

# Bakalářská práce

Lucie Křížová

2017

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra speciální produkce rostlinné

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie-Živočišné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

## Bakalářská práce

Studium genetického polymorfismu populací blýskáčka  
řepkového, *Meligethes aeneus*, v populacích s různou úrovní  
rezistence k insekticidům

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Lucie Křížová

České Budějovice, 2017



**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie KRÍŽOVÁ**  
Osobní číslo: **Z14498**  
Studijní program: **B4131 Zemědělství**  
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - Živočišné**  
Název tématu: **Studium genetického polymorfismu populací blýskáčka  
řepkového, *Meligethes aeneus* v populacích s různou úrovní  
rezistence k insekticidům**  
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod: cílem práce je vyhodnocení genetického polymorfismu v populacích blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*; Fabricius, 1775), které vykazují různou úroveň rezistence k insekticidům. Cíle práce: definice hypotéz a cílů práce.

Literární přehled: taxonomické zařazení a popis *M. aeneus*, vývoj výskytu populací blýskáčka rezistentních k pyrethroidům, příčiny vzniku rezistence, přehled molekulárních markerů používaných ke studiu diverzity bezobratlých.

Materiál a metody: popis a charakteristika studovaných populací *M. aeneus*, metodika odběru vzorků, izolace DNA a analýzy molekulárních markerů.

Výsledky: charakterizace odběrů a odběrových lokalit, vyhodnocení technik izolace DNA, výsledky analýz molekulárních markerů, vyhodnocení elektroforetických dat, uspořádání do tabulek, grafů, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků.

Diskuze: porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce, doporučení vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: 5-10 stran  
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná  
Seznam odborné literatury:


Seidenglanz M. (2014): Vývoj výskytu populací blýskáček (*Meligethes* spp.) rezistentních k pyretroidům na jižní Moravě. Úroda - vědecká příloha časopisu [CD] 62: 251-254.  
Freeland J. R. (2011): *Molecular Ecology*, Wiley-Blackwell.  
Weising K. et al. (2005): *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. CRC Press.  
Makunas V. (2012): Species diversity of pollen beetles (*Meligethes* s.l.: Coleoptera, Nitidulidae) in oilseed rape and resistance of *Meligethes aeneus* (F.) to pyrethroids. Aleksandras Stulginskis University.  
Kazachkova, Nadiya (2007). Genotype analysis and studies of pyrethroid resistance of the oilseed rape (*Brassica napus*) insect pest - pollen beetle (*Meligethes aeneus*). Uppsala, Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.**  
Katedra speciální produkce rostlinné  
Konzultant bakalářské práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**  
Katedra speciální produkce rostlinné  
Datum zadání bakalářské práce: **8. března 2016**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2017**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studentická 1656, 270 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 8. března 2016

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis autora

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a ochotu s jakou mi pomáhal při zpracování této práce.

## Abstrakt

Práce se zabývá studiem populací blýskáčka řepkového s různým stupněm rezistence k pyrethroidům na molekulární úrovni. Vzorky se sbíraly ve 13 lokalitách po České republice během roku 2016. DNA brouků byla izolována pomocí CTAB – PVP a Chelexu 100. Následně se populace blýskáčka řepkového odlišily na základě ISSR markerů (Inter-simple sequence repeats). Byly rozlišeny populace brouků s rozdílným profilem mikrosatelitů a výsledky se zpracovaly PCA analýzou. Celkem bylo vyzkoušeno pět ISSR primerů, z čehož reprodukovatelný výsledek vykazoval jeden primer. Na základě matice genetických vzdáleností byly PCA analýzou vzorky zařazeny do clusterů podle genetické podobnosti a byl zhodnocen vztah geografické vzdálenosti vzorků vůči rozdílnému ISSR profilu. Závěrem byla vyzkoušena amplifikace genu kódujícího sodíkové iontové napětím řízené kanály (VSSC).

Klíčová slova: insekticidy; rezistence; molekulární markery; ISSR; blýskáček řepkový



## Abstract

This thesis deals with pollen beetle populations with various degrees of resistance to pyrethroids. Samples were collected in 13 locations in the Czech Republic in 2016. DNA of beetles was isolated by CTAB – PVP and Chelex 100. After that, molecular methods based on ISSR markers (Inter-simple sequence repeats) were used to distinguish between different pollen beetle populations. Different populations were described based on microsatellites and the results were processed by the PCA analysis (Principal component analysis). 5 ISSR primers were tried and one result of the primers was reproducible. On the basis of matrix genetic distance, samples were classified into clusters according to genetic similarity by PCA analysis. In the next step, the author evaluated the relationship of geographical distance and different ISSR profiles. In the end of the work, the author tried to amplify a gene encoding voltage-sensitive sodium channels.

Keywords: insecticides; resistance; molecular markers; ISSR; pollen beetle

# Obsah

1. Úvod .....	12
2. Insekticidy – charakterizace .....	13
2.1 Pyrethroidy .....	13
3. Rezistence hmyzu k insekticidům .....	15
3.1 Detoxikační enzymy.....	16
3.2 Cílová místa.....	17
4. Genetický polymorfismus a metody jeho detekce .....	19
4.1 Metoda RFLP (Restriction fragment length polymorphism) .....	19
4.2 Metoda AFLP (Amplified fragment length polymorphism).....	20
4.3 Metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) .....	20
4.4 Detekce mikro- a minisatelitů.....	21
4.5 Sekvenační analýza.....	21
5. Modelový organismus blýskáček řepkový.....	22
5.1 Morfologie blýskáčka řepkového.....	22
5.2 Bionomie blýskáčka řepkového .....	23
5.3 Škodlivost blýskáčka řepkového .....	24
6. Průběh šíření rezistentních populací b. řepkového .....	26
7. Cíle práce.....	28
8. Materiál a metodika.....	29
8.1 Sběr vzorků .....	29
8.2 Izolace DNA b. řepkového pomocí Chelexu 100 .....	30

8.3 Izolace DNA b. řepkového pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)..	30
8.4 ISSR (Inter-simple sequence repeats).....	32
8.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	33
8.6 Gelová elektroforéza.....	34
9. Výsledky.....	35
9.1 Izolace DNA.....	35
9.2 ISSR .....	35
9.3 Amplifikace genu VSSC.....	39
10. Diskuse .....	40
10.1 Izolace DNA.....	40
10.2 ISSR .....	40
10.3 Amplifikace genu VSSC.....	41
11. Závěr.....	42
Bibliografie .....	43

# 1. Úvod

Insekticidy či pesticidy obecně nalézají své využití u většiny současných zemědělců, ale mají své uplatnění i v lesnictví, potravinářských závodech i u malých pěstitelů. Celkové využití chemické ochrany rostlin neodmyslitelně patří k dnešnímu intenzivnímu zemědělství. Používání pesticidů zajišťuje vyšší výnosy, zlepšuje sensorické, nutriční a technologické vlastnosti produktů a zajišťuje velké podnikatelské výhody.

Zároveň však nelze opomenout negativní vliv pesticidů na životní prostředí. Akumulace reziduí pesticidů v půdě i v potravních řetězcích je v podstatě nevratná a při jejich aplikaci může docházet k otrávám i necílových organismů. Rezidua jednoho z prvních využívaných insekticidů – DDT, se stále vyskytují v půdě po celém světě a přes potravní řetězce i v organismech.

Další komplikací spojenou s využíváním insekticidů jsou vznikající rezistentní populace škůdců. Příkladem škůdce, u něž se vyvinula rezistence a kterým se tato práce zabývá, je blýskáček řepkový (*Meligethes aeneus*). Ten je v současnosti jedním z nejvýznamnějších škůdců ozimé řepky. K jeho velkému rozšíření značnou mírou přispěl enormní nárůst osevních ploch řepky za poslední desetiletí. Nezanedbatelnou příčinou nárůstu rezistence je také nadužívání insekticidů bez předcházející kontroly porostu.

Svou neustále vzrůstající rezistencí vůči běžně používaným insekticidům již vzbudil pozornost nejednoho vědce či vědecké skupiny. Přesto doposud nebyl objasněn mechanismus vzniku rezistence b. řepkových a ani lokalizován gen, který ji způsobuje. Proto je v současnosti nejúčinnější ochranou proti dalšímu vývoji rezistence tohoto škůdce důkladný monitoring odolných populací, provádění kontrol stavu zamoření škůdcem a vyhodnocení nutnosti aplikace chemických preparátů či dodržování dalších antirezistentních opatření.

## 2. Insekticidy – charakterizace

Insekticidy jsou druhem pesticidů určené k hubení škodlivého hmyzu ve všech jeho stádiích vývoje. Dělí se podle účinku na jednotlivá vývojová stádia na ovocidy – hubí vajíčka škůdců a na larvocidy – hubí škůdce v larválním stádiu (Matsumura, 2012).

Z chemického hlediska lze insekticidy rozdělit na anorganické sloučeniny, organické sloučeniny, karbamáty a pyrethroidy. Anorganické sloučeniny jsou dnes už jen málo významná skupina insekticidů. Význam ztratily především se zákazem používání sloučenin na bázi olova, arzenu a selenu. Částečně insekticidní povahu mají anorganické sloučeniny mědi (Matsumura, 2012).

Mezi organické insekticidní sloučeniny se řadí látky se stejným mechanismem působení. Patří mezi ně hlavně organochlorové, organofosforové a karbamátové sloučeniny. Mezi organické sloučeniny se řadí většina současně používaných insekticidních látek (Matsumura, 2012).

Estery, vznikající z kyseliny karbamové, jsou souhrnně označovány jako karbamáty a mají široké insekticidní účinky. Poslední skupinou insekticidních látek jsou pyrethroidy. Jedná se o synteticky připravované insekticidy, působící proti požerovým, savým a bodavě-savým škůdcům (Matsumura, 2012).

### 2.1 Pyrethroidy

Desítky let se pyrethroidní insekticidy používají k hubení škodlivého hmyzu. Kvůli intenzivnímu používání pyrethroidů se u mnoha populací hmyzu vyvinula rezistence na tyto sloučeniny. Mnoho z rezistentních jedinců nese specifické bodové mutace v genu sodíkových kanálů. Mechanismus působení pyrethroidů je založen na zpomalení či inaktivaci sodných kanálů, čímž způsobuje paralýzu a smrt hmyzu (Liu, 2000; Soderlund & Knippe, 2003).

Z rostlinného rodu chryzantémy se získává skupina přirozeně se vyskytujících látek nazývaných pyrethriny. Některé chemické látky z extraktu tohoto rodu mají insekticidní vlastnosti a jsou jako insekticidy běžně využívány. Jejich velkou výhodou je snadná degradovatelnost, především vlivem slunečního záření (Todd & kol., 2003). Pyrethroidy jsou pyrethrinům strukturálně velmi podobné, ale vyrábějí se chemicky, jsou toxičtější pro hmyz, mohou ohrozit i malé savce a na slunci jsou stabilnější (Kazachkova, 2007).

Bylo vyvinuto více než 1000 syntetických pyrethroidů, většina z nich je směs stereoizomerů s různými insekticidními vlastnostmi o různé toxicitě (Kazachkova, 2007). Podle mechanismu účinku se řadí mezi modulátory sodíkových kanálů (sodium channel modulators). Látky této skupiny ovlivňují transfer  $\text{Na}^+$  iontů v nervovém systému a patří tedy mezi nervové jedy (Šenoldová & Lokaj, 2008).

Spolu s pyrethroidy se do této skupiny dále řadí velmi odolné látky DDT a methoxychlor, které jsou obtížně rozpustné ve vodě, velmi lipofilní a perzistentní, s kumulativním účinkem v tělesném tuku. Pyrethroidy také působí podobně jako DDT a methoxychlor. Jsou to stejně tak požerové a kontaktní jedy s velmi rychlým účinkem, tzv. knock – down efektem. Nemohou však pronikat do pletiv a nekumulují se v nich. Narušují axiální vedení nervových vzruchů narušením rovnováhy mezi sodíkovými a draslíkovými ionty (Šenoldová & Lokaj, 2008). Studie ukázaly, že pyrethroidy poškodí stabilizaci otevřeného stavu kanálu a inhibují jejich deaktivaci, takže jsou kanály udržovány stále otevřené (Dong, 2007).

Neurotoxiny obecně jsou řazeny do skupin podle typu navázání a účinků na sodíkové kanály. Pyrethroidy jsou seskupeny do dvou typů, typ I a II. K jakému typu jsou pyrethroidy zařazeny, závisí na mechanismu účinku a jejich chemické struktuře. V případě, že pyrethroidy způsobují opakované výboje při reakci na jeden stimul, jsou řazeny k typu I. Pokud pyrethroidy způsobují depolarizaci membrány s následnou represí akčního potenciálu, řadí se k typu II (Dong, 2007).

Část aplikovaných pyrethroidů ztrácí účinnost navázáním na částice půdy. Díky lipofilnímu charakteru se snadno váží na kutikulu hmyzu a jsou obtížně smývatelné deštěm. Nevznikne-li rezistence častou aplikací bez střídání přípravků s jinými chemickými skupinami, spolehlivě působí na dospělé jedince i larvální stádia a můžou vykazovat i ovocidní a repelentní účinky. Obecně lépe působí při nižších teplotách, kolem 10 °C a mají širokou specifitu účinku, tudíž působí i na neškodné či užitečné druhy (Šenoldová & Lokaj, 2008). Účinek pyrethroidů lze na hmyzu pozorovat během 1-2 minut jako ztrátu normální pozice a pohybu. Příznaky intoxikace se poměrně rychle rozvíjí. Mezi typické příznaky patří zvýšená dráždivost, křeče, ataxie a poruchy koordinace (Shafer & kol., 2005).

### 3. Rezistence hmyzu k insekticidům

Rezistence vzniká selekčním procesem, kdy jsou jedinci dané populace opakovaně vystavováni toxické látce a postupně si k ní vytváří různé stupně odolnosti. Jako rezistentní se označují populace, které jsou schopné přežít dávku, v tomto případě insekticidu, která by dříve zahubila většinu z nich. Rezistence se vytváří vůči samostatné látce, ale i vůči skupině látek (Kazda & kol., 2008).

Typy rezistence se dají rozdělit na:

- **Multirezistence** – rezistence vůči skupině chemicky podobných látek
- **Spřážená rezistence (cross-rezistence)** – rezistence proti jedné látce způsobí zároveň rezistenci proti jiné, doposud nepoužívané látce

Správným používáním pyrethroidů lze oddálit vznik rezistence. Je k tomu zapotřebí dodržovat antirezistentní opatření, mezi která patří užívání maximální registrované dávky insekticidů. Dávky by se neměly snižovat ani při užívání insekticidů se smáčedly nebo jinými pomocnými látkami. Samozřejmostí by mělo být pravidelné obměňování přípravků s různými účinnými látkami a využívání lokální aplikace přímo na napadené části. Množství chemických zásahů lze regulovat využitím signalizačních metod napadení či využitím i jiných než chemických ochranných mechanismů proti b. řepkovému (Kazda & kol., 2008).

Existuje několik způsobů, kterými se hmyz může bránit proti insekticidům. Rezistentní škůdci obvykle vykazují kombinaci několika těchto mechanismů rezistence současně. Jedním z nich je tzv. **behaviorální rezistence**, kdy hmyz rozeznává nebezpečí a vyhýbá se jedu. Tento mechanismus rezistence byl zaznamenán u několika druhů insekticidů včetně organochloridů, organofosfátů, karbamátů a pyrethroidů. Hmyz se jednoduše přestane krmit, pokud vycítí jedovatou látku nebo úplně opustí oblast, kde byly insekticidy aplikovány (Karaağaç, 2012).

Dále může dojít ke **sníženému pronikání** insekticidu do těla škůdce. Rezistentní hmyz potom absorbuje toxin pomaleji než hmyz citlivý. K tomuto mechanismu rezistence dojde specifickou tvorbou pokožky hmyzu, která následně zpomaluje absorpci látek do celého těla. To může chránit jedince před celou řadou insekticidů. Odolnost proti průniku se často vyskytuje v kombinaci s jinými mechanismy rezistence a jen umocňuje jejich účinnost (Karaağaç, 2012).

Způsobem obrany hmyzu je i **změna metabolických drah**. Rezistentní hmyz tak může detoxikovat nebo zničit toxin rychleji než hmyz vnímavý, nebo rychle vyloučit toxické molekuly ze svého těla. Metabolická rezistence je nejčastějším mechanismem a často představuje největší problém. Hmyz používá své interní enzymové systémy k rozložení insekticidů. Rezistentní populace mohou mít vyšší expresi nebo účinnější formy těchto enzymů. Kromě jejich vysoké účinnosti mohou tyto enzymy mít i široké spektrum aktivity – mohou degradovat mnoho různých insekticidů (Karaağaç, 2012).

Posledním způsobem ochrany hmyzu je **konformace (změna) cílového místa** insekticidu. Tato rezistence vzniká, pokud se insekticid nenaváže na místo svého působení (Kazachkova, 2007). Místo, kam se insekticid obvykle váže, je modifikované, čímž se snižuje nebo zcela inaktivuje účinek insekticidu. Jedná se o druhý nejčastější mechanismus rezistence hmyzu proti insekticidům (Karaağaç, 2012; Brogdon & McAllister, 1998).

KDR (Knock-down rezistence) je termín používaný k popisu rezistence vůči DDT a pyrethroidním insekticidům, která vyplývá právě ze snížené citlivosti nervového systému. Tímto způsobem je omezena účinnost všech pyrethroidů. Tento mechanismus by mohl mít vážné negativní dopady na trvalou ochranu proti škodlivému hmyzu (Soderlund, 2003).

### 3.1 Detoxikační enzymy

Při změně metabolických drah dojde ke zvýšení hladiny nebo modifikaci aktivity enzymů esteráz, oxidáz nebo glutathion S-transferázy (GST), které zabraňují insekticidům dosáhnout cílového místa působení (Kazachkova, 2007). Jedním z nejčastějších mechanismů rezistence je úprava hladiny či aktivity detoxikačních enzymů esteráz, které metabolizují širokou škálu insekticidů hydrolýzou esterových vazeb. Tyto esterázy lze zařadit do 6 rodin proteinů patřících do alfa/beta hydroláz. Vyskytují se v clusterech. Mutace jednotlivých genů clusteru mohou způsobit rezistenci, ale i změna jedné aminokyseliny může změnit specifčnost esterázy (Brogdon & McAllister, 1998).

Také oxidázy, též oxygenázy, metabolizují insekticidy. K rozkladu insekticidní látky dochází prostřednictvím hydroxylace nebo oxidace. Oxidáza cytochrom P450 (CYP) patří do obrovské superrodiny proteinů, která obsahuje 62 čeledí, vyskytujících se u zvířat a rostlin. U hmyzu byly prokázány rodiny 4, 6, 9 a 18. Oxidázy hmyzu odpovědné za rezistenci patřily k rodině 6 (Brogdon & McAllister, 1998). Cytochrom



P450 je největší genová rodina přítomná ve všech živých organismech (Feyereisen, 1999).

U hmyzu lze nalézt stovky genů kódujících CYP. Bylo prokázáno, že CYP mohou být zodpovědné za rezistenci škůdců vůči insekticidům, ale doposud nebyly nalezeny žádné mutace, které by způsobovaly rezistenci změnami ve struktuře nebo aktivitě proteinu. Místo toho bylo prokázáno, že hladiny transkriptu CYP genů, metabolizujících pyrethroidy, jsou zvýšené u mnoha rezistentních škůdců, což by mohl být důvod rezistence (Feyereisen, 1999).

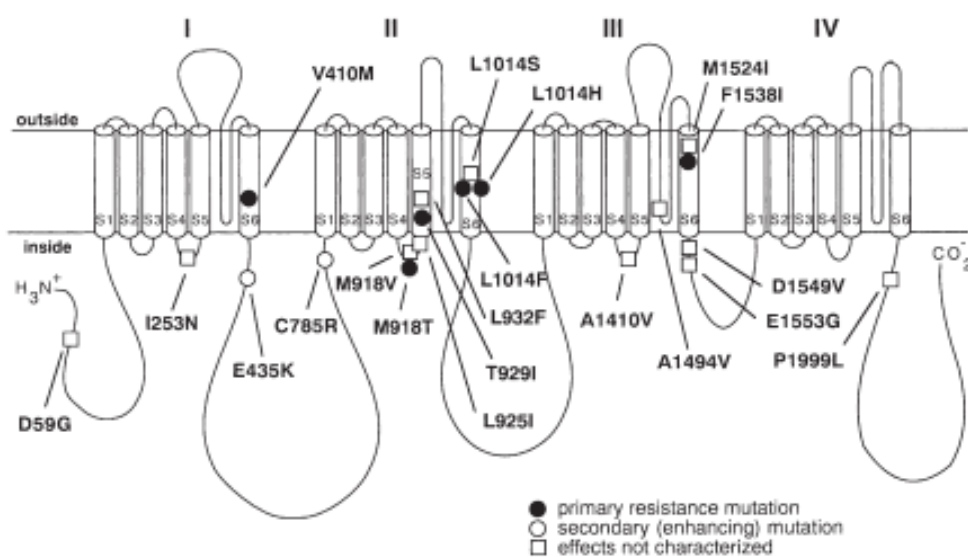
Rezistenci u hmyzu mohou také způsobovat enzymy glutathion S-transferázy (GST). Většina organismů obsahuje více GST ze dvou nebo více tříd. GST můžou způsobit odolnost hmyzu konjugací redukovaného glutathionu insekticidu nebo jeho metabolitů. Nejvíce informací o rezistenci zprostředkované GST se týká mouchy domácí, ale byla prokázána rezistence k pyrethroidům i u jiných druhů hmyzu (Brogdon & McAllister, 1998; Kristensen, 2005).

### 3.2 Cílová místa

Častou příčinou vzniklé rezistence u hmyzu je konformace některého z cílových míst daného insekticidu. Příkladem takového místa jsou ligandem řízené iontové kanály. Neurotransmitery, jako jsou acetylcholin nebo gama-aminomáselné kyseliny (GABA), dostávají chemické signály, které přeměňují na elektrické signály přes otvor jejich integrálních iontových kanálů. Receptor hmyzu GABA je místem působení insekticidů na bázi cyklodienů a fenylpyrazolů jako je fipronil (Ffrench-Constant & kol., 2004).

Dalším cílovým místem jsou acetylcholinové esterázy (AChE). AChE jsou cílové lokality organofosforu (OP) a karbamátových insekticidů. Nacházejí se v nervových synapsích a končí nervový impuls katalýzou hydrolýzy neurotransmiteru acetylcholinu. AChE jsou klíčové enzymy u hmyzu, u kterého je cholinergní systém zásadní. Jejich inhibice kovalentní vazbou insekticidů na aktivní místo enzymů způsobí úhyn hmyzu (Brogdon & McAllister, 1998; Ffrench-Constant & kol., 2004; Fournier & kol., 1992). Na modelovém organismu *Drosophila* bylo prokázáno, že AChE jsou kódovány jedním genem, *Ace*. Bodová mutace tohoto genu způsobuje sníženou citlivost AChE vůči insekticidním látkám a umožňuje hmyzu přežít aplikaci těchto látek (Fournier & kol., 1992).

Dalším příkladem cílového místa, a co se týče b. řepkového asi nejvýznamnějším cílovým místem, jsou sodíkové iontové napětím řízené kanály (VSSC). Ionový kanál je transmembránový proteinový komplex, který tvoří vodou naplněný pór přes lipidovou dvojvrstvu, jehož prostřednictvím specifické anorganické ionty difundují dovnitř pomocí elektrochemického gradientu (Zlotkin, 1999). VSSC jsou cílovou lokalitou pro organochloridy a syntetické pyrethroidy. VSSC se skládá ze 4 homologních domén (obr. 1) a bodové mutace tohoto genu jsou spojovány s Knock-down rezistencí. Na rozdíl od ligandem řízenými iontovými kanály jsou VSSC ovlivňovány spíše membránovým napětím než změnami koncentrace neurotransmiterů (Ffrench-Constant & kol., 2004; Brogdon & McAllister, 1998).



Obr. 1 Struktura VSSC

Zdroj: Soderlund & Knippe, 2003

Široké používání insekticidní látky dichlor difenyl trichlorethanu (DDT) způsobilo v minulosti rozšíření tzv. křížové rezistence i proti pyrethroidům stejným mechanismem jako proti DDT (Soderlund, 2008). Pyrethroidy ovlivňují VSSC v membránách nervových buněk (Soderlund & Knippe, 2003). VSSC se skládá ze čtyř opakovaných domén, značených I – IV, z nichž každá obsahuje šest transmembránových šroubovic (S1 – 6). Jsou důležité pro elektrickou signalizaci a rychlé vybudování akčního potenciálu přes membránu. K proudění sodíkových iontů přes membránu do buňky dochází, jen pokud je kanál otevřený. Otevření kanálu je odezva na depolarizaci membrány. Tento mechanismus je pro buňku životně důležitý, což z něho dělá cílové místo pro neurotoxiny, jako jsou pyrethroidy (Dong, 2007).

## 4. Genetický polymorfismus a metody jeho detekce

O genetický polymorfismus se jedná, pokud se v jednom lokusu vyskytuje 2 a více alel s výskytem převyšujícím 1 % v populaci a příčinou nejsou opakovaně probíhající mutace. Vyskytuje-li se daný polymorfismus trvale, nazýváme ho balancovaný, ale existují i polymorfismy přechodné. Nejčastější, tzv. **bodový polymorfismus**, je v podstatě jednonukleotidová záměna v sekvenci DNA. Bývá označován SNP z anglického „Single nucleotide polymorphism“. Jedná se o velmi častý typ genové variace a většinou vůbec neovlivňuje fenotyp, ale vyskytuje-li se v kódující nebo regulační části DNA může být predikcí dědičných onemocnění.

Polymorfní úseky se mohou také nacházet mezi tzv. **repetitivními sekvencemi**. Jako repetitivní jsou v DNA označovány sekvence, která se zde vyskytují v mnoha kopiích na rozdíl od jednotkových sekvencí, které se v DNA objevují v jedné nebo jen několika málo kopiích. Rozlišujeme tzv. tandemové repetice, které se vyznačují tím, že se jednotlivé kopie nacházejí přímo za sebou, a repetice rozptýlené, která jsou lokalizovány po celé délce DNA. Repetitivní sekvence se dále dělí na mikro- a minisatelity (Kazachkova, 2007).

Vyskytuje-li se mnoho relativně krátkých sekvencí genomu ve formě tandemových repetic, hovoříme o tzv. satelitní DNA neboli satelitech. Mikrosatelity obvykle obsahují 2-4 báze a vyskytují se v 10-50 kopiích. Delší minisatelity, tvořené obvykle 10-60 páry bází, jsou častější a předpokládá se, že jsou náhodně rozloženy po celé DNA (Kazachkova, 2007).

### 4.1 Metoda RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

RFLP diferencuje homologní sekvence DNA, které lze detekovat přítomností fragmentů různých délek po štěpení vzorků DNA specifickými restričními endonukleázami. RFLP, jako molekulární marker, je specifický pro jediný klon, danou kombinací restričních enzymů. RFLP markery jsou zpravidla kodominantní a vysoce specifické (Weising & kol. 2005).

Metoda vyžaduje velké množství DNA, je nákladná a časově náročná. Prostřednictvím RFLP lze zkoumat genovou diverzitu, strukturu populací, hybridizaci, tok genu a autopolyploidii. RFLP markery mohou být cennými fylogenetickými a fylogeografickými markery (Kazachkova, 2007).

## 4.2 Metoda AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Metoda se zakládá na univerzální PCR založené na markrech pro rychlé znázornění genetické variability. Technika zahrnuje tři hlavní kroky (Savelkoul & kol., 1999):

1. Štěpení genomové DNA restrikčními endonukleázami a následná ligace dvouřetězcových adaptérů, každý složený ze dvou oligonukleotidů, čímž se vytvoří restrikční fragmenty se známými sekvencemi adaptérů.
2. Specifická amplifikace podмноžiny těchto fragmentů za použití primerů (jeden značený) komplementárních k adaptérům s jednou bází navíc.
3. Obvykle automatizované analyzování vzorků.

Pro snížení počtu amplifikovaných fragmentů se využívá reamplifikace po amplifikaci v kroku č. 2, s přidáním jedné nebo dvou dalších bází navázaných na adaptér. Diference nebo polymorfismy mezi vzorky se ukáží separací značených fragmentů elektroforézou (Savelkoul & al, 1999; Mueller & Wolfenbarger, 1999).

Výhody metody AFLP jsou v použití univerzálního protokolu, v kombinaci s různými restrikčními endonukleázami a následný výběr jednoho nebo více selektivních nukleotidů v druhém kroku. Nejdůležitějším rysem AFLP je však schopnost současné detekce z mnoha oblastí DNA náhodně rozdělených po celém genomu (Savelkoul & kol., 1999; Mueller & Wolfenbarger, 1999).

## 4.3 Metoda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD využívá pouze jeden primer a předpokládá blízkost stejných míst na opačném vlákně DNA, která se tímto primerem amplifikují v PCR reakci. Pokud se jedná o polymorfni úsek DNA, primer jeho sekvenci nerozezná a daný úsek se při PCR neamplifikuje, což vede k různým vzorům tvořeným na gelu při následné elektroforéze (Weising & kol. 2005).

Tato technika je jednoduchá, levná, nevyžaduje žádné předchozí znalosti o DNA sekvenci sledovaného organismu, ani velké množství izolované DNA. Nevýhody metody spočívají v její špatné reprodukovatelnosti, dominanci markerů (znemožní určit, zda je úsek amplifikován z heterozygotního nebo homozygotního lokusu), homologii produktů a alelických variant (Kazachkova, 2007; Weising & kol. 2005)

#### 4.4 Detekce mikro- a minisatelitů

Tyto markery jsou kodominantní a lze je detekovat z jaderné DNA, ale i z DNA organel. Ve srovnání s ostatními markery se zde polymorfismy vyskytují častěji, proto se hojně využívají ke srovnávání populací. Aplikace těchto markerů zahrnuje odhad genové diverzity a populační struktury.

Nevýhodou je vysoká cena a náročnost, metoda totiž vyžaduje klonování a následné sekvenování DNA. Velkou komplikací také mohou být tzv. homoplasy, shodné znaky, které se vyvinuly samostatně v různých vývojových liniích (Kazachkova, 2007).

#### 4.5 Sekvenační analýza

Pro odhalení diversity mezi populacemi může být využito i přímé sekvenování daného lokusu DNA. Specifický fragment se nejprve amplifikuje PCR a následně je sekvenován. Výsledkem je celkové přečtení sekvence bází konkrétního lokusu, který lze porovnat se standardem. Touto cestou lze rychle a snadno získat velké množství informací. Nevýhodou je obtížnost čtení některých konkrétních vzorků.

## 5. Modelový organismus blýskáček řepkový

### 5.1 Morfologie blýskáčka řepkového

Dospělci blýskáčka řepkového (*Coleoptera: Nitidulidae*) (obr. 2) měří 2 – 2,5 mm a jsou 1,5 mm širocí. Mají malou, širokou hlavu vtáhnutou pod štít a shora klenuté kovově lesklé tělo. Krovky jsou modře či tmavě zeleně tečkované a nohy hnědé, hnědočervené nebo žlutohnědé. Spodní strana těla je černá. Tykadla mají hnědočervený druhý článek, jinak jsou celá černá (Tóth & Hudec, 2007).



Obr. 2 Dospělec na květu řepky

Zdroj: Basf.cz

Kukla je 4 mm dlouhá, žlutobílá a po bocích každého článku zadečku má brvu. Larvy (obr. 3) jsou asi 4 mm dlouhé, líhnou se bezbarvé. Později se barví do mléčně bílé se žlutohnědou hlavou. Mají 3 páry končetin a po stranách na každém tělním článku černou skvrnu (Vašák, 2000).



Obr. 3 Larvy b. řepkového

Zdroj: Basf.cz

Vajíčka jsou veliká 0,2 - 0,3 mm, mají válcovitý tvar na pólech zaoblený. Nejprve bývají průhledná, později mléčně zakalená (Vašák, 2000).

## 5.2 Bionomie blýskáčka řepkového

Dospělci b. řepkového přezimují v půdě na okrajích polí a lesů. V dubnu, když se teplota ovzduší pohybuje okolo 10 °C, opouští své úkryty před zimou. Začínají nalétávat na různé kvetoucí rostliny a týden či dva se živí jejich pylem. Když teplota stoupne nad 12 °C, začínají vyhledávat brukvovité rostliny pro páření a kladení vajíček. Dospělci obvykle dorazí na rostlinu řepky v době tvorby květních pupat a živí se pylem (Williams, 2010). Před květem vykousávají do pupat nepravidelné otvory, aby se k pylu dostali. Vykousanými otvory také kladou do pupat vajíčka, nejčastěji na prašníky (Häni & kol. 1993).

Jedna samička naklade až 250 vajíček, 2–3 do každého pupate. Larvy se líhnou již po několika dnech a jejich vývoj trvá přibližně jeden měsíc, v závislosti na teplotě (Williams, 2010). Larvy se živí pylem, ale zpravidla nepoškozují prašníky, pokud se jich v jednom květu nevyskytuje více než pět (Tóth & Hudec, 2007). Plně vyvinuté larvy padají z květů na zem a zavrtávají se do půdy, přibližně 1,5–6 cm hluboko, kde se kuklí. Po 10–11 dnech se líhnou z kukel dospělci. V době líhnutí stále žije původní generace dospělců, ale postupně začíná hynout a nově vylíhlí brouci se po několika týdenním žíru uchylují do půdy, kde přezimují. Stěhování do zimovišť začíná již v červenci, ale probíhá někdy až do září (Miller, 1956).

### 5.3 Škodlivost blýskáčka řepkového

Největší škody způsobují b. řepkoví u slabých porostů a na pomalu vyvíjejících se poupatech. Ošetření se provádí na počátku masového náletu imág, a to při výskytu 200–500 brouků na 100 rostlin (Čača & kol., 1990). Dospělci vykousávají do pupat různě veliké otvory, kterými se dostávají k tyčinkám, respektive pylu. U menších pupat může dojít k úplnému sežrání. Větší pupata vykusují ze strany, následkem čehož se scvrkávají, osychají a později opadávají. Z okvětí zůstávají pouze stopky, čímž vzniká nepravidelný vzhled květenství (Tóth & Hudec, 2007).

Larvy se živí pylem a téměř neškodí, později však okusují i květní plátky, čnělky a povrch mladých šešulí (Kazda & kol., 2003).

Nejvýznamnější jsou škody způsobené dospělci v období zeleného a žlutého poupěte za chladného počasí. Může být zničeno až 70 % květů (Kazda & kol., 2003). V České republice je aktuálně povoleno šestnáct účinných látek insekticidů, které se běžně prodávají jako komerční přípravky. Všechny tyto účinné látky působí kontaktně až na acetamiprid jehož mechanismus účinku je systémový (Tab. 1).



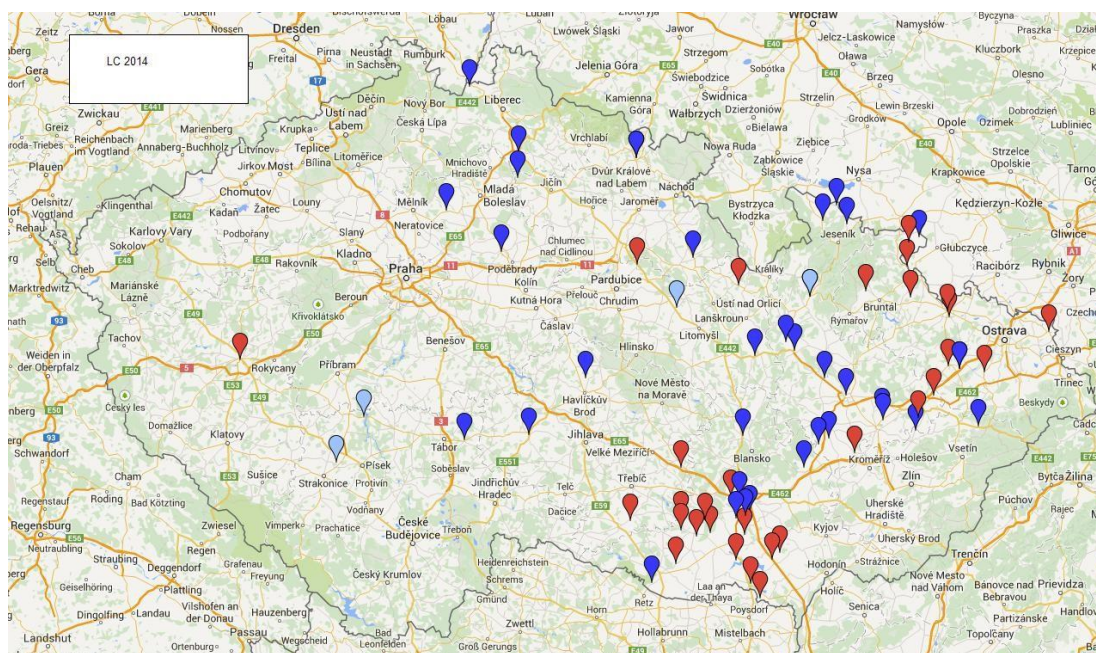
Tab. 1 Povolené přípravky na ochranu rostlin

<b>Komerční přípravek</b>	<b>Účinná látka</b>	<b>Mechanismus působení</b>
Acetguard	Acetamiprid	Systémový
Actipir 480 EC	Chlorpyrifos	Kontaktní
Alfametrin ME	Alfa-cypermethrin	Kontaktní
Avaunt 15 EC	Indoxakarb	Kontaktní
Bulldock 25 EC	Beta-cyfluthrin	Kontaktní
Cyperkill 25 EC	Cypermethrin	Kontaktní
Daskor	Chlorpyrifos-methyl, Cypermethrin	Kontaktní
Decis Forte	Deltamethrin	Kontaktní
Fury 10 EW	Zeta-cypermethrin	Kontaktní
Fyfanon 440 g/L EW	Malathion	Kontaktní
Mavrik 2 F	Tau-fluvalinát	Kontaktní
Nexide	Gama-cyhalothrin	
Plenum	Pymetrozin	Kontaktní
Pyrinex M22	Chlorpyrifos-methyl	Kontaktní
Sumi – Alpha 5EW	Esfenvalerát	Kontaktní
Trebon 30 EC	Etofenprox	Kontaktní

Zdroj: ÚKZUZ

## 6. Průběh šíření rezistentních populací b. řepkového

Syntetické pyrethroidy se zejména od začátku jejich používání v 80. letech staly nejpoužívanějšími insekticidy, kvůli jejich cenové dostupnosti, vyšší šetrnosti vůči opylovačům a nižšímu potřebnému množství účinné látky na hektar. Masové používání pyrethroidů vedlo již na konci minulého století k prvním projevům rezistence v západní a severní Evropě, a vzhledem k enormnímu podílu řepky na orných půdách v posledních letech po celé Evropě, i v České republice se dalo rozšíření rezistentních populací očekávat. V letech 2008–2014 byly pomocí IRAC Susceptibility Test Method No. 11 testovány populace b. řepkových z České republiky a Slovenska k rezistenci lambda – cyhalotrinu. Havel & kol. (2015) ve své práci uvádějí, že první rezistentní populace b. řepkového v České republice byly nalezeny v roce 2008. Do roku 2010 se rezistentní populace rozšířily po celém severu České republiky a v roce 2012 se rezistence u b. řepkového vůči pyrethroidům vyskytovala v celé republice. Od roku 2012 jsou všechny populace rezistentní, liší se jen různou intenzitou odolnosti (Havel & kol., 2015).



Obr. 4 Rezistentní populace v ČR v 2014

Zdroj: (Havel & kol., 2015)

Na obr. 4 jsou znázorněna místa sběru vzorků analyzovaných populací b. řepkového v roce 2014. Světle modré body znázorňují středně rezistentní populace, jejichž mortalita měřená po 24 hodinách, po podání 100 % registrované dávky lambda – cyhalotropinu byla 90–99 %. Tmavě modré body představují rezistentní populace, jejichž mortalita za daných podmínek byla mezi 50–89 % a červeně jsou označeny

silně rezistentní populace, jejichž mortalita za stejných podmínek byla nižší než 50 %. Vysoce citlivé a citlivé populace, s mortalitou 100 % i při nižší dávce lambda – cyhalotropinu než je 100% registrovaná dávka, se v roce 2014 na rozdíl od let předchozích nevyskytují (Havel & kol., 2015).

K testování citlivosti b. řepkového k pyrethroidům lze využít tzv. lahvičkový test (adult-vial-test), vyvinutý organizací zabývající se rezistencí – IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). Tento test se využívá k zařazení populací b. řepkového do skupin dle stupně rezistence (Tab. 2).

Tab. 2 Klasifikace rezistence

Koncentrace (% z registrované dávky)	Účinnost po 24 hodinách	Klasifikace	Klasifikační stupeň
100 % 20 %	100 % 100 %	Velmi citlivý	1
100 % 20 %	100 % Menší 100 %	Citlivý	2
100 %	90–99 %	Středně rezistentní	3
100 %	50–89 %	Rezistentní	4
100 %	Menší 50 %	Vysoce rezistentní	5

Zdroj: (Insecticide Resistance Action Committee, 2009)

Nejčastěji používaná látka lambda-cyhalothrin se naředí s acetonem do koncentrací 100 % běžně používané dávky a 20 % běžně používané dávky. Pro kontrolu se test provádí i s čistým acetonem. Do skleněných lahviček jsou tyto roztoky aplikovány v množství přizpůsobeném ploše dna lahvičky. Do lahviček se poté přidají pozorovaní brouci a výsledky se odečítají po 24 hodinách (Insecticide Resistance Action Committee, 2009).

## 7. Cíle práce

Cílem práce bylo:

- Zpracovat literární rešerši k dané problematice
- Izolovat DNA b. řepkového z populací různě rezistentních vůči pyrethroidům
- Detekovat polymorfismus u populací s různou úrovní rezistence
- Identifikovat VSSC gen v populacích b. řepkového jako důkaz rezistence k pyrethroidům

## 8. Materiál a metodika

### 8.1 Sběr vzorků

Vzorky b. řepkového (Tab. 3) byly sbírány podle interaktivní mapy se zvýrazněnými lokacemi výskytu různě rezistentních populací b. řepkového. Mapu vytvořili Havel & kol. (2015) a je volně dostupná např. na webových stránkách Rostlinolékařského portálu (<http://eaagri.cz/public/web/ukzuz/portal>).

Tab. 3 Vzorky populací b. řepkového

Číslo vzorku	Lokalita	Rostlina	Stupeň rezistence
1	Pozemek ZF JU	Řepka	-
2	Val	Řepka	-
3	Horažďovice	Řepka	4
4	Manešovice	Řepka	-
5	Babice	Řepka	5
6	Hostkovice	Řepka	4
7	Předín	Řepka	5
8	Hory	Řepka	-
9	Budíškovice	Řepka	-
10	Studená	Řepka	5
11	Vatín	Řepka	-
12	Pozemek ZF JU	Řepka	-
13	Kadov	Divizna	-

Sběr probíhal v roce 2016 od dubna do června. Jedinci z jedné lokality byli živí umístěni do jedné zkumavky a usmrceni okamžitým přepravením do mrazáku při -20 °C, kde byli poté i nadále skladováni. Stupeň rezistence byl určen na základě práce Havel & kol. (2015) a je založen na předpokladu, že se daná rezistence určená z předešlého roku nezměnila.

## 8.2 Izolace DNA b. řepkového pomocí Chelexu 100

První metodou izolace genomové DNA byla izolace pomocí Chelexu 100. Jedná se o chelatační pryskyřici, která se využívá pro izolaci DNA zejména ve forenzní genetice. Jde o jednoduchou, rychlou metodu, jejíž největší výhodou je nízké riziko kontaminace vzorku, protože celý postup se provádí v jedné mikrozkušavce. Chemicky se Chelex skládá ze styrenu divinylbenzen kopolyméru, což je makromolekulární látka složená nejméně ze dvou různých monomerů, a z párových iminodiacetátových iontů, které fungují jako chelátory vážící na sebe polyvalentní kovové ionty. V zásaditém prostředí Chelex zvyšuje afinitu ke kationtům těžkých kovů, jako jsou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . To je pro metodu klíčové, jelikož tyto dvojmocné ionty za vysokých teplot mohou poškodit DNA produkt. Dále chelatace iontů  $\text{Mg}^{2+}$  inaktivuje činnost nukleáz degradujících DNA tak, že vyvázáním hořčnatých iontů znemožní enzymatickou aktivitu. Izolace spočívá v mechanické homogenizaci a následné destrukci a degradaci buněčných membrán, proteinů a denaturaci DNA v zásaditém prostředí za vysokých teplot (95–100 °C). Následně se pryskyřice s navázanými komponenty od supernatantu s izolovanou DNA oddělí centrifugací. Takto získaná DNA lze využít pro další molekulární metody, jako např. PCR, kde je třeba dát pozor na kontaminaci Chelexem, jelikož působí jako inhibitor PCR reakce (Čapková & kol., 2012). Při izolaci byli jedinci vloženi do 1,5 ml mikrozkušavek společně se 100 µl sterilní vody (metodika uvádí 1 ml, kvůli zvýšení výsledné koncentraci DNA byl použit menší objem). Následně byla tkáň mechanicky homogenizována a odstředěna po dobu 3 minut při 12 000 otáčkách. Vzniklý supernatant o objemu 50–60 µl byl přenesen do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 50 µl 5% Chelexu. Vzorky se daly inkubovat na 20 minut při 56 °C, poté se 10 vteřin vortexovaly a opět inkubovaly, 10 minut při 100 °C. Ihned po inkubaci byly vzorky stočeny po dobu 3 minut při 12 000 otáčkách ve 4 °C. Takto upravené vzorky byly skladovány při – 20° C.

## 8.3 Izolace DNA b. řepkového pomocí CTAB-PVP (polyvinylpyrrolidon)

K izolaci DNA byla dále použita metoda využívající roztoku CTAB-PVP, která slouží k získání většího množství poměrně čisté DNA. CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) funguje jako detergentní činidlo uvolňující DNA z komplexu membrán a bílkovin. Dále má schopnost tvořit komplex s nukleovými kyselinami, jehož rozpustnost je ovlivněna koncentrací solí. Komplex je rozpustný při koncentraci 0,7 M NaCl a při nižší než 0,45

M vytváří sraženinu. Na rozdílné rozpustnosti CTAB a nukleových kyselin se pak celá metoda zakládá (Čurn & kol., 2012).

Využita byla metodika, kterou vytvořili Čurn & kol. (2012) s mírnou modifikací. Do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek byli dáni čtyři blýskáčci, přidalo se 250  $\mu$ l předeřhřátého pufru CTAB - PVP a 2,5  $\mu$ l merkptoethanolu. S přihlédnutím na množství DNA bylo využito poloviční množství pufru i merkptoethanolu. Pro lepší rozdrčení bylo přidáno trochu křemičitého písku. Po homogenizaci a promíchání se vzorky inkubovaly 45 minut při 65 °C. Po inkubaci se vzorky centrifugovaly 10 minut při 12 000 otáčkách a získaný supernatant se převedl do nových mikrocentrifugačních zkumavek.

K supernatantu bylo přidáno 500  $\mu$ l chloroformu s IAA (isoamylalkohol), směs se 10 minut promíchávala a poté opět centrifugovala 5 minut při 12 000 otáčkách. Následně byla do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetována vodná fáze, přidáno 80  $\mu$ l 5% CTAB a 500  $\mu$ l směsi chloroformu s IAA, opět se směs 10 minut protřepávala a centrifugovala 5 minut maximální rychlostí (14 000 otáček).

Vzniklá vodná fáze byla smíchána s 250  $\mu$ l isopropanolu v čistých mikrocentrifugačních zkumavkách a vložena do mrazáku při -20 °C na min. 12 hodin. Po vyjmutí z mrazáku se vzorky centrifugovaly při 4 °C 5 minut maximální rychlostí. DNA se zachytila na dně zkumavek a supernatant byl slit. K DNA se přidalo 300  $\mu$ l 1x TE a směs se nechala na 45 minut inkubovat při 37 °C. Poté bylo přidáno 600  $\mu$ l ledového 96% ethanolu, směs se lehce promíchala a opět dala do mrazáku při -20 °C na min. 12 hodin.

Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 4 °C maximální rychlostí. DNA vytvořila na dně zkumavek viditelný pelet a supernatant byl odstraněn. Po přidání 1 ml 70% ethanolu se obsah zkumavky lehce promíchal a centrifugoval 2 minuty maximální rychlostí při teplotě 4°C. Poté se ihned slil všechny supernatant a vzorky se daly přibližně na hodinu vysušit. Po důkladném vysušení se přidalo 100  $\mu$ l TE pufru. Takto byly vzorky skladovány při -20 °C a připraveny k dalšímu použití.

## 8.4 ISSR (Inter-simple sequence repeats)

Mikrosatelity jako takové bývají vysoce polymorfní a v eukaryotickém genomu se vyskytují ve velké míře. Kvůli jejich častému výskytu se ukázaly jako dobré genetické markery pro mapování polymorfismů na populační úrovni (Mezghani Khemakhem, 2005). Principem metody je, že se do každé PCR reakce dá pouze jeden primer komplementární k mikrosatelitu. Ten se naváže v různých místech na DNA v obou směrech a vytvoří tak různě dlouhé fragmenty. Metodou ISSR se tedy získávají sekvence nacházející se mezi těmito mikrosatelity a ty se pak analyzují na gelu podle velikosti.

Metoda ISSR byla zde použita k detekci genetické variability mezi populacemi b. řepkového s různým stupněm rezistence proti insekticidům. Bylo vyzkoušeno pět různých primerů (Tab. 4), z nichž na izolovanou DNA nasedaly tři primery a jen jeden výsledek byl dále reprodukovatelný.

Tab. 4 Sekvence primerů ISSR

UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT

Do stripů byly smíchány složky pro PCR reakci (Tab. 5) a vloženy do termocyklu. Program pro ISSR metodu začínal počáteční denaturací 2 minuty při 95 °C a následovalo čtyřicet opakujících se cyklů. Teplota denaturace každého cyklu byla 93 °C po dobu 20 sekund, poté klesala na teplotu annealingu 52 °C na 1 minutu a opět stoupala na elongační teplotu 72 °C na 20 sekund. Po skončení všech cyklů proběhla konečná elongace trvající 6 minut při 72 °C.



Tab. 5 Složení ISSR reakcí

Chemikálie	Objem v $\mu\text{l}$ (na 10 $\mu\text{l}$ )
Master Mix	5
Primer	0,25
BSA	0,2
Voda	3,55
Templátová DNA	1

Po skončení PCR-ISSR reakce byly vzorky přeneseny na agarózový gel pro detekci délek fragmentů.

### 8.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí PCR byla vyzkoušena amplifikace genu VSSC, jehož bodové mutace by mohly být příčinou vzniku rezistence u b. řepkových vůči insekticidům. Vzhledem k nedostatku informací o genomu b. řepkových byla tato amplifikace prováděna na základě práce Pernestál J. (2009).

Tab. 6 Sekvence primerů VSSC

VSSC 1-4 Forward	5'- ATG ACA GAA GAT TCC GAC TCG ATA - 3'
VSSC 1-4 Reverse	5'- TCA GAC ATC CGC CGT GCG CG - 3'
VSSC 3417 Forward	5'- CCT CAT CAA GAA GGG GAT CA - 3'
VSSC 5405 Reverse	5'- GCT GAC GTC GAC ATC TGA AA - 3'

Kódující sekvence primerů (Tab. 6), složení PCR směsi (Tab. 7) i program pro PCR byly převzaty z práce Pernestál J. (2009). Jedná se o primery navržené pro amplifikaci čtvrté domény genu VSSC. Primery VSSC 1-4 Forward a VSSC 1-4 Reverse mají ohraničit a amplifikovat gen VSSC, primery VSSC 3417 Forward a VSSC 5405 Reverse pak amplifikují konkrétně doménu IV tohoto genu. Program reakce je pro oba páry primerů stejný.

Tab. 7 Složení PCR reakce

Chemikálie	Objem v $\mu\text{l}$ (na 10 $\mu\text{l}$ )
Master Mix	5
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Voda	3
Templátová DNA	1

PCR začínala počáteční denaturací při 98 °C po dobu 30 sekund. Následovalo 35 cyklů složených z denaturace při 98 °C 30 sekund, annealingu při 50 °C 30 sekund a elongace při 72 °C po dobu 2 minut. Na závěr proběhla konečná denaturace trvající 10 minut při 72 °C.

## 8.6 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je technika využívaná v laboratořích k separaci DNA a jiných makromolekul. Vzorky se separují v elektrickém poli přes gel na základě jejich relativní molekulové hmotnosti, tvaru a elektrického náboje. Molekuly DNA mají z pravidla negativní náboj, vzniklý záporně nabitými fosfátovými skupinami. Tudíž se v elektrickém poli pohybují vždy k anodě. Rozdělení fragmentů v gelu je závislé na jejich velikosti. Stejně dlouhé úseky postupují stejnou rychlostí, na konci zůstanou seskupeny v jednom místě a pomocí speciálního barvení je lze vizualizovat. Nejčastěji využívaným je pravděpodobně agarózový gel v horizontální poloze, do kterého se přidává ethidium bromid jako interkalační barvivo. Gel na molekulární úrovni je matrice agarózových molekul, které drží pohromadě vodíkovými můstky a tvoří tak malé póry. Přidaný ethidium bromid se během průchodu DNA fragmentů naváže dovnitř dvoušroubovice a po ultrafialovém ozáření fluoreskuje (Čurn & kol., 2012). Pro detekci bandů PCR s VSSC primery i PCR-ISSR metodu byl využit 2% horizontální agarózový gel s přidaným ethidium bromidem. Pro metodu ISSR byl gel se vzorky vystaven 90 V po dobu 150 minut pro dokonalejší rozdělení bandů. Pro PCR s VSSC primery bylo gel se vzorky vystaven 90 V po dobu 90 minut. Vztahy mezi jednotlivými populacemi b. řepkového byly analyzovány z matice genetických vzdáleností pomocí metody hlavních komponent (Principal component analysis - PCA) v programu R (2017).

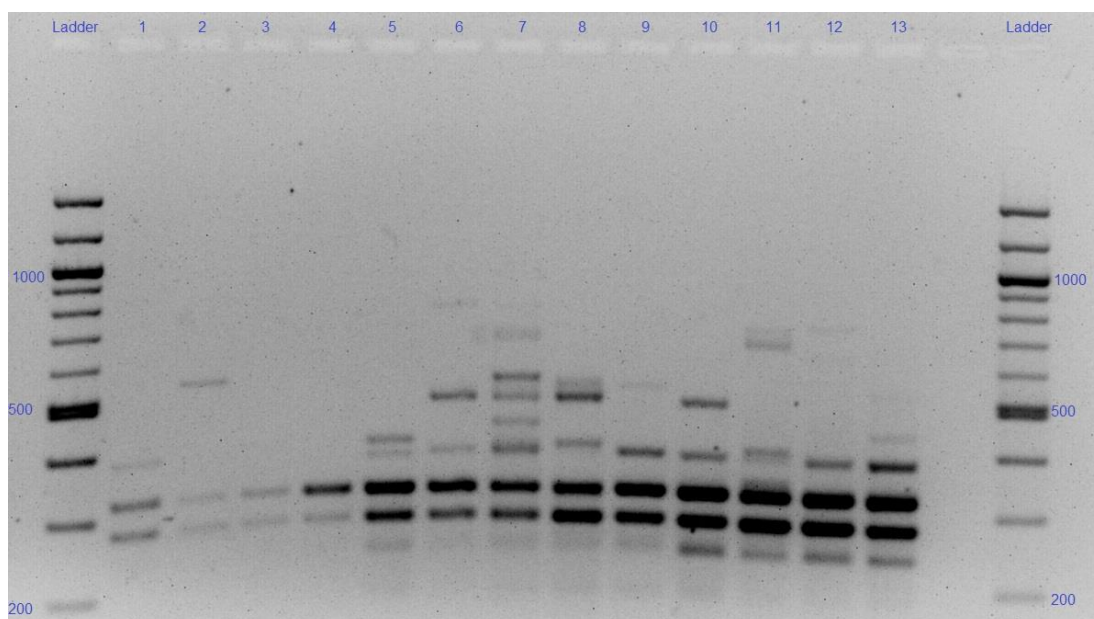
## 9. Výsledky

### 9.1 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí Chelexu 100 a CTAB – PVP. V obou případech se DNA podařilo izolovat. DNA izolovaná Chelexem 100 po analýze na NanoDropu vykazovala velké množství DNA s poměrně vysokou kontaminací a vizualizace na gelu po PCR se převážně nedařila. Metoda izolace pomocí CTAB – PVP sice vykazovala menší množství izolované DNA, ale byla prokazatelně méně kontaminovaná a PCR i vizualizace na gelu této DNA probíhala bez problému. Pro další analýzy byla použita DNA izolovaná pomocí CTAB – PVP.

### 9.2 ISSR

Jediné reprodukovatelné výsledky z původních pěti primerů vycházely při použití primeru č. 840. Dále na templátovou DNA nasedaly primery č. 812 a 840. Výsledky těchto ISSR primerů se však při opakováních neshodovaly.



Obr. 5 ISSR s primerem 840

Z výsledného gelu (obr. 5) lze vyčíst, že polymorfismus odlišený na základě mikrosatelitních úseků DNA se u různě rezistentních populací b. řepkových nachází až ve fragmentech o 400 párů bází a delších. V nepolymorfních částech se mikrosatelitní sekvence vyskytovaly vcelku pravidelně ve vzdálenostech od 200 do 350 bází.

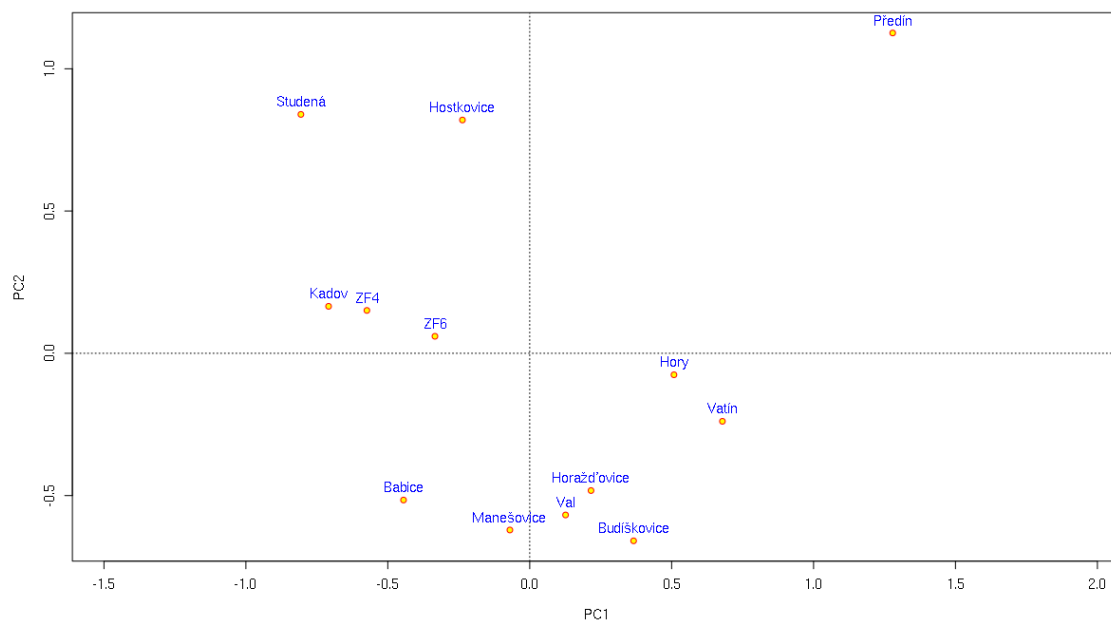
Z gelu s primerem č. 840 (obr. 5) je zřejmé, že se nejvíce mikrosatelitních sekvencí komplementárních k danému primeru nachází ve vzorku č. 7, který byl sbírán poblíž obce Předín a klasifikován stupněm rezistence 5. Další vzorky s určeným stupněm rezistence 5 jsou vzorky č. 5 od obce Babice a 10 od obce Studená. Oba tyto vzorky obsahují podstatně méně mikrosatelitních sekvencí (na gelu je u nich vizualizováno méně bandů). Vzorky č. 5, 7 a 10 se shodují kromě nepolymorfních úseků, ještě v úseku délky DNA 400 párů bází, dále se však i tyto vzorky se stejným stupněm rezistence rozcházejí. Společný band mají pak ještě vzorky č. 5 a 7 v délce 450 párů bází a vzorky č. 7 a 10 v délce 550 párů bází.

Vzorky s určeným stupněm rezistence 4, tedy vzorek č. 3 sbíraný u obce Horažďovice a vzorek č. 6 z obce Hostkovice, se shodují pouze v nepolymorfních částech DNA. Zatímco u vzorku č. 3 se mikrosatelitní sekvence kromě nepolymorfních částí vůbec neprokázaly, vzorek č. 6 vytváří fragmenty ještě v délkách 400, 550 a 800 párů bází.

Ze vzorků nezařazených do stupně rezistence se vzorek č. 1, pocházející z pozemku ZF JU a sbíraný v dubnu, úplně neshoduje s žádným ze zařazených. Vyskytuje se u něj pouze jeden polymorfní fragment v délce 400 párů bází, který se nachází u 10 ze 13 vzorků. U vzorku č. 2 sbíraného poblíž obce Val se mimo nepolymorfní úsek nachází fragment o délce 550 bází, který se také vyskytuje u zařazených vzorků č. 6, 7 a 10, u kterých byly určeny rezistence stupňů 4 a 5. Vzorek č. 4 od obce Manešovice, stejně jako vzorek č. 3 zařazený do stupně rezistence 4, nevykazuje mimo nepolymorfní úsek žádné mikrosatelitní sekvence. Vzorek č. 8, pocházející od obce Hory, vykazuje celkem 3 polymorfní fragmenty shodující se v délkách 400, 550 a 600 párů bází se vzorkem č. 7 stupeň rezistence 5. Vzorek č. 9 sbíraný u Budíškovic obsahuje polymorfní fragmenty v délce 400 a 600 párů bází, čímž je podobný vzorku č. 6 se stupněm rezistence 4, chybí mu však fragment v délce 800 párů bází. Ve vzorku č. 11 od obce Vatín byly detekovány polymorfní fragmenty o délkách 400, 700 a 750 párů bází, čímž se blíže nepodobá žádnému z určených vzorků. Vzorek č. 12, pocházející z pozemku ZF JU sbíraný v červnu, obsahuje polymorfní fragmenty v délkách 400 a 750 párů bází, je tedy téměř shodný se vzorkem č. 11, ale ne s žádným s určeným stupněm rezistence. U vzorku č. 13 od obce Kadov jsou vidět polymorfní fragmenty v délkách 400 a 450 párů bází a je tedy zcela shodný se vzorkem č. 5, u kterého byla určena rezistence stupně 5.

Vzdálenost populací b. řepkového na molekulární úrovni byla zhodnocena a graficky znázorněna PCA analýzou a shlukovou analýzou pomocí dendogramu. Z grafu

(obr. 6) lze vyčíst genetickou vzdálenost zkoumaných populací. Vzorky se tak dají rozdělit do několika geneticky podobných skupin podle jejich umístění v grafu. Nejvzdálenější populace, lišící se od všech ostatních je populace sbíraná u obce Předín. Ostatní populace jsou si mezi sebou geneticky bližší, i když populace sbírané u obcí Studená a Hostkovice jsou od ostatních stále značně odlišné.



Obr. 6 PCA analýza

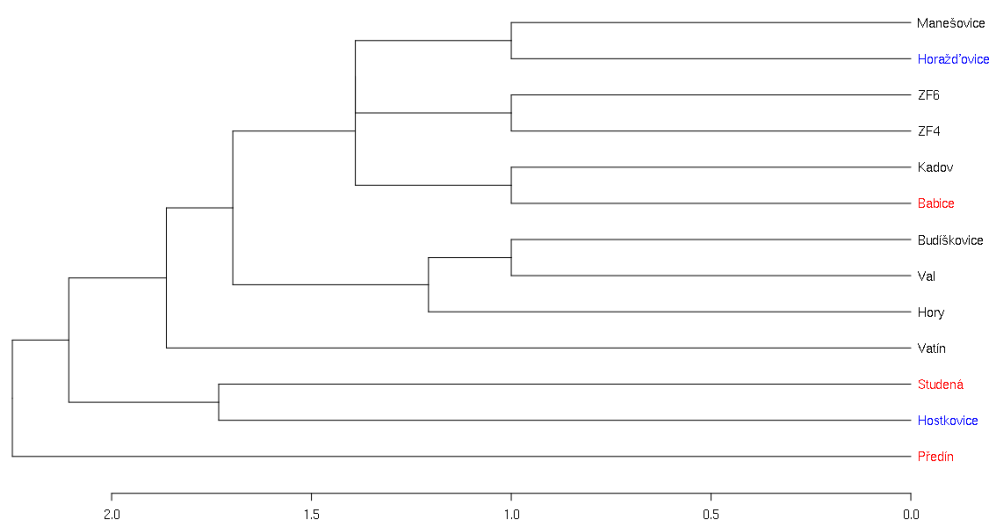
Na základě ISSR markerů lze rozdělit vzorky do clusterů podle populační podobnosti. Jednu skupinu podobných vzorků vytváří vzorek č. 1 sbíraný v dubnu na pozemku ZF JU, vzorek č. 12 sbíraný v červnu na pozemku ZF JU a vzorek č. 13 pocházející od obce Kadov. Podobnost mezi vzorky č. 1 a 12 byla předvídána, vzhledem k tomu, že oba vzorky byly sbírány na pozemku ZF JU. Podobnost se vzorkem č. 13 je vzhledem ke vzdálenosti obce Kadov u níž, byl vzorek sbírán spíše náhodná. Podobný ISSR profil je zaznamenán ještě u vzorků pocházejících od obcí Studená (vzorek č. 10) a Hostkovice (vzorek č. 6). Podobnost těchto vzorků byla předpokládána vzhledem k jejich geografické blízkosti a podobnému stupni rezistence.

Další skupinu populačně podobných b. řepkových vytváří vzorky sbírané u obcí Manešovice (vzorek č. 4), Val (vzorek č. 2), Horažďovice (vzorek č. 3), Budiškovice (vzorek č. 9) a populačně vzdálenější Babice (vzorek č. 5). Genetická podobnost u vzorků č. 4, 9 a 5 byla vzhledem ke geografickému rozmístění předpokládána. U vzorku č. 4 a 9 byla očekávána, vzhledem ke vzdálenosti sběru pouze 2 km, vyšší

podobnost. Místa sběru vzorků č. 2 a 3 jsou sice geograficky vzdálenější, ale populační analýza, i přes jistou podobnost, ukázala odpovídající odchylky.

Populačně podobné vzorky pocházející od obcí Hory (vzorek č. 8) a Vatín (vzorek č. 11) jsou si sice mezi sebou populačně nejbližší, přesto je mezi nimi poměrně velká odchylka na zařazení do jednoho clusteru. Vzorek č. 7 sbíraný u obce Předín je populačně nejvzdálenější od všech ostatních vzorků. Nejpodobnější je vzorku č. 8, ke kterému má i geograficky nejbližší, vzhledem k jejich blízké poloze sběru však byla očekávána větší populační podobnost.

V dendogramu (obr. 7) jsou červeně zvýrazněná místa sběru vzorků, u kterých byla rezistence klasifikována stupněm 5 a modře zvýrazněná jsou místa sběru vzorků s určenou rezistencí stupně 4. Černě jsou v dendogramu vypsány místa sběru vzorků, u nichž nebyl zjišťován stupeň rezistence.



Obr. 7 Dendogram

Z dendogramu vytvořeného na základě ISSR detekce vyplývá, že populačně nejbližší jsou si vzorky: Manešovice – Horažďovice; vzorek pocházející z pozemku JU ZF sbíraný v červnu (ZF 6) – vzorek pocházející z pozemku JU ZF sbíraný v dubnu (ZF 4); Kadov – Babice; Budiškovice – Val. Dále lze k sobě přiřadit vzorky: Studená – Hostkovice, ikdyž populační podobnost je zde o něco menší. Na nižší úrovni populační shody pak vzniká cluster: Manešovice – Horažďovice – ZF6 – ZF4 – Kadov – Babice. Na tento cluster o něco menší genetickou shodou navazují Budiškovice,

Val a Hory. Další navazující populace s klesající podobností se k předešlým populacím přiřazují populace od obce Vatín, následně Studená shodně s Hostkovicemi a nakonec s nejmenší populační podobností populace sbírané poblíž obce Předín.

### 9.3 Amplifikace genu VSSC

Fragmenty genu VSSC ohraničené primery VSSC 1-4 se při PCR nepodařilo amplifikovat. Amplifikaci primery VSSC 3417 Forward a VSSC 5405 Reverse tedy nebylo možné vyzkoušet.

## 10. Diskuse

### 10.1 Izolace DNA

Vzhledem k opakovaně neúspěšným pokusům s DNA z b. řepkového izolovanou pomocí Chelexu 100, lze za spolehlivější metodu izolace DNA brouků považovat metodu využívající CTAB – PVP. Předpokládaným důvodem neúspěchu PCR s templátovou DNA izolovanou Chelexem 100 je vysoká kontaminace vzorků sacharidy. Po izolaci Chelexem 100 bylo vyzkoušeno i následné přečištění vzorku srážecí sekvenační reakcí, ale ani poté se nedaly vzorky po PCR na gelu spolehlivě vizualizovat.

### 10.2 ISSR

Blýskáček řepkový je velmi rozšířený škůdce, jehož genom nebyl doposud prozkoumán. Vzhledem k jeho rychle vzrůstající rezistenci k běžně užívaným insekticidům je zapotřebí najít molekulární příčinu odolnosti škůdce, pochopit mechanismus vzniku této rezistence a na základě toho přijít na účinné řešení. Metoda ISSR byla vybrána právě kvůli nedostatku informací o genomu b. řepkového. Genetické variace populací byly analyzovány ISSR markery v závislosti na geografickém umístění i na rozdílném stupni rezistence. Při rozsáhlejším výzkumu mohou ISSR markery pomoci objasnit základ genetického polymorfismu v závislosti k rezistenci a tím přispět k odhalení principu jejího vzniku. Informace získané v této práci poslouží jako základ pro další ISSR analýzy s jinými mikrosatelitními sekvencemi.

Analýza ISSR markery byla původně zkoušena pěti mikrosatelitními sekvencemi, z nichž dvě (primery č. 810 a 845) při několika opakováních DNA b. řepkových vůbec neamplifikovaly. Primery č. 812 a 880 na DNA b. řepkových vcelku úspěšně nasedaly, tvořily však při každém z pokusů jiný počet odlišně dlouhých fragmentů, tzn. ukázaly se jako nespolehlivé a nereprodukovatelné. Amplifikace ohraničená primerem č. 840 vykazovala na separačním gelu při několika opakováních stejný počet stejně dlouhých fragmentů, tzn. primer č. 840 se jako jediný ukázal pro analýzu genetického polymorfismu b. řepkových spolehlivý a reprodukovatelný. Metoda se ukázala pro populační analýzu b. řepkových vhodná a po zvolení vhodného primeru snadno reprodukovatelná.



ISSR markery se celkově pro populační analýzu osvědčily. Velkou výhodou je především využití pro nezmapovaný genom, metodická nenáročnost a ve srovnání s některými dalšími molekulárními markery i nízká cena. Metodickým postupem a využitím se ISSR nejvíce podobá metodě RAPD. Oproti RAPD jsou však výsledky ISSR reprodukovatelnější a časová i finanční náročnost nižší. Reprodukovatelnost výsledků metody ISSR a AFLP je srovnatelná, AFLP je však finančně náročnější. Další výhodou využití ISSR při populační analýze je velká variabilita a vsudypřítomnost mikrosatelitních sekvencí v DNA, na základě čehož se od sebe populace dobře odlišují. Nevýhodou metody ISSR je, že se jedná o dominantní markery, nerozlišují se tedy homozygoti od heterozygotů a během analýzy se předpokládá, že se zkoumané populace nachází v Hardy – Weinbergově rovnováze (HWE).

Stejně jako ve své práci uvádí Kazachkova (2007), která se zabývala podobnou populační analýzou b. řepkových ve Švédsku, i tato práce ukázala velký genetický polymorfismus mezi geograficky vzdálenějšími populacemi. Lineární závislost mezi genetickou a geografickou vzdáleností však neexistuje. V závislosti ke stupni rezistence, který ve své práci uvádí Havel a kol. (2015) použitá mikrosatelitní sekvence neprokázala žádné významné genetické shody v rámci stejně rezistentních populací. Tím se vylučuje pouze vztah k rezistenci pouze této konkrétní mikrosatelitní sekvence, nikoli celé metody. Dá se předpokládat, že použití dalších ISSR primerů prokáže vztah mezi stupněm rezistence a umístěním mikrosatelitních sekvencí v DNA. ISSR markery se ukázaly jako spolehlivá, reprodukovatelná metoda při populační analýze b. řepkového

### 10.3 Amplifikace genu VSSC

S přihlédnutím k dobrým výsledkům PCR s jinými primery lze vyloučit, že neúspěšnou amplifikaci VSSC genu způsobila nekvalitní templátová DNA. Příčinou mohla být například špatně navržená sekvence primerů nebo nepřesně navržený program pro PCR. Pernestál J. (2009) ve své práci však uvádí, že PCR s primery VSSC 1-4 fungovala bez větších problémů, potíže se objevily až při reamplifikaci s primery navrženými pro čtvrtou doménu VSSC 3417 Forward a VSSC 5404 Reverse. Pro optimalizaci metody je zapotřebí přehodnotit dostatečnost komplementarity sekvence primerů k templátové DNA obou reakcí. Zkontrolovat teplotu nasedání daných primerů a případně si ji ověřit pomocí gradientové PCR.

## 11. Závěr

Pomocí ISSR markerů byl prokázán genetický polymorfismus u populací blýskáčka řepkového s různou rezistencí k insekticidům. Populace byly úspěšně odlišeny a srovnávány na základě jedné mikrosatelitní sekvence. Dále byla prokázána vhodnost a reprodukovatelnost použití ISSR markerů při detekci polymorfismů b. řepkového. Pro průkaznější výsledky budou však populace dále zkoumány pomocí více ISSR primerů. Dalším krokem pro určení korelace vztahu rezistence a DNA sekvence bude amplifikace genu kódující sodíkové iontové napětím řízené kanály a genu kódující acetylcholinové esterázy. Mutace těchto genů by mohly přímo souviset se vznikem rezistence u blýskáčka řepkového. V případě VSSC bude snaha o optimalizaci již zkoušené PCR a případně budou navrženy nové sekvence primeru pro tento gen. Dokud nebude plně objasněn mechanismus vznik rezistence u b. řepkových, nejúčinnější ochrannou proti dalšímu šíření rezistentních populací zůstane důkladný monitoring a dodržování antirezistentních opatření.

## Bibliografie

- Brogdon, W. G., & McAllister, J. C. (1998). *Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases*. 4(4): 605-613 s.
- Čača, Z., & kol. (1990). *Ochrana polních a zahradních plodin*. Státní zemědělské nakladatelství. 362 s.
- Čapková Frydrychová, & kol. (2012). *Kurz základních metod molekulární biologie*. Biologické centrum AV ČR.
- Čurn, V., & kol. (2012). *Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genetických zdrojů řepky (Brassica napus L.) a hodnocení jejich diverzity*. Biotechnologické centrum JU ZF České Budějovice.
- Dong, K. (2007). *Insect sodium channels and insecticide resistance*. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1): 17-30 s.
- Feyereisen, R. (1999). *Insect P450 enzymes*. *Annual Review Entomology* 44: 507-533 s.
- Ffrench-Constant, R. H., & kol. (2004). *The genetics and genomics of insecticide resistance*. Department of Biology and Biochemistry, University of Bath.
- Fournier, D., & kol. (1992). *Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide*. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(20): 14270-14274 s.
- Häni, F. J., & kol., (1993). *Obrázkový atlas chorob a škůdců polních plodin*. Scienta. 336 s.
- Havel, J., & kol. (2015). *Průběh šíření populací blýskáčka řepkového (Meligethes aeneus) rezistentních k pyretroidům v České republice*. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., provozovna Opava1, Mendelova univerzita Brno2, Zemědělský výzkum spol. s r.o. Troubsko3, Agritec Plant Research s.r.o. Šumperk4.
- IRAC Susceptibility Test Method 11. *Meligethes aeneus* Ver. 3, June 2009
- Karaağaç, U. S. (2012). *Insecticide Resistance. Insecticides – Advances in Integrated Pest Management*. InTech. 722 s.

- Kazachkova, N. (2007). *Genotype Analysis and Studies of Pyrethroid Resistance of the Oilseed Rape (Brassica napus) Insect Pest - Pollen Beetle (Meligethes aeneus)*. 11: 56 s.
- Kazda, J., & kol. (2003). *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*. Profi Press s.r.o. 116 s.
- Kazda, J., & kol. (2008). *Metodika integrované ochrany řepky*. SPZO s.r.o. 78 s.
- Kristensen, M. (2005). *Glutathione S-transferase and insecticide resistance in laboratory strains and field populations of Musca domestica*. Journal of Economic Entomology 98(4): 1341-1348 s.
- Liu, Z. V. (2000). *Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 30(10): 991-997 s.
- Matsumura, F. (2012). *Toxicology of Insecticides*. Springer Science & Business Media. 504 s.
- Mezghani Khemakhem, M. (2005). *Genetic diversity of Mayetiola destructor and Mayetiola hordei (Diptera: Cecidomyiidae) by intersimple sequence repeats (ISSRs)*. African Journal of Biotechnology 4(7): 601-606 s.
- Miller, F. (1956). *Zemědělská entomologie*. ČSAV. 1056 s.
- Mueller, U. G., & Wolfenbarger, L. L. (1999). *AFLP genotyping and fingerprinting*. Trends in Ecology & Evolution, 14(10): 389–394 s.
- Pernestål, J., (2009). *Molecular analysis of insecticide resistance in pollen beetle (Meligethes aeneus)*. Department of Plant Biology and Forest Genetics Swedish University of Agricultural Sciences. 30 s.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

- Savelkoul, P. H., & kol. (1999). *Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art*. Journal of Clinical Mikrobiology. 37(10): 3083-3091 s.
- Shafer, T. J., & kol. (2005). *Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs*. Environmental Health Perspectives, 113(2): 123-136 s.
- Soderlund, D. M. (2003). *The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides*. Insect Biochemistry And Molecular Biology. 33(6): 563-577 s.
- Soderlund, D. M. (2008). *Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels*. Pest Management Science. 64(6): 610-616 s.
- Soderlund, D., & Knippe, D. (2003). *The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33(6): 563-577 s.
- Šefrová, H. (2006). *Rostlinolékařská entomologie*. Konvoj. 257 s.
- Šenoldová, P., & Lokaj, Z. (2008). *Taháky z fytofarmakologie - mechanismus zoocidních účinných látek II*. Rostlinolékař. 2(1): 34-35 s.
- Todd, G. D. & kol. (2003). *Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 328 s.
- Tóth, P., & Hudec, K. (2007). *Škodcovia a choroby repky olejky Integrovaná ochrana*. Naše pole, s.r.o. 247 s.
- Vašák, J. (2000). *Řepka*. Agrospoj. 322 s.
- Weising, K. & kol. (2005). *DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications*. Taylor & Francis Group. 444 s.
- Williams, I. H. (2010). *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Springer Science Busines Media B.V. 461 s.
- Zlotkin, E. (1999). *The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides*. Annual Review of Entomology. 44: 429-455 s.