulophinae sp. 2), and the remaining 26 were indicators of both types of unsown patches combined (Table A4). No indicator species were detected for OSR controls.

#### 3.2. Abundance of dominant parasitoid species

In general, most of the dominant species showed significant responses to habitat types and sampling periods (Table A5; Fig. A3). All species were more abundant during OSR ripening than during flowering.

**Table 1**

Effects of habitat type, sampling period, position, and their interaction on the species richness and abundance of parasitoids on unsown patches in OSR fields. For each response variable, the independent variables and significant interactions, their estimates, standard errors, z, and P-values are shown.

Response variable	Independent variables	Estimates	Std. error	z value	P-value
Species richness	Habitat type	1.95 (Intercept: Control, Spring, Edge)	0.14	13.91	<0.0001
	Sampling period	0.51 (Summer)	0.17	2.91	0.004
	Position	0.38 (Unsown patch)	0.18	2.11	0.04
	Habitat * period	0.23 ( <i>Onobrychis</i> patch)	0.18	1.28	0.20
		0.05 (Interior)	0.56	0.56	0.58
		0.98 (Unsown patch, Summer)	0.22	4.36	<0.0001
		1.09 ( <i>Onobrychis</i> patch, Summer)	0.23	4.76	<0.0001
Total abundance	Habitat type	2.29 (Intercept: Control, Spring, Edge)	0.19	11.72	<0.0001
	Sampling period		0.25	3.43	0.0006
	Position	0.87 (Summer)			
	Habitat * period	0.93 (Unsown patch)	0.25	3.67	0.0002
		0.47 ( <i>Onobrychis</i> patch)	0.26	1.82	0.07
		-0.02 (Interior)	0.14	-0.15	0.88
		1.46 (Unsown patch, Summer)	0.34	4.27	<0.0001
	1.83 ( <i>Onobrychis</i> patch, Summer)	0.35	5.28	<0.0001	



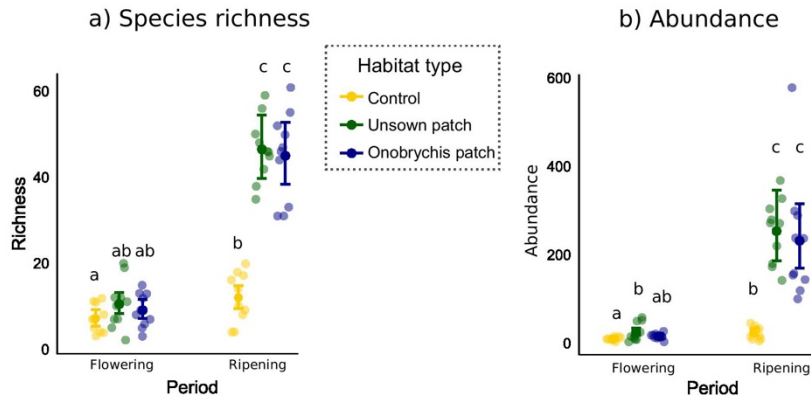


Fig. 2. Interactive effects of habitat type and sampling period on parasitoid assemblages in OSR and artificial field defects. For species richness (a) and abundance (b), estimates ( $\pm 95\%$  confidence intervals) from the GLMMs (dots and error bars), plus raw data (blurry dots) are shown. Yellow represents OSR control plots, green unsovn patches, and blue *Onobrychis* patches. Different letters indicate significant differences according to Tukey's post hoc tests. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

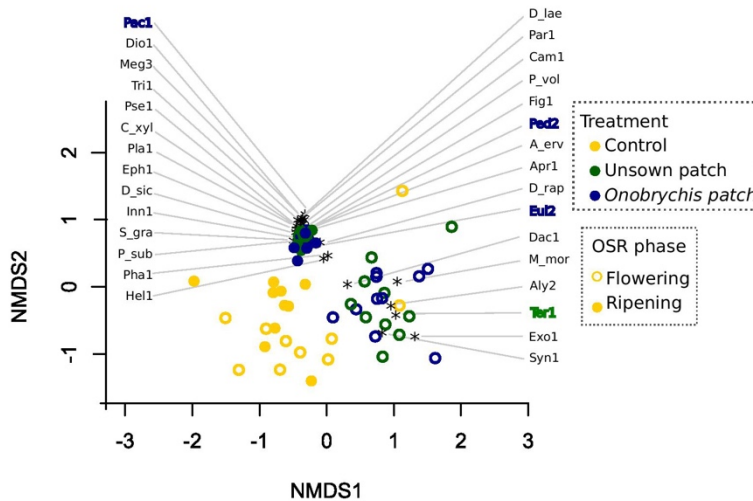


Fig. 3. NMDS bi-plot for the species composition of parasitoids in OSR and artificial field defects. Habitat types are shown with different colors: OSR control in yellow, unsovn patches in green, and *Onobrychis* patches in blue. Samples from OSR flowering are shown with empty circles and samples from OSR ripening with filled circles. Indicator species from the Indicator Species Analysis are shown using stars and lines connecting each star with the species label. Species names in green and blue represent species associated to unsovn and *Onobrychis* patches, respectively, whereas species names in black are used for indicators of both types of unsovn patches combined. For the complete species names corresponding to each label, please see Table A4. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In general, there were no differences between habitat types during OSR flowering, except for *Dacnusa* sp. 1, *Omphale clypealis*, and Eulophidae sp. 1, which were more abundant in both types of unsovn patches, and *Pseudotorymus* sp. 1, which was not collected in that sampling period. Finally, during OSR ripening all species were more abundant in both types of unsovn patches than in OSR controls, while only *Pseudotorymus* sp. 1 was significantly more abundant in unmanaged patches than in *Onobrychis* patches.

*Pediobius metallicus* was more abundant at field edges than interiors (Table A5; Fig. A4). For the remaining species, no large differences between positions were found, although Helconidae sp. 1, *Mesopolobus norys*, and *Pseudotorymus* sp. 1 had slightly higher abundances at the edge (Table A5). Contrarily, *Dacnusa* sp. 1 and Eulophidae sp. 1 tended to have more individuals at the interior of the fields.

### 3.3. Influence of flower availability on parasitoids in unsovn patches

During OSR flowering, the availability of flowers on both unsovn patches and *Onobrychis* patches was positively related to the total richness and abundance of parasitoids, whereas during OSR ripening flower availability was not important (Table A7; Fig. 4). At the level of individual species, the abundances of Helconidae sp. 1 and *Diaeretiella rapae* were also positively associated with flower availability during OSR flowering, and *Pediobius metallicus* was positively linked to flower availability at both sampling periods (Table A6; Fig. A5). On the other hand, the remaining dominant species showed no responses to flower availability (Table A6).

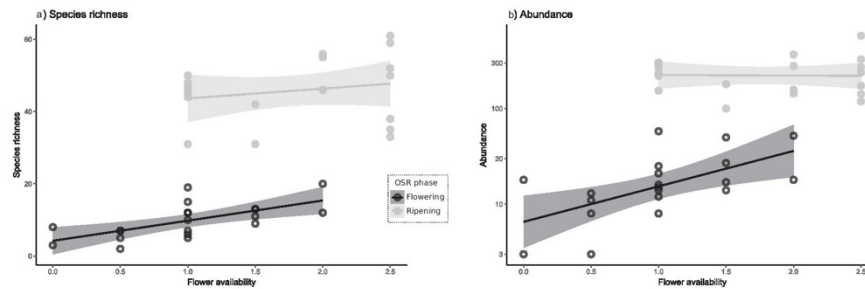


Fig. 4. Interactive effects of flower availability and sampling period on parasitoid assemblages in unsown patches within OSR fields. For species richness (a) and abundance (b), the estimated effect of flowers and sampling period ( $\pm 95\%$  confidence intervals) from the GLMMs (lines and confidence bands) and raw data (dots) are shown. Black and grey represent OSR flowering and ripening, respectively.

#### 4. Discussion

The presence of non-crop habitats within arable fields or in their surroundings is frequently linked to an increase in arthropod diversity, including beneficial organisms such as natural enemies of agricultural pests (Chaplin-Kramer et al., 2011). Here, we showed that artificially-created field defects (unsown patches) within OSR fields were linked to increased local diversity and abundance of hymenopteran parasitoids, including common parasitoids of OSR pests. This increase was particularly remarkable in summer, when OSR starts to ripen (from BBCH 80) and unsown patches offer flower resources for beneficial insects. Contrary to our expectations, patches located at the field edges and interiors supported similar numbers of species and individuals. This suggests that the dispersal abilities of most species allow them to colonize the different parts of a field early in the season. Furthermore, the relevance of floral resources was highlighted by the positive link between flower availability within both types of unsown patches and species richness, total abundance, and abundance of some key parasitoid species.

The higher richness and abundance of parasitoids found on unsown patches, compared to OSR fields, contrasts with the lower diversity of carabids found on natural field defects (Seidl et al., 2020). This difference could be linked to the scarce vegetation cover of natural field defects. Natural field defects are frequently linked to stressful conditions for the growth of both crop and other plant species. Though, plant cover benefited ground beetle species richness (Seidl et al., 2020), indicating that it is a key factor determining the value of defects for insects. Artificial defects, by contrast, were created in field parts where OSR was growing successfully, which could also translate into better conditions for spontaneously-growing plants. In addition, the importance of both natural field defects (Seidl et al., 2020) and unsown patches for insect communities increased during OSR ripening. In contrast to OSR flowering, when the crop offers high amounts of nectar, during ripening defects can become an important source of scarce resources. At this time, mainly the offspring of the overwintered parasitoids are sampled (Ulber et al., 2010) and this might indicate that defects are more relevant for this new generation than for overwintered individuals, which are searching for hosts in the crop earlier in the season. Also, this result is in agreement with the idea that populations of natural enemies that reproduce within crop fields move towards non-crop habitats during crop senescence (Rand et al., 2006). In addition, pesticide applications typically decrease during ripening, which could contribute to the increase in diversity and abundance. However, since the increase was observed mainly in unsown patches, resource provision and spillover seem more relevant.

Multivariate analysis revealed that species composition of parasitoid assemblages in unsown patches during OSR ripening was much more homogeneous and similar to control plots than during OSR flowering. As

OSR pest parasitoids find hosts and flowers within the crop during flowering, the differences in species composition indicate that other species not closely-related to OSR were collected within unsown patches, which highlights their potential benefits to support biodiversity on arable land. In fact, several indicator species associated with both types of unsown patches were identified. This highlights the role of unsown patches in supporting insect biodiversity and providing resources also to parasitoid species that might act as natural enemies in other crops. Even if managed non-crop patches such as flower strips can support higher richness and abundance of insects, wild flower patches can provide resources with different phenologies that play a relevant complementary role (von Königsłow et al., 2021). On the other hand, the higher similarity and low variability during OSR ripening reinforces the idea of spillover of natural enemies from the crop towards semi-natural habitats (Rand et al., 2006).

The sowing of *Onobrychis* plants did not affect parasitoid assemblages, i.e., both *Onobrychis* and unmanaged patches had similar diversity and assemblage composition. This could be linked to the limited development of *Onobrychis* plants in the experiment because of very dry weather conditions in 2018. As a result, the number of flowering *Onobrychis* plants was low and other weeds colonised both types of unsown patches (MK, personal observation; Fig. A1, A6). In addition, legumes represent a suitable source of nectar only for a limited subset of parasitoid species (Wäckers, 2004), so this plant species can have limited benefits for parasitoids.

Contrary to our expectations, species richness, abundance, and composition at field edges and interiors were similar. Most parasitoid species of OSR pests hibernate in OSR fields from the previous season or in non-crop habitats (Ulber et al., 2010) and must move from these habitats to colonize new OSR fields after the winter due to crop rotation. Thus, in spring, a higher abundance of parasitoids can be expected in field edges (Murchie et al., 1999), whereas after mating, their distribution can extend throughout the fields and reflect the spatial distribution of their hosts (Ferguson et al., 2000) and the availability of nectar sources (Hatt et al., 2018). Nevertheless, the good dispersal abilities of flying parasitoids can help them to efficiently disperse through agricultural landscapes at distances lower than 100 m (Halder, 2011) and some OSR pest parasitoids respond strongly to landscape scales of 1–1.5 km (Thies and Tschamtkke, 2010), which explain the lack of differences between our edge and interior positions. Since interior unsown patches also supported diverse communities of parasitoids, this indicates that these simple management actions can be included at different parts of the fields to increase beneficial insects far from field edges. As networks of semi-natural habitats are highly important to increase biodiversity in agricultural landscapes (Tschamtkke et al., 2021), unsown patches of similar sizes to those used in this study could be incorporated in parts of the fields where other agri-environmental schemes are more difficult to



establish.

The dominant parasitoid species found in our study indicate that at least the cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham)), the brassica pod midge (*Dasineura brassicae* (Winnertz)), and aphids were some of the main pests of OSR in these fields. *Trichomalus perfectus* and *Mesopolobus morys* are the main parasitoids of the cabbage seedpod weevil and can effectively control its populations (Kovács et al., 2013, 2019; Veromann et al., 2010). Only females of *T. perfectus* survive the winter in non-crop habitats (Alford, 2003). Potentially, unsown patches could act as suitable habitats for this and other species with similar life cycles after OSR senescence. The life cycles of most parasitoids are poorly studied, but similar phenologies are expected for many species (Alford, 2007). Some of the abundant parasitoids indicate the presence of minor and incidental pests of OSR, such as other aphids (*Myzus persicae*) and lepidopteran larvae (*Plutella xylostella* and *Pieris* spp.). Despite these herbivores are rarely considered serious pests of OSR (Alford, 2003), they can be the main pests in other crops. Therefore, unsown patches could also be playing a role as sources of natural enemies for neighboring fields or future crops following crop rotation as, for example, the movement of parasitoids between OSR and other crops can be considerably high (Macfadyen and Muller, 2013).

During OSR flowering, local flower availability within unsown patches was positively linked to total species richness and abundance, as well as to the abundance of three dominant species. As flower availability in unsown patches was more limiting during this phase, patches dominated by bare ground seem to be avoided by parasitoids. This suggests that active management aimed at increasing early floral resources in these habitats could increase the performance of unsown patches, although unmanaged patches supported parasitoids, particularly during OSR ripening, and the lack of management could be attractive for farmers as well. Many species of hymenopteran parasitoids are known to visit and feed on flowers (Jervis et al., 1993), which in many cases is linked to increases in longevity, fecundity, and activity (Bianchi and Wäckers, 2008). Indeed, *Diaeretiella rapae* was one of the species positively linked to flower availability and a previous study showed that nectar consumption increased female longevity and the number of parasitised hosts (Jamont et al., 2013). Pest control can thus be improved when flowers are provided such as in flower strips, although only within close proximity to the strips (Albrecht et al., 2020) and, in the case of OSR, this was observed only after six years (Thies et al., 1997). Furthermore, certain flower traits, such as nectar availability and flower colour, can drive the abundance of parasitoids of OSR pests in flower strips (Hatt et al., 2018). However, nectar accessibility is a key factor for parasitoids in general (Wäckers, 2004), and thus tailored flower enrichments are usually ideal (Tschumi et al., 2016). Unfortunately, as we did not measure the composition of flowering plants on unsown patches, we cannot relate parasitoid assemblages with specific plant species. Nevertheless, wild flowers can support variable abundances of other insects as well, especially when late-flowering plants are present (von Königslöw et al., 2021).

Some caution has to be exercised when interpreting the positive effects of our unsown patches on parasitoids. On the one hand, even though our results revealed clear patterns, the experiment was replicated in a low number of fields due to logistic reasons. On the other hand, these ephemeral habitats could also act as reservoirs for pests (Tamburini et al., 2020). However, Hatt et al. (2018) showed that parasitoids of pollen beetles and weevils on flower strips responded to flower traits and not to their host abundance, which suggests that alternative resources rather than hosts are attracting parasitoids into non-crop habitats. At the same time, there is a risk that unsown patches become an ecological trap in arable fields, as observed for predators in annual ploughed wildflower strips (Ganser et al., 2019). Small habitat patches usually have higher rates of species loss due to ecosystem decay, suggesting that isolated unsown patches might have limited value to sustain biodiversity across time (Chase et al., 2020). Moreover, despite their potential benefits for farmers, natural field defects (as well as our

artificial defects) are usually managed as the rest of the field, including pesticide application and tillage. Insecticide applications can have severe consequences for OSR pest parasitoids when an application is done after the early-season migration to the fields (Murchie et al., 1997). After harvesting OSR and when the next crop is sown, tillage is known to reduce the populations of parasitoids overwintering in the soil by at least 50% (Nilsson, 1985), which could be a significant issue if the high number of individuals collected during OSR ripening also overwinters in these patches. Nevertheless, our results show that even with conventional management, local diversity and abundance were much higher in unsown patches than in OSR during ripening. Unsown patches are an easy and inexpensive method for farmers to apply, which can motivate their choice. A comparison among unsown patches and other agri-environmental schemes, such as flower strips or fallows, would provide needed information of their relative performance in terms of biodiversity and ESs enhancement while considering the associated management costs. In this sense, unsown patches show some similarities to fallow plots for ground-nesting birds (Chamberlain et al., 2009), although the latter are larger and thus our patches might be less suitable for birds. Furthermore, future studies on crop pests, pollinators, insect trophic webs and pest control levels are necessary to determine if the net effects of unsown patches for crops is beneficial (i.e., if yield losses due to unsown patches can be compensated). Similarly, it would also be interesting to evaluate if maintaining these patches for a longer time period and studying how alternative management strategies such as low levels of soil disturbance (Alford, 2007) can help to maximize the positive effects of unsown patches.

## 5. Conclusions

Our study showed that newly created unsown patches in OSR fields can support natural enemies of crop pests despite their relatively small size and lack of specific management. Besides the potential benefits for the provision of biological pest control, unsown patches were also linked to a diverse assemblage of parasitoids, which shows their potential to support biodiversity in agricultural landscapes. This was especially true in the late season, when spontaneous vegetation can become a source of scarce resources for many species. In addition to the higher abundance and richness of parasitoids in unsown patches, compared to OSR, flower availability enhanced parasitoids diversity and abundance, indicating that flower resources are an important mechanism driving our results. These positive effects call for further research on the applicability of this simple tool in arable land. Future studies investigating other arthropod taxa and benefits for nesting birds would further improve our understanding on the potential of unsown patches as conservation tools on arable land.

## Funding

This study was supported by the Czech Science Foundation (grant number 18-26542S).

## CRedit authorship contribution statement

MK and TK designed the study; MS and MK organized the experiment; EG and MS performed sampling and laboratory work; EG, PJ and TH identified the material; EG performed statistical analysis; EG and MK wrote the first draft and all authors contributed to and agreed on the final version.

## Data availability

The raw data used in the article is available through Mendeley Data (González et al., 2022).



### Declaration of competing interest

We declare no conflict of interests.

### Acknowledgements

We thank Miroslav Seidl, Lada Jakubíková and Oldřich Čížek for their help during fieldwork and Kamil Holý for identification of *Ichnumonidea* species. We also thank Lada Jakubíková for her support with sample processing, ZD Liběšice for providing OSR fields for this experiment, Tjit Teder for fruitful comments on the manuscript draft and the handling editor and two anonymous reviewers for their constructive comments on the manuscript. We declare that we have no conflict of interests.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109409>.

### References

- Albrecht, M., Kleijn, D., Williams, N.M., Tschumi, M., Blaauw, B.R., Bommarco, R., Campbell, A.J., Dainese, M., Drummond, F.A., Entling, M.H., Ganser, D., Arjen de Groot, G., Goulson, D., Grab, H., Hamilton, H., Herzog, F., Isaacs, R., Jacot, K., Jenneret, P., Jonsson, M., Knop, E., Kremen, C., Landis, D.A., Loeb, G.M., Marini, L., McKeerchar, M., Morandini, L., Pfister, S.C., Potts, S.G., Rundlöf, M., Sardiñas, H., Sciligo, A., Thies, C., Tschirntke, T., Venturini, E., Veromann, E., Vollhardt, I.M.G., Wäckers, F., Ward, K., Wilby, A., Woltz, M., Wratten, S., Sutter, L., 2020. The effectiveness of flower strips and hedgerows on pest control, pollination services and crop yield: a quantitative synthesis. *Ecol. Lett.* 23, 1488–1498. <https://doi.org/10.1111/ele.13576>.
- Alford, D.V., 2003. *Biocontrol of Oilseed Rape Pests*. Blackwell Science, Oxford.
- Alford, D.V., 2007. The oilseed rape crop. In: *Biocontrol of Oilseed Rape Pests*. Blackwell Science Ltd, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470750988.ch1>.
- Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.
- Bianchi, F.J.J.A., Wäckers, F.L., 2008. Effects of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids. *Biol. Control* 46, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.010>.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2007. lme4: Linear Mixed-effects Models Using Eigen and SVD. R Package Version 0.9975-12.
- Bianchi, F.J.J.A., Booij, C.J.H.J.H., Tschirntke, T., 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proc. Biol. Sci.* 273, 1715–1727. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3530>.
- Brose, U., 2003a. Bottom-up control of carabid beetle communities in early successional wetlands: mediated by vegetation structure or plant diversity? *Oecologia* 135, 407–413. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1222-7>.
- Brose, U., 2003b. Regional diversity of temporary wetland carabid beetle communities: a matter of landscape features or cultivation intensity? *Agric. Ecosyst. Environ.* 98, 163–167. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00078-1).
- Chamberlain, D., Gough, S., Anderson, G., Macdonald, M., Grice, P., Vickery, J., 2009. Bird Study Bird Use of Cultivated Fallow "Lapwing plots" Within English Agri-environment Schemes. <https://doi.org/10.1080/00063650902792114>.
- Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M.E., Blitzer, E.J., Kremen, C., 2011. A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecol. Lett.* 14, 922–932. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01642.x>.
- Chase, J.M., Blowes, S.A., Knight, T.M., Gerstner, K., May, F., 2020. Ecosystem decay exacerbates biodiversity loss with habitat loss, 2020 *Nature* 584, 238–243. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2531-2>, 5847820.
- Czech Hydrometeorological Institute [WWW Document], 2020. URL <http://portal.chmi.cz/> (accessed 5.20.20).
- Dainese, M., Martin, E.A., Aizen, M.A., Albrecht, M., Bartomeus, I., Bommarco, R., Carvalheiro, L.G., Chaplin-Kramer, R., Gagic, V., Garibaldi, L.A., Ghazoul, J., Grab, H., Jonsson, M., Karp, D.S., Kennedy, C.M., Kleijn, D., Kremen, C., Landis, D.A., Letourneau, D.K., Marini, L., Poveda, K., Rader, R., Smith, H.G., Tschirntke, T., Andersson, G.K.S., Badenhausser, I., Baensch, S., Bezerra, A.D.M., Bianchi, F.J.J.A., Boreux, V., Bretagnolle, V., Caballero-Lopez, B., Cavigliasso, P., Cetković, A., Chacoff, N.P., Classen, A., Cusser, S., Da Silva E Silva, F.D., Arjen De Groot, G., Dudenhöffer, J.H., Ekroos, J., Fijen, T., Franck, P., Freitas, B.M., Garratt, M.P.D., Gratton, C., Hipólito, J., Holzschuh, A., Hunt, L., Iverson, A.L., Jha, S., Keasar, T., Kim, T.N., Kishinevsky, M., Klatt, B.K., Klein, A.M., Krewenka, K.M., Krishnan, S., Larsen, A.E., Lavigne, C., Liere, H., Maas, B., Mallinger, R.E., Pachon, E.M., Martínez-Salinas, A., Meehan, T.D., Mitchell, M.G.E., Molina, G.A.R., Nesper, M., Nilsson, L., O'Rourke, M.E., Peters, M.K., Plečáček, M., Potts, S.G., Ramos, D.de L., Rosenheim, J.A., Rundlöf, M., Rusch, A., Sáez, A., Scheper, J., Schleuning, M., Schmack, J.M., Sciligo, A.R., Seymour, C., Stanley, D.A., Stewart, R., Stout, J.C., Sutter, L., Takada, M.B., Taki, H., Tamburini, G., Tschumi, M., Viana, B.F., Westphal, C., Willcox, B.K., Wratten, S.D., Yoshioka, A., Zaragoza-Trello, C., Zhang, W., Zou, Y., Steffan-Dewenter, L., 2019. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. *Sci. Adv.* 5 <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0121>.
- De Caceres, M., Jansen, F., 2016. Package "indicspecies". *Indicators* 8, 1.
- Ekroos, J., Olsson, O., Rundlöf, M., Wätzold, F., Smith, H.G., 2014. Optimizing agri-environment schemes for biodiversity, ecosystem services or both? *Biol. Conserv.* <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.02.013>.
- Emoult, A., Vialatte, A., Butet, A., Michel, N., Rantier, Y., Jambon, O., Burel, F., 2013. Grassy strips in their landscape context, their role as new habitat for biodiversity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 166, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.07.004>.
- Eurostat, 2021. Crop production. [WWW Document]. URL <https://ec.europa.eu/eurostat/>.
- Ferguson, A.W., Klukowski, Z., Walczak, B., Perry, J.N., Muggleston, M.A., Clark, S.J., Williams, I.H., 2000. The spatio-temporal distribution of adult *Ceutorhynchus assimilis* in a crop of winter oilseed rape in relation to the distribution of their larvae and that of the parasitoid *trichomalus perfectus*. *Entomol. Exp. Appl.* 95, 161–171. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2000.00654.x>.
- Ganser, D., Knop, E., Albrecht, M., 2019. Sown wildflower strips as overwintering habitat for arthropods: effective measure or ecological trap? *Agric. Ecosyst. Environ.* 275, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.02.010>.
- Gibson, G.A.P., Huber, J.T., Woolley, J.B., 1997. *Annotated Keys to the Genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera)*. National Research Council Research Press, Ottawa.
- Glennan, S.R., 2015. *Agroecology: The Ecology of Sustainable Food Systems*, thirdEd. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- González, E., Landis, D.A., Knapp, M., Valladares, G., 2020a. Forest cover and proximity decrease herbivory and increase crop yield via enhanced natural enemies in soybean fields. *J. Appl. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13732>.
- González, E., Salvo, A., Defago, M.T., Valladares, G., 2016. A moveable feast: insects moving at the forest-crop interface are affected by crop phenology and the amount of forest in the landscape. *PLoS One* 11, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158836>.
- González, Ezequiel, Seidl, M., Kadlec, T., Ferrante, M., Knapp, M., 2020b. Distribution of ecosystem services within oilseed rape fields: effects of field defects on pest and weed seed predation rates. *Agric. Ecosyst. Environ.* 295, 106894 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106894>.
- González, E., Strobl, M., Jansta, P., Hovorka, T., Kadlec, T., Knapp, M., 2022. Data from: Artificial temporary non-crop habitats support parasitoids on arable land. Mendeley Data V1. <https://doi.org/10.17632/kmgwm2tb8k1>.
- Goulet, H., Huber, J.T., 1993. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Agriculture Canada, Ottawa.
- Hajek, A.E., Eilenberg, J., 2018. *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*, seconded. Cambridge University Press, Cambridge.
- Halder, A.C., 2011. Distribution of natural enemies in herbivores of oilseed rape fields in Sweden. *Int. J. Agric. Res. Innov. Technol.* 1, 29–36. <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.305262>.
- Hartig, F., 2021. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-level/Packed) Regression Models. R Package Version 0.4.1. <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>.
- Hatt, S., Uytendaele, R., Lopes, T., Chen, J.L., Piquery, J., Monty, A., Francis, F., 2018. Effect of flower traits and hosts on the abundance of parasitoids in perennial multiple species wildflower strips sown within oilseed rape (*Brassica napus*) crops. *Arthropod Plant Interact.* 12, 787–797. <https://doi.org/10.1007/s11829-017-9567-8>.
- Jamont, M., Crépeillère, S., Jaloux, B., 2013. Effect of extrafloral nectar provisioning on the performance of the adult parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Biol. Control* 65, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.01.010>.
- Jervis, M.A., Kidd, N.A.C., Fitton, M.G., Huddleston, T., Davah, H.A., 1993. Flower-visiting by hymenopteran parasitoids. *J. Nat. Hist.* 27, 67–105. <https://doi.org/10.1080/00222939300770051>.
- Knapp, M., González, E., Strobl, M., Seidl, M., Jakubíková, L., Čížek, O., Balvín, O., Benda, D., Teder, T., Kadlec, T., 2022. Artificial field defects: a low-cost measure to support arthropod diversity in arable fields. *Agric. Ecosyst. Environ.* 325, 107748 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107748>.
- Kovács, G., Kaasik, R., Metspalu, L., Williams, I.H., Luik, A., Veromann, E., 2013. Could Brassica rapa, Brassica juncea and Sinapis alba facilitate the control of the cabbage seed weevil in oilseed rape crops? *Biol. Control* 65, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.01.011>.
- Kovács, G., Kaasik, R., Lof, M.E., van der Werf, W., Kaart, T., Holland, J.M., Luik, A., Veromann, E., 2019. Effects of land use on infestation and parasitism rates of cabbage seed weevil in oilseed rape. *Pest Manag. Sci.* 75, 658–666. <https://doi.org/10.1002/PS.5161>.
- Kruskal, J.B., 1964. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29, 1–27. <https://doi.org/10.1007/BF02289565>.
- Landis, D.A., 2017. Designing agricultural landscapes for biodiversity-based ecosystem services. *Basic Appl. Ecol.* <https://doi.org/10.1016/j.bae.2016.07.005>.
- Larsen, N.J., Minor, M.A., Cruickshank, R.H., Robertson, A.W., 2014. Optimising methods for collecting Hymenoptera, including parasitoids and Halictidae bees, in New Zealand apple orchards. *J. Asia Pac. Entomol.* 17, 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.03.004>.
- Lenth, R., Singmann, H., Love, J., Buerkner, P., Herve, M., 2019. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-squares Means.
- Lüdtke, D., 2018. ggeffects: tidy data frames of marginal effects from regression models. *J. Open Source Softw.* 3, 772. <https://doi.org/10.21105/joss.00772>.

- Macfadyen, S., Muller, W., 2013. Edges in agricultural landscapes: species interactions and movement of natural enemies. *PLoS One* 8, e59659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059659>.
- Murchie, A.K., Williams, I.H., Alford, D.V., 1997. Effects of commercial insecticide treatments to winter oilseed rape on parasitism of *Ceutorhynchus assimilis* Paykull (Coleoptera: Curculionidae) by *Trichomalus perfectus* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Crop Prot.* 16, 199–202. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(96\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(96)00103-2).
- Murchie, A.K., Williams, I.H., Perry, J.N., 1999. Edge distributions of *Ceutorhynchus assimilis* and its parasitoid *Trichomalus perfectus* in a crop of winter oilseed rape (*Brassica napus*). *BioControl* 44, 379–390. <https://doi.org/10.1023/A:1009997917947>.
- Nilsson, C., 1985. Impact of ploughing on emergence of pollen beetle parasitoids after hibernation. *Z. Angew. Entomol.* *<sb:volume-nr></sb>* *<sb:volume-nr> 100, 302–308.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1985.tb02783.x>.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., 2007. *Vegan: Available, Community Ecology Package. R Package Version 1.8-5.*
- Pfiffner, L., Wyss, E., 2004. Use of sown wildflower strips to enhance natural enemies of agricultural pests. In: Guff, G.M., Wratten, S.D., Altieri, M.A. (Eds.), *Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods*. CABI-Publishing, Collingwood, pp. 167–188. <https://doi.org/10.1079/9780851999036.0165>.
- R Core Development Team, 2015. *R: A Language And Environment for Statistical Computing, 3.2.1.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Ramankutty, N., Mehrabi, Z., Waha, K., Jarvis, L., Kremen, C., Herrero, M., Rieseberg, L.H., 2018. Trends in global agricultural land use: implications for environmental health and food security. *Annual Review of Plant Biology* 69, 789–815.
- Rand, T.A., Tylmanak, J.M., Tschamtk, T., 2006. Spillover edge effects: the dispersal of agriculturally subsidized insect natural enemies into adjacent natural habitats. *Ecol. Lett.* 9, 603–614. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00911.x>.
- Rösch, V., Tschamtk, T., Scherber, C., Batáry, P., 2013. Landscape composition, connectivity and fragment size drive effects of grassland fragmentation on insect communities. *J. Appl. Ecol.* 50, 387–394. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12056>.
- Seidl, M., González, E., Kadlec, T., Saska, P., Knapp, M., 2020. Temporary non-crop habitats within arable fields: the effects of field defects on carabid beetle assemblages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 293, 106856 <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106856>.
- Stary, P., Lukáš, J., 2009. Aphid parasitoids and their tritrophic associations in Slovakia (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). In: *Folia Hymenopterologica Slovaca*, 1, pp. 1–63.
- Tamburini, G., Santoiemma, G., E. O'Rourke, M., Bommarco, R., Chaplin-Kramer, R., Dainese, M., Karp, D.S., Kim, T.N., Martín, E.A., Petersen, M., Marini, L., 2020. Species traits elucidate crop pest response to landscape composition: a global analysis. *Proc. R. Soc. B* 287. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2020.2116>.
- Thies, C., Tschamtk, T., 2010. Biological rape pest control in spatio-temporally changing landscapes. In: *Biocontrol-based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht, pp. 273–284. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3983-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3983-5_9).
- Thies, C., Denys, C., Tschamtk, T., Ulber, B., 1997. Influence of field margins and fallowland on pest-beneficial insect-interactions on oilseed rape *Brassica napus* ssp. *oleifera* Der Einfluss von Saumbiotopen und Ackerbrachen auf Schadlings-Nutzungs-Interaktionen im Raps *Brassica napus* ssp. *oleifera*, 27, 393–398.
- Tobias, V.I., Belokobylskij, S.A., Kotenko, A.G., 1986. Keys to the Insects of the European Part of the Ussr., Baba Barkha Nath, New Delhi. <https://doi.org/10.1093/aesa/89.3.494>.
- Tschamtk, T., Grass, I., Wanger, T.C., Westphal, C., Batáry, P., 2021. Beyond organic farming – harnessing biodiversity-friendly landscapes. *Trends in Ecology & Evolution* 2877. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.06.010>.
- Tschamtk, T., Klein, A.M., Kruess, A., Steffan-Dewenter, I., Thies, C., 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - ecosystem service management. *Ecol. Lett.* <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00782.x>.
- Tschumi, M., Albrecht, M., Collatz, J., Dubsy, V., Entling, M.H., Najar-Rodriguez, A.J., Jacot, K., 2016. Tailored flower strips promote natural enemy biodiversity and pest control in potato crops. *J. Appl. Ecol.* 53, 1169–1176. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12653>.
- Ulber, B., Williams, I.H., Klukowski, Z., Luijk, A., Nilsson, C., 2010. Parasitoids of oilseed rape pests in Europe: key species for conservation biocontrol. In: *Biocontrol-based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Netherlands, pp. 45–76. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3983-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3983-5_2).
- Veromann, E., Williams, I.H., Kaasik, R., Luijk, A., 2010. In: Potential of parasitoids to control populations of the weevil *Ceutorhynchus obstrictus* (Marsham) on winter oilseed rape, 57, pp. 85–92. <https://doi.org/10.1080/09670874.2010.539714>.
- von Königslöw, V., Mupepele, A.-C., Klein, A.-M., 2021. Overlooked jewels: existing habitat patches complement sown flower strips to conserve pollinators. *Biol. Conserv.* 261, 109263 <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2021.109263>.
- VUMOP, 2020. Map portal of Research Institute for Soil and Water Conservation. <https://mapy.vumop.cz/>.
- Wackers, F.L., 2004. Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. *Biol. Control* 29, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2003.08.005>.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Rezistence blýskáčka řepkového k pyrethroidům v České republice bez prokázaného výskytu mutace typu *kdr* v jeho populacích

U všech námi deseti hodnocených populací byla v letech 2017 až 2020 prokázána vysoká rezistence vůči pyrethroidu lambda-cyhalothrin (dále LC) (Hovorka et al. 2021a). Toto zjištění je v souladu s pracemi Slater et al. (2011), Seidenglanz et al. (2016b, 2016a) a Stará & Kocourek (2018), kteří také zkoumali rezistenci blýskáčka k pyrethroidům v ČR. Rezistence blýskáčka řepkového vůči tomuto pyrethroidu je tak v ČR široce rozšířená a odpovídá celoevropskému trendu šíření této rezistence (Delorme et al. 2002; Hansen 2003; Heimbach & Muller 2010; Nauen et al. 2012; Heimbach & Müller 2013), která je zapříčiněna dlouhodobým a nadměrným používáním účinných látek pyrethroidů.

Po ztrátě účinnosti přípravků na bázi LC a také deltamethrinu začaly být zemědělci využívány jiné pyrethroidy, a to hlavně tau-fluvalinate (dále TF) a etofenprox (dále EP) (Heimbach & Muller 2010; Stará & Kocourek 2018). Podobně jako u LC došlo i u TF k postupné ztrátě jeho účinnosti, avšak míra rezistence nebyla v německých a dánských populacích blýskáček tak silná jako v případě LC (Hansen 2003; Heimbach et al. 2010). Stejně tak byla i v naší práci zaznamenána mnohem vyšší citlivost k TF v porovnání s LC, avšak s vysokou variabilitou mezi zkoumanými roky. V naší studii také nebyla nalezena zkřížená rezistence mezi LC a TF, což je ve shodě s Heimbachem a Müllerem (2010), kteří také nenalezli u německých populací blýskáček tento typ rezistence. Nicméně Seidenglanz et al. (2020) ve své studii publikovali střední míru zkřížené rezistence mezi LC a TF.

Naše data letálních dávek thiaklopridu (dále TC) u deseti populací blýskáček ukázala vysokou variabilitu mezi populacemi a posun ve snižování citlivosti vůči této účinné látce. Hodnoty LD<sub>50</sub> byly ve 26 případech vyšší než hodnoty z německých populací publikované Zimmerem & Nauenem (2011b). V letech 2018 a 2020 dosáhla míra rezistence vůči TC námi zkoumaných populací srovnatelné úrovně jako rezistence vůči pyrethroidům LC a TF. Jak ukázala korelační analýza, tak snížená citlivost k TC souvisela s jeho cross rezistencí vůči LC a TF a také s rostoucím trendem rezistence v letech 2018 a 2020. Mírný pokles citlivosti několika populací k thiaklopridu byl již dříve hlášen z Dánska v roce 2014, z Německa v letech 2015–2016 (Kaiser et al. 2018) a z Česka v roce 2014 (Spitzer et al. 2020).

V našem výzkumu (Hovorka et al. 2021a) nebyla prokázána snížená citlivost populací blýskáčků vůči ú.l. chlorpyrifos (mortalita všech populací 100%) a indoxakarb, což je ve shodě s pracemi Wegorek et al. (2011); Seidenglanz et al. (2017) a Spitzer et al. (2020). Účinná látka chlorpyrifos byla však v EU v roce 2020 zakázána a není ji tak možné v ochraně rostlin dále využívat (European Commission 2020). Stejně tak není již od roku 2021 možné používat ú.l. indoxakarb (ÚKZÚZ 2022). Jedinou alternativou tak v ochraně rostlin proti rezistentním populacím blýskáčků zůstává neonikotinoid acetamiprid.

Dospělci blýskáčků, kteří přežili 100% a vyšší dávku pyrethroidů LC a TF, byli zkoumáni na přítomnost mutace typu *kdr* L1014F v sodném kanálu. U žádného jedince nebyla tato mutace nalezena (Hovorka et al. 2021a). Stejně jako v pracích Nauen et al. (2012) a Wrzesińska et al. (2014) byly zjištěny pouze dvě tiché mutace, které nemají vliv na vznik a vývoj rezistence u blýskáčků. Mechanismus rezistence českých populací blýskáčků tak bude pravděpodobně metabolického původu a založený na zvýšené aktivitě cytochrom P450 oxidázy. Tento předpoklad podporuje studie (Erban et al. 2017), která prokázala významnou roli cytochromu P450 a glutathion-S-transferázy v detoxifikaci pyrethroidu deltamethrinu v populacích českých blýskáčků.

## **5.2 Rezistence/tolerance blýskáčka řepkového k insekticidům z pohledu proteomiky**

V naší studii (Kocourek et al. 2021) byl demonstrován vysoce výkonný proteogenomický přístup k identifikaci markerů, které by mohly hrát klíčovou roli v toleranci/rezistenci blýskáčků vůči účinným látkám insekticidů z různých skupin. Změny zastoupení markerů po ošetření LC a TC ukázaly aditivní účinek při postupné selekci populace blýskáčků těmito insekticidy, což je ve shodě s výsledky biologických testů. Z výsledků také vyplývá, že detoxifikační enzymy pravděpodobně nehrají hlavní roli v přežívání blýskáčků po vystavení vysokým dávkám pesticidů, což bylo již naznačeno v předcházející studii Erban et al. (2017). Statisticky významný nárůst PR5-like proteinů (pathogenesis-related protein 5-like) ve všech variantách ošetření potvrdil jejich důležitou roli v toleranci/rezistenci blýskáčků k pyrethroidům a neonikotinoidům (Kocourek et al. 2021) což také potvrzuje předcházející studie Erban et al. (2017) v případě ú.l. deltamethrin. U proteinů typu Thaumatin, kam patří PR5-like protein, je dobře známo, že reagují na abiotický i biotický stres (Shatters et al. 2006). Mohou tedy, jak uvádí Erban et al. (2017), reagovat také na stres vyvolaný ošetřením pesticidy.

Za obecně důležité markery rezistence jsou považovány silné detoxifikační enzymy různých tříd, které jsou při ošetření nadměrně exprimovány. V naší studii (Kocourek et al. 2021) byla s vysokou spolehlivostí po ošetření LC zjištěna významně snížená abundance esterhydrolázy (C11orf54 homologu). Ačkoliv se v dřívějších studiích Philippou et al. (2011) a Zamojska et al. (2013) ukázalo, že esterázy hrají jen omezenou roli v některých populacích blýskáčků, jejich detoxifikační potenciál by neměl být podceňován. V případě, že dojde ke štěpení esterové vazby, pyrethroidy mohou být deaktivovány. Tento fakt je důležitý z hlediska vyšší účinnosti neesterového pyrethroidu etofenproxu oproti esterovým pyrethroidům jako je LC, deltamethrin a alfa-cypermethrin, kterým esterázy štěpí na rozdíl od etofenproxu vazbu a mohou tak hrát roli v toleranci/rezistenci blýskáčků vůči insekticidům (Makunas et al. 2011; Šmatas et al. 2012; Seidenglanz et al. 2020). V naší studii (Kocourek et al. 2021) nebyl s vysokou spolehlivostí nalezen žádný klíčový detoxifikační enzym typu cytochromoxidázy (CYP) odpovědný za rezistenci. Na nižší úrovni spolehlivosti bylo však u všech variant ošetření v porovnání s kontrolou nalezeno vyšší množství CYP9Z40. Podobně bylo také v předchozí studii Erban et al. (2017) nalezeno nižší množství CYP6BQ23 u brouků, kteří nepřežili ošetření deltamethrinem, avšak opětovná analýza nepotvrdila významný rozdíl u přeživších a nepřeživších brouků. Nicméně tato opakovaná analýza přinesla zjištění, že ošetření deltamethrinem zvýšilo abundanci detoxifikačního enzymu označovaného jako CYP9Z42 (cytochrom P450), který vykazuje podobnost s námi nalezeným CYP9Z40 a dle výsledků proteomiky lze poukázat na existenci metabolické souvislosti s přežíváním. V naší studii (Kocourek et al. 2021) byla také zjištěna významná role RNA helikáz (DEAD-box ATP-dependenční 20-like helikázy = DEAD20 a tři isoformy ATP-dependenční RNA helikázy p62-like = Rm62) jako faktorů, které ovlivňují rezistenci/toleranci k pesticidům. RNA helikázy se podílejí na genové expresi a fungují jako hnací síla zpracování mRNA na translačně aktivní mRNA (Jankowsky & Fairman 2007; Bourgeois et al. 2016). Změna v DEAD-box helikázách je dle Kant et al. (2007) a Linder & Jankowsky (2011) spojena s reakcí na stres. V naší práci (Kocourek et al. 2021) byla pozorována významná downregulace těchto RNA helikáz po ošetření LC a také LC+TH podobně jako ve studii Erban et al. (2017) v případě ošetření blýskáčků deltamethrinem. Regulace DEAD-box helikáz jako epigenetických markerů může být klíčovým faktorem v reakci na více stresů. Otevřenou otázkou zůstává, zda a jak tyto markery souvisejí s dalšími pozorovanými změnami, zejména s upregulací PR5 v důsledku expozice pesticidům. Naše data ukazují na multirezistentní adaptace k ošetření



pesticidy a tyto mechanismy jsou pravděpodobně regulovány epigenetickými faktory. Další výzkum je však spolu se studiem genetického pozadí populací nutný.

### **5.3 Rozdílná atraktivita odrůd řepky jako potenciální nástroj ochrany proti blýskáčku řepkovému a krytonosci šešulovému**

V naší čtyřleté studii (Hovorka et al. 2021b) bylo zjištěno, že odrůdy řepky s různou barvou květu a fenologií mají rozdílnou atraktivitu pro blýskáčka řepkového a krytonosce šešulového.

Výsledky přímého odpočtu dospělců blýskáčka ukázaly, že brouci nebyli schopni rozlišit odrůdy řepky před květem. Od počátku kvetení však blýskáčci preferovali žlutě kvetoucí odrůdy řepky před bíle kvetoucí odrůdou s nejvyšší abundancí na odrůdě DK Exssence. Data získaná metodou smýkání konstantně napříč roky u blýskáčka ukázala, že blýskáčci preferovali odrůdy žlutě kvetoucí s nejvyšší abundancí na odrůdě DK Exssence a statisticky významně nižší abundancí na odrůdě bíle kvetoucí (Witt). Toto potvrzuje také Giamoustaris & Mithen (1996), kteří uvádějí, že početnost blýskáčků byla v jejich studii přibližně o 50 % nižší na bíle kvetoucí odrůdě než na žlutě kvetoucí. Také Blight & Smart (1999) uvádějí vyšší atraktivitu žluté barvy oproti bílé pro blýskáčky. Rozdíl mezi žlutě kvetoucími odrůdami s odlišnou fenologií nebyl v případě blýskáčka statisticky průkazný, ačkoliv na pozdnější odrůdě bylo v průměru zachyceno méně jedinců. Studie Koleva & Zhelezov (2017) a Krüger & Ulber (2010) však potvrzují statisticky významný rozdíl v počtu blýskáčků mezi žlutě kvetoucími odrůdami s rozdílnou fenologií a je tak třeba dalších studií v podmínkách ČR. Podobně jako blýskáček i krytonosec šešulový preferoval odrůdy žlutě kvetoucí před bíle kvetoucí a rozdíl v abundanci k. šešulového na žlutě kvetoucích odrůd s rozdílnou fenologií taktéž nebyl statisticky významný (Hovorka et al. 2021b). Podobných výsledků dosáhla i kanadská studie Cárcamo et al. (2007), která využila kombinaci brukve řepáku jako obsevu s řepkou jako hlavní plodinou. Krytonosci v této studii preferovali dříve kvetoucí b. řepák, kde se koncentrovali, a mohlo zde být provedeno ošetření a zabránit tak migraci do hlavní plodiny. V období od počátku květu lze tedy ošetření řepky založené na atraktivitě odrůd využít jak pro blýskáčka, tak pro krytonosce, kteří v našich studiích vykazovali podobnou reakci na odrůdy.

Znalosti o rozdílné atraktivitě odrůd řepky pro oba škůdce lze využít pro úpravu ochrany na jednotlivých odrůdách, kterou lze založit na strategii "push-pull" (Cook et al. 2007). Podle Cook et al. (2013) ale byly bíle kvetoucí odrůdy pro blýskáčka stejně atraktivní

jako odrůda se žlutými okvětními plátky, ale rostliny s červenými a modrými okvětními lístky byly výrazně méně atraktivní. Důvodem tohoto rozdílu v atraktivitě dvou bíle kvetoucích odrůd řepky pro blýskáčka může být odlišný genotyp, který ovlivňuje různé úrovně UV odrazivosti (Cook et al. 2013). Barari et al. (2005) a Cook et al. (2006) uvádějí využití preference hostitelských rostlin ve strategiích ochrany proti škůdcům řepky. Rostliny preferované škůdci mohou být využity jako lapací a na nich provedeno chemické ošetření insekticidy.

V sortimentu odrůd řepky jsou také odrůdy, které disponují jistou obranyschopností (antixenóza) vůči škůdcům a jsou jimi méně preferovány. Antixenotická odolnost těchto odrůd je založena na rozdílné atraktivitě rostlin, kterou hmyz vnímá čichem nebo zrakem. Byly například vyšlechtěny odrůdy řepky s nízkým podílem alkenylglukosinolatů, které blýskáčci méně preferují (Cook et al. 2006). Podobně byla při šlechtění řepky použita hořčice bílá, která je odolná vůči poškození k. šešulovým (Doddall & Kott 2006). Slibné hybridy řepky olejky pro použití ve strategii push-pull by byly založeny na kombinaci obou mechanismů, jako hybridy, které hmyz vnímá čichem, a ty, které vnímá zrakem.

Na základě výsledků (Hovorka et al. 2021b) byla navržena pěstební technologie řepky využívající rozdílnou atraktivitu odrůd pro škůdce. Díky této technologii by mohlo v budoucnu dojít ke snížení chemických vstupů do polí a nepřímé podpoře diverzity členovců včetně přirozených nepřátel a predátorů škůdců řepky.

## **5.4 První záznam o výskytu lumčička *Microctonus brassicae* v České republice a jeho potenciál jako bioagens proti dřepčíku olejkovému**

Celkem bylo v tomto krátkém experimentu vylíhnuto pět samců parazitoida *Microctonus brassicae*. Tato práce (Hovorka 2022) přináší první záznam o výskytu tohoto druhu v České republice a kontinentální Evropě. Ve vzorku populace dřepčíků byla v tomto experimentu poměrně vysoká míra parazitace (20 %). Podobných výsledků dosáhla i studie stejného parazitoida kolektivem Jordan et al. (2020) z Velké Británie. Míra parazitace byla v laboratorních experimentech s dřepčíky v průměru 44 %. Ve studii byl také detailněji popsán životní cyklus tohoto parazitoida a možnosti jeho chovu a množení v zajetí. Právě úspěšně popsán protokol chovu lumčička *M. brassicae* v zajetí ukazuje do budoucna na možnost jeho využití pro biologickou ochranu brukvovitých plodin proti dřepčíku olejkovému (Jordan et al. 2020; Ortega-Ramos et al. 2022). Je ovšem nutné laboratorní chov optimalizovat do podmínek České republiky a Evropské unie a následně vyzkoušet

funkčnost tohoto bioagens v praxi. Další možností použití tohoto parazitoida v ochraně brukvovitých rostlin mimo laboratorní chovy je zpětné vypuštění parazitovaných dospělců dřepčίκů na pole s plodninami (McNeill et al. 2002; Jordan et al. 2020; Ortega-Ramos et al. 2022). Je však nutné přesně identifikovat napadené dospělé a také zjistit míru parazitace populací dřepčिका olejkového tak, jak doporučují Jordan et al. (2020) a Ortega-Ramos et al. (2022) ve svých studiích.

Druhy parazitoidů rodu *Microctonus* Wesmael, 1835 byly již ve světě v praxi úspěšně použity pro biologickou ochranu rostlin (Goldson et al. 1992, 1997; McNeill et al. 2002; Jordan et al. 2020). Příkladem mohou být dva druhy: *M. aethiopoides* (Loan, 1975) a *M. hyperodae* (Loan, 1974), které byly introdukovány na Nový Zéland za účelem biologické ochrany ploch vojtěšky a obilnin, na kterých škodí dva zavlečené druhy nosatcovitých brouků (*Sitona discoideus* Gyllenhal, 1834 a *Listronotus bonariensis* Kuschel, 1955). V případě obou druhů parazitoidů byla introdukce úspěšná a parazitace škůdců v průměru přesahovala 50 % (Prestidge et al. 1991; John M. & Barlow 2001). Výsledky všech zmíněných studií tak ukazují na potenciál využití druhů rodu *Microctonus* včetně *M. brassicae* v biologické ochraně proti škůdcům.

## **5.5 Dočasně uměle vytvořené mimoprodukční plochy podporují výskyt parazitoidů na orné půdě**

Za dobu našeho výzkumu (González et al. 2022) bylo celkem odchyceno 5 586 jedinců blanokřídleho hmyzu patřících do 7 nadčeledí, 20 čeledí a celkem 192 druhů, z nichž 140 bylo odchyceno na neosetých plochách bez managementu (polní kazy), 147 na plochách s vičencem a 81 na kontrolních plochách v poli s řepkou. Některé druhy parazitoidů, které nejsou blízce vázány na řepku, byly odchyceny pouze v polních kazech. Z toho vyplývá fakt, že uměle vytvořené polní kazy jsou spojeny s podporou lokální diverzity a početnosti blanokřídlejších parazitoidů podobně jako je tomu dle Chaplin-Kramer et al. (2011) u ostatních mimoprodukčních ploch.

V naší studii (González et al. 2022) byla prokázána interakce mezi typem prostředí (management ploch) a počtem druhů parazitoidů. Nejvíce druhů bylo zaznamenáno na obou plochách bez řepky, jak v období květu, tak v období dozrání řepky. V období dozrání bylo na plochách bez řepky odchyceno více jak pětinasobné množství druhů, což je zapříčiněno vyšší nabídkou kvetoucích rostlin na těchto plochách v tomto období. Avšak výsledky Seidla et al. (2020) ukázaly nižší diverzitu střevlíkovitých brouků v přirozeně



vzniklých polních kazech. Jelikož jsou přirozeně se vyskytující kazy zapříčiněny nevhodnými podmínkami pro růst většiny rostlin, mívají také menší pokryv vegetací, s čímž by mohly souviset rozdíly ve výsledcích našich studií. Námi vytvořené polní kazy byly naopak na místech, kde se plodinám dařilo a poskytovaly pravděpodobně také vhodnější podmínky pro růst plevelných rostlin než u přirozeně vzniklých polních kazů. Během období dozrávání řepky se ale význam polních kazů v obou studiích zvýšil, poněvadž v tomto období mohou nabízet pro přirozené nepřátele nedostatkové zdroje v podobě pylu a nektaru. Ve fázi dozrávání řepky je dle Ulber et al. (2010b) zaznamenáváno více potomků přezimujících parazitoidů, což naznačuje významnost polních kazů z hlediska nabídky nedostatkových zdrojů pro tuto novou generaci. Tento výsledek je také v souladu s myšlenkou, že populace přirozených nepřátel, které se rozmnožují na polích s plodinami, se během stárnutí plodin přesouvají na stanoviště mimo plodiny (Rand et al. 2006). Kromě toho se během dozrávání obvykle snižuje aplikace pesticidů, což by mohlo přispět ke zvýšení diverzity a početnosti nejen parazitoidů.

Třicet druhů parazitoidů bylo silně asociováno s typem stanoviště, z nichž jeden druh (*Tersilochinae* sp. 1, *Ichneumonidae*) byl indikátorem ploch bez managementu (polní kazy), tři druhy indikátory ploch s vičencem (*Pachyneuron* sp. 1, *Pediobius* sp. 2, *Eulophinae* sp. 2) a zbylých 26 bylo společnými indikátory těchto dvou stanovišť. Nebyl nalezen žádný indikátorový druh pro kontrolní plochy s řepkou. Druhové složení parazitoidů odpovídalo výskytu některých škůdců řepky, jako jsou krytonosec šesulový, bejломorka kapustová, záředník polní, bělásci a různé druhy mšic. Ačkoliv je škodlivost některých druhů v řepce nízká mohou být významnými škůdci přilehlých plodin. Proto by polní kazy mohly hrát roli i jako zdroj přirozených nepřátel pro okolní pole nebo následné plodiny (Macfadyen & Muller 2013).

Oproti našemu očekávání nebyl prokázán vliv polohy polních kazů (vnitřek vs. okraj pole) na druhovou bohatost, početnost a složení parazitoidů. To naznačuje, že schopnost šíření většiny druhů umožňuje parazitoidům kolonizovat různé části nebo jiná pole na počátku sezóny. Na jaře lze tedy očekávat vyšší početnost parazitoidů na okrajích polí (Murchie et al. 1999), zatímco po spáření se mohou šířit napříč polem a odrážet tak prostorové rozšíření svých hostitelů (Ferguson et al. 2000) a dostupnost zdrojů nektaru (Hatt et al. 2018). Výhodné vlastnosti z hlediska šíření u okřídlených parazitoidů jim umožňují efektivně se šířit zemědělskou krajinou na vzdálenosti do 100 m (Halder 2011) a orientovat se v měřítku krajiny 1-1,5 km (Thies & Tschardtke 2010), což vysvětluje absenci rozdílů mezi polními kazy na okraji a uvnitř pole. Jelikož polní kazy uvnitř polí taktéž podporovaly

společenstva parazitoidů, lze tato jednoduchá managementová opatření provádět na různých částech pole a zvýšit tak výskyt užitečných organismů mimo okraje polí. Sítě polopřirozených stanovišť jsou velmi důležité z hlediska podpory biodiverzity v zemědělské krajině (Tschardt et al. 2021), proto by polní kazy podobné velikosti jako v naší studii mohly být vytvořeny na částech polí, kde je obtížné zavést jiná agroenvironmentální opatření.

Během období květu řepky nebyly zaznamenány významné rozdíly v preferenci druhů parazitoidů pro zkoumané plochy (González et al. 2022). Většina dominantních druhů parazitoidů byla ale významně více početná v období dozrávání řepky na obou plochách bez ní. Důležitou roli zde v tomto období hraje dostupnost květů na neosetých plochách, která zvyšuje diverzitu i početnost parazitoidů a je tedy důležitou proměnnou, která významně ovlivnila naše výsledky. Aktivní management polních kazů (dosévání kvetoucích rostlin) by mohl podpořit výskyt parazitoidů, ale spíše absence managementu je v praxi pro zemědělce více lákavá. Nicméně je známo, že mnoho druhů parazitoidů navštěvuje květy, kde se živí pylem a nektarem (Jervis et al. 1993). Právě nabídka květů je spojena s prodloužením životnosti a plodnosti parazitoidů, jak bylo zjištěno Bianchi & Wäckers (2008). Jedním z druhů pozitivně vázaných na květy byl v naší studii lumčík *Diaeretiella rapae*, u kterého bylo již ve studii Jamont et al. (2013) prokázáno, že nabídka pylu a nektaru zvyšuje dlouhověkost a počet parazitovaných hostitelů (mšice). Parazitace škůdců užitečnými organismy se tak může zvýšit s nabídkou kvetoucích rostlin v bezprostřední blízkosti polí v podobě jak kvetoucích pásů, tak divoce rostoucích rostlin v polních kazech.

Ačkoliv výsledky naší studie (González et al. 2022) odhalil pozitivní vliv polních kazů, je třeba zmínit i pár úskalí naší studie. Kromě malého počtu opakování by efemérní stanoviště v podobě polních kazů mohla také sloužit jako rezervoár škůdců (Tamburini et al. 2020). Hatt et al. (2018) také ve své studii upozornili, že spíše alternativní zdroje lákají parazitoidy než vyšší abundance hostitelů. Existuje také riziko, že neoseté polní kazy se stanou ekologickou pastí na orné půdě, jako tomu bylo v případě predátorů a každoročně oraných květnatých pásů ve studii Ganser et al. (2019). Malé plochy jako polní kazy obvykle vykazují vyšší míru úbytku druhů v důsledku rozpadu ekosystému, což naznačuje, že mohou mít omezenou hodnotu pro udržení biodiverzity v čase (Chase et al. 2020). Negativní vliv na potenciál polních kazů má také většinou konvenční způsob obhospodařování na těchto plochách, včetně orby a aplikace pesticidů (Nilsson 1985; Murchie et al. 1997). Nicméně naše výsledky ukazují (González et al. 2022), že i při

konvenčním hospodaření byla lokální diverzita a početnost v polních kazech během období dozrávání mnohem vyšší než v řepce. Neoseté plochy jako polní kazy tak mohou být pro zemědělce snadnou a levnou alternativou k některým jiným opatřením vyžadující pravidelný management, jako jsou květnaté pásy nebo zelené úhory. Avšak multidisciplinární srovnávací výzkum různých opatření a jejich vliv na podporu biodiverzity a rentability pro zemědělce je do budoucna nutný.

## 6 Závěry

Výsledky publikovaných prací jsou rozděleny do tří tematických celků: (1) zaměřených na stanovení míry rezistence českých populací blýskáčka řepkového a jejích mechanismů, (2) na inovaci pěstební technologie řepky, která je využitelná v rámci integrované ochrany rostlin a jako antirezistentní strategie ochrany řepky proti škůdcům, (3) na možnosti využití užitečných organismů a podpory jejich výskytu v zemědělské krajině.

Výsledky monitoringu účinnosti přípravků na ochranu proti blýskáčku řepkovému ukázaly vysokou míru rezistence vůči pyrethroidu lambda-cyhalothrin u všech hodnocených populací v letech 2017 až 2020. Byly zaznamenány první lokální populace se sníženou citlivostí k účinné látce thiaklopid s vysokou variabilitou mezi roky. Poprvé byla v polních podmínkách prokázána cross rezistence thiaklopidu a lambda-cyhalothrinu a thiaklopidu a tau-fluvalinatu. Dále byla zjištěna nízká účinnost etofenproxu a vysoká účinnost chlorpyrifosu a indoxacaru, avšak po ukončení řešení projektu byla registrace těchto dvou účinných látek ukončena. V českých populacích blýskáčka nebyla prozatím nalezena mutace typu *kdr*, která by byla odpovědná za rezistenci vůči pyrethroidům, pozadí této rezistence je tak pravděpodobně jiného původu. Výsledky proteogenomického přístupu naznačují, že důležitou roli v rezistenci/toleranci blýskáček k pyrethroidům a neonicotinoidům mohou hrát proteiny PR5 (pathogenesis-related protein 5) spolu s RNA helikázami (DEAD-box helikázy). Byla také zjištěna metabolická souvislost přežívání blýskáček po vysokých dávkách insekticidů, která je spojena s vysokou expresí některých detoxifikačních enzymů jako jsou cytochrom-oxidázy. Pro potvrzení epigenetických faktorů ovlivňují rezistenci je nutné dalších detailnějších studií.

Úzké spektrum registrovaných insekticidů neumožňuje v současné době efektivně dodržovat antirezistentní strategii, proto byla ověřována nová pěstební technologie řepky. Tato technologie byla založena na využívání rozdílné atraktivity odrůd řepky pro škůdce. Výsledky odchytu dvou škůdců řepky blýskáčka řepkového a krytonosce šešulového ukázaly v období od začátku květu řepky statisticky významnou preferenci žlutě kvetoucích odrůd před bíle kvetoucí. Byl také zaznamenán rozdíl ve výskytu obou škůdců mezi fenologicky odlišnými žlutě kvetoucími odrůdami, ale statisticky nebyl průkazný. Dále bylo zjištěno, že blýskáčci nejsou schopni rozlišit odrůdy před začátkem kvetení. Navržená pěstební technologie využívá obsevu bíle kvetoucí řepky na hlavní části pozemku časnější žlutě kvetoucí odrůdou, která slouží jako lapací plodina. Na preferované odrůdě se koncentrují škůdci a je proti nim možný provést ochranný zásah, čímž lze ušetřit hlavní část

pozemku od nadbytečných chemických vstupů a podpořit tak výskyt přirozených nepřátel škůdců, jako jsou jejich parazitoidi, na hlavní části pozemku.

Významnou skupinu přirozených nepřátel představují blanokřídlí parazitoidi, kteří dokážou účinně regulovat některé škůdce. Proto se další studie věnovala zjištění výskytu lumčíka *Microctonus brassicae*, který parazituje v dospělých škůdce řepky dřepčíka olejkového. Výskyt tohoto parazitoida byl poprvé zaznamenán v České republice a také v kontinentální Evropě. Tento druh parazitoida by mohl být v budoucnu po dalším výzkumu využit jako prostředek biologické ochrany rostlin. Z hlediska regulace škůdců řepky je důležité pro parazitoidy a také další užitečné organismy vytvořit vhodné podmínky pro jejich přežívání. Ty může řada druhů v zemědělské krajině nalézt na mimoprodukčních plochách, kterými mohou být i polní kazy (nepravidelnosti ve struktuře porostů). Výsledky našeho výzkumu ukázaly, že uměle vytvořené polní kazy v polích s řepkou mají vysoký potenciál v podpoře výskytu přirozených nepřátel. Bylo prokázáno, že uměle vytvořené polní kazy jsou ve srovnání s kontrolními plochami s řepkou spojeny s rozmanitým společenstvem parazitoidů. Některé druhy parazitoidů indikovaly výskyt svých hostitelů, mezi které patřily i škůdci řepky. Významně vyšší výskyt a diverzita parazitoidů na umělých polních kazech, v porovnání s řepkou, byla obzvláště patrná v pozdní sezóně (dozrávání řepky). V tuto dobu přirozeně vzniklá vegetace na umělých polních kazech s řadou kvetoucích druhů plevelů a poskytovala parazitoidům v porovnání s plochami v řepce nedostatkové zdroje jako je pyl a nektar.

## 7 Seznam literatury

- Achterberg CV. 2016. Braconidae. Fauna Europaea. Museum für Naturkunde, Berlin. Available from [https://fauna-eu.org/cdm\\_dataportal/taxon/b741ef3d-98bf-4771-96f3-dcd26b0d95b0](https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/b741ef3d-98bf-4771-96f3-dcd26b0d95b0) (accessed March 2023).
- Albrecht M, Kleijn D, Williams NM, Tschumi M, Blaauw BR, Bommarco R, Campbell AJ, Dainese M, Drummond FA, Entling HE, Ganser D, Groot GA, Goulson D, Grab H, Hamilton H, Herzog F, Isaacs R, Jacot K, Jeanneret P, Jonsson M, Knop E, Kremen C, Landis DA, Loeb GM, Marini L, McKerchar M, Morandin L, Pfister SC, Potts SG, Rundlöf M, Sardiñas H, Sciligo A, Thies C, Tschamntke T, Venturini E, Veromann E, Vollhardt IMG, Wäckers F, Ward K, Westbury DB, Wilby A, Woltz M, Wratten S, Sutte L. 2020. The effectiveness of flower strips and hedgerows on pest control, pollination services and crop yield: a quantitative synthesis. *Ecology Letters* **23**:1488-1498.
- Alford DV. 1999. *A Textbook of Agricultural Entomology*. Blackwell Science, Oxford & London.
- Alford DV. 2003. The oilseed rape crop. Pages 1-9 in Alford DV, editor. *Biocontrol of Oilseed Rape Pests*. Blackwell Science, Oxford.
- Alford DV. 2003. *Biocontrol of Oilseed Rape Pests*. Blackwell Science, Oxford.
- Altieri MA. 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. Pages 19-31 in Paoletti MG, editor. *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes*. Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- Ansari MS, Moraiet MA, Ahmad S. 2014. Insecticides: impact on the environment and human health. Pages 99-123 in Malik A, Grohmann E, Akhtar R, editors. *Environmental Deterioration and Human Health*. Springer, Dordrecht.
- Anstead JA, Williamson MS, Eleftherianos I, Denholm I. 2004. High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**:871-877.
- Assefa Y, Prasad PV, Foster C, Wright Y, Young S, Bradley P, Stamm M, Ciampitti IA. 2018. Major management factors determining spring and winter canola yield in North America. *Crop Science* **58**:1-16.

- Audisio P, Cline AR, Biase AD, Antonini G, Mancini E, Trizzino M, Costantini L, Strika S, Lamanna F. 2009. Preliminary re-examination of genus-level taxonomy of the pollen beetle subfamily Meligethinae (Coleoptera: Nitidulidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **49**:341-504.
- Baimey HK, Hamamouch N, Kolombia YA. 2020. *Horticultural Crops*. IntechOpen, London.
- Barari H, Cook SM, Clark SJ, Williams IH. 2005. Effect of a turnip rape (*Brassica rapa*) trap crop on stem-mining pests and their parasitoids in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *BioControl* **50**:69-86.
- Barzman M, Bàrberi P, Birch NAE, Boonekamp P, Dachbrodt-Saaydeh S, Graf B, Hommel B, Jensen JE, Kiss J, Kudsk P, Lamichhane JR, Messéan A, Moonen AM, Ratnadass A, Ricci P, Sarah JL, Sattin M. 2015. Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development* **35**:1199-1215.
- Bass C, Puinean AM, Zimmer CT, Denholm I, Field LM, Foster SP, Gutbrod O, Nauen R, Slater R, Williamson MS. 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **51**:41-51.
- Begon M, Harper JL, Townsend CR. 1986. *Ecology. Individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Beránek J, Jégrová K, Juroch J, Patočková J, Perutka M, Radová Š, Šlégrová Z. 2023. Rostlinolékařský portál. ÚKZÚZ, Brno. Available from [https://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/#rlp|so|skudci](https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rlp|so|skudci) (accessed March 2023)
- Bianchi FJJA, Booij CJH, Tscharrntke T. 2006. Sustainable pest regulation in agricultural landscapes: a review on landscape composition, biodiversity and natural pest control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**:1715-1727.
- Bianchi FJJA, Wäckers FL. 2008. Effects of flower attractiveness and nectar availability in field margins on biological control by parasitoids. *Biological Control* **46**:400-408.
- BIOCONT. 2023. Mšice. BIOCONT. Available from <https://www.biocont.cz/msice/> (accessed March 2023).
- Blacquiere T, Smagghe G, Van Gestel CA, Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* **21**:973-992.

- Blight MM, Smart LE. 1999. Influence of visual cues and isothiocyanate lures on capture of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* in field traps. *Journal of Chemical Ecology* **25**:1501-1516.
- Boatman ND, Brickle NW, Hart JD, Milsom TP, Morris AJ, Murray AW, Murray KA, Robertson PA. 2004. Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds. *Ibis* **146**:131-143.
- Bohatá J. 2023. Rostlinolékařský portál. ÚKZÚZ, Brno. Available from [https://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/#rlp|uzitorg|detail:7ce88979b78062af8041508c0b6d2de7](https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rlp|uzitorg|detail:7ce88979b78062af8041508c0b6d2de7) (accessed March 2023).
- Bourgeois CF, Mortreux F, Auboeuf D. 2016. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**:426-438.
- Brose U. 2003. Regional diversity of temporary wetland carabid beetle communities: a matter of landscape features or cultivation intensity? *Agriculture, Ecosystems & Environment* **98**:163-167.
- Büchs W. 2003. Predators as biocontrol agents of oilseed rape pests. Pages 279-298 in Alford DV, editor. *Biocontrol of oilseed rape pests*. Blackwell Science, Oxford.
- CABI. 2019. CABI Digital Library. CABI Compendium. Available from <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.12444#sec-12> (accessed March 2023)
- Cameron PJ, Walker GP. 1989. Release and establishment of *Aphidius* spp. (Hymenoptera: Aphidiidae), parasitoids of pea aphid and blue green aphid in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **32**:281-290.
- Casida JE, Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology* **43**:1-16.
- Chaplin-Kramer R, O'Rourke ME, Blitzer EJ, Kremen C. 2011. A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters* **14**:922-932.
- Chase JM, Blowes SA, Knight TM, Gerstner K, May F. 2020. Ecosystem decay exacerbates biodiversity loss with habitat loss. *Nature* **584**:238-243.
- Claro KD, Oliveira PS, Rico-Gray V. 2009. *Tropical Biology and Conservation Management (Volume V)*. EOLSS Publishers, Oxford.



- Cook SM, Khan ZR, Pickett JA. 2007. The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annual Review of Entomology* **52**:375-400.
- Cook SM, Skellern MP, Döring TF, Pickett JA. 2013. Red oilseed rape? The potential for manipulation of petal colour in control strategies for the pollen beetle (*Meligethes aeneus*). *Arthropod-Plant Interactions* **7**:249-258.
- Cook SM, Smart LE, Martin JL, Murray DA, Watts NP, Williams IH. 2006. Exploitation of host plant preferences in pest management strategies for oilseed rape (*Brassica napus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **119**:221-229.
- Cox ML. 1998. The genus *Psylliodes* Latreille (Chrysomelidae: Alticinae) in the UK: with keys to the adults of all species and to the larvae of those species feeding on Brassicaceae. *The Coleopterist* **7**:33-65.
- Dainese M, . Martin EA, Aizen MA, Albrecht M, Bartomeus I, Bommarco R, Catvalheiro LG, Chaplin-Kramer R, Gagic V, Garibaldi LA, Ghazoul J, Grab H, Johnsson M, Karp DS, Kennedy, CM, Kleij D, Kremen C, Landis DA, Letourneau DK, Marini L, Poveda K, Rader R, Smith HG, Tscharntke T, Adersson GKS, Badenhausser I, Baensch S, Bezerra ADM, Bianchi FJJA, Boreaux V, Bretagnolle V, Caballero-Lopez B, Cavigliasso P, Cetkovič P, Chacoff NP, Classen A, Cusser S, da Silva e Silva FD, de Groot GA, Dudenhoffer JH, Ekroos J, Fijen T, Franck P, Freitas BM, Garratt MPD, Gratton C, Hipólito J, Holzschuh A, Hunt L, Iverson AL, Jha S, Keasar T, Kim TN, Kishinevsky M, Klatt BK, Klein AM, Krewenka KM, Krishnan S, Larsen AE, Lavigne C, Liere H, Maas B, Mallinger RE, Pachon EM, Martinez-Slainas A, Meehan TD, Mitchell MGE, Molina GAR, Nesper M, Nilsson L, O'Rourke ME, Peters MK, Plečáš M, Potts SG, Ramos DL, Rosenheim JA, Rundlof M, Rush A, Sáez A, Scheper J, Schleuning M, Schmack JM, Sciligo AR, Seymour C, Stanley DA, Stewart R, Stout JC, Sutter L, Takada MB, Taki H, Tamburini G, Tschumi M, Viana BF, Westphal C, Willcox BK, Wratten SD, Yoshioka A, Zaragoza-Trello C, Zhang W, Zhou Y, Steffan-Dewenter I. 2019. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. *Science Advances* (eaax012) [DOI: 10.1126/sciadv.aax0121](https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0121).
- Delorme R, Détourne D, Touton P, Pauron D, Ballanger Y. 2002. Résistance des méligèthes du colza aux pyrèthrinoides: quels mécanismes? In: AFPP-Sixieme Conference Internationale Sur Les Ravageurs En Agriculture, Montpellier, 4-6 Decembre.
- Donnelly MJ, Isaacs AT, Weetman D. 2016. Identification, validation, and application of molecular diagnostics for insecticide resistance in malaria vectors. *Trends in Parasitology* **32**:197-206.
- Dosdall L, Cárcamo H. 2011. Biology and integrated management of the cabbage seedpod weevil in prairie canola crops. *Prairie Soils & Crops* **4**:14-23.

- Dosdall LM, Kott LS. 2006. Introgression of resistance to cabbage seedpod weevil to canola from yellow mustard. *Crop Science* **46**:2437-2445.
- Dunley JE, Welter SC. 2000. Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology* **93**:955-962.
- Ministerstvo zemědělství. 2023. Registr přípravků na ochranu rostlin. Available from <https://eagri.cz/public/app/eagriapp/por/Vyhledavani.aspx> (accessed March 2023).
- Ekbohm B. 2010. Pests and their enemies in spring oilseed rape in Europe and challenges to integrated pest management. Pages 151-165 in Williams IH, editor. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht.
- Ekbohm B, Borg A. 1996. Pollen beetle (*Meligethes aeneus*) oviposition and feeding preference on different host plant species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **95**:291-299.
- Erbán T, Harant K, Chalupníková J, Kocourek F, Stara J. 2017. Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: An in-depth proteomic study employing a transcriptome database. *Journal of Proteomics* **150**:281-289.
- Erbán T, Stara J. 2014. Methodology for glutathione S-transferase purification and localization in two-dimensional gel electrophoresis performed on the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**:369-373.
- Ernoult A, Vialatte A, Butet A, Michel N, Rantier Y, Jambon O, Burel F. 2013. Grassy strips in their landscape context, their role as new habitat for biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **166**:15-27.
- European Commission. 2020. Commission Implementing Regulation (EU) 2020/18 of 10 January 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance chlorpyrifos, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. *Official Journal of the European Union* **7**:14-16.
- European Commission. 2023. Oilseeds and protein crops. European Commission. Available from [https://agriculture.ec.europa.eu/data-and-analysis/markets/overviews/market-observatories/crops/oilseeds-and-protein-crops\\_en](https://agriculture.ec.europa.eu/data-and-analysis/markets/overviews/market-observatories/crops/oilseeds-and-protein-crops_en) (accessed March 2023).

- European Commission. 2013. Commission Implementing Regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances Text with EEA relevance. European Commission. Available from [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_impl/2013/485/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2013/485/oj) (accessed March 2023).
- FAO. 2023. Integrated Pest Management (IPM) | Pest and Pesticide Management | Food and Agriculture Organization of the United Nations | IPM and Pesticide Risk Reduction. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/en/> (accessed March 2023).
- Ferguson AW, Klukowski Z, Walczak B, Perry JN, Muggleston MA, Clark SJ, Williams IH. 2000. The spatio-temporal distribution of adult *Ceutorhynchus assimilis* in a crop of winter oilseed rape in relation to the distribution of their larvae and that of the parasitoid *Trichomalus perfectus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **95**:161-171.
- Ferguson AW, Solinas M, Ziesmann J, Isidoro N, Williams IH, Scubla P, Mudd A, Clark SJ, Wadhams LJ. 1999. Identification of the gland secreting oviposition-detering pheromone in the cabbage seed weevil, *Ceutorhynchus assimilis*, and the mechanism of pheromone deposition. *Journal of Insect Physiology* **45**:687-699.
- Ferguson AW, Williams IH, Castle LM, Skellern M. 2010. Key Parasitoids of the Pests of Oilseed Rape in Europe: A Guide to Their Identification. Pages 77-114 in Williams IH, editor. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht.
- Free JB, Williams IH. 1978. The responses of the pollen beetle, *Meligethes aeneus*, and the seed weevil, *Ceuthorhynchus assimilis*, to oil-seed rape, *Brassica napus*, and other plants. *Journal of Applied Ecology* **15**:761-774.
- Friedt W, Snowdon R. 2010. Oilseed Rape. Pages 91-126 in Vollmann J, Rajcan I, editors. *Oil Crops*. Springer, New York.
- Ganser D, Knop E, Albrecht M. 2019. Sown wildflower strips as overwintering habitat for arthropods: effective measure or ecological trap? *Agriculture, Ecosystems & Environment* **275**:123-131.

- Garbe V, Gladders P, Lane A. 2000. Report of the concerted Action “Research for the adaption of oilseed crops to the new requirements of the common agricultural policy: crop competitiveness, seed quality, environment”. IOBC WPRS BULLETIN **23**:173-178.
- Geiger F, Bengtsson J, Berendse F, Weisser WW, Emmerson M, Morales MB, Ceryngier P, Liira J, Tschardt T, Winqvist C. 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology* **11**:97-105.
- Georghiou GP, Taylor CE. 1986. Factors influencing the evolution of resistance. Pages 157-169 in Georghiou GP, Taylor CE, editors. *Pesticide resistance: strategies and tactics for management*. National Academy Press, Washington DC.
- Giamoustaris A, Mithen R. 1996. The effect of flower colour and glucosinolates on the interaction between oilseed rape and pollen beetles. Pages 206-208 in Städler E, Rowell-Rahier M, Bauer R, editors. *Proceedings of the 9th International Symposium on Insect-Plant Relationships*. Springer, Dordrecht.
- Goldson SL, McNeill MR, Phillips CB, Proffitt JR. 1992. Host specificity testing and suitability of the parasitoid *Microctonus hyperodae* (Hymenoptera: Braconidae, Euphorinae) as a biological control agent of *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae) in New Zealand. *Entomophaga* **37**:483-498.
- Goldson SL, Phillips CB, McNeill MR, Barlow ND. 1997. The potential of parasitoid strains in biological control: Observations to date on *Microctonus* spp. intraspecific variation in New Zealand. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **64**:115-124.
- González E, Salvo A, Defagó MT, Valladares G. 2016. A Moveable Feast: Insects Moving at the Forest-Crop Interface Are Affected by Crop Phenology and the Amount of Forest in the Landscape. PLOS ONE (e0158836) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158836>.
- González E, Štrobl M, Janšta P, Hovorka T, Kadlec T, Knapp M. 2022. Artificial temporary non-crop habitats support parasitoids on arable land. *Biological Conservation* (109409) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109409>.
- Gratwick M. 2012. *Crop Pests in the UK: Collected edition of MAFF leaflets*. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- Grenier S. 1988. Applied biological control with Tachinid flies (Diptera, Tachinidae): A review. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* **61**:49-56.

- Haaland C, Naisbit RE, Bersier LF. 2011. Sown wildflower strips for insect conservation: a review. *Insect Conservation and Diversity* **4**:60-80.
- Halder AC. 2011. Distribution and natural enemies in herbivores of oilseed rape fields in Sweden. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology* **1**:29-36.
- Hansen LM. 2003. Insecticide-resistant pollen beetles (*Meligethes aeneus* F) found in Danish oilseed rape (*Brassica napus* L) fields. *Pest Management Science* **59**:1057-1059.
- Harašta P, Peterka V, Talich P, Řehák V, Zapletal M. 2015. Správné a bezpečné používání přípravků na ochranu rostlin. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from [https://eagri.cz/public/web/file/440132/Spravne\\_a\\_bezpecne\\_pouzivani\\_pripravku\\_publicace\\_NAP\\_2015.pdf](https://eagri.cz/public/web/file/440132/Spravne_a_bezpecne_pouzivani_pripravku_publicace_NAP_2015.pdf). (accessed March 2023).
- Hatt S, Uyttenbroeck R, Lopes T, Chen JL, Piqueray J, Monty A, Francis F. 2018. Effect of flower traits and hosts on the abundance of parasitoids in perennial multiple species wildflower strips sown within oilseed rape (*Brassica napus*) crops. *Arthropod-Plant Interactions* **12**:787-797.
- Haye T, Dancau T, Bennett AM, Mason PG. 2021. The impact of parasitoids on diamondback moth in Europe: a life table approach. *The Canadian Entomologist* **153**:741-756.
- Heimbach U, Müller A. 2013. Incidence of pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany. *Pest Management Science* **69**:209-216.
- Heimbach U, Müller A, Thieme T. 2010. Monitoring of pollen beetle pyrethroid resistance from 2005 to 2010. Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Berlin. Available from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123027170> (accessed March 2023).
- Hendrikse A, Zucchi R, Lenteren JC van, Woets J. 1980. *Dacnusa sibirica* Telenga and *Opius pallipes* Wesmael (Hym., Braconidae) in the control of the tomato leafminer *Liriomyza bryoniae* Kalt. *Bulletin SROP* **3**:83-98.
- Henle K, Alard D, Clitherow J, Cobb P, Firbank L, Kull T, McCracken D, Moritz RFA, Niemi J, Rebane M, Wascher D, Watt A, Young J. 2008. Identifying and managing the conflicts between agriculture and biodiversity conservation in Europe: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **124**:60-71.

- Herlihy MV, Van Driesche RG, Abney MR, Brodeur J, Bryant AB, Casagrande RA, Delaney DA, Elkner TE, Fleischer SJ, Groves RL. 2012. Distribution of *Cotesia rubecula* (Hymenoptera: Braconidae) and its displacement of *Cotesia glomerata* in eastern North America. *Florida Entomologist* **95**:461-467.
- Hoffmann US, Jauker F, Diehl E, Mader V, Fiedler D, Wolters V, Diekötter T. 2020. The suitability of sown wildflower strips as hunting grounds for spider-hunting wasps of the genus *Trypoxylon* depends on landscape context. *Journal of Insect Conservation* **24**:125-131.
- Hoffmann US, Jauker F, Lanzen J, Warzecha D, Wolters V, Diekötter T. 2018. Prey-dependent benefits of sown wildflower strips on solitary wasps in agroecosystems. *Insect Conservation and Diversity* **11**:42-49.
- Højland DH, Nauen R, Foster SP, Williamson MS, Kristensen M. 2015. Incidence, Spread and Mechanisms of Pyrethroid Resistance in European Populations of the Cabbage Stem Flea Beetle, *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *PLOS ONE* (e0146045) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146045>.
- Holý K. 2019. Užitečné organizmy (1) - Parazitoidi škůdců. *Agromanuál* **4**:42.
- Holý K. 2020. Užitečné organizmy (11) - lumkovití - Ichneumonidae. *Agromanuál* **2**:70-71.
- Holý K, Zeman V. 2018. Catalogue of Ichneumonidae (Hymenoptera) of the Czech and Slovak Republics. Moravian Museum, Brno.
- Honěk A, Lukáš J, Martinková Z, Pultar O, Řezáč M. 2008. Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Honěk A, Martinková Z, Platková H, Saska P, Skuhrovec J. 2021. Škůdci na obilninách a jejich přirození nepřátelé. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Horowitz AR, Ghanim M, Roditakis E, Nauen R, Ishaaya I. 2020. Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. *Journal of Pest Science* **93**:893-910.
- Hovorka T. 2022. First record of *Microctonus brassicae* in Czechia, a potential biological control agent against a primary oilseed rape pest. *Journal of Entomological and Acarological Research* (10047) DOI: <https://doi.org/10.4081/jear.2022.10047>.
- Hovorka T, Kocourek F, Horská T, Stará J. 2021a. Widespread resistance of pollen beetles to pyrethroids in Czechia with no evidence for kdr mutation. *Crop Protection* (105648) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105648>.

- Hovorka T, Saska P, Stará J, Kocourek F. 2021b. Attractiveness of oilseed rape cultivars to *Brassicogethes aeneus* and *Ceutorhynchus obstrictus* as a potential control strategy. *Plant, Soil and Environment* **67**:608-615.
- Hovorka T, Skuhrovec J. 2019. Stonkoví krytonosci na ozimé řepce. *Agromanuál* **3**:40-43.
- Hrouda P. 2023. Ekologie a význam hub. Masarykova univerzita, Brno. Available from <https://www.sci.muni.cz/botany/mycology/ekolhub.htm> (accessed March 2023).
- Hůrka K. 2005. Brouci České a Slovenské republiky. Kabourek, Zlín.
- Isbell F, Adler PR, Eisenhauer N, Fornara D, Kimmel K, Kremen C, Letourneau DK, Liebman M, Polley HW, Quijas S. 2017. Benefits of increasing plant diversity in sustainable agroecosystems. *Journal of Ecology* **105**:871-879.
- Ishaaya I, Horowitz AR. 2016. Advances in insect control and resistance management: an overview. Springer, Switzerland.
- Jamont M, Crépellière S, Jaloux B. 2013. Effect of extrafloral nectar provisioning on the performance of the adult parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Biological Control* **65**:271-277.
- Jankowsky E, Fairman ME. 2007. RNA helicases-one fold for many functions. *Current Opinion in Structural Biology* **17**:316-324.
- Jervis MA, Kidd NAC, Fitton MG, Huddleston T, Dawah HA. 1993. Flower-visiting by hymenopteran parasitoids. *Journal of Natural History* **27**:67-105.
- John M. K, Barlow ND. 2001. A spatial model for the successful biological control of *Sitona discoideus* by *Microctonus aethiopoulos*. *Journal of Applied Ecology* **38**:162-169.
- Jordan A, Broad GR, Stigenberg J, Hughes J, Stone J, Bedford I, Penfield S, Wells R. 2020. The potential of the solitary parasitoid *Microctonus brassicae* for the biological control of the adult cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **168**:360-370.
- Kaiser C, Jensen KMV, Nauen R, Kristensen M. 2018. Susceptibility of Danish pollen beetle populations against  $\lambda$ -cyhalothrin and thiacloprid. *Journal of Pest Science* **91**:447-458.
- Kant P, Kant S, Gordon M, Shaked R, Barak S. 2007. Stress Response Suppressor1 and Stress Response Suppressor2, two Dead-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiology* **145**:814-830.



- Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. Encyklopedie ochrany rostlin. Profi Press s.r.o., Praha.
- Kazda J, Škeřík J, Baranyk P, Herda G, Nerad D, Volf M. 2008. Metodika integrované ochrany řepky. SPZO s.r.o., Praha.
- Kelm M, Klukowski Z. 2000. The effect of stem weevil (*Ceutorhynchus pallidactylus* Marsh.) infestation on oilseed rape yield. IOBC WPRS BULLETIN **23**:125-130.
- Kevvää R, Veromann E, Luik A, Saarniit M. 2006. Cabbage seed weevil (*Ceutorhynchus assimilis* Payk.) and its parasitoids in oilseed rape crops in Estonia. Agronomy Research **4**:227-230.
- Kim Y, Park H, Cho J, Ahn Y. 2006. Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal of economic entomology **99**:954-958.
- Knight AL, Norton GW. 1989. Economics of Agricultural Pesticide Resistance in Arthropods. Annual Review of Entomology **34**:293-313.
- Kocourek F. 2019. Vývoj rezistence dřepčίκů na řepce vůči insekticidům a možnosti ochrany. Agromanuál **7**:49-51.
- Kocourek F, Havel J, Hovorka T, Jursík M, Kazda J, Kolařík P, Plachká E, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2018a. Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům vyjma podzimních škůdců. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Kocourek F, Havel J, Hovorka T, Kazda J, Kolařík P, Kovaříková K, Ripl J, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2017. Ochrana řepky proti živočišným škůdcům na podzim bez mořidel na bázi neonikotinoidů. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Kocourek F, Skuhrovec J, Hovorka T. 2018b. Monitoring stonkových krytonosců a ochrana řepky proti nim. Agromanuál **2**:38-42.
- Kocourek F, Stará J. 2016. Škodlivost a ochrana řepky před dřepčίκem olejkovým Agromanuál **8**:46-49.
- Kocourek F, Stará J, Horská T, Hovorka T, Seidenglanz M, Kolařík P, Havel J, Hrudová E. 2020. Biologické metody hodnocení rezistence škůdců k insekticidům a antirezistentní strategie. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.

- Kocourek F, Stara J, Sopko B, Talacko P, Harant K, Hovorka T, Erban T. 2021. Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicogethes (Meligethes) aeneus*. Journal of Proteomics (104086) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104086>.
- Koleva L, Zhelezov Y. 2017. Effect of winter oilseed rape cultivars on the population density of pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) in Bulgaria. 52. Hrvatski i 12. Međunarodni simpozij agronoma 12.-17. veljače 2017, Dubrovnik. Available from [https://www.researchgate.net/profile/Hakima-Oulebsir-Mohandkaci/publication/322029737\\_867129Proceedings\\_SA\\_2017\\_Dubrovnik/links/5a3ecf08aca272d2944ea3db/867129Proceedings-SA-2017-Dubrovnik.pdf#page=347](https://www.researchgate.net/profile/Hakima-Oulebsir-Mohandkaci/publication/322029737_867129Proceedings_SA_2017_Dubrovnik/links/5a3ecf08aca272d2944ea3db/867129Proceedings-SA-2017-Dubrovnik.pdf#page=347). (accessed March 2023).
- Koukol O. 2014. Ekologie hub. Univerzita Karlova, Praha. Available from <https://botany.natur.cuni.cz/koukol/ekologiehub/> (accessed March 2023).
- Kovaříková K, Holý K, Skuhrovec J, Saska P. 2017. The efficacy of insecticides against eggs and nymphs of *Aleyrodes proletella* (Hemiptera: Aleyrodidae) under laboratory conditions. Crop Protection **98**:40-45.
- Kromp B. 1999. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. Agriculture, Ecosystems & Environment **74**:187-228.
- Krüger DW. 1983. Oilseed Rape: Pests and Diseases (a Pamphlet for Advisers and Practical Men). Semundo, Hamburg.
- Krüger ML, Ulber B. 2010. Influence of different winter oilseed rape cultivars on the reproduction and population density of the pollen beetle, *Meligethes aeneus*. Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Berlin.
- Landis DA. 2017. Designing agricultural landscapes for biodiversity-based ecosystem services. Basic and Applied Ecology **18**:1-12.
- Láska P, Kocourek F. 1991. Monitoring of flight activity in some crucifer-feeding pests by means of yellow water-traps. Acta Entomologica Bohemoslovaca **88**: 25-32.
- Lerin J. 1991. Influence of host plant phenology on the reproduction of the rape weevil, *Ceuthorrhynchus assimilis* Payk. Journal of Applied Entomology **3**:303-310.
- Letourneau DK, Armbrrecht I, Rivera BS, Lerma JM, Carmona EJ, Daza MC, Escobar S, Galindo V, Gutiérrez C, López SD. 2011. Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review. Ecological Applications **21**:9-21.

- Linder P, Jankowsky E. 2011. From unwinding to clamping the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**:505-516.
- Macfadyen S, Muller W. 2013. Edges in Agricultural Landscapes: Species Interactions and Movement of Natural Enemies. *PLOS ONE* (e59659) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059659>.
- Maienfisch P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofer D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A, Widmer H. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest Management Science* **57**:906-913.
- Makunas V, Brazauskiene I, Šmatas R. 2011. Resistance of *Meligethes aeneus* to pyrethroids in Lithuania. *Zemdirbyste* **98**:431-438.
- Marja R, Kleijn D, Tscharrntke T, Klein AM, Frank T, Batáry P. 2019. Effectiveness of agri-environmental management on pollinators is moderated more by ecological contrast than by landscape structure or land-use intensity. *Ecology Letters* **22**:1493-1500.
- Goulet H, Huber JT. 1993. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Agriculture Canada Publication, Ottawa.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS. 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology* **8**:339-346.
- McNeill MR, Goldson SL, Proffitt JR, Phillips CB, Addison PJ. 2002. A description of the commercial rearing and distribution of *Microctonus hyperodae* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Listronotus bonariensis* (Kuschel) (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control* **24**:167-175.
- Menzler-Hokkanen I, Hokkanen HM, Buchs W, Klukowski Z, Luik A, Nilsson C, Ulber B, Williams IH. 2006. Insect problems in European oilseed rape cultivation, and how to deal with them: the OSR farmers' perspective. *IOBC WPRS BULLETIN* **29**:91.
- Miller AL, Tindall K, Leonard BR. 2010. Bioassays for monitoring insecticide resistance. *Journal of Visualized Experiments* (e2129) DOI: [10.3791/2129](https://doi.org/10.3791/2129).
- Moreira X, Abdala-Roberts L, Rasmann S, Castagneyrol B, Mooney KA. 2016. Plant diversity effects on insect herbivores and their natural enemies: current thinking, recent findings, and future directions. *Current Opinion in Insect Science* **14**:1-7.

- Mota-Sanchez D, Hollingworth RM, Grafius EJ, Moyer DD. 2006. Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* **62**:30-37.
- Mupepele AC, Bruelheide H, Bruhl C, Dauber J, Fenske M, Freibauer A, Gerowitt B, Krüss A, Lakner S, Plieninger T, Potthast T, Schlacke S, Seppelt R, Stützel H, Weisser W, Wägele W, Böhning-Gaese K, Klein AM. 2021. Biodiversity in European agricultural landscapes: transformative societal changes needed. *Trends in Ecology & Evolution* **36**:1067-1070.
- Murchie AK, Williams IH, Alford DV. 1997. Effects of commercial insecticide treatments to winter oilseed rape on parasitism of *Ceutorhynchus assimilis* Paykull (Coleoptera: Curculionidae) by *Trichomalus perfectus* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). *Crop Protection* **16**:199-202.
- Murchie AK, Williams IH, Perry JN. 1999. Edge distributions of *Ceutorhynchus assimilis* and its parasitoid *Trichomalus perfectus* in a crop of winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Biocontrol* **44**:379-390.
- Nauen R, Zimmer CT, Andrews M, Slater R, Bass C, Ekbohm B, Gustafsson G, Hansen LM, Kristensen M, Zebitz CPW, Williamson MS. 2012. Target-site resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus* F. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **103**:173–180.
- Newman PL. 1984. The effects of insect larval damage upon the incidence of canker in winter oilseed rape. British Crop Protection Council, Croydon. Available from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19850522630> (accessed March 2023).
- Nicastro RL, Sato ME, Da Silva MZ. 2010. Milbemectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. *Experimental and Applied Acarology* **50**:231-241.
- Nilsson C. 1985. Impact of ploughing on emergence of pollen beetle parasitoids after hibernation. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **100**:302-308.
- Nilsson C. 2003. Parasitoids of pollen beetles. Pages 73–86 in Alford DV, editor. *Biocontrol of oilseed rape pests*. Blackwell Science, Oxford.
- Nouhuys SV. 2015. *Cotesia glomerata*. Cornell University, Ithaca. Available from <https://biocontrol.entomology.cornell.edu/parasitoids/cotesia.php> (accessed March 2023).

- Onstad DW, Knolhoff LM. 2022. Insect resistance management: biology, economics, and prediction. Academic Press, Cambridge.
- Ortega-Ramos PA, Coston DJ, Seimandi-Corda G, Mauchline AL, Cook SM. 2022. Integrated pest management strategies for cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*) in oilseed rape. *GCB Bioenergy* **14**:267-286.
- Paranhos BJ, Nava DE, Malavasi A. 2019. Biological control of fruit flies in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* ( e26037) DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.26037>.
- Pekár S. 2012. Spiders (Araneae) in the pesticide world: an ecotoxicological review. *Pest Management Science* **68**:1438-1446.
- Philippou D, Field LM, Węgorzek P, Zamojska J, Andrews MC, Slater R, Moores GD. 2011. Characterising metabolic resistance in pyrethroid-insensitive pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) from Poland and Switzerland. *Pest Management Science* **67**:239-243.
- Plotnikov K, Pashkovsky S, Ryabinina V, Blazhko N. 2020. Efficiency of the preparation based on *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus against diamond back moth (*Plutella xylostella*). *E3S Web of Conferences* (02040) DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022202040>.
- Poschlod P, Bonn S. 1998. Changing dispersal processes in the central European landscape since the last ice age: an explanation for the actual decrease of plant species richness in different habitats? *Acta Botanica Neerlandica* **47**:27-44.
- Prestidge RA, Barker GM, Pottinger RP. 1991. The economic cost of Argentine stem weevil in pastures in New Zealand. New Zealand Weed and Pest Control Society, Palmerston. Available from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19921176082>. (accessed March 2023).
- Prudil M. 2020. Integrovaná ochrana versus Integrovaná produkce. ÚKZÚZ, Brno. Available from <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/integrovaná-ochrana-rostlin/integrovaná-ochrana-versus-integrovaná/> (accessed March 2023).
- Rand TA, Tylianakis JM, Tschamntke T. 2006. Spillover edge effects: The dispersal of agriculturally subsidized insect natural enemies into adjacent natural habitats. *Ecology Letters* **9**:603-614.

- Rod J, Hluchý M, Zavadil K, Prášil J. 2005. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. Biocont Laboratory s.r.o., Brno.
- Rodriguez VA, Belaich MN, Ghiringhelli PD. 2012. Baculoviruses: Members of integrated pest management strategies. Pages 463-480 in Larramendy ML, Soloneski S, editors. *Integrated Pest Management and Pest Control-Current and Future Tactics*. InTechOpen, Rijeka.
- Rösch V, Tschardt T, Scherber C, Batáry P. 2013. Landscape composition, connectivity and fragment size drive effects of grassland fragmentation on insect communities. *Journal of Applied Ecology* **50**:387-394.
- Roush R, Tabashnik BE. 2012. *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer Science & Business Media, New York & London.
- Sarfraz M, Keddie AB, Dossall LM. 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: a review. *Biocontrol Science and Technology* **15**:763-789.
- Scarisbrick DH, Atkinson L, Asare E. 1989. Oilseed rape. *Outlook on Agriculture* **18**:152-159.
- Schliephake E, Graichen K, Rabenstein F. 2000. Investigations on the vector transmission of the Beet mild yellowing virus (BMV) and the Turnip yellows virus (TuYV) *Journal of Plant Diseases and Protection* **107**:81-87.
- Scott JG. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**:757-777.
- Scott JG. 2019. Life and death at the voltage-sensitive sodium channel: evolution in response to insecticide use. *Annual Review of Entomology* **64**:243-257.
- Seidenglanz M, BajeroVá R, Kolařík P, Hrudová E, Havel J, Tánčík J, Ruseňáková, Bokor P, Kocourek F, Stará J, Vichová L, Šafař J. 2020. The correlation between the susceptibilities to lambda-cyhalothrin and tau-fluvalinate in Czech and Slovak pollen beetle populations. *Zemdirbyste-Agriculture* **107**:359-366.
- Seidenglanz M, Poslušná J, Kolařík P, Rotrekl J, Hrudová E, Tóth P, Havel J, Plachká E, Tánčík J, Hudec K. 2017. Negative correlations between the susceptibilities of Czech and Slovak pollen beetle populations to lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl in 2014 and 2015. *Plant Protection Science* **53**:108-117.

- Seidenglanz M, Poslušná J, Rotrekl J, Kolařík P, Hrudová E, Tóth P, Havel J, Bernardová M. 2016a. *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) resistance to lambda-cyhalothrin in the Czech Republic in 2012 and 2013. *Plant Protection Science* **51**:94-107.
- Seidenglanz M, Poslušná J, Rotrekl J, Kolařík P, Hrudová E, Tóth P, Havel J, Spitzer T, Bernardová M. 2016b. Changes in *Meligethesaeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) susceptibility to lambda-cyhalothrin in the Czech Republic between 2009 and 2011. *Plant Protection Science* **51**:13-32.
- Seidl M, González E, Kadlec T, Saska P, Knapp M. 2020. Temporary non-crop habitats within arable fields: The effects of field defects on carabid beetle assemblages. *Agriculture, Ecosystems & Environment* (106856) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106856>.
- Shatters RG, Boykin LM, Lapointe SL, Hunter WB, Weathersbee AA. 2006. Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. *Journal of Molecular Evolution* **63**:12-29.
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Dyck HV, Praagh JV, Sluijs JPV, Whitehorn PR, Wiemers M. 2015. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* **22**:5-34.
- Slater R, Ellis S, Genay JP, Heimbach U, Huart G, Sarazin M, Longhurst C, Müller A, Nauen R, Rison JL, Robin F. 2011. Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): A coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Management Science* **67**:633-638.
- Slavíková L, Kumar J. 2018. Virové choroby řepky a možnosti ochrany. *Agromauál* **7**:40-42.
- Smart LE, Blight MM. 1997. Field discrimination of oilseed rape, *Brassica napus* volatiles by cabbage seed weevil, *Ceutorhynchus assimilis*. *Journal of Chemical Ecology* **23**:2555-2567.
- Šmatas R, Makunas V, Brazauskiene I, Petraitiene E. 2012. Sensitivity of pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to insecticides with different modes of action and their efficacy in the field conditions. *Zemdirbyste* **99**:197-202.



- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009. 2009. Available from [https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/predpisy-es-eu/Legislativa-EU\\_x2006-2010\\_smernice-2009-128-pesticidy.html](https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/predpisy-es-eu/Legislativa-EU_x2006-2010_smernice-2009-128-pesticidy.html) (accessed March 2023).
- Sood P, Mehta PK, Bhandari K, Prabhakar CS. 2010. Transmission and effect of sublethal infection of granulosus virus (PbGV) on *Pieris brassicae* Linn. (Pieridae: Lepidoptera). *Journal of Applied Entomology* **134**:774-780.
- Sparks TC, Nauen R. 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **121**:122-128.
- Spitzer T, Bílovský J, Matušinsky P. 2020. Changes in resistance development in pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* F.) to lambda-cyhalothrin, etofenprox, chlorpyrifos-ethyl, and thiacloprid in the Czech Republic during 2013–2017. *Crop Protection* (105224) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105224>.
- Šrámková A, Holý K, Nerad D. 2014. Biodiverzita hmyzu na orné půdě. *Úroda* **5**: 80-83.
- Stará J, Kocourek F. 2007. Metodika hodnocení rezistence obaleče jablečného k insekticidům a návrhy antirezistentních strategií. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
- Stará J, Kocourek F. 2018. Seven-year monitoring of pyrethroid resistance in the pollen beetle (*Brassicogethes aeneus* F.) during implementation of insect resistance management. *Pest Management Science* **74**:200-209.
- Stará J, Kocourek F. 2019. Cabbage stem flea beetle's (*Psylliodes chrysocephala* L.) susceptibility to pyrethroids and tolerance to thiacloprid in the Czech Republic. *Plos One* (e0214702) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214702>.
- Starý P. 1970. Series entomologica 6: Biology of aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) with respect to integrated control. Springer, Dordrecht.
- Starý P. 1974. Taxonomy, origin, distribution and host range of *Aphidius* species (Hymenoptera, Aphidiidae) in relation to biological control of the pea aphid in Europe and North America. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **77**:14-171.
- Starý P. 1975. *Aphidius colemani* Viereck: its taxonomy, distribution and host range (Hymenoptera, Aphidiidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **72**:156-163.
- Talašová A. 2018. Přínosy nektarodárných biopásů. *Úroda* **7**:40-42.

- Talašová A, Straka J, Hadrava J, Benda D, Kocourek F, Kazda J. 2018. High degree of philopatry is required for mobile insects used as local indicators in biodiversity studies. *Ecological Indicators* **94**:99-103.
- Tamburini G, Santoiemma G, E. O'Rourke M, Bommarco R, Chaplin-Kramer R, Dainese M, Karp DS, Kim TN, Martin EA, Petersen M. 2020. Species traits elucidate crop pest response to landscape composition: a global analysis. *Proceedings of the Royal Society B* (20202116) DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2116>.
- Thieme T, Heimbach U, Müller A. 2010. Chemical Control of Insect Pests and Insecticide Resistance in Oilseed Rape. Pages 313-35 in Williams IH, editor. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht.
- Thies C, Tschardtke T. 2010. Biological rape pest control in spatio-temporally changing landscapes. Pages 273-284 in Williams IH, editor. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht.
- Tixeront M, Dupuy F, Cortesero AM, Hervé MR. 2023. Understanding crop colonization of oilseed rape crops by the cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae)). *Pest Management Science* DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.7424>.
- Tóth P, Hrudová E, Sapáková E, Závadská E, Seidenglanz M. 2013. Species of the genus *Meligethes* occurring in oil-seed crop fields in the Czech Republic. *Plant Protection Science* **49**:177-186.
- Tschardtke T, Grass I, Wanger TC, Westphal C, Batáry P. 2021. Beyond organic farming—harnessing biodiversity-friendly landscapes. *Trends in Ecology & Evolution* **36**:919-930.
- Tschumi M, Albrecht M, Entling MH, Jacot K. 2015. High effectiveness of tailored flower strips in reducing pests and crop plant damage. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**:20151369.
- ÚKZÚZ. 2022. Ukončení používání přípravků na bázi účinné látky indoxakarb. ÚKZÚZ, Brno. Available from <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/pripravky-na-or/ukonceni-pouzivani-pripravku-na-bazi.html> (accessed March 2023).
- Ulber B, Fischer K, Klukowski Z, Luik A, Veromann E, Nilsson C, Ahman B, Williams IH, Ferguson AW, Piper R. 2006. Identity of parasitoids and their potential for biocontrol of oilseed rape pests in Europe. *Symposium on Integrated Pest Management in Oilseed Rape*, Berlin. Available from [https://www.eppo.int/media/uploaded\\_images/MEETINGS/Meetings\\_2017/ipm/3-2-Ulber.pdf](https://www.eppo.int/media/uploaded_images/MEETINGS/Meetings_2017/ipm/3-2-Ulber.pdf) (accessed March 2023).

- Ulber B, Klukowski Z, Williams IH. 2010a. Impact of Insecticides on Parasitoids of Oilseed Rape Pests. Pages 337-355 in Williams IH, editor. Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests. Springer, Dordrecht.
- Ulber B, Nitzsche O. 2006. Phenology of parasitoids (Hym., Ichneumonidae-Tersilochinae) of oilseed rape pests in northern Germany from 1995-1997. IOBC WPRS BULLETIN **29**:173.
- Ulber B, Williams IH, Klukowski Z, Luik A, Nilsson C. 2010b. Parasitoids of oilseed rape pests in Europe: key species for conservation biocontrol. Pages 45-76 in Williams IH, editor. Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests. Springer, Dordrecht.
- Van Leeuwen T, Dermauw W, Mavridis K, Vontas J. 2020. Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. Current Opinion in Insect Science **39**:69-76.
- Veromann E, Luik A, Metspalu L, Williams I. 2006. Key pests and their parasitoids on spring and winter oilseed rape in Estonia. Entomologica Fennica **17**:400-404.
- Wäckers FL. 2004. Assessing the suitability of flowering herbs as parasitoid food sources: flower attractiveness and nectar accessibility. Biological Control **29**:307-314.
- Walters KFA, Lane A. 1994. Sampling procedures for pests of winter oilseed rape: Meeting the needs of the crop consultant. Aspects of Applied Biology **37**:83-94.
- Wang X, Long Y, Wang N, Zou J, Ding G, Broadley MR, White PJ, Yuan P, Zhang Q, Luo Z. 2017. Breeding histories and selection criteria for oilseed rape in Europe and China identified by genome wide pedigree dissection. Scientific Reports **7**:1-11.
- Wegorek P, Zamojska J, Mrówczyński M. 2011. High resistance to pyrethroid insecticides in the Polish pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.): The role of oxidative metabolism. Phytoparasitica **39**:43-49.
- Wei JN, Bai BB, Yin TS, Wang Y, Yang Y, Zhao LH, Kuang RP, Xiang RJ. 2005. Development and use of parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae & Aphelinidae) for biological control of aphids in China. Biocontrol Science and Technology **15**:533-551.
- Wharton RA. 1993. Bionomics of the Braconidae. Annual Review of Entomology **38**:121-143.
- Williams IH. 2003. Parasitoids of cabbage seed weevil. Pages 97-112 in Alford DV, editor. Biocontrol of oilseed rape pests. Blackwell Science, Oxford.

- Williams IH. 2006. Integrating parasitoids into management of pollen beetle on oilseed rape. *Agronomy Research* **4**:465-470.
- Williams IH. 2010a. The Major Insect Pests of Oilseed Rape in Europe and Their Management: An Overview. Pages 1-43 in Williams IH, editor. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht.
- Williams IH. 2010b. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer, Dordrecht.
- Williams IH, Büchi R, Ulber B. 2003. Sampling, trapping and rearing oilseed rape pests and their parasitoids. Pages 145-160, Alford DV, editor. *Biocontrol of oilseed rape pests*. Blackwell Science, Oxford.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics* **252**:51-60.
- Willis CE, Foster SP, Zimmer CT, Elias J, Chang X, Field LM, Williamson MS, Davies TGE. 2020. Investigating the status of pyrethroid resistance in UK populations of the cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). *Crop Protection* (105316) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105316>.
- Wood TJ, Holland JM, Goulson D. 2015. Pollinator-friendly management does not increase the diversity of farmland bees and wasps. *Biological Conservation* **187**:120-126.
- Wrześcińska B, Czerwoniec A, Wieczorek P, Węgorzek P, Zamojska J, Obrępańska-Stęplowska A. 2014. A survey of pyrethroid-resistant populations of *Meligethes aeneus* F. in Poland indicates the incidence of numerous substitutions in the pyrethroid target site of voltage-sensitive sodium channels in individual beetles. *Insect Molecular Biology* **23**:682-693.
- Yu D, Van Achterberg C, Horstmann K. 2016. Taxapad 2016 Ichneumonoidea (Biological and taxonomical information). Available from <https://www.catalogueoflife.org/data/dataset/1068> (accessed March 2023).
- Zákon č. 326/2004 Sb. - Zákon o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. 2004. 326/2004 Sb. Zákon o rostlinolékařské péči. Available from <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-326> (accessed March 2023).

- Zamojska J, Wegorek P, Mrowczynski M. 2013. Susceptibility level of the pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) to selected pyrethroids in Poland, and resistance mechanisms of the pest to deltamethrin. *Journal of Plant Protection Research* **53**:90-95.
- Zhang H, Breeze T, Bailey A, Garthwaite D, Harrington R, Potts SG. 2017. Arthropod pest control for UK oilseed rape—comparing insecticide efficacies, side effects and alternatives. *PLoS One* (e0169475) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169475>.
- Zhao J-Z, Collins HL, Li Y-X, Mau RFL, Thompson GD, Hertlein M, Andaloro JT, Boykin R, Shelton AM. 2006. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. *Journal of Economic Entomology* **99**:176-181.
- Zichová T, Kocourek F, Salava J, Nad'ová K, Stará J. 2010. Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods. *Pest Management Science* **66**:853-860.
- Zichová T, Stará J, Kundu JK, Eberle KE, Jehle JA. 2013. Resistance to *Cydia pomonella* granulovirus follows a geographically widely distributed inheritance type within Europe. *Biocontrol* **58**:525-534.
- Zimmer CT, Müller A, Heimbach U, Nauen R. 2014. Target-site resistance to pyrethroid insecticides in German populations of the cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **108**:1-7.
- Zimmer CT, Nauen R. 2011a. Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **100**:264-272.
- Zimmer CT, Nauen R. 2011b. Pyrethroid resistance and thiacloprid baseline susceptibility of European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) collected in winter oilseed rape. *Pest Management Science* **67**:599-608.

## 8 Seznam obrázků a tabulek

<b>Obrázek 1.</b> Poškození řepky larvami stonkových krytonosců (vlevo) a poškození šešulí řepky bejlmorkou kapustovou (vpravo). Foto: vlevo T. Hovorka, vpravo Rostlinolékařský portál. . 6	
<b>Obrázek 2.</b> Dospělec blýskáčka řepkového vžirající se do nerozvinutého poupěte. Foto: Hovorka T. .... 8	8
<b>Obrázek 3.</b> Poškození rostliny řepky žírem dřepčíka olejkového a dva dospělí jedinci dřepčíka olejkového. Foto: T. Hovorka. .... 11	11
<b>Obrázek 4.</b> Dospělec krytonosce šešulového a jeho larva vžirající tvořící se semeno v šešuli řepky. Foto: vpravo T. Hovorka, vlevo J. Kazda. .... 13	13
<b>Obrázek 5.</b> Schematické znázornění mechanismů rezistence u hmyzu. .... 17	17
<b>Obrázek 6.</b> Typy rezistence vůči insekticidům u hmyzích škůdců. .... 18	18
<b>Obrázek 7.</b> Rozdělení parazitoidů dle různých kritérií. .... 31	31
<b>Obrázek 8.</b> Mšicomar podčeledi Aphidiinae a nafouklé mumie mšic s otvorem po vylíhnutí parazitoidea. Foto: T. Hovorka. .... 33	33
<b>Obrázek 9.</b> Nejdůležitější blanokřídlí parazitoidi: A) lumek (Ichneumonidae), B) lumčík (Braconidae) podčeledi Microgastrinae C) chalcidka čeledi Torymidae. Foto: T. Hovorka. 35	35
<b>Obrázek 10.</b> Kvetoucí pohanka v blízkosti dozrávajícího pole s řepkou poskytující užitečným organismům snadno dostupnou a energeticky bohatou potravu ve formě pylu a nektaru. Foto: T. Hovorka. .... 38	38
<b>Tabulka 1.</b> Přehled druhů blýskáček vyskytujících se nejčastěji na polích s řepkou v ČR. .... 7	7
<b>Tabulka 2.</b> Vztahy mezi přirozenými nepřáteli a škůdci. .... 28	28

## 9 Curriculum vitae a seznam publikací autora

### Osobní informace

Jméno a příjmení: Ing. Tomáš Hovorka  
Datum narození: 26. 04. 1993  
Národnost: Česká  
Kontaktní adresa: U Gymnázia 126/5, Praha 4,  
14000, Czech Republic  
Telefon: +420 723 996 999  
Email: hovorkarl@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-6887-2644  
h-index: 2

---

### Probíhající studium

<b>10/2018 až nyní</b>	<b>Česká zemědělská univerzita v Praze</b>	<b>Doktorské studium</b>
Fakulta:	Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů	
Obor:	Zemědělská a lesnická fytopatologie a ochrana rostlin (aplikovaná entomologie)	
<b>10/2020 až nyní</b>	<b>Univerzita Karlova v Praze</b>	<b>Magisterské studium</b>
Fakulta:	Přírodovědecká fakulta	
Obor:	Zoologie	

---

### Ukončené vzdělání

<b>10/2016–05/2018</b>	<b>Česká zemědělská univerzita v Praze</b>	<b>Magisterské studium</b>
Fakulta:	Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů	
Obor:	Rostlinolékařství	
Téma závěrečné práce:	Metody monitoringu vybraných škůdců řepky a hodnocení ochranných opatření vůči nim	
<b>10/2013–05/2016</b>	<b>Česká zemědělská univerzita v Praze</b>	<b>Bakalářské studium</b>
Fakulta:	Fakulta tropického zemědělství	
Obor:	Zemědělství tropů a subtropů	
Téma závěrečné práce:	Use of <i>in vitro</i> cultures in <i>Incarvillea delavayi</i> (Lamiales: Bignoniaceae) v Anglickém jazyce	



09/2008–06/2012  
Maturitní zkouška:

Gymnázium u Libeňského zámku  
Biologie, Chemie, Anglický jazyk  
(B2)

---

### Pracovní zkušenosti

04/2022 až nyní

Pozice:  
Popis práce:

Národní muzeum

Kurátor  
Péče o sbírku řádu Hymenoptera a její rozšiřování o další exempláře, práce v laboratoři a příprava vědeckých publikací

03–04/2022

Pozice:  
Popis práce:

Staatliche Museum für  
Naturkunde Stuttgart

Stáž (šest týdnů)  
Určování blanokřídlých parazitoidů, práce v laboratoři molekulární biologie a práce s fylogenetickými daty

01/2019–04/2022

Pozice:  
Popis práce:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Výzkumný pracovník  
Výzkum rezistence vybraných škůdců, polní pokusy, identifikace blanokřídlých parazitoidů

11/2016–12/2018

Pozice:  
Popis práce:

Výzkumný ústav rostlinné výroby,  
v.v.i.

Asistent výzkumu  
Provádění pokusů se škůdci, vyhodnocení pokusů, příprava článků, identifikace sběru hmyzu

11/2013–09/2016

Pozice:  
Popis práce:

Česká zemědělská univerzita v Praze

Asistent výzkumu  
Experimenty s *in vitro* kulturami u různých rostlinných druhů

---

### Zkušenosti a schopnosti

Osobní profil:

Spolehlivost, pečlivost, vstřícnost, metodičnost, dochvilnost

Jazykové zkušenosti:

Anglický jazyk (B2) – aktivní komunikace, Německý jazyk (A2), Ruský jazyk (A1)

Zkušenosti práce s PC:

MS office pokročilý uživatel, statistický software R základní uživatel

Řidičské zkušenosti:

Aktivní řidič (oprávnění skupin B a A1)

---

**Ocenění**

**2022:** Cena rektora za publikační výstup zaměstnanců ČZU v Praze v časopisech, zařazených v 1. decilu Web of Science

**2019:** Cena děkana FAPPZ za nejlepší prezentaci svého výzkumu na studentské vědecké konferenci doktorandů FAPPZ

**2019:** Cena společnosti Selgen za studentskou práci v oboru genetiky a šlechtění rostlin

**2018:** Cena děkana Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů (FAPPZ) za nejlepší prezentaci diplomové práce

---

**Publikované články v periodikách s nenulovým impakt faktorem a články uvedené v databázi SCOPUS**

**Hovorka T**, Kocourek F, Horská T, Stará J. 2021. Widespread resistance of pollen beetles to pyrethroids in Czechia with no evidence for kdr mutation. *Crop Protection* (105648) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105648>. (IF 3,036)

**Hovorka T**, Saska P, Stará J, Kocourek F. 2021. Attractiveness of oilseed rape cultivars to *Brassicogethes aeneus* and *Ceutorhynchus obstrictus* as a potential control strategy. *Plant, Soil and Environment* 67:608-615. (IF 2,328)

**Hovorka T.** & Macek J. 2022. Catalogue of type specimens of braconid wasps (Hymenoptera: Braconidae) deposited in the National Museum, Prague, Czech Republic. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 62: 521-546. (IF 0,883)

Kocourek F, Stará J, Sopko B, Talacko P, Harant K, **Hovorka T**, Erban T. 2021. Proteogenomic insight into the basis of the insecticide tolerance/resistance of the pollen beetle *Brassicogethes (Meligethes) aeneus*. *Journal of Proteomics* (104086) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104086>. (IF 3,855)

Belokobylskij S. A. & **Hovorka T.** 2022. A new fossil euphorine genus and species (Hymenoptera, Braconidae) with the longest known ovipositor from Dominican amber. *Journal of Hymenoptera Research* 93: 71–80. (IF 1,76)

González E, Štrobl M, Janšta P, **Hovorka T**, Kadlec T, Knapp M. 2022. Artificial temporary non-crop habitats support parasitoids on arable land. *Biological Conservation* (109409) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109409>. (IF 7,497)

**Hovorka T.** 2022. First record of *Microctonus brassicae* in Czechia, a potential biological control agent against a primary oilseed rape pest. *Journal of Entomological and Acarological Research* (10047) DOI: <https://doi.org/10.4081/jear.2022.10047>. (SCOPUS, SJR 0,18).

**Hovorka T**, Viehmannová I, Vitamvas J, Hlásná Čepková P, Fernández E. 2019. Micropropagation of *Incarvillea delavayi* Bureau et Franchet (Bignoniaceae). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **67**:1453-1456. (SCOPUS, SJR 0,18)

---

### Kapitoly v knize

**Hovorka T**, Kocourek F. 2022. Přirození nepřátelé škůdců a opylovači: Predátoři, parazitoidi a patogeni. Pages 93-96 in Kocourek F, editor. *Integrovaná ochrana zeleniny*. Profi Press s.r.o., Praha.

**Hovorka T**, Kocourek F. 2022. Metody monitorování škůdců zeleniny. Pages 63-68 in Kocourek F, editor. *Integrovaná ochrana zeleniny*. Profi Press s.r.o., Praha.

Kocourek F, **Hovorka T**, Talašová A. 2022. Ochrana a podpora užitečných organismů a podpora biodiverzity. Pages 52-57 in Kocourek F, editor. *Integrovaná ochrana zeleniny*. Profi Press s.r.o., Praha.

---

### Vybrané články v ostatních periodikách

**Hovorka T.**, Holý K., Macek J. 2022. Distribution of *Mymaromma anomalum* (Hymenoptera: Mymarommatidae) in the Czech Republic. *Klapalekiana* **58**: 69-76.

**Hovorka T.**, Horská T. 2022. Lumčíkovití (Hymenoptera: Braconidae): diverzita a jejich využití v ochraně rostlin proti škůdcům. *Rostlinolékař* **1**: 9-14.

**Hovorka T.** 2021. Faunistic Records From The Czech Republic – 512. *Klapalekiana* **57**: 236.

**Hovorka T.** 2021: Užitečné organismy v ochraně proti škůdcům řepky. *Úroda* **5**: 54-58.

**Hovorka T.** 2021: Potenciální pomocník v boji proti dřepčíkovi olejkovému. *Úroda* **10**: 39-41

**Hovorka T**, Kocourek F, Stará J. 2021. Citlivost populací mšice broskvoňové vůči vybraným insekticidům. *Úroda* **1**:34-36.

**Hovorka T**, Kocourek F. 2020. Škůdci řepky na jaře: blýskáček řepkový a krytonosec šešulový. *Úroda* **3**:46-50.

**Hovorka T**, Kocourek F. 2020. Škůdci řepky na jaře: stonkoví krytonosci. *Úroda* **1**:30-34.

Stará J, **Hovorka T**, Kocourek F. 2020. Citlivost mandelinky bramborové k nově používaným insekticidům. *Agromanuál* **1**:34-35.

**Hovorka T**, Kocourek F, Stará J. 2020. Mšice broskvoňová na ozimé řepce-Aktuální poznatky o rezistenci a účinnosti vybraných insekticidů. *Agromanuál* **8**:58-59.

**Hovorka T.** 2020. Užitečný hmyz (1): úvod do tématu. *Selská revue* **8**:42-44.

- Hovorka T.** 2020. Užitečný hmyz (2): nadčeleď Ichneumonoidea. Selská revue **11**:56-58.
- Stará J, **Hovorka T**, Kocourek F. 2019. Rezistence mšice broskvoňové na řepce vůči insekticidům a možnosti ochrany. Agromanuál **8**:48-49.
- Hovorka T**, Stará J, Kocourek F. 2019. Mšice broskvoňová: rezistence a možnosti ochrany na řepce. Úroda **8**:60-63.
- Hovorka T**, Kocourek F, Stará J. Monitoring a ochrana proti hlavním škůdcům řepky na podzim. Úroda **9**:40-45.
- Hovorka T.**, Skuhrovec J. 2019. Stonkoví krytonosci na ozimé řepce. Agromanuál **2**: 40-43.
- Hovorka T.**, Kocourek F, Stará J. 2019. Monitoring a ochrana proti hlavním škůdcům řepky na podzim. Úroda **9**: 40-45.
- Hovorka T.**, Kocourek F. 2019. Odrůdové rozdíly v atraktivitě pro škůdce řepky. Úroda **4** (Příloha řepka): 11-13.
- Kocourek F, Stará J, **Hovorka T.** 2019. Rezistence škůdců k insekticidům-příčina selhání ochrany. Selská revue **8**:78-82.
- Kocourek F, Skuhrovec J, **Hovorka T.** 2018b. Monitoring stonkových krytonosců a ochrana řepky proti nim. Agromanuál **2**:38-42.

---

### **Konference s aktivní účastí**

- Hovorka T**, Holý K. 2020. The distribution and biology of the tribus Helconini (Hymenoptera: Braconidae: Helconinae) in Czechia. Kostecké inspirování 2020. Sborník abstraktů XII. Ročníku konference 19. – 20. 11. 2020: p. 21.
- Hovorka T**, Holý K. 2020. Seznam lumčíků České republiky a Slovenska. Zoologické dny Olomouc 6.-7. 2. 2020. Sborník abstraktů z konference: pp. 77-78.
- Hovorka T.** 2018. Monitoring stonkových krytonosců na ozimé řepce. Page 79 in Šefrová H, Šafránková I, editors. XXI. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Sborník abstraktů. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
- Hovorka T.** 2019. New technology for winter rape growing and control using varietal differences in pests and their natural enemies preferences. Page 5 in Lošťák M, editor. CASEE conference 2019. The role of life science universities in redirecting land use from

threat to guardian of ecosystem. Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of Sarajevo, Sarajevo.

**Hovorka T**, Kocourek F. 2019. Technology for winter rape growing and control using varietal differences in pests and their natural enemies preferences. Page 11 in Božík M, Šašková M, Rysová L, editors. Vědecká konference doktorandů – sborník příspěvků. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

---

### **Výsledky aplikované pro zemědělskou praxi**

#### **Metodiky**

Kocourek F, Havel J, **Hovorka T**, Kazda J, Kolařík P, Kovaříková K, Ripl J, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2017. Ochrana řepky proti živočišným škůdcům na podzim bez mořidel na bázi neonicotinoidů. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.

Kocourek F, Havel J, **Hovorka T**, Jursík M, Kazda J, Kolařík O, Plachká E, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2018. Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům vyjma podzimních škůdců. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Praha.

Kocourek F, Stará J, Horská T, **Hovorka T**, Seidenglanz M, Kolařík P, Havel J, Hrudová E. 2020. Biologické metody hodnocení rezistence škůdců k insekticidům a antirezistentní strategie. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.

#### **Technologie**

Kocourek F, Havel J, **Hovorka T**, Kazda J, Kolařík P, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2018. Technologie pěstování a ochrany řepky založená na výběrovém ošetření odrůd různě atraktivních pro klíčové škůdce – ověřená technologie. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Projekt MZe č. QJ1610217.

---

### **Vybrané projekty a granty s aktivní účastí řešení**

**MZe č. QJ1610217:** Inovace systému integrované ochrany řepky pro omezení negativních dopadů současné technologie pěstování.

**MZe č. QK1820081:** Metody monitorování rezistence hospodářsky významných škůdců a plevelů k přípravkům na ochranu rostlin a antirezistentní strategie.

**MZe č. QK21020238:** Inovace integrované produkce zeleniny při změně spektra prostředků ochrany, zdokonaleném monitoringu škodlivých organismů a omezení rizik pesticidů v produktech.

**GAUK č. 375421:** Vliv životních strategií vybraných druhů drobných motýlů na složení společenstva jejich parazitoidů (hlavní řešitel v období 2021-2023).