

Monitoring herbicidní rezistence a antirezistentní strategie

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

prof. Ing. Josef Soukup, CSc. a kol.

Kolektiv autorů:

prof. Ing. Josef Soukup, CSc.

Ing. Pavlína Košnarová, Ph.D.

Ing. Kateřina Hamouzová, Ph.D.

Ing. Pavel Hamouz, Ph.D.

doc. Ing. Miroslav Jursík, Ph.D.

Pracoviště autorů:

katedra agroekologie a rostlinné produkce

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchbátka

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Rok vydání: 2020

Dedikace:

Certifikovaná metodika vznikla na základě poznatků získaných při řešení výzkumného projektu NAZV QK 1820081 s názvem Metody monitorování rezistence hospodářsky významných škůdců a plevelů k přípravkům na ochranu rostlin a antirezistentní strategie.

Oponentní posudky vypracovali:

Odborník za státní správy:

RNDr. Jan Juroch, ÚKZÚZ, Zemědělská 1752/1a, 61300 Brno

Odborník z oboru:

Ing. Jiří Peterka, Ph.D., katedra agroekosystémů, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 1457, 370 05 České Budějovice

Publikaci bylo přiděleno osvědčení č. UKZUZ 027345/2021

ISBN: v tištěné verzi

Obsah

CÍL METODIKY.....	4
1. VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	4
1.1. Herbicidní rezistence jako evoluční jev	4
1.2. Hlavní typy a mechanismy rezistence	4
1.2.1. Rezistence v místě účinku (angl. <i>target-site resistance</i>)	4
1.2.2. Genetický základ rezistence	5
1.2.3. Rezistence mimo místo účinku (angl. <i>non-target site resistance</i>).....	6
1.2.4. Křížová a vícenásobná rezistence (angl. <i>cross resp. multiple resistance</i>).	6
1.3. Významné případy herbicidní rezistence ve světě a v ČR	7
1.3.1. Situace ve světě	7
Zdroj: (Heap, www.weedscience.org)	8
1.3.2. Situace v Evropě	8
1.3.3. Situace v České Republice	9
1.4. Monitoring a mapování rezistence.....	14
1.5. Metody testování rezistence	20
1.5.1. Posouzení citlivosti populace k herbicidům prostřednictvím růstových esejí	21
1.5.2. Metoda vodních kultur a agarových pěst	24
Obr. 9: Testování psárky polní na rezistenci k ALS inhibitorům pomocí RISQ metody	24
1.5.3. Enzymatické studie.....	24
1.5.4. Diagnostika rezistentních populací plevelů pomocí měření fluorescence chlorofylu.....	25
1.5.5. Molekulárně-genetické metody	26
1.6. Využití monitoringu při hodnocení rizika a v antirezistentních strategiích.....	29
2. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	31
3. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	32
4. EKONOMICKÉ ASPEKTY	32
5. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	33
6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	36

CÍL METODIKY

Metodika si klade za cíl charakterizovat nejvýznamnější plevelné druhy s herbicidní rezistencí, popsat postupy monitoringu a mapování rezistence a metody detekce rezistence k herbicidům různých mechanismů účinku. Na základě monitoringu jsou zpracovány údaje o frekvenci a intenzitě rezistence u populací sledovaných plevelů a navržen integrovaný systém regulace, který umožní dlouhodobé udržení úrovně jejich výskytu v porostech polních plodin na hospodářsky akceptovatelné úrovni a bude plnit i funkci prevence proti vzniku herbicidní rezistence. Metodika je určena zejména pro pracovníky ve státních institucích v jejichž gesci je registrace a používání přípravků na ochranu rostlin, pro zemědělce, zemědělské poradce, podniky zemědělských služeb, ale i další odborníky zabývající se regulací plevelů.

1. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1.1. Herbicidní rezistence jako evoluční jev

Herbicidní rezistence je podobně jako u jiných přípravků na ochranu rostlin evoluční jev, který vzniká vlivem dlouhodobého selekčního tlaku vytvářeného aplikací herbicidu na původně převážně citlivou populaci plevelu. V každé populaci se vyskytují jedinci s různou mírou citlivosti k herbicidu, včetně velmi malého počtu jedinců (např. jedna rostlina z milionu), kteří jsou k herbicidu v důsledku genetické změny vysoce odolní – rezistentní. Citlivější část populace je v průběhu let aplikací herbicidu postupně potlačována a v populaci začne převažovat potomstvo rezistentních jedinců. Z důvodu vysokého reprodukčního potenciálu plevelů pěstitel zpozoruje výskyt rezistence na pozemku často z roku na rok, když výskyt plevelu překročí pro něj akceptovatelnou míru, ačkoliv selekční proces probíhal již roky předtím. Z pohledu pěstitele má tedy rezistence hospodářský význam až tehdy, pokud se výskyt rezistentních jedinců zvýší natolik, že překročí práh škodlivosti. Při používání herbicidů se v podstatě jevu herbicidní rezistence vyvarovat nelze. Prostřednictvím antirezistentních strategií se snažíme udržovat co nejnižší frekvenci rezistentních jedinců v populaci a oddálit jejich převládnutí a hospodářskou škodlivost.

1.2. Hlavní typy a mechanismy rezistence

Herbicidy hubí plevelu narušením jejich základních fyziologických nebo biochemických procesů, obvykle prostřednictvím specifické interakce a následné inhibice jednoho nebo více enzymů, které katalyzují některou z reakcí při biosyntéze organických sloučenin – aminokyselin, karotenoidů, lipidů apod. Následně však může docházet k druhotným projevům na místech, kde jsou dané sloučeniny zapotřebí v navazujících biochemických procesech či jako stavební jednotky buněčných organel.

1.2.1. Rezistence v místě účinku (angl. *target-site resistance*)

Rezistence v místě účinku vzniká v důsledku změny vazebného místa herbicidu nebo nadprodukce cílového enzymu. Mechanismus rezistence v místě účinku je obvykle spojován se zamezením efektivního navázání herbicidu na cílové místo z důvodu strukturální změny vazebného místa (Tharayil-Santhakumar, 2003). Cílovým místem jsou obvykle enzymy, proteiny nebo jejich komponenty, se kterými se herbicidy váží a tím narušují jejich katalytickou funkci. Počet míst účinku se pohybuje pro v současné době používané herbicidy mezi 15-20

(Cobb, Kirkwood, 2000). Příčinou změny vazebného místa bývá bodová mutace genu, který kóduje pro enzym, na kterém by se herbicid normálně navázal. Záměna pořadí aminokyselin v primární struktuře cílového proteinu způsobená bodovou mutací umožní enzymu jeho normální funkci i za přítomnosti herbicidu (Preston, Malory-Smith, 2001). Tyto změny již byly popsány u většiny významných míst účinku herbicidů – D1 proteinu, acetolaktátsyntázy (ALS), acetyl-koenzym A karboxylázy (ACCasy), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS) a dalších (Devine, Shukla, 2000).

Rezistence v místě účinku může být dále způsobena polymorfismem cílových enzymů herbicidů. Polymorfní molekulární formy enzymů (isozymy) jsou enzymy katalyzující stejnou reakci, ale liší se sekvencí a složením aminokyselin. Variabilita metabolické aktivity je způsobena přítomností několika typů alel nebo i genů pro danou skupinu enzymů. V populaci se tak vyskytují alely, u jejichž nositelů můžeme předpokládat různě rychlý metabolismus substrátu daného enzymu, nebo různou afinitu k herbicidu a tím i rozdílný efekt aplikovaného herbicidu.

Další příčinou rezistence v místě účinku může být nadprodukce cílového enzymu, na který má herbicid působit. Enzym je produkován v pletivech rezistentního jedince v takové míře, že herbicid aplikovaný v normální dávce nepostačuje k zablokování veškerého množství enzymu. Příčinou nadprodukce enzymu bývá větší počet kopií genu kódujícího cílový enzym nebo jeho zvýšená exprese. Zvýšená exprese genu může být způsobena různými mechanismy. Ke zvýšené expresi některých genů nebo i ke zvýšení výskytu mutací zakládajících rezistenci může docházet i v důsledku stresu (Gressel, 2011).

1.2.2. Genetický základ rezistence

Na základě genetických studií bylo zjištěno, že rezistence v místě účinku je obvykle založena na jednom jaderném genu, jehož rezistentní alely vykazují vysoký stupeň dominance. Nicméně dědičné vlastnosti mohou být založeny různě:

- úplná dominance alel,
- neúplná dominance alel,
- recesivita alel,
- nejaderná, mateřská dědičnost chloroplastové DNA,
- polygenně založená dědičnost.

Stupeň dominance rezistentních genů je obzvláště důležitý u cizosprašných druhů, neboť plně recesivní geny se v heterozygotních jedincích ředí. Naopak stupeň dominance má jen malý význam pro vývoj rezistence u druhů, které jsou obligátně samosprašné, protože mezi potomstvem rezistentního jedince jsou vždy homozygoti nesoucí gen rezistence.

Je-li rezistence kódována recesivními alelami, trvá obvykle velmi dlouho, než se četnost alel v populaci dostane na takovou úroveň, aby se rezistence projevila. Je-li naopak rezistence kódována dominantními alelami, je šíření rezistentní populace výrazně rychlejší. Rezistence plevelů k triazinovým není kódována chromozomální DNA, ale nejadernou DNA, která je v chloroplastech buněk mateřské rostliny. Z toho plyne, že gen rezistence se nemůže přenášet pylem, ale semena vzniklá na rezistentní rostlině produkují vždy rezistentní jedince. Předpokládá se, že vysoké dávky herbicidů podporují selekci populací s rezistencí v místě

účinku, která je založena monogenně a bývá silnější. Naopak nízké dávky herbicidů nebo herbicidy s nižší účinností podporují vznik polygenně založené typy rezistence, jako je rezistence metabolická (Vila-Aiub, Ghersa, 2005; Neve, Powles, 2005).

1.2.3. Rezistence mimo místo účinku (angl. *non-target site resistance*)

Podstatou rezistence mimo místo účinku je nedosažení místa účinku takovou koncentrací herbicidu, aby mohlo dojít k inhibici cílového enzymu. K tomu může dojít několika způsoby. Jednou z příčin může být snížený příjem, kdy rezistentní rostlina herbicid přijímá v nedostatečném množství např. díky morfologickým změnám na povrchu listů, jako je nadprodukce vosků, trichomy, apod. (Tharayil-Santhakumar, 2003).

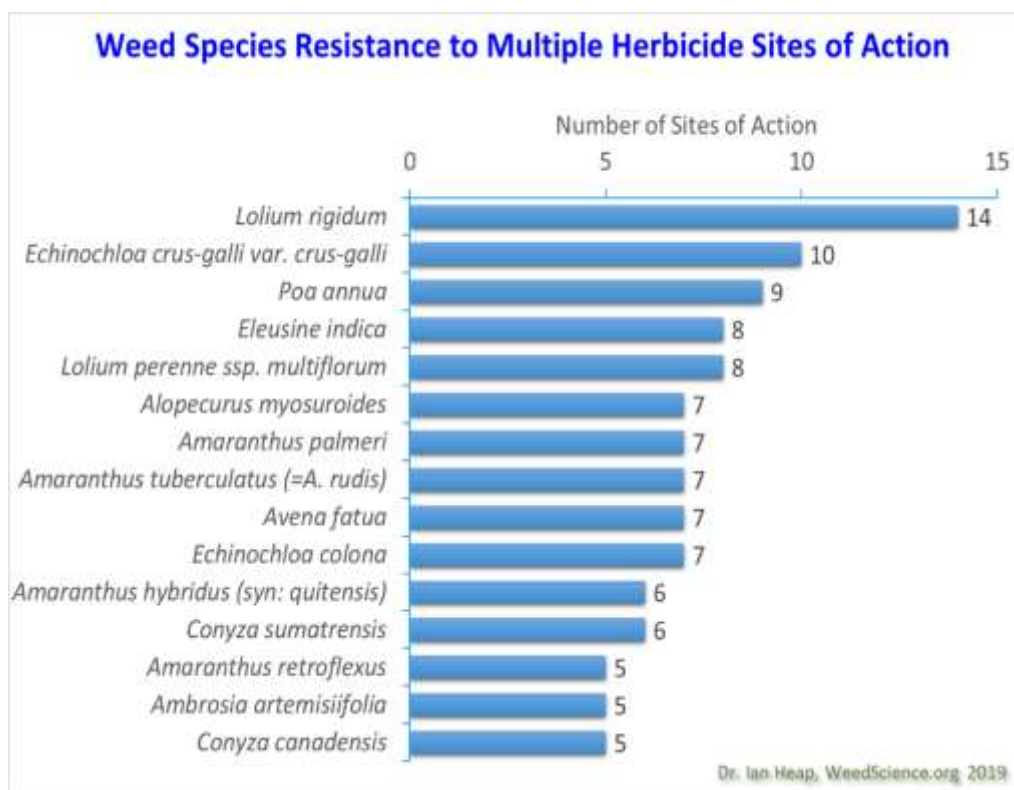
Častou příčinou rezistence mimo místo účinku je nedostatečná translokace herbicidu, případně jeho přemístění a uložení na místo, odkud nemůže účinkovat (Heap, LeBaron, 2001).

Nejčastějším druhem rezistence mimo místo účinku je zvýšený metabolismus – detoxikace prostřednictvím oxidace, redukce, nebo hydrolýzy s následnou konjugací metabolitů. Herbicid je v těchto biochemických reakcích odbourán dříve, než dosáhne místa účinku (Yuan et al., 2006). Schopnost deaktivovat herbicid má rostlina díky detoxikačním enzymům, jejichž zvýšená aktivita způsobuje rychlé snížení koncentrace herbicidu v buňce. Nejvýznamnějším z nich je enzymatický komplex cytochrom P450 monooxygenáza (CYP450) se širokou substrátovou specifitou, která dokáže v první detoxikační fázi schopnost oxidovat velké množství cizorodých látek. Z herbicidů jsou to např. sulfonylmočoviny, aryloxyfenoxypropionáty a triaziny (Mallory-Smith, Namuth, 2010). Široká substrátová specifita CYP450 je způsobena značným strukturálním polymorfismem enzymu, který je dán častými mutacemi genu pro CYP450 (Yun, 2005). Zvýšená metabolizace herbicidů způsobená aktivitou tohoto enzymu již byla popsána jako příčina stojící za vznikem rezistence k inhibitorům ACCázy, ALS a PS II u řady travovitých plevelů (Tharayil-Santhakumar, 2003). Ve druhé fázi detoxikace dochází ke konjugaci velkých hydrofilních molekul s metabolity. Důležitým enzymem v této fázi je glutathion-S-transferáza (GST), která katalyzuje konjugaci glutathionu s různými substráty za vzniku glutathionového konjugátu, který je následně transportován do vakuol. GST se účastní vzniku řady různých sekundárních metabolitů a umožňuje detoxifikovat širokou škálu chemických látek. Dalším významným enzymem, který se účastní fáze II je O-glykosyltransferáza (OGT), která má podobnou funkci jako GST. Třetí fáze detoxikace zahrnuje transport konjugovaných molekul do vakuol nebo mimobuněčných prostor aktivním transportem, na němž se nejčastěji podílejí ABC přenašeče (Bartholomew, 2003). Ve čtvrté fázi dochází k dalším degradacím konjugovaných molekul ve vakuolách a mimobuněčných prostorech. Ve vakuolách např. dochází k odštěpení peptidů za vzniku cysteinu, který může být využit jako substrát pro tvorbu dalších aminokyselin (Yuan et al., 2006).

1.2.4. Křížová a vícenásobná rezistence (angl. *cross resp. multiple resistance*).

Poměrně velkým problémem jsou z pohledu hubení rezistentních populací plevelů křížová a vícenásobná rezistence. U křížové rezistence je populace, u níž byla vyvolána rezistence dlouhodobým používáním jedné účinné látky herbicidu, rezistentní také vůči dalším účinným látkám se stejným mechanismem účinku. Mnohonásobná či vícenásobná rezistence je případ, kdy vznikne současně rezistence ke dvěma nebo více účinným látkám s různým

mechanizmem účinku (Obr. 1). Tyto populace jsou pak rezistentní vůči širokému spektru herbicidních přípravků a ochrana proti nim je velmi komplikovaná.



Obr. 1: Případy vybraných plevelů s vícenásobnou rezistencí (Zdroj: Heap, www.weedscience.org)

1.3. Významné případy herbicidní rezistence ve světě a v ČR

1.3.1. Situace ve světě

Doposud byly popsány případy herbicidní rezistence ve více než 70 zemích světa v 93 plodinách. Do září roku 2020 bylo celosvětově popsáno 514 unikátních případů herbicidní rezistence (míněno plevelný druh x mechanismus účinku), u 262 druhů, z toho 152 dvouděložných a 110 jednoděložných. Rezistence byla potvrzena k 23 z 26 známých mechanismů účinku přípravků (Tab. 1) a 167 různým herbicidům (www.weedscience.org). Nejvíce popsáných případů herbicidní rezistence bylo zjištěno v USA (165), Austrálii (93), Kanadě (68) a Francii (55). Velmi závažnými rezistentními druhy v Severní Americe jsou laskavec Palmerův (*Amaranthus palmeri*) a laskavec tamaryškový (*Amaranthus tuberculatus*). V některých státech USA byly u těchto druhů detekovány vícenásobné rezistence, např. v Kansasu byla zjištěna rezistence u populace laskavce Palmerova dokonce již k pěti různým mechanismům účinku herbicidů. Laskavce mají vzhledem k vysoké reprodukční schopnosti a počtu genetických kombinací velký potenciál ke vzniku a rychlému nárůstu rezistentních populací. Dlouhá životnost semen navíc téměř znemožňuje regulaci těchto populací. Mezi další problematické dvouděložné plevele s rezistencí zejména k ALS a PSII inhibitorům v těchto oblastech dále patří bytel metlatý (*Kochia scoparia*) a turanka kanadská (*Conyza canadiensis*),

z jednoděložných pak činí potíže hlavně ježatky (*Echinochloa spp.*), jílek tuhý (*Lolium rigidum*), béry (*Setaria spp.*) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne*). Přibližně do 90. let minulého století se problematika herbicidní rezistence týkala pouze rozvinutých zemí. V posledních dvou desetiletích došlo k výrazným změnám ve způsobu hospodaření směrem k výrazné intenzifikaci v rozvíjejících se zemích, což se následně promítlo i do výskytu rezistentních plevelů. V současnosti se s rezistencí plevelů potýkají již také v Jihoafrické republice, Číně, Brazílii i dalších státech. Co se týká plodin, ve kterých nejčastěji nalézáme rezistentní plevelné druhy, jsou na prvních místech ve statistice pšenice, kukuřice, sója a rýže. To jistě není překvapivé, vzhledem k tomu, že tyto plodiny zaujímají největší osevní plochy celosvětově a regulace plevelů je řešena primárně herbicidně. Další stanoviště, na kterých často byly zaznamenány rezistentní biotypy, jsou okraje komunikací a ovocné sady. Příčinou je omezený sortiment používaných herbicidů a několikrát za sezónu opakované aplikace stejných herbicidů, především glyfosátu, což vytváří vysoký selekční tlak.

Tab. 1: Mechanismy účinku herbicidů celosvětově nejvíce postižené herbicidní rezistencí

#	Mechanismus účinku	HRAC	Příklad účinné látky	Dvouděložné	Jednoděložné	Celkem
1	ALS inhibitory	B	chlorsulfuron	101	64	165
2	Inhibitory fotosystému II	C1	atrazine	51	23	74
3	Inhibitory ACCázy	A	sethoxydim	0	48	48
4	Inhibitory EPSP syntázy	G	glyphosate	24	23	47
5	Syntetické auxiny	O	2,4-D	33	8	41
6	Inhibitory PSI	D	paraquat	22	10	32
7	Inhibitory PS II (ureázy, amidy)	C2	chlorotoluron	11	18	29
8	PPO inhibitory	E	oxyfluorfen	10	3	13

Zdroj: (Heap, www.weedscience.org)

1.3.2. Situace v Evropě

Z hlediska evropského zemědělství patří mezi nejvýznamnější rezistentní plevele psárka polní (*Alopecurus myosuroides*), jílky (*Lolium spp.*), ježatky (*Echinochloa spp.*) a turanka kanadská (*Conyza canadensis*). Odhaduje se, že psárka polní se v EU vyskytuje na 9 milionech hektarů a polovina těchto populací je rezistentní, ve Velké Británii a Francii je toto procento dokonce ještě vyšší – 80 % a psárka polní se zde stává obtížně řešitelným problémem (Petersen, Rosenhauer, 2014). Výjimečné nejsou u psárky polní výskyty rezistentních populací k několika mechanismům účinku herbicidů (Heap, 2020) viz dále. V mnoha evropských státech (Německo, Španělsko, Dánsko, Itálie) patří k nejvýznamnějším plevelům jílky. V průzkumu provedeném ve Spojeném království bylo prokázáno, že 70 % populací jílky je rezistentních k alespoň jednomu herbicidu. Rezistentní populace ježatky představují komplikace v polích kukuřice a rýže v Itálii a nyní se rozšiřují ve Francii, Španělsku a Portugalsku. Co se týče dvouděložných plevelů, jsou hlavním problémem, který ovlivňuje produkci sadů, turanky kanadské a úzkolisté (*Conyza bonariensis*) rezistentní k ALS inhibitorům a glyfosátu. V západní

Evropě ale i v některých severovýchodních zemích začínají narůstat rezistentní populace máku vlčího (*Papaver rhoeas*), heřmánkovce přímořského (*Tripleurospermum maritimum*) a ptačince prostředního (*Stellaria media*). Objevují se i případy rezistentních populací laskavce ohnutého (*Amaranthus retroflexus*) a merlíku bílého (*Chenopodium album*), např. v sousedním Polsku byly popsány rezistentní populace laskavce ohnutého k metamitronu v řepě cukrové a v Itálii v kukuřici, sóje a cukrové řepě k metamitronu a terbuthylazinu. V případě merlíku bílého byly rezistentní populace k metamitronu publikovány v roce 2005 v Belgii v kukuřici a v roce 2008 ve Švédsku v porostech cukrové řepy a bramborách. Doposud lze většinu případů rezistence překonat použitím herbicidů s jiným mechanismem účinku nebo využít nechemické regulace plevelů. Poměrně velkým problémem z pohledu regulace rezistentních populací plevelů je vícenásobná rezistence (Obr. 1). Takovéto případy jsou v Evropě již popsány, u jílku tuhého (*Lolium rigidum*) byly v Řecku a Španělsku nalezeny rezistentní populace k celkem čtyřem různým mechanismům účinku herbicidů. V Belgii je popsána vícenásobná rezistence populace psárky polní k dokonce pěti různým mechanismům účinku herbicidů, v Německu a Anglii ke čtyřem. Sortiment účinných látek k regulaci psárky je v tomto případě prakticky vyčerpán a zemědělci v těchto zasažených lokalitách musejí používat pouze nechemické metody.

1.3.3. Situace v České Republice

V porovnání se západoevropskými státy nejsou problémy s rezistencí v České republice zatím tak vážné, ale v některých podnicích již řeší značné problémy s rezistencí, které se promítají do ekonomiky výroby.

Jednoděložné plevele

Chundelka metlice (*Apera spica-venti*)

Největší hospodářské ztráty v České republice představují vzhledem k zasažené ploše rezistentní populace chundelky metlice v ozimých obilninách. Při výskytu pěti rostlin chundelky na jednom metru čtverečním, což je po neúčinném zásahu herbicidu u rezistentní populace běžné, je ztráta výnosu zhruba pět procent. Při hustotě zaplevelení sto lat na jednom metru čtverečním může pěstitel přijít o 0,5 až 1 tunu zrna z hektaru (Hamouz et al., 2014). Výskyty rezistentních populací chundelky metlice se v posledních letech staly poměrně běžnou záležitostí, nejedná se již o žádný ojedinělý jev. Přes 70 % námi testovaných populací (Tab. 2), které byly odebrány na pozemcích, kde byla pozorována snížená účinnost herbicidního přípravku, vykazovalo rezistenci k různým účinným látkám ze skupiny inhibitorů ALS. Poměrně běžnou je u chundelky **křížová rezistence** (rezistence k více účinným látkám se stejným mechanismem účinku) k sulfonylmočovinám (chlorsulfuronu, iodosulfuronu, mesosulfuronu, sulfosulfuronu), triazolovým pyrimidinům (penoxsulamu, pyroxsulamu) a sulfonylamino-carbonyl-triazolinonům (propoxycarbazonu). V případě podezření na rezistenci k jedné účinné látce ze skupiny inhibitorů ALS je tedy nutné z ochrany vyřadit z používání i všechny ostatní přípravky s tímto mechanismem účinku. Situaci v některých podnicích komplikuje fakt, že si chundelka vytváří rezistenci i k dalším herbicidním skupinám s jiným mechanismem působení a vzniká tzv. **vícenásobná rezistence** (Obr. 2). Nejvíce případů vícenásobné rezistence bylo detekováno k inhibitorům ALS a zároveň k inhibitorům fotosystému II (PSII), ale přibývají i

případy, kdy je chundelka rezistentní k inhibitorům ALS a současně k inhibitorům enzymu acetyl-koenzym A karboxylázy (ACCáza). V průběhu řešení tohoto projektu jsme našli a popsali biotyp chundelky metlice rezistentní dokonce ke všem třem výše uvedeným mechanismům účinku. Tento typ rezistence nalezený v jižních Čechách prakticky vylučuje z použití většinu postemergentních herbicidů.



Obr. 2: Populace chundelky metlice s vícenásobnou rezistencí

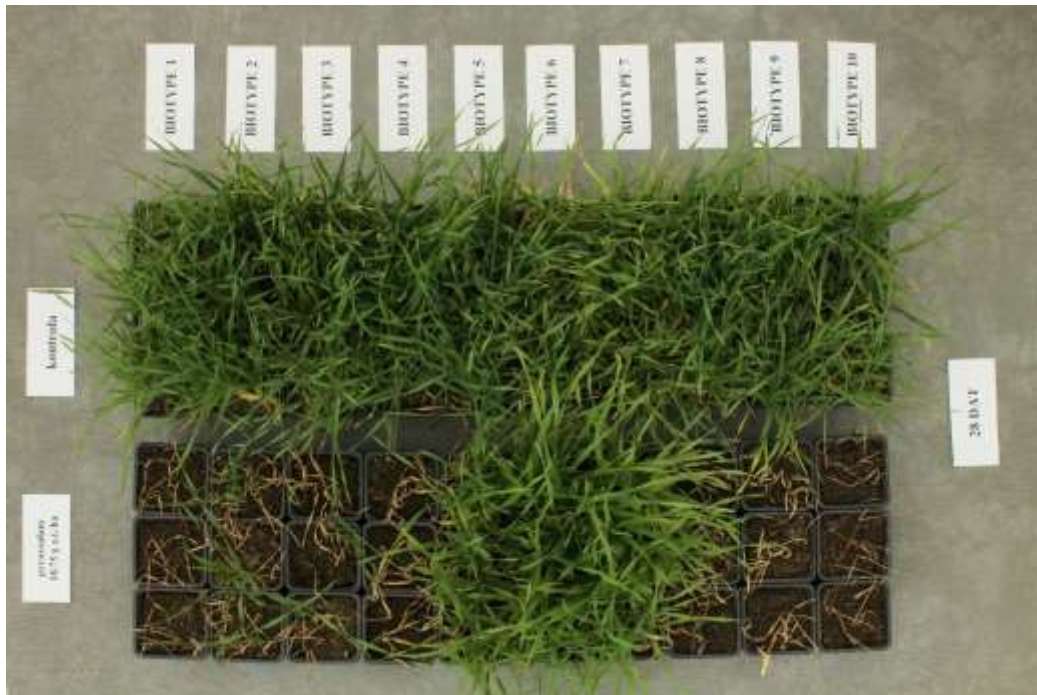
Psárka polní (*Alopecurus myosuroides*)

U nás se psárka polní zatím vyskytuje pouze na několika lokalitách, kde je však její škodlivost značná. Nejsilnější výskyty jsou dlouhodobě zaznamenávány v oblasti Českých Budějovic, Třeboně a Jindřichova Hradce. V posledních letech se psárka vlivem nevhodného střídání plodin, kdy časté zařazování obilnin podporuje její reprodukci, šíří také v okolí Prahy, Mělníka, Mladé Boleslavi a Hradce Králové. Přestože jsou proti psárce registrovány podobné herbicidy jako proti chundelce metlici, je u ní třeba počítat s výrazně vyšší přirozenou odolností vůči většině herbicidů. Zmapováním výskytu psárky polní a detekcí herbicidní rezistence jsme se věnovali v několika oblastech jižních Čech, kde je její výskyt místy kalamitní a byla zde již dříve u několika biotypů potvrzena rezistence vůči inhibitorům ALS. Prakticky u všech testovaných vzorků z jižních Čech, které byly odebrány z jedinců přeživších aplikací, byla prokázána rezistence alespoň k jedné účinné látce ze skupiny inhibitorů ALS. U několika dalších populací se vyskytovala vícenásobná rezistence k ALS inhibitorům a pinoxadenu či fenoxapropu nebo k ALS inhibitorům a chlorotoluronu (Košnarová et al., 2018).

Sveřep jalový (*Bromus sterilis*)

Sveřep jalový je jednoletý vysoce konkurenceschopný přezimující plevel, který se v ČR v posledních letech expanzivně šíří. K šíření sveřepu také přispívají minimalizační technologie zpracování půdy, protože obilky sveřepu mají jen velmi krátkou dormanci a okamžitě po disperzi klíčí z povrchu půdy. Dalším důvodem šíření sveřepu je obtížná a nedostatečně účinná chemická ochrana. Sveřepy jsou přirozeně velmi odolné vůči většině běžně používaných herbicidů. Ve Francii byly již v roce 2009 popsány populace rezistentní vůči inhibitorům ALS a

v sousedním Německu v roce 2012 vůči inhibitorům ACCázy. V naší republice byl zaznamenán první výskyt rezistence v roce 2017 u tří populací k účinným látkám pyroxulam (Obr. 3) a propoxycarbazone. Jako příčinu rezistence jsme prokázali vyšší expresi *als* genu a zvýšený metabolismus pyroxulamu rostlinami sveřepu (Sen et al., 2020). Problémem regulace rezistentních populací sveřepu je, že jiné selektivní herbicidy, než na bázi ALS inhibitorů proti němu nejsou v obilninách registrovány. Případné omezení používání glyfosátu i v meziorostním období by potlačování populací rezistentních k ALS inhibitorům značně zkomplikovalo.



Obr. 3: Účinnost pyroxulamu v registrované dávce na testované populace sveřepu jalového (28 dnů po aplikaci)

Oves hluchý (*Avena fatua*)

Na území naší republiky již byly také detekovány první dvě populace **ovsa hluchého** s herbicidní rezistencí (Košnarová a kol, 2018). Jedna populace vykazovala rezistenci k účinným látkám fluazifop and propaquizafop ze skupiny inhibitorů ACCázy a druhý vzorek byl rezistentní k inhibitorům ALS, konkrétně k pyroxulamu. Většina námi testovaných vzorků ovesa hluchého však byla k registrovaným přípravkům citlivá a k selhání účinnosti herbicidů v podnicích, kde byly vzorky sebrány, pravděpodobně došlo z jiných důvodů než je rezistence.

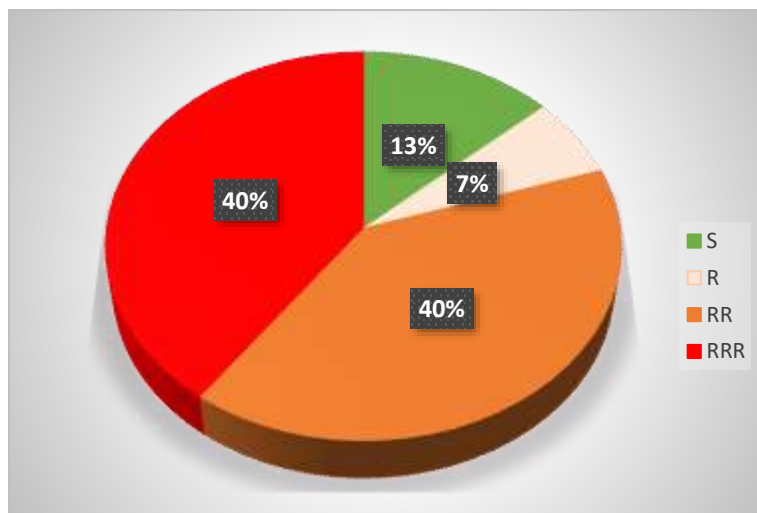
Dvouděložné plevely

V osmdesátých a devadesátých letech minulého století byly v České republice popsány výskyty dvouděložných plevelů rezistentních k inhibitorům PSII, mezi nimi i merlíku bílého, laskavce ohnutého a lilku černého (Mikulka, 1987). Jednalo se zejména o případy v sadech, vinicích a porostech kukuřice vůči tehdy masově používanému atrazinu, jehož aplikace je v Evropské unii od roku 2005 zakázána. Podstata herbicidní rezistence k účinným látkám ze

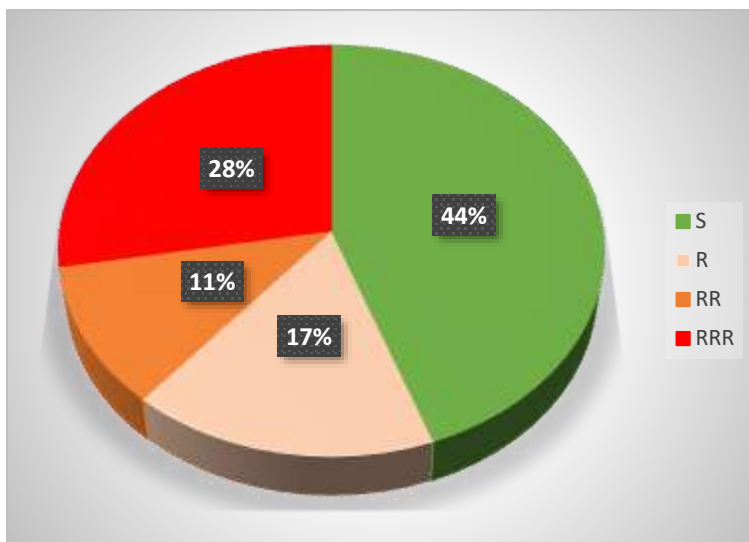
skupiny inhibitorů PSII používaných v současnosti na orné půdě nebyla u žádného z dvouděložných druhů v České republice dlouhou dobu spolehlivě charakterizována (Salava, Chodová, 2006). V posledních letech dochází na našich polích k nárůstu heřmánkovitých plevelů, významně vzrostlo i zastoupení svíce, rozrazilů a máku vlčího. Podobně jako v několika dalších evropských zemích (Německo, Dánsko, Francie, Polsko) jsme zachytili i u nás první rezistentní populace heřmánkovce nevonného (*Tripleurospermum inodorum*) vůči tribenuronu, florasulamu, metsulfuronu a iodosulfuronu a máku vlčího (*Papaver rhoeas*) vůči sulfonylmočovinám, který se již několik let vyskytuje ve Španělsku, Francii a Itálii. Z těchto důvodů se naše pracoviště v posledních letech zaměřilo také na monitoring rezistence u významných dvouděložných druhů.

Plevele škodící v jarních širokořádkových plodinách – laskavec ohnutý a merlík bílý

V letech 2017-2019 jsme provedli monitoring herbicidní rezistence k inhibitorům fotosystému II u merlíku bílého, laskavce ohnutého v porostech cukrovky, kukuřice, brambor a zeleniny (Košnarová et al., 2019). Bylo otestováno celkem 63 populací merlíku bílého a 34 populace laskavce ohnutého. Sledována byla pomocí nádobových pokusů účinnost dvou látek v současnosti používaných k jejich regulaci – metamitronu a terbuthylazinu. V případě merlíku bílého bylo zjištěno poměrně malé procento (8 %) rezistentních populací k oběma těmto účinným látkám. U většiny testovaných populací merlíku bílého dosahovala účinnost terbuthylazinu 100 %, avšak některé populace byly silně rezistentní a přežívaly mnohonásobně vyšší dávku terbuthylazinu, než je registrovaná. V případě laskavce ohnutého bylo v obou letech monitoringu identifikováno velké množství populací se slabou, střední i silnou rezistencí, a to zejména k účinné látce metamitron (Graf. 1 a 2).



Graf 1: Procentické zastoupení citlivých (S), slabě (R), středně (RR) a silně (RRR) rezistentních populací laskavce ohnutého k metamitronu detekovaných v roce 2017



Graf 2: Procentické zastoupení citlivých (S), slabě (R), středně (RR) a silně (RRR) rezistentních populací laskavce ohnutého k metatritronu detekovaných v roce 2019

Plevele škodící v ozimých plodinách – mák vlčí a heřmánkovce nevonný

Sběry semen populací máku vlčího a heřmánkovce nevonného, které přežily po aplikaci herbicidů na pozemcích s ozimou pšenicí a ozimou řepkou probíhaly v letech 2019 a 2020. Celkem bylo otestováno růstovými esejemi 46 populací máku vlčího a 28 populací heřmánkovce přímořského. Pro první screening byly vybrány účinné látky tribenuron a florasulam (ALS inhibitory) a 2,4 D a dicamba (syntetické auxiny). V roce 2019 byly detekovány dvě rezistentní populace máku vlčího a dvě rezistentní populace heřmánkovce nevonného; všechny populace byly rezistentní k účinné látce tribenuron, k ostatním testovaným účinným látkám byly všechny populace citlivé. V roce 2020 byla herbicidní rezistence zjištěna populací máku vlčího pouze u jedné populace z 29 testovaných, ale k oběma testovaným ALS inhibitorům – tribenuronu i florasulamu. U heřmánkovce nevonného byly detekovány tři populace rezistentní k tribenuronu (Obr. 4). Populace získané z tohoto screeningu jsou v současnosti společně s německými, norskými a švédskými podrobovány srovnávacím studiím k objasnění mechanismu rezistence a je připravován vědecký článek.



Obr. 4: Účinnost tribenuronu ve stupňovaných dávkách na rezistentní populaci heřmánkovce nevonného 30 dnů po aplikaci (1N = registrovaná dávka)

1.4. Monitoring a mapování rezistence

Přístupů, jak monitorovat herbicidní rezistenci je mnoho. V zásadě je můžeme shrnout do dvou skupin, kdy jsou pozemky vybírány náhodně nebo se jedná o cílené vzorkování. V některých případech, se přistupuje i ke kombinaci obou přístupů. Výhody i rizika obou přístupů jsou shrnuty v Tab. 2.

Tab. 2: Výhody a nevýhody cíleného a náhodného sběru vzorků (podle L. Ulber, Německo)

Přístup	Metoda	Pozitiva	Negativa
Náhodné vzorkování	Pozemek vybrán na základě předem stanovených kritérií (GPS)	Určíme frekvenci rezistentních biotypů v určené oblasti	Pro získání objektivního výsledku, je nutné zahrnout vyšší počet vzorků do testování
	Oblast rozdělena do sekcí na stejné podoblasti, náhodně vybrané pozemky v každém sektoru	Popíšeme faktory, které přispěly ke vzniku rezistence	
Cílené vzorkování	Sběr diaspor na pozemcích, kde selhává herbicidní ochrana	Potvrdíme rezistentní biotypy mezi všemi sebranými vzorky	Neodhadneme frekvenci
		Určíme frekvenci snížené účinnosti herbicidu/ů, která je způsobena rezistencí	Obtížně určíme faktory, které přispívají ke vzniku rezistence

Nejčastěji je monitoring herbicidní rezistence součástí sledování spolehlivosti přípravků v polních podmínkách jejich výrobci a distributory. Není vždy jednoduché odlišit, zda se jedná opravdu o rezistenci, či je snižená účinnost způsobena z nějakého jiného důvodu. Proto se vlastnímu testování na herbicidní rezistenci věnují specializovaná pracoviště, kam jsou vzorky rostlinného materiálu (diaspory, vegetativní části) po odběru na pozemku zasílány k provedení testů.

Než přistoupíme k vlastnímu testování a mapování herbicidní rezistence u daného plevelného druhu, je nutné vzít v úvahu jeho biologické vlastnosti, které do značné míry ovlivňují to, zda a v jakém rozsahu se herbicidní rezistence může vyskytnout a rozvinout. Dále jsou nezbytnou součástí monitoringu dotazníková šetření, která umožní sběr informací, které pomohou porozumět vzniku a vývoji rezistence. Na základě výsledků statistických analýz je pak možné posoudit vliv agrotechnických opatření (např. zpracování půdy, herbicidní ochrany a dalších) na rozvoj či tlumení rezistence.

Pro cílené vzorkování vybíráme pozemky na základě předem stanovených kritérií, obvykle to v případě herbicidní rezistence bývá výpadek účinnosti daného přípravku nebo skupiny přípravků. Tento přístup lze částečně aplikovat i u náhodného výběru pozemku, zde však kritériem není nedostatečná účinnost přípravku. Cílené sběry bývají při monitoringu herbicidní rezistence preferovány, vzhledem k tomu, že není nutné sbírat tolik vzorků a dále, že se zaměřujeme pouze na ty plochy, kde dochází k výpadkům účinnosti herbicidních přípravků. V ČR takto průběžně monitorujeme chundelku metlice s podezřením na rezistenci vůči inhibitorům ALS (Hamouzová et al., 2011). Od roku 2004 jsou na našem pracovišti každoročně testovány desítky populací chundelky metlice. Během této doby se samozřejmě také rozšířilo portfolio testovaných přípravků. Výsledky testování shrnuje Tab. 3.

Tab. 3: Procentické zastoupení populací chundelky metlice s rezistencí k herbicidům s různými mechanismy účinku (za období 2004–2020)

	CELKEM	%
počet testovaných populací	788	100
z toho rezistentních	554	70,3
rezistence k ALS inhibitorům	554	70,3
rezistence k ACCase inhibitorům	16	2,0
rezistence k PSII inhibitorům	22	2,8
rezistence k ostatním skupinám herbicidů	0	0

*populace rezistentní k ACCase a PSII inhibitorům byly zároveň rezistentní k ALS inhibitorům

Druhý přístup spočívá v náhodném výběru testovaných populací. Příkladem může být testování heřmánkovce nevonného v České republice a Německu, kdy byla náhodně odebrána těsně před sklizní plodiny semena heřmánkovce a poté otestovány předpěstované rostliny v nádobových pokusech. V Německu bylo sesbíráno 78 vzorků, u 6 byla potvrzena rezistence, několik vzorků vykazovalo sníženou citlivost k testovanému přípravku (Ulber, 2019, osobní sdělení). V České republice bylo v letech 2019-2020 otestováno celkem 28 populací heřmánkovce nevonného, u 5 populací byla potvrzena herbicidní rezistence k účinné látce

tribenuron (Kořnarová a Hamouzová, 2020, nepubl. data). Rozsahem největší studie je pravděpodobně testování populací jílku tuhého v Austrálii, kdy při studiu rezistence bylo hodnoceno více než 5000 populací tohoto plevelného druhu a testovány byly přípravky z 8 skupin s různým mechanismem účinku (Broster et al., 2019). Jednalo se o náhodné sběry na těch pozemcích, které vykazovaly problémy s účinností některého přípravku. Celkem 80 % všech testovaných vzorků bylo rezistentních k inhibitorům ACCázy a fenylpyrazolovým herbicidům, 56 % k inhibitorům ALS a 24 % k cyklohexandionům. Případů rezistence k inhibitorům PSII, EPSPS a dalším mechanismům účinku bylo na úrovni 10 %. Další přístup náhodných sběrů je rovněž z Austrálie, kdy předmětem zájmu byla turanka kanadská s podezřením na rezistenci ke glyfosátu. Owen et al. (2009) rozdělili západoaustralský obilnářský pás do pěti zón. Semena byla sbírána z populací turanky z polí, podél cest a silnic a konečně v centrech měst, všude tam, kde byly jedinci turanky spatřeni. Poté byly rovněž vysety do nádob a testovány různými dávkami glyphosate. Dalším příkladem může být distribuce laskavce tamaryškového v Missouri. Laskavce byly sebrány na 187 polích se sójou v 57 okrscích ve dvou oblastech – obilnářské a kukuřičné v Missouri. Místa pro sběr byla vybírána náhodně, pouze na základě přítomnosti laskavce těsně před sklizní plodiny, tedy sóji (Schultz et al. 2015). Dalším příkladem může být merlík bílý, který byl sbírán v Belgii, Holandsku, Francii, Německu a Švédsku, celkem bylo otestováno 60 populací. Výsledky jsou shrnuty v práci De Marez et al. (2008). Menchari et al. (2006) ve svém přístupu zkombinovali náhodné i cílené vzorkování. Zkoumali rozmístění psárky polní na regionální úrovni. Celkem byly vzorky sebrány na 116 pozemcích, kde pěstitelé poukazovali na sníženou účinnost herbicidní ochrany. Síť pozemků, na kterých byly sběry učiněny, pak byla náhodně a homogenně rozmístěna po území Francie, 4 pozemky byly vybrány náhodně v každém kantonu, což vedlo k celkovému počtu 158 testovaných vzorků, výskyt psárky polní byl potvrzen na 80 % z nich, u mnoha byla rovněž potvrzena herbicidní rezistence.

Okolnosti vzniku rezistence na daném pozemku

Jestliže na pozemku po aplikaci herbicidu, který má daný plevelný druh hubit, tento druh ošetření přežívá, je nutné prověřit následující okolnosti:

- 1) Zmapovat historii pozemku, zejména opakované používání přípravků se stejným mechanismem účinku.
- 2) Faktory ovlivňující výskyt plevelného druhu na daném pozemku (velikost populace, nerovnoměrné vzcházení/klíčení během celé sezóny, vysoké zaplevelení v předcházejícím roce atd.).
- 3) Nevhodné povětrnostní podmínky při aplikaci přípravku (větrno, teplota, vlhkost, srážky).
- 4) Problémy při vlastní aplikaci přípravku (dávka nebo načasování).
- 5) Podezření na herbicidní rezistenci.

Je nutné vzít v úvahu, že selekční tlak narůstá, pokud se opakují aplikace přípravků se stejným mechanismem účinku, dále při pěstování monokultur (víceleté a vytrvalé plodiny, šíření od krajů pozemků), aplikacích vysokých dávek přípravku, nebo používáním přípravků s dlouhým reziduálním účinkem. A v neposlední řadě používáním směsných přípravků s partnery, kteří patří do stejné skupiny.

V prvním kroku jsou analyzovány příčiny vzniku selhání herbicidní ochrany – např. nevhodné naplánování termínu aplikace, chyby v dávkování přípravku nebo povětrnostní vlivy – dešťové srážky po aplikaci, půdní podmínky (vlhkost, adsorpce, kvalita seťového lůžka) či nízká teplota ovlivňující příjem některých účinných látek. V případě, že na pozemku docházelo k opakovanému selhání přípravků se stejným mechanismem účinku a opakovanému přežívání cílového plevelného druhu, je velmi pravděpodobné, že je nedostatečná účinnost herbicidu způsobena herbicidní rezistencí a přistupujeme k odběru vzorků.

Sběr vzorků na pozemku

Podle toho, jakou budeme aplikovat metodu při testování rezistence, sbíráme buď diaspory (semena, nažky apod.), nebo přímo některá pletiva či orgány rostlin, nejčastěji listy. V omezeném množství případů je možné některá měření provádět přímo *in situ*, tedy přímo na pozemku, např. měření fluorescence chlorofylu (Linn et al., 2018).

Při testování herbicidní rezistence téměř vždy porovnááme data se standardy – tedy referenční populací stejného druhu, ideálně pocházející z podobných podmínek, o které je předem prověřeno, že je k dané účinné látce / přípravku citlivá.

Musíme vzít v úvahu, co bude cílem dané studie, zda odhadnout frekvenci herbicidní rezistence v populaci na pozemku (zde je pro skutečný odhad frekvence rezistence požadována hustota životných semen v půdní bance semen), variabilitu rezistence mezi jedinci v rámci populace nebo průměrnou úroveň rezistence populace na daném pozemku.

Při odběru zaznamenáváme následující data:

- Identifikace pozemku (ID, GPS souřadnice, LPIS číslo atd.).
- Datum sběru, osoba, která poskytne detailní informace.
- Plocha, na které byl sběr proveden, metoda, která byla použita (Z schéma, ohniska atd.).
- Plodina, osevňovací postup či sled, způsob zpracování půdy.
- Úroveň zaplevelení na pozemku.
- Pokud je to možné – historie používání herbicidů (dávka, datum, přípravek).
- Časový horizont ideálně 5 let.

Před začátkem sběru je nutné si položit otázku, kolik jedinců sesbírat na pozemku, kde je vysoká hustota přeživších jedinců. Burgos et al. (2013) doporučuje se rozhodnout podle způsobu opylování daného plevelného druhu. U samosprašných druhů doporučuje odebrat minimálně 20-40 rostlin, u cizosprašných druhů alespoň 5-10 rostlin. Při našich vlastních studiích, v případech vysokého zaplevelení na pozemku, doporučujeme sbírat diaspory alespoň u 100 jedinců a doručit k testování směsný vzorek. V případě, že jsou jedinci na pozemku rozmístěni homogenně, doporučuje se nesebírat je na okrajích a v rozích pozemků, ideálním způsobem je transekt (např. 3x100 m rovnoběžně). Případně je doporučováno sbírat jedince pomocí různých vzorů či písmen např. W, Z, atd. Častěji se však setkáváme s případy, kdy je na pozemku několik přežívajících rostlin nebo se vyskytují v ohniscích. Zde je nutné

vyločit to, že se jedná o aplikační chybu (vyloučení určitých ploch), sbírat semena z rostlin individuálně anebo sbírat směsné vzorky z jednotlivých ohnisek.

Musíme vzít také v úvahu to, že plevelné druhy dozrávají krátce před dozráním plodiny a pro sběr diaspor máme ve většině případů poměrně krátké časové okno. Pro další navazující studie je vhodné zajistit rezervu životných semen. Sbíráme tedy pouze zralá semena, která zajistí vyšší klíčivost a vzcházivost. Sběr je nejlépe uskutečnit na začátku opadávání semen, u trav bývá obvykle 20 % již vypadaných. Diaspory sbíráme do papírových sáčků nebo textilních sáčků, nikoliv do plastových obalů. U některých dvouděložných je sběr obtížnější z důvodu dlouhého časového rozpětí dozrávání, malého množství semen, nebo habitu rostliny. Proto se někdy rovněž přistupuje k tomu, že je možné odebrat celou rostlinu, přesadit do sadbovače, semena nechat dozrát a takto sbírat postupně.

Po sběru semen je nutné předcházet vystavení semen nevhodným podmínkám, zejména vlhkosti, a teploty. Ideálně diaspory usušíme při normální pokojové teplotě po dobu asi 2 týdnů. V dalším kroku odstraníme nežádoucí příměsi, vzorek prosejeme, vyfoukáme nečistoty proudem vzduchu apod. Pro dlouhodobé uskladnění mohou být semena uložena za nízké teploty a relativní vlhkosti, tak jak je tomu v genových bankách (<https://www.vurv.cz/vyzkum/odbor-genetiky-a-slechtenu-rostlin/genova-banka/>).

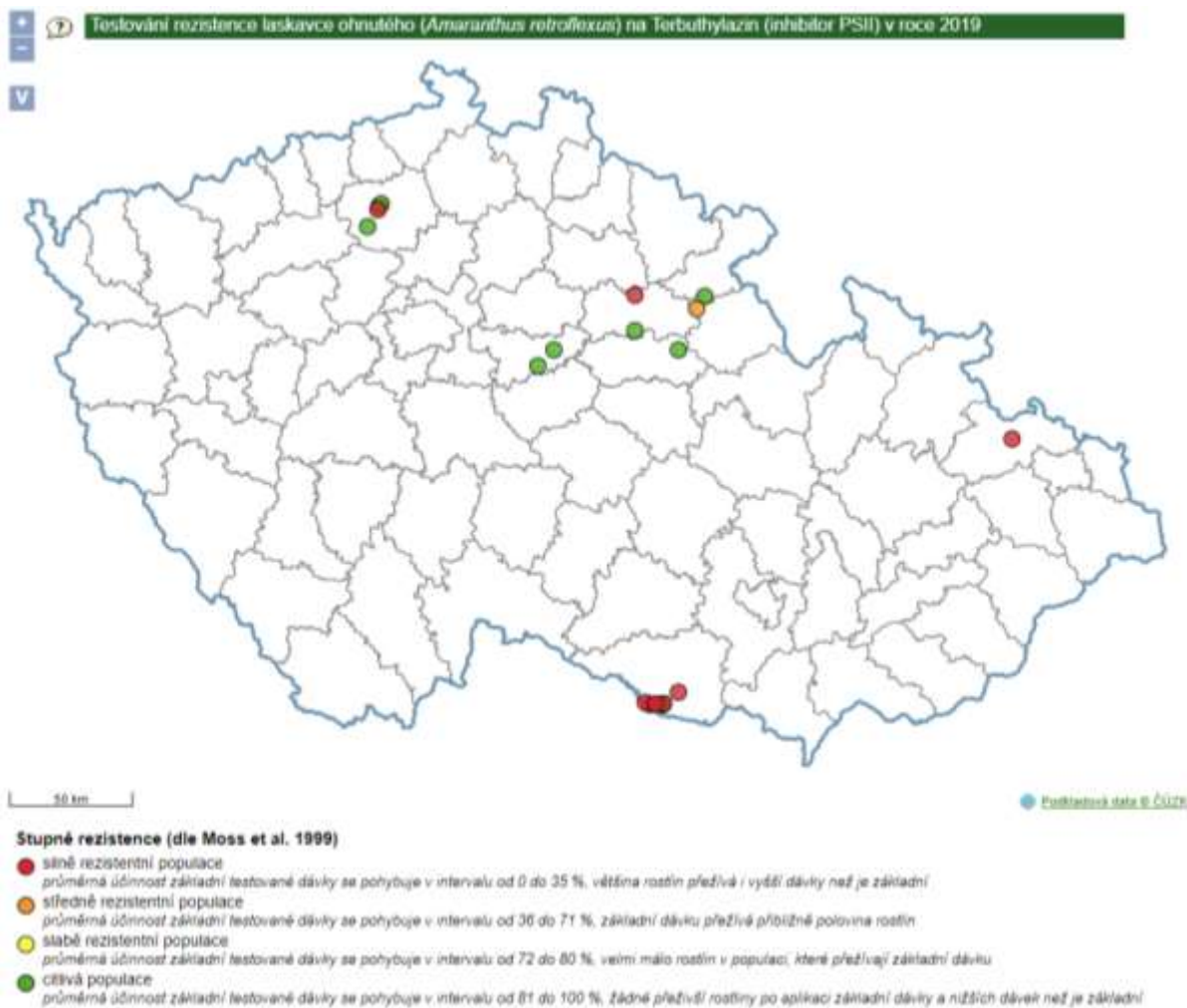
Před vlastním testováním herbicidní rezistence je vhodné provést test klíčivosti, případně vzcházivosti, proto abych určili, kolik semen je nutno vysít k tomu, abychom získali požadovaný počet rostlin pro další testování. Při testování klíčivosti a vzcházivosti vycházíme z údajů v dostupné odborné literatuře. U druhů dormantních je nutné přerušit dormanci, k tomu, abychom dostali vyrovnané klíčení/vzcházení. Je možné využít různých metod např. stratifikaci chladem, mechanické, chemické nebo ošetření teplem, vystavení vysokým nebo nízkým teplotám, případně kombinaci těchto metod. Klíčivost je nejčastěji prováděna v Petriho miskách a jako substrát používáme filtrační papír. Na misku umístíme 25-100 semen, navlhčíme destilovanou vodou a inkubujeme v optimálních teplotních a světelných podmínkách. Obvykle postačuje pro vyklíčení většiny životných semen za optimálních podmínek desetidenní inkubace.

Před vlastním testováním herbicidní rezistence v nádobách je nutné vybrat vhodný citlivý (v některých případech i rezistentní) standard. Standardem musí být stejný plevelný druh se známou citlivostí k testované účinné látce herbicidu. Úroveň rezistence mezi populacemi z různých studií může být porovnána jen tehdy, pokud je použit stejný citlivý standard. Požadavky na citlivý (S) standard jsou tyto: Vzorek by měl být reprezentativní, ideálně sesbíraný ve stejné oblasti jako vzorek, který chceme testovat a u něhož je podezření na herbicidní rezistenci. Citlivé standardy přednostně sbíráme na pozemcích, kde byly příslušné herbicidy používány se správnou praxí a nevyskytují se problémy s jejich účinností. Pro specifické účely se používají citlivé standardy pocházející od zemědělců hospodařících v režimu ekologického zemědělství, nebo z nezemědělské půdy, kde herbicidy nebyly používány a je předpoklad, že populace plevelného druhu ještě nebyla vystavena selekčnímu tlaku herbicidu. Ve Velké Británii testovali Davies et al. (2017) citlivost 40 populací psárky polní ke glyfosátu, z nichž žádná nevykazovala herbicidní rezistenci vůči této účinné látce. I přesto se vypočítané hodnoty efektivní dávky potřebné k 50 % účinku (ED₅₀) vypočítané na

základě log-logistických regresních modelů významně lišily. Hodnota ED₅₀ u citlivého standardu má značný dopad na výsledky testování a hodnotu faktoru rezistence, jak na to poukázali také Escorial et al. (2011) ve Španělsku při testování druhu *Bromus diandrus*. Proto vždy doporučujeme, testovat citlivý standard před založením vlastního pokusu. V některých případech jsme nuceni zařadit i několik S populací nebo vybrat tu S populaci, která je citlivá k většině testovaných přípravků.

V případě, že pracujeme s pletivou nebo orgány (listy) pro izolace nukleových kyselin, odebíráme listy z horní části mladých rostlin, u trav nejmladší listy. Listy z jednotlivých rostlin skladujeme odděleně, ukládáme obvykle do jednotlivých plastových sáčků. Vzorek se nesmí zahřát a v co nejkratší době jej proto umístíme do mrazáku nebo alespoň do chladu. V případě izolace RNA je nutné vzorky okamžitě ponořit do tekutého dusíku a až poté pokračovat v analýzách nebo dále uskladnit při -80°C.

Data o nových výskytech rezistentních populací plevelných druhů včetně charakteristik (lokalizace pomocí GPS, datum sběru vzorku, rezistence k příslušné účinné látce atd.) jsou vkládány do Databáze WeedMap. Tato databáze byla vyvinuta ve spolupráci katedry agroekologie a rostlinné produkce a Geocentra Olomouc. Systém je přístupný on-line na stránce www.weedmap.eu. Primárním účelem této databáze je možnost ukládání a zpracování dat získaných při fytoecologických průzkumech. Databáze však rovněž umožňuje vkládání informací o herbicidní rezistenci k danému druhu. Výsledky monitoringu rezistence získané pomocí nádobových testů v rámci tohoto projektu byly přeneseny do map výskytu rezistentních hospodářsky významných populací plevelů. Data z testování byla vložena na webové interaktivní mapy Rostlinolékařského portálu, které jsou volně přístupné na http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public. Elektronická mapa je geografickým vyjádřením výsledků, znázorňuje lokality, na kterých byly odebrány vzorky plevelných populací a testovány na herbicidní rezistenci (Obr. 5). Vzhledem k citlivosti údajů jsou lokality popsány pouze na úrovni okresů, mapu si však lze zvětšovat či zmenšovat a získat tak ucelenější představu o monitorovaném území. Detailní výsledky z testování se objeví po jednoduchém kliknutí na zanesený bod. U každé lokality je uveden stupeň citlivosti testované populace, v jakém porostu byla odebrána, jakými účinnými látkami s definovaným mechanismem účinku byla testována a jaká byla průměrná účinnost základní testované látky.



Obr. 5: Mapové zobrazení geografického rozšíření různě citlivých populací laskavce ohnutého k terbutylazinu z testování v roce 2019 (Rostlinolékařský portál ÚKZÚZ, data ČZU v Praze)

1.5. Metody testování rezistence

V polních podmínkách je téměř nemožné od sebe odlišit citlivé a rezistentní populace plevelů. Rozdíl většinou zaznamenáme až po zjištění nedostatečného účinku herbicidu (Tharayil-Santhakumar, 2003). Po vyloučení faktorů, které by se mohly podílet na selhání účinku herbicidu, přistupujeme k vlastnímu podrobnému testování a zkoumání rezistence. V současné době existuje široká škála metod k prokázání rezistence a jejich použití se řídí účelem studie. V prvním kroku je potřeba na úrovni vzorku populace prokázat, zda se skutečně jedná a rezistenci. K tomuto účelu se používají růstové eseje, pomocí kterých je možné stanovit nejen zdali je populace rezistentní, ale také stupeň rezistence. Pokud je rezistence prokázána, je možné navázat laboratorními studiemi na metabolické nebo molekulárně genetické úrovni, kterými lze stanovit mechanismus rezistence. Stanovení mechanismu rezistence není významné jen z vědeckého hlediska, ale poskytuje důležitou informaci pro vytvoření vhodné antirezistentní strategie, jak z pohledu prevence vzniku a šíření rezistence v populaci, tak i managementu rezistentních populací.

1.5.1. Posouzení citlivosti populace k herbicidům prostřednictvím růstových esejí

Za účelem zjištění rezistence či citlivosti vůči účinným látkám herbicidů s různými mechanismy účinku je vhodné na vybraných materiálech nejprve provést nedestruktivní růstové eseje sledující reakci rostlin na aplikovanou dávku herbicidu. Rostliny předpěstované v nádobách ze semen pocházejících z populace s podezřením na rezistenci ošetřujeme obvykle ve fázi jednoho až tří pravých listů nebo v časných růstových fázích registrovanými (1N) a dvojnásobnými (2N) dávkami vybraných herbicidů. Pro tyto testy jsou vybírány herbicidy, u kterých docházelo k selhání účinnosti a další nejčastěji používané účinné látky proti danému plevelnému druhu. Dále jsou také zařazovány herbicidy, u kterých zatím nebyla hlášena ztráta účinnosti a mohly by proto být využity jako alternativa v antirezistentních strategiích a doporučeny pro praxi. Každá populace by měla být testována alespoň ve čtyřech opakováních. Po 3-4 týdnech po aplikaci se vyhodnotí účinnost použitých herbicidů (v % nebo jako hmotnost vyprodukované biomasy plevele v nádobě) a provede se porovnání účinnosti mezi testovanou populací a citlivým standardem.

Cílem biologických testů se zařazením několika herbicidů je také potvrzení či vyvrácení existence křížové či vícenásobné rezistence. U populací s potvrzenou rezistencí jsou následně prováděny tzv. dose-response testy. Provede se aplikace účinné látky v 6–10 logaritmicky odstupňovaných koncentracích se středem rozpětí na hodnotě registrované dávky a vyhodnotí se účinnost jednotlivých dávek. Z výsledků dose-response testů jsou pomocí nelineární regrese vypočítány parametry rovnic a stanoveny hodnoty ED_{50} (dávka, při které dochází k 50% redukci nadzemní biomasy) a hodnoty faktoru rezistence (RF), který získáme podílem hodnot ED_{50} rezistentní biotyp / ED_{50} citlivý biotyp. Tato relativní hodnota vyjadřuje, kolikrát větší dávku herbicidu musíme u rezistentního biotypu použít, aby bylo dosaženo stejné účinnosti jako u biotypu citlivého (Moss, 2007).

Výsev a pěstování

Semena testovaných populací se vysévají do pokusných pěstebních nádob naplněných půdou či pěstebním substrátem, který neobsahuje žádná rezidua herbicidů či jiných chemických látek. Krátce po vzejití jsou rostliny vyjednoceny na konečný počet 8-12 rostlin/nádobu dle druhu. Nádobky mohou být umístěny v kryté venkovní vegetační hale nebo ve skleníku s regulovanou teplotou. Rostliny jsou zalévány podmokem a 1x během vegetace přihnojeny hnojivem N-P-K (19–6–20). Ke každému druhu jsou vysety citlivé standardy pocházející z lokalit, které nebyly herbicidně ošetřeny.



Obr. 6: Nádobové pokusy s chundelkou metlicí v kryté vegetační hale

Aplikace a hodnocení

Postemergentní aplikace herbicidů se provádí v přesném laboratorním komorovém postřikovači (používáme AVIKO PK-3, Obr. 7) ve fázi plevelů doporučené výrobcem přípravků. Postřikovač umožňuje přesnou a rovnoměrnou aplikaci postřikové kapaliny na plochu 0,5 x 1 m. Aplikaci zajišťují snadno a rychle odnímatelné trysky upevněné na pohyblivém modulu, který je umístěn v horní části komory na kolejnicích kruhového průřezu. Aplikovanou dávku lze regulovat rychlostí pojezdu, pracovním tlakem a volbou velikosti trysek.



Obr. 7: Přesný laboratorní komorový postřikovač AVIKO-PK3

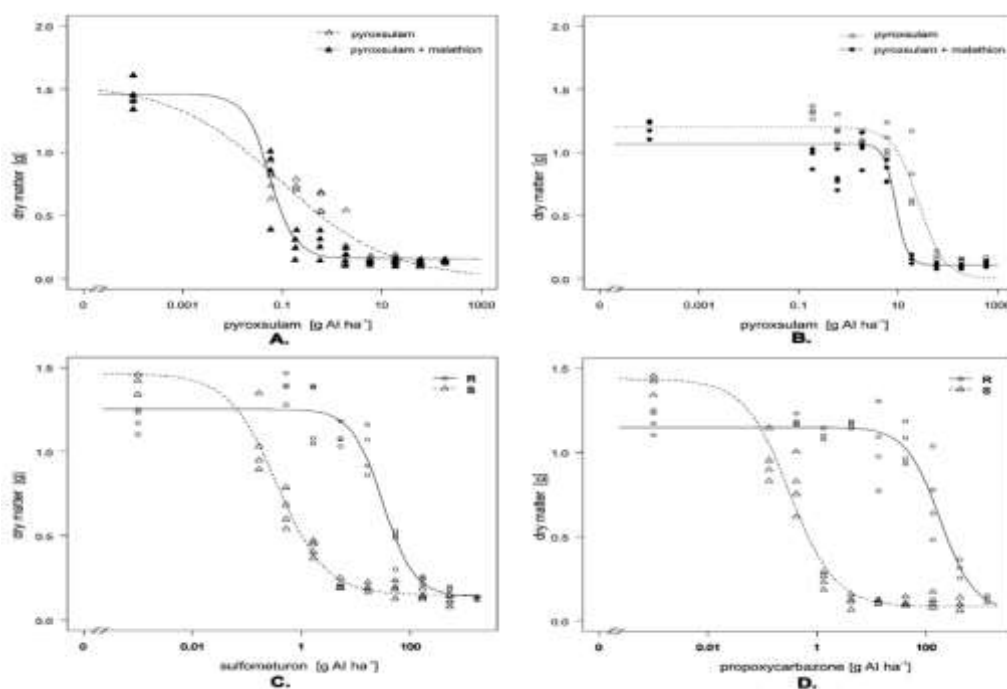
Účinnost herbicidů se hodnotí odhadovou metodou a je vyjádřena v % vůči neošetřené kontrole. Účinek jednotlivých herbicidů je porovnáván s citlivým biotypem. Účinnost je hodnocena na základě typických symptomů (zastavení růstu, chlorózy, fialovění, nekrózy až případné uhynutí rostlin) po 14, 21, 28 či 30 dnech (v některých případech i více) od aplikace v závislosti na mechanismu účinku herbicidu. Při ukončení experimentu se odebírá a váží čerstvá nadzemní biomasa rostlin, která je následně usušena při teplotě 105 °C a rovněž zvážena.

Statistické zpracování dat

Výsledky z dose-response testů jsou popsány pomocí logaritnicko-logistické rovnice s vyjádřením směrodatné odchylky průměrů ze čtyř opakování (Obr. 8). Pro vyjádření redukce nadzemní biomasy ED₅₀ se používá nelineární regresní model (Nielsen et al., 2004):

$$y = c + \frac{d - c}{1 + e^{(b \cdot (\ln x - \ln ED_{50}))}}$$

kde y je závisle proměnná (např. účinnost), c a d jsou koeficienty odpovídající spodnímu (0%) a hornímu limitu účinnosti (100%) a ED₅₀ je inflexní bod funkce nacházející se mezi spodní a horní asymptotou a vyjadřující dávku, při níž bude dosaženo 50% účinnosti; b je šikmost křivky v bodě ED₅₀ a x je nezávislá proměnná (dávka).

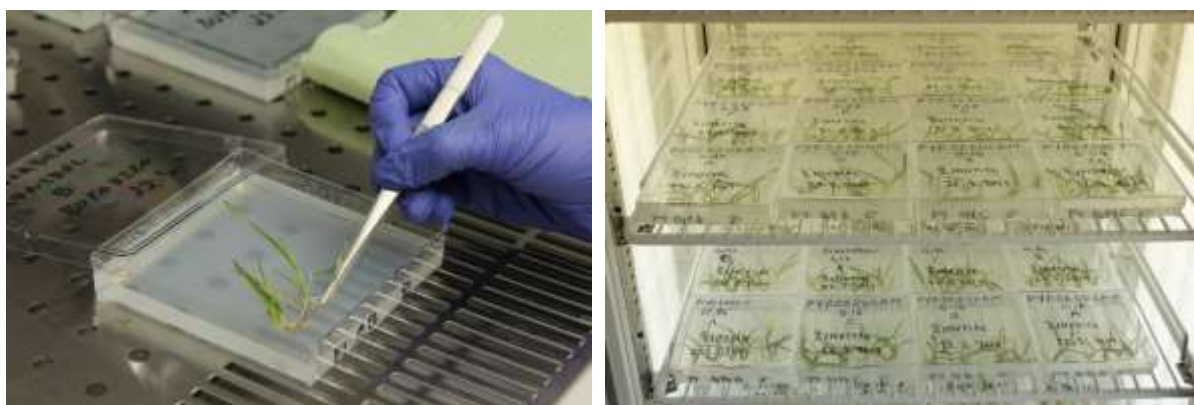


Obr. 8: Nelineární regresní model získaný ze suché nadzemní biomasy dvou populací sveřepu jalového po aplikaci herbicidů s různými účinnými látkami (R = rezistentní populace, S = citlivá populace)

Ke statistickému zpracování dat a modelování je možné použít software R-project (The R Development Core Team, 2005).

1.5.2. Metoda vodních kultur a agarových půd

Při použití metody vodních kultur se naklíčená semena vkládají do speciálních nádob a vzešlé rostliny se pěstují v živném roztoku s herbicidem. Rezistence či citlivost je hodnocena pomocí počtu uhynulých rostlin či inhibice růstu. Metoda agarových půd je založena na pěstování rostlin v agarovém médiu (Obr. 9) s rozpuštěným testovaným herbicidem a hodnocení počtu živých a uhynulých rostlin či inhibice růstu. Na tomto principu je založen RISQ test (Resistance In-Season Quick test) vypracovaný ve společnosti Syngenta (Kaundun et al., 2010), který je používán při detekci herbicidní rezistence k ALS a ACCase inhibitorům především u trávovitých plevelů. Rostliny ve fázi 1-2 listů odebrané na pozemku jsou přesazovány do Petriho misek na agarové médium, ve kterém je rozpuštěn herbicid ve zvolené koncentraci. Petriho misky jsou následně umístěny do růstových komor, fytotronů či skleníku s definovaným světelným režimem, teplotou a světelnou intenzitou a po 7-10 dnech po přesazení rostlin je hodnocena účinnost herbicidu. Sledován je rozvoj nových kořenů a listů a barevné změny na rostlinách. Výhodou metody je stanovení rezistence či citlivosti dané populace v průběhu sezóny a možnost výběru herbicidu podle výsledku testu ještě v daném vegetačním období.



Obr. 9: Testování psárky polní na rezistenci k ALS inhibitorům pomocí RISQ metody

1.5.3. Enzymatické studie

Enzymatické studie se používají ke stanovení aktivity cílového enzymu herbicidního účinku v přítomnosti herbicidu, která se nepřímo stanovuje na základě množství reakčního produktu nebo koncentrace substrátu.

Metoda pro stanovení aktivity enzymu acetolaktát syntázy (ALS)

Pomocí této metody lze určit typ rezistence různých druhů rostlin vůči herbicidům ze skupiny ALS-inhibitorů, zejména sulfonylmočovin a imidazolinonů. V současné době je využívána zejména ke stanovení, zda se jedná o rezistenci mimo místo účinku (metabolickou)

či rezistenci v místě účinku (target-site). Aktivita enzymu je zjišťována spektrofotometricky jako množství produktu – acetolaktátu, získaného z extraktu nadzemní části rostliny po dekarboxylaci v přítomnosti kyseliny za vzniku acetoinu. Specifická aktivita je poté vypočtena ze standardní křivky a vyjádřena jako množství vyprodukovaného acetoinu za jednotku času. Přidáním herbicidu inhibujícího ALS k rostlinnému extraktu je u citlivých rostlin zabráněno vzniku acetoinu. Vyšší obsah acetoinu indikuje přítomnost rezistence k těmto herbicidům (Singh et al., 1988). Pokud je ALS vykazuje *in-vitro* aktivitu i v přítomnosti herbicidu, je předpoklad nesenzitivity enzymu např. v důsledku mutace.

Metoda pro stanovení aktivity enzymu acetylkoenzym-A karboxylázy (ACCázy)

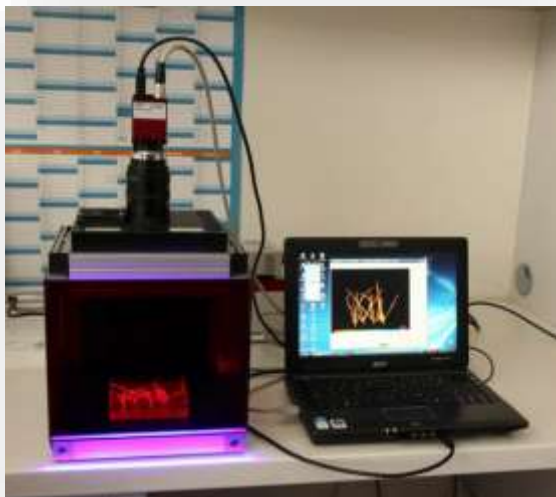
Pomocí této metody lze studovat mechanismy rezistence vůči herbicidům ze skupiny inhibitorů enzymu acetylkoenzym-A karboxylázy. Aktivita enzymu ACCázy je pomocí této metody kvantifikována měřením rychlosti inkorporace acetylkoenzymu A z H_2CO_3 do stabilního C_{14} produktu.

Studium aktivity enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS)

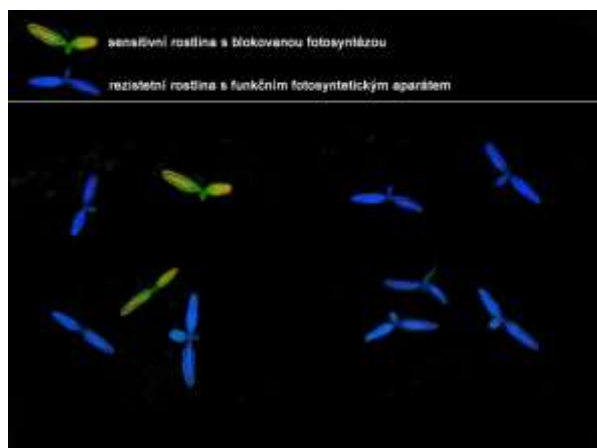
Tato metoda se používá k testování rezistence ke glyfosátu. Inhibice enzymu EPSPS glyfosátem vede ke zvýšení koncentrace reakčního meziprojektu – kyseliny šikimové. Vlastní metoda je založena na spektrofotometrickém měření aktivity fosfatázy, která katalyzuje odtržení p-nitrofenolu od p-nitrofenylfosfátu. Intenzita zabarvení vzorku p-nitrofenolem úměrná katalytické aktivitě fosfatázy se měří spektrofotometrem.

1.5.4. Diagnostika rezistentních populací plevelů pomocí měření fluorescence chlorofylu

Fluorescenční metoda je využívána pro detekci rezistence především vůči PS II inhibitorům u rostlin během vegetace (Obr. 10). Spočívá v rozdílném průběhu fluorescence chlorofylu po ošetření herbicidy u rostlin citlivých a rezistentních. Zvýšení úrovně fluorescence odpovídá změnám ve fotosystému II, které jsou důsledkem narušení funkce herbicidu. Obecně platí, že se snižující se fotosyntézou narůstá podíl fluorescenčního záření a naopak (Maxwell, Johnson, 2000). Jestliže je rostlina obsahující chlorofyl adaptována ve tmě a pak náhle osvětlena, projeví se zde různá úroveň fluorescenční aktivity, která je úměrná přeměně energie ve fotosyntéze (Obr. 11). Průběh fluorescenční křivky a hodnoty z ní odvozené mohou být využity jako spolehlivý test pro změny fotosyntetické aktivity v závislosti na citlivosti rostliny (PS II) k herbicidu (Kočová, 1998). Této skutečnosti se využívá k měření účinnosti a fytotoxicity herbicidů (Smutný et al., 2011). Metoda měření fluorescence chlorofylu také umožňuje sledování vlivu aplikační techniky, adjuvantů a podmínek při aplikaci, rychlost příjmu, působení herbicidů v rostlině, ale i diagnostiku rezistentních populací plevelů (Klem, 2006).



Obr. 10: Měření fluorescence chlorofylu u chundelky metlice rostoucí na agarovém médiu s obsahem chlortoluronu



Obr. 11: Odlišení rezistentních (modré) a citlivých (zelené) rostlin laskavce ohnutého v populaci metodou měření fluorescence chlorofylu 1 den po aplikaci terbuthylzinu

1.5.5. Molekulárně-genetické metody

V současnosti existuje řada molekulárně-genetických metod, které je možno použít pro detekci mutací způsobujících rezistenci plevelů vůči herbicidům. Spočívají v přímém prokázání příslušné sekvence DNA kódující změnu pořadí aminokyselin, a tím i struktury či vazebného místa inhibovaného enzymu. Mezi molekulárně-genetické metody patří sekvenování, restriční analýza (RFLP), polymerázová řetězová reakce (PCR) s alelově specifickými primery (PASA), ligázová řetězová reakce (LCR) a délkový polymorfismus restričně štěpené amplifikované DNA (CAPS), pyrosequencing a další. Výhodou molekulárních metod ve srovnání s biologickým testem je vedle jejich rychlosti i to, že jejich výsledek není ovlivňován podmínkami vnějšího prostředí.

Izolace nukleových kyselin, polymerázová řetězová reakce (PCR)

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě. Pro izolaci se používá celá řada různých protokolů a v poslední době se často používají komerčně vyráběné speciální soupravy

– kity, např. DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Podstatou polymerázové řetězové reakce (PCR) je enzymatické zmnožení určitého úseku nebo více úseků DNA. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA vzorku se při hybridizují krátké syntetické oligonukleotidy (primery), od nichž probíhá syntéza nové DNA zprostředkovaná dependentní DNA polymerázou. Specifické primery pro PCR lze navrhnout na základě známých sekvencí genů u geneticky příbuzných rostlin pomocí programu Primer 3 (Rozen, Skaletsky, 2000). Tyto sekvence nukleotidů lze získat z veřejné databáze GenBank. Produkty amplifikace PCR jsou obarveny ethidiumbromidem a elektroforeticky separovány v agarózovém gelu. Výsledek frakcionace je pozorován po přenesení gelu na UV transiluminátor při vlnové délce 310 nm. Vzorky, které jsou určeny pro sekvenaci je nutné přecistit, opět pomocí komerční soupravy, např. QIAGEN nebo Genomed JETQUICK.

Sekvenování DNA

Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí bazí v molekulách DNA. Sekvenací daného úseku DNA můžeme odhalit polymorfní místo genu přímo zodpovědné za daný fenotypový projev. Porovnáváním polymorfních úseků rezistentní a senzitivní rostliny můžeme nalézt mutace spojené se vznikem rezistence. V herbologii se tato metoda využívá k hledání mutací, které představují takovou změnu cílového místa – enzymu, že herbicid nemůže být na tomto místě poután. Rezistence k ALS inhibitorům může být podmíněna celou řadou bodových mutací. U mnoha druhů plevelů již bylo pouze u enzymu ALS dosud objeveno a popsáno již 29 substitucí aminokyselin v osmi pozicích, které způsobují rezistenci. Na základě popsaného pořadí aminokyselin u *Arabidopsis thaliana* byly tyto pozice očíslovány jako Ala₁₂₂, Pro₁₉₇, Ala₂₀₅, Trp₅₇₄, Asp₃₇₆, Arg₃₇₇, Trp₅₇₄, a Ser₆₅₃ (Heap, 2020). Příklady plevelných druhů s různými mutacemi jsou uvedeny v Tab. 4. Velmi častou příčinou rezistence k PSII inhibitorům je bodová mutace psbA genu, který kóduje D1 protein ve fotosystému II. Při této mutaci dochází v D1 proteinu nejčastěji v pozici 264 k nahrazení aminokyseliny serinu glycinem, což znemožní vazbu molekuly herbicidu s D1 proteinem a transport elektronů může probíhat i za jeho přítomnosti. Poměrně časté jsou i další mutace v pozicích 219, 266, 251, 255 a 274 téhož genu (Park, Mallory-Smith, 2006). Také ve většině případů rezistence plevelů k inhibitorům ACCázy je příčinou pozměněné místo účinku herbicidu – mutace genu, který kóduje ACCázu. Záměny Ile-1781-Leu a Asp-2078-Gly udělují rezistenci k cyklohexandionům a aryloxyfenoxypropionátům (APPs), substituce Trp-2027-Cys a Ile-2041-Asn jsou příčinou rezistence pouze k APPs, a záměny Trp-1999-Cys způsobují rezistenci k fenoxaprofu.

Tab. 4: Příklady mutací zodpovědných za herbicidní rezistenci u různých plevelných druhů

Skupina	Aminokyselina/ pozice	Záměna aminokyseliny	Příklad druhu	Země výskytu	Rok popsání
ALS inhibitory	alanin 122	threonin	<i>Amaranthus retroflexus</i>	USA	2005
ALS inhibitory	prolin 197	threonin	<i>Apera spica- venti</i>	ČR	2009
ALS inhibitory	alanin 205	valin	<i>Conyza canadensis</i>	Izrael	2015
ALS inhibitory	kys. aspargová 376	glutamin	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Čína	2016
ALS inhibitory	arginin 377	histidin	<i>Apera spica- venti</i>	Německo	2011
ALS inhibitory	trpyptofan 574	leucin	<i>Papaver rhoeas</i>	Francie	2011
ALS inhibitory	serin 653	threonin	<i>Avena fatua</i>	Kanada	2012
ALS inhibitory	glycin 654	kys. aspargová	<i>Setaria viridis</i>	USA	2009
EPSPS inhibitory	threonin 102	ileucin	<i>Amaranthus hybridus</i>	J. Amerika	2019
EPSPS inhibitory	alanin 103	valin	<i>Amaranthus hybridus</i>	J. Amerika	2019
EPSPS inhibitory	prolin 106	serin	<i>Conyza canadensis</i>	USA	2017

Pozice aminokyselin standardizována podle sekvence *Arabidopsis thaliana*

Zpracováno za využití dat od J. Heap (weedsience.org)

1.6. Využití monitoringu při hodnocení rizika a v antirezistentních strategiích

Monitoring a poznatky získané z výzkumu herbicidní rezistence poskytují důležité doplňkové informace při registraci přípravků na ochranu rostlin, při managementu herbicidní rezistence a zavádění antirezistentních strategií v praxi. Uplatňování antirezistentních strategií umožňuje zpomalit vývoj rezistence omezením selekčního tlaku a prodloužit tak životnost přípravku, tj. zachovat jeho účinnost po delší období.

Hodnocení rizika herbicidní rezistence podle standardu EPPO PP1/213 (EPPO, 2015), které je součástí registračního řízení nového herbicidu, vyžaduje informace o výskytu rezistence v regionu, základní (baseline) citlivosti rizikových populací k dané účinné látce v době před zavedením přípravku a její vývoj v čase, včetně případného vzniku rezistence, protože postupem času většina přípravků účinnost ztrácí (Ulber et al., 2013).

Kvantitativní přístup k hodnocení rizika vzniku rezistence a způsobů jejího managementu publikovali Moss et al. (2019). Riziko vzniku rezistence je dáno vlastnostmi herbicidu, cílového plevelu, ale také celkovým způsobem hospodaření, který zahrnuje i způsob používání herbicidů. Výše rizika vzniku rezistence u konkrétního herbicidu je založena především jeho mechanismem účinku. Herbicidy působící v místech účinku s vysokým stupněm polymorfismu cílového enzymu, jako jsou například ALS, ACCase a PSII inhibitory, mají přirozeně vyšší míru rizika, než herbicidy působící v konzervativnějších místech účinku, takže v databázích a ve vědecké literatuře u nich najdeme více případů rezistence. Vyšší stupeň rizika mají dále účinné látky, které snadněji podléhají metabolismu v rostlině, jako například sulfonylmočoviny a aryloxyfenoxypromionáty. Dalším významným prvkem ovlivňujícím výši rizika jsou biologické vlastnosti plevelu (skupiny plevelů), proti kterým je daný herbicid používán. Riziko zvyšují druhy cizosprašné, s vysokou konkurenční a reprodukční schopností, schopné rychlého navyšování populační hustoty, s vyšší perzistencí semen v půdní zásobě a širokou ekologickou valencí. Interakce mezi herbicidem a příslušným plevelným druhem zakládá specifické inherentní riziko vzniku rezistence. Monitoring rezistence přináší lokálně specifickou informaci o tom, které skupiny herbicidů vykazují v daných podmínkách nejvyšší frekvenci případů rezistence a také, které druhy patří v oblasti mezi nejvíce rizikové z pohledu vzniku rezistence i ekonomických dopadů a je důležitou informací pro posuzovatele při hodnocení nového herbicidního přípravku. Pokud je výše inherentního rizika příliš vysoká a z toho by vyplývalo i vysoké agronomické riziko při neomezeném používání přípravku, je třeba navrhnout vhodné modifikátory rizika. Částečného snížení rizika vzniku rezistence lze dosáhnout používáním směsných přípravků a tank-mixů s komponenty s různými mechanismy účinku, omezením počtu aplikací přípravků se stejným mechanismem účinku v sezóně či po sobě následujících letech a správným termínem aplikace. Tato doporučení jsou jako nejběžnější modifikátory rizika uváděna na etiketách přípravků, bohužel často paušálně u každého přípravku stejně, bez skutečného vyhodnocení rizik. Výrazné omezení rizika a prodloužení životnosti přípravku lze dosáhnout jeho používáním podle zásad integrované ochrany, v kombinaci s preventivními opatřeními a nechemickými metodami ochrany. Za nejúčinnější modifikátory agronomického rizika je považováno vhodné střídání plodin, které brání shiftu problematických druhů ve společenstvech a brzdí rozvoj rezistence v populaci a rovněž hlubší zpracování půdy, které přispívá k přirozenému úbytku semen v půdní zásobě včetně vyselektovaných rezistentních jedinců, důsledná regulace plevelů v mezíporostním období mechanickými zásahy i používáním neselektivních herbicidů a mnoho dalších agronomických zásahů specifických podle specifických místních podmínek a způsobu

hospodaření. Paradoxně by měly být preventivní metody – modifikátory rizika využívány více a cíleněji, pokud jsou používány modernější, účinnější, ale z pohledu vzniku rezistence rizikovější herbicidní skupiny, jako jsou inhibitory ALS nebo ACCázy.

V praxi antirezistentní strategie představují doporučení a návody pro pěstitele plodin, jak předcházet rezistenci, případně jak zvýšit účinnost ochranných opatření u plevelů, u kterých se rezistence již vyskytuje. Zemědělci mohou nyní získat základní přehled o výskytu rezistence na Rostlinolékařském portálu ÚKZÚZ. Pokud mají podezření na rezistenci na svých pozemcích, nechávají si vzorek testovat na našem pracovišti prostřednictvím svých obchodních partnerů, nebo se obracejí přímo. Zpravidla je zadavateli testována větší kolekce vzorků a po ukončení experimentu je poskytnuta podrobná zpráva včetně fotodokumentace. V závěrech je informace o účinnosti testovaných účinných látkách a o tom, ke kterým je příslušný vzorek rezistentní. Zároveň jsou doporučeny vhodné přípravky, na které populace rezistentní prozatím není.

Na základě výsledků z monitoringu a testování populací chundelky metlice je možné přijmout v zasažených oblastech tato opatření: V lokalitách, kde byla prokázána rezistence pouze k inhibitorům ALS, je u chundelky metlice dosahováno stále dobré účinnosti v případě použití chlortoluronu ze skupiny inhibitorů PSII a herbicidů na bázi inhibitorů ACCázy (pinoxaden, fenoxaprop). U převážné většiny testovaných vzorků tyto přípravky dosahují spolehlivé účinnosti (vyšší než 82 %). Výhodou posledních dvou jmenovaných je, že vykazují dobrou účinnost až do počátku sloupkování chundelky a působí také na oves hluchý. V případě výskytu vícenásobné rezistence k ALS inhibitorům, inhibitorům ACCázy a PSII inhibitorům je možným řešením použití přípravků s obsahem flufenacetu ze skupiny inhibitorů syntézy mastných kyselin se dlouhým řetězcem (VLCFA), prosulfocarbu ze skupiny inhibitorů syntézy lipidů, pendimethalinu ze skupiny inhibitorů mitotického dělení buněk, či flumioxazinu ze skupiny inhibitorů biosyntézy rostlinných pigmentů. Všechny přípravky s obsahem těchto látek vykazovaly v našich nádobových pokusech vysokou účinnost (82-100 %) a všechny testované populace k nim byly citlivé. Všechny tyto herbicidy jsou určeny pro aplikaci v raných růstových fázích chundelky (BBCH10-12) na podzim. Uvedené herbicidy, ač bývají nákladnější a někdy plně neochrání porost před zapelevelením po celou vegetaci, mají rozdílné a méně rizikové mechanismy účinku a měly by být v systému ochrany pravidelně používány, aby byla „šetřena“ účinnost postemergentních herbicidů používaných na jaře, které jsou pouze na bázi ALS a ACCase inhibitorů, s vysokým rizikem vzniku rezistence.

U populací psárky polní rezistentních k inhibitorům ALS, ACCázy a PSII dosahovaly poměrně vysoké účinnosti (85%) přípravky na bázi prosulfocarbu (inhibitor VLCFA) a diflufenicanu (inhibitor enzymu fytoendesaturázy - PDS) a je možné tyto účinné látky v zasažených oblastech k regulaci psárky doporučit. Herbicidy s obsahem prosulfocarbu nebo flufenacetu jsou z hlediska antirezistentní strategie v západní Evropě doporučovány do aplikačních sledů s postemergentními herbicidy jako je mesosulfuron, fenoxaprop, nebo pinoxaden. Pozitivně se v případě regulace psárky uplatňuje také podmínka a její ošetření herbicidem s obsahem glyfosátu před založením následné ozimé obilniny.

Výskyt rezistentních populací sveřepu jalového k ALS inhibitorům může v budoucnu způsobit velké problémy s jeho regulací, neboť jiné, než tyto selektivní herbicidy proti němu nejsou registrovány. Jednou z účinných možností i v rezistentních populacích je aplikace glyfosátu v meziorostním období několik týdnů po provedení podmínky na vzešlé rostliny

sveřepu. U rezistentních populací k pyroxsulamu a propoxycarbazonu dosahovala účinnost v našich pokusech u glyfosátu 82-100 %. V oblastech, kde nelze glyfosát aplikovat, nebo při nižší úrovni výskytu sveřepu, je vhodná opakovaná podmínka, nebo opakovaná předsetová příprava půdy s odstupem 2-3 týdnů, která zničí v první vlně klíčící a vzcházející rostliny sveřepu. Důležitý je i optimální termín výsevu ozimých obilnin – rané výsevy v září bývají sveřepem podstatně více zaplevelené a chemická ochrana tudíž obtížnější.

V případě výskytu rezistentního máku vlčího a heřmánkovce přímořského k inhibitorům ALS lze v rámci antirezistentních strategií doporučit v zasažených lokalitách přípravky s obsahem syntetických auxinů (2,4-D a dicamba). Ani u jedné z testovaných populací těchto dvou druhů nebyla k přípravkům s tímto mechanismem účinku objevena rezistence a účinnost se pohybovala mezi 90-100%, avšak některé populace máku vlčího ve Francii jsou již rezistentní i k 2,4 D. Na většinu populací máku vlčího stále dobře působí i florasulam, i když patří též mezi ALS inhibitory, ale lze počítat s postupnou ztrátou jeho účinnosti, jako je tomu již u některých populací heřmánkovce přímořského.

Antirezistentní strategie nelze doporučit paušálně, ale jejich návrh se musí řídit lokálními podmínkami, které zahrnují podmínky přírodní a způsob hospodaření, na nichž závisí výskyt plevelů, pěstované plodiny a použitelné způsoby jejich regulace. Výše uvedená doporučení jsou pouze obecná a vycházejí z nejčastěji řešených případů.

2. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Metodika vznikla v souvislosti s řešením grantového projektu NAZV QK 1820081 v letech 2018 - 2020, který na rozdíl od předchozích, jejichž výstupy byly určeny především pro zemědělskou praxi, byl řešen pro potřeby státní správy. Výsledky měly především poskytnout přehlednou informaci o rozšíření herbicidní rezistence v ČR a poskytnout datové podklady pro tvorbu specializovaných map. Kromě toho byl projekt zaměřen na optimalizaci screeningu herbicidní rezistence a metod používaných k její detekci.

V rámci projektu byly na území ČR identifikovány a publikovány nové případy rezistence u trávovitých plevelů, z nichž mezi hospodářsky nejzávažnější je možno považovat vícenásobnou rezistenci chundelky metlice vůči herbicidům tří různých mechanismů účinku a rezistenci sveřepu jalového se světově unikátním mechanismem rezistence vůči ALS inhibitorům. Překvapivě bylo nalezeno mnoho populací merlíku bílého, laskavce ohnutého a lilku černého rezistentních k PSII inhibitorům, které se již nepoužívají v takové míře jako dříve. Jako hrozbu do budoucna je nutno považovat nově identifikované případy rezistence vůči ALS inhibitorům u dvouděložných plevelů škodících v ozimých plodinách – heřmánkovce nevonného a máku vlčího. Nově identifikované případy rezistence již byly a průběžně budou publikovány v prestižních mezinárodních časopisech viz kap. 6.

V rámci výzkumu byly zdokonaleny a v metodice jsou prezentovány růstové eseje pro detekci rezistence a optimalizovány molekulární metody pro stanovení jejich mechanismů. Zcela nově a poprvé v ČR byly použity a optimalizovány metody měření fluorescence chlorofylu u trávovitých plevelů a kvantitativní real-time PCR a průtoková cytometrie pro určení mechanismu rezistence vůči ALS inhibitorům.

V metodice jsou shrnuty jak dosavadní znalosti a postupy, tak nově získané v rámci projektu a zároveň je naznačen význam monitoringu a mapování rezistence z pohledu uplatňování antirezistentní strategie.

3. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena především pro pracovníky státních institucí, ÚKZÚZ, SZIF, ale i odborných útvarů Ministerstva zemědělství, v jejichž gesci je problematika monitoringu škodlivých organismů včetně jejich rezistence k pesticidům, posuzování přípravků na ochranu rostlin v registračním řízení, pracovníkům provádějícím kontrolu jejich používání a v neposlední řadě i odborníkům podílejícím se na tvorbě Národního akčního plánu pro udržitelné používání pesticidů a průběžné evaluaci jeho plnění. Vedle toho mohou metodiku využívat i výrobci a distributoři přípravků na ochranu rostlin při monitorování spolehlivosti nabízených produktů, případného výskytu rezistence plevelů vůči nim a odběru vzorků k testování. V neposlední řadě najde metodika uplatnění i v zemědělské praxi, mezi zemědělskými poradci, ve výzkumných ústavech a ve vzdělávacích institucích při výuce specializovaných předmětů na středních školách zemědělského zaměření a univerzitách.

4. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Vzhledem k hlavnímu uplatnění metodiky pro potřeby státní správy při monitoringu rezistence, registraci přípravků na ochranu rostlin a formulaci pravidel pro udržitelné používání herbicidů v rámci integrované ochrany, je obtížné hodnotově vyčíslit přímé ekonomické přínosy. Předpokládáme, že se metodika stane jednou z opor při rozhodování a dojde i k dalšímu rozvoji spolupráce mezi státní správou a akademickými pracovišti, včetně dalšího vývoje geografického informačního systému na Rostlinolékařském portálu. Produkty této spolupráce jsou pak k dispozici zemědělské praxi i dalším komerčním subjektům a poradenské službě.

Fenomén herbicidní rezistence způsobuje zemědělcům používajícím chemickou ochranu ekonomickou újmu, ať již přímo (snížením výnosu v důsledku selhání ochrany nebo nutností používání nákladnějších alternativních herbicidů či nechemických metod ochrany), či nepřímo, z důvodu používání preventivních metod a modifikátorů rizika v systému integrované ochrany, díky vyžadují vynaložení nákladů. Ztráty (nebo vícenáklady) na úrovni podniku se liší podle typu a plevele, mechanismu a intenzity rezistence a také plodiny, ve které se rezistentní plevel vyskytuje a škodí. V obilninách, ve kterých se v ČR vyskytuje nejvíce rezistentních populací plevelů, vznikají při nejběžnějším výskytu rezistence chundelky metlice vůči ALS inhibitorům vícenáklady ve výši 300-800 Kč/ha na použití téměř vždy nákladnějších alternativních herbicidů s jiným mechanismem účinku. Předpokládáme-li, že „ALS rezistencí“ chundelky metlice je v menší či větší míře zasaženo 5 % ploch ozimých obilnin, tj. cca 50 tis. ha, lze celorepublikové podnikové ztráty v důsledku rezistence odhadnout na min. 25 mil. Kč. Pokud metodika tím, že přispěje k lepší informovanosti zemědělců, výrobců a distributorů přípravků na ochranu rostlin o problému rezistence, jejím rozsahu v podmínkách ČR, zásadách monitoringu a antirezistentních strategiích včetně volby vhodných herbicidů a dojde ke zlepšení stavu alespoň o 10 %, vzniká jen u tohoto plevele celorepublikový přínos metodiky v řádech milionů korun. Vhodnou indikací produktů pro herbicidní ochranu dojde i k prodloužení jejich životnosti na trhu a tržeb z jejich prodeje.

5. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Bartholomew, D. M., Van Dyk, D. E., Lau, C., O'Keefe, D., Rea, P. A., Viitanen, P. V., 2002. Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiology*, 103, 1562-1572.

Broster, J. C., Pratley, J. E., Ip, R. H. L., Ang, L., Seng, K. P., 2019. A quarter of a century of monitoring herbicide resistance in *Lolium rigidum* in Australia. *Crop and Pasture Science* 70, 283-293. <https://doi.org/10.1071/CP18584>

Burgos, N. R., Tranel, P. J., Streibig, J. C., Davis, V. M., Shaner, D., Norsworthy, J. K., Ritz, C., 2013. Review: Confirmation of resistance to herbicides and evaluation of herbicide levels. *Weed Science*, 61:4-20.

Cobb, A. H., Kirkwood, R. C. 2000. Challenges for herbicide development. In: Cobb, A.H., Kirkwood, R.C.: *Herbicides and their Mechanism of action*. In: Sheffield Academic Press, Sheffield.

Davies, L. R., Neve, P., 2017. Interpopulation variability and adaptive potential for reduced glyphosate sensitivity in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research* 57, 323-332.

De Marez, T., Mechant, E., Hermann, O., Olsson, R., Bulcke, R., 2008. Monitoring for resistance to metamilon in *Chenopodium album*, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 85-89.

Devine, M. D., Shukla, A. 2000. Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection*, 19, 881-889.

EPPO. 2015. PP 1/213 (4) Resistance risk analysis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 45 (3), 371–387

Escorial, C., Loureiro, I., Rodríguez-García, E., & Chueca, C., 2011. Population Variability in the Response of Ripgut Brome (*Bromus diandrus*) to Sulfosulfuron and Glyphosate Herbicides. *Weed Science*, 59(1), 107-112. doi:10.1614/WS-D-10-00033.1

Genová banka vuvr https://www.vuvr.cz/index.php?p=genova_banka&site=vyzkum

Gressel, J. 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science* 67(3), 253-257.

Hamouz, P., Hamouzová, K., Tyšer, L., Holec, J. 2014. Effect of site-specific weed management in winter crops on yield and weed populations. *Plant Soil Environment*, 60 (1), 27-35.

Hamouzová, K., Soukup, J., Jursík, M., Hamouz, P., Venclová, V., Tůmová, P., 2011. Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Weed Research* 51, 113–122.

Heap, I. 2020. The international survey of herbicide resistant weeds. *Weed Science Society of America*. Available at: <http://weedsociety.org/>, Accessed: 25 July, 2020.

Heap, I., LeBaron, H. 2001. Introduction and Overview of Resistance, In: Powles, S. B., Shaner, D. L.: *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC, Press LLC.

- Kaundun, S. S. et al. 2010. A novel in-season method for detecting resistance to post-emergence ACC and ALS herbicides in grass weeds. In: 15th EWRS Symposium, July, Kaposvar, Hungary, p. 12.
- Klem, K. 2006. Využití fluorescence chlorofylu v rostlinolékařství, Rostlinolékař 1. 23-25.
- Kočová, M. et al., 1988. Využití metody Hillovy reakce pro rozlišování biotypů plevelů rezistentních a citlivých vůči atrazinu. Agrochémia, 28, 87-90.
- Košnarová, P., Hamouz, P., Šuk, J., Soukup, J. 2019. Herbicidní rezistence u merlíku bílého a laskavce ohnutého v ČR. Úroda, roč. 67, č. 4, s. 77-80. ISSN: 0139-6013.
- Košnarová, P., Hamouzová, K., Hamouz, P., Soukup, J. 2018. Současný stav herbicidní rezistence u trávovitých plevelů v ČR. Úroda, roč. 66, č. 4, s. 73-78.
- Linn A., Košnarová, P., Soukup, J., Gerhards, R., 2018. Detecting herbicide-resistant *Apera spica-venti* with a chlorophyll fluorescence agar test. Plant Soil Environ., 64: 386-392.
- Mallory-Smith, C., Namuth, D., 2020. Herbicide Resistance: Mechanisms, Inheritance, and Molecular Genetics [cit. 2020-09-23], dostupné z <https://digitalcommons.unl.edu/passel/65/>
- Maxwell, K., Johnson, G., N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. J Exp Bot 51:659–668.
- Menchari Y., Camilleri, C., Michel, S., Brunel, D., Dessaint, F., Le Corre, V., Delye, C., 2006. Weed response to herbicides: regional-scale distribution of herbicide resistance alleles in the grass weed *Alopecurus myosuroides*. New Phytologist, 171 (4).
- Mikulka, J. 1987. Development of resistant weed biotypes following long-term application of herbicides. Internationale Zeitschrift der Landwirtschaft, 59 - 62.
- Moss, S. R. 2007. Managing herbicide-resistant black-grass (*Alopecurus myosuroides*): theory and practice. Weed Technology, 21, 300-309.
- Moss, S., Ulber, L., den Hoed, I. 2019. A herbicide resistance risk matrix. Crop Protection, 115, 13-19.
- Neve, P.; Powles, S. 2005. High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. Heredity, 95, 485–492.
- Nielsen, O. K., C. Ritz, J. C. Streibig, 2004. Nonlinear mixed-model regression to analyze herbicide dose-response relationships. Weed Technology, 18, str. 30-37.
- Owen, L., Steckel, L., Koger, C., Main, C., & Mueller, T., 2009. Evaluation of Spring and Fall Burndown Application Timings on Control of Glyphosate-Resistant Horseweed (*Coryza canadensis*) in No-Till Cotton. Weed Technology, 23(3), 335-339. doi:10.1614/WT-08-170.1
- Park, K.W., Mallory-Smith, C.A., 2006. psbA mutation (Asn266 to Thr) in *Senecio vulgaris* L. confers resistance to several PS II-inhibiting herbicides. Pest Manag Sci 62: 880– 885 .

- Petersen, J., Rosenhauer, M., 2014. Current status of herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides* in Europe. Paper presented at the Herbicide Resistance in Europe: Challenges, Opportunities and Threats Conference, May 19-20, Frankfurt, Germany
- Preston, CH., Mallory-Smith, C. A., 2001. Biochemical mechanisms, inheritance and molecular genetics of herbicide resistance in weeds. Pages 24–49 in Powles, S. B. and Shaner, D. L. eds. Herbicide Resistance and World Grains. Boca Raton, FL: CRC.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J.: 365-386.
- Salava, J., Chodová, D. 2006. The mechanism of resistance to herbicides in Czech biotype of weeds. In: Proceedings XVII. Czech and Slovak Conference on Plant Protection. Czech University of Agriculture in Prague, 581-586.
- Schultz, J., Chatham, L. A., Riggins, C. W., Tranel, P. J., Bradley, K. W., 2015. Distribution of herbicide resistances and molecular mechanisms conferring resistance in Missouri Waterhemp (*Amaranthus rudis* Sauer) Populations. Weed Science, 63:336-345.
- Sen, M. K., Hamouzová, K., Mikulka, J., Bharati, R., Košnarová, P., Hamouz, P., Roy, A., Soukup, J. 2020. Enhanced metabolism and target gene over-expression confer resistance against acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Bromus sterilis*. Pest Management Science, <https://doi.org/10.1002/ps.6241>.
- Singh, B. K., M. A. Stidham, D. J. Shaner, 1988. Assay of acetohydroxyacid synthase. Analytical Biochemistry, 171, 173-179.
- Smutný et al. 2011. Stanovení optimálních dávek herbicidů s využitím přístrojů založených na měření fluorescenci chlorofylu. Metodika pro praxi, Mendelova univerzita v Brně, ISBN 978-80-7375-551-5
- Tharayil-Santhakumar, N. 2003. Mechanism of herbicide resistance in weeds. WeedScience.org, pp. 2., [cit. 2020-10-11], dostupné z <http://www.weedscience.org/in.asp>
- Ulber, L., Nordmeyer, H., Zwerger, P. 2013. Resistance risk assessment within herbicide authorisation—a call for sensitivity data. Pest management science 69(2), 160-164.
- Vila-Aiub, M. M.; Ghersa, C. M. 2005. Building up resistance by recurrently exposing target plants to sublethal doses of herbicide. European Journal of Agronomy, 22, 195–207.
- Yuan, J. S., Tranel, P. J., Stewart, C. N. 2006. Non-target-site herbicide resistance: a family business. Trends in Plant Science, Vol.12 No. 6-13.
- Yun, M. S., Yogo, Y., Miura R., Yamasue, Y., Fischer A., 2005 Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and –susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*), Pesticide Biochemistry Physiology, 83, 107-114.

6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Publikace v časopisech s IF:

Hamouzová, K., Soukup, J., Jursík, M., Hamouz, P., Venclová, V., Košnarová, P. 2011. Cross-resistance to three frequently used sulfonylurea herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Weed Research*, 51: 113-122.

Hamouzová, K., Košnarová, P., Salava, J., Soukup, J., Hamouz, P. 2014. Mechanisms of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in populations of *Apera spica-venti* from the Czech Republic. *Pest Management Science*. 70: 541-548.

Linn A., Košnarová, P., Soukup, J., Gerhards, R., 2018. Detecting herbicide-resistant *Apera spica-venti* with a chlorophyll fluorescence agar test. *Plant Soil Environ.*, 64: 386-392.

Sen, M. K., Hamouzová, K., Mikulka, J., Bharati, R., Košnarová, P., Hamouz, P., Roy, A., Soukup, J. 2020. Enhanced metabolism and target gene over-expression confer resistance against acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Bromus sterilis*. *Pest Management Science*, <https://doi.org/10.1002/ps.6241>.

Ostatní recenzované publikace

Košnarová, P., Hamouz, P., Šuk, J., Soukup, J. 2019. Herbicidní rezistence u merlíku bílého a laskavce ohnutého v ČR. *Úroda*, roč. 67, č. 4, s. 77-80. ISSN: 0139-6013.

Košnarová, P., Hamouzová, K., Soukup, J. 2014. Vývoj herbicidní rezistence u chundelky metlice v ČR. *Úroda*, 2014, roč. 62, č. 12, s. 10-14.

Ostatní publikace v časopisech:

Hamouzová, K., Košnarová, P., Soukup, J. 2016. Vznik herbicidní rezistence v ČR a vývoj v posledních letech, *Agromanuál*, roč. 11, č. 2, s. 30-32.

Košnarová, P., Hamouzová, K., Hamouz, P., Soukup, J. 2018. Současný stav herbicidní rezistence u travovitých plevelů v ČR. *Úroda*, roč. 66, č. 4, s. 73-78.

Košnarová, P., Hamouzová, K., Soukup, J. 2017. Rezistence plevelů vůči herbicidům – aktuální situace v ČR. *Agromanuál*, roč. 12, č. 8, s. 18-21.

Košnarová, P., Jursík, M., Valičková, V., Soukup, J. 2018. Biologie a možnosti regulace sveřepu jalového. 2018, *Agromanuál*, roč. 13, č. 2, s. 20-22.

Košnarová, P., Soukup, J., Hamouz, P., Mikulka, J., Šuk, J. 2019. Herbicidní rezistence v Evropě i v ČR nabývá na významu. *Agromanuál*, roč. 14, č. 8, s. 18-20.

Příspěvky v konferenčních sbornících:

Hamouzová, K., Košnarová, P., Soukup, J., Hamouz, P., Šuk, J. 2019. First Czech case of herbicide resistance to tribenuron and florasulam in *Stellaria media*. In: Resistance 2019, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK 16-18 September 2019, s. 75

Košnarová, P., Hamouz, P., Šuk, J. Soukup, J., 2019. Prevalence and mechanisms of resistance to PSII inhibitors in *Chenopodium album* in the Czech Republic. In: Resistance 2019, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK 16-18 September 2019, s. 73

Košnarová, P., Hamouzová, K., Žďárková, V., Soukup, J. 2016, Investigating the extent of herbicide resistance in problematic grass weeds in the Czech Republic, In: Proceedings 7th International Weed Science Congress, Prague 19.-25.6.2016, s. 321

Košnarová, P., Hamouzová, K., Linn, A., Hamouz, P., Soukup, J. 2018. *Apera spica-venti* biotype from the Czech Republic resistant to three herbicide modes of action. In: Book of abstracts 18th European Weed Research Society Symposium, Ljubljana 17.-21.6.2018