

Diplomová práce

Bc. Lucie Křížová

2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

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

Diplomová práce

Monitoring populací blýskáčka řepkového s
využitím metod časně detekce rezistence
pomocí molekulárních metod

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

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

Autor diplomové práce: Bc. Lucie Křížová

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie KRÍŽOVÁ**
Osobní číslo: **Z17077**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Monitoring populací blýskáčka řepkového s využitím metod
časné detekce rezistence pomocí molekulárních metod**
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

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

Intenzivní zemědělství a s tím související užívání insekticidů zvyšuje i selekční tlak na populace škůdců. Monitoring rezistence škůdců proti POR je nezbytnou součástí všech programů ochrany rostlin. Rezistence k insekticidům je vážným problémem, vzhledem k tomu, že počet případů rezistence škůdců k POR neustále roste. Poznání molekulárních mechanismů vzniku a fixování genů rezistence v populaci je klíčové pro studium oddálení rezistence a v rozhodování o další strategii ochrany proti škůdcům. Populace b. řepkového rezistentní k pyretroidům se objevují postupně na celém území ČR. Rezistence je monitorována biologickými testy, které přinášejí výsledky ex post. Naproti tomu časná molekulární detekce rezistence je důležitá pro dlouhodobý management v ochraně rostlin a správné rozhodnutí o strategii ochrany v momentě, než dojde k vytvoření rezistence.

Cílem diplomové práce je monitoring populací blýskáčka řepkového s využitím metod časné detekce rezistence pomocí molekulárních a genetických metod s přihlédnutím ke genotypové variabilitě na základě geneticky podmíněných markerů rezistence, vedoucí ke zjištění distribuce genotypů rezistentních a nerezistentních populací a identifikace genů rezistence u populací b. řepkového.

Digitálně podepsaný
Lucie Krížová
Osobní číslo: Z17077
Datum: 2018.03.20
14:52:15

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:


- Slater, R. , Ellis, S. , Genay, J. , Heimbach, U. , Huart, G. , Sarazin, M. , Longhurst, C. , Müller, A. , Nauen, R. , Rison, J. L. and Robin, F. (2011), Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest. Manag. Sci.*, 67: 633-638. doi:10.1002/ps.2101
- Zimmer, C. T. and Nauen, R. (2011), Pyrethroid resistance and thiacloprid baseline susceptibility of European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) collected in winter oilseed rape. *Pest. Manag. Sci.*, 67: 599-608. doi:10.1002/ps.2137
- Zimmer C.T., Bass C., Williamson M.S., Kaussmann M., Wolfel K., Gutbrod O., Nauen R. (2014), Molecular and functional characterization of CYP6BQ23, a cytochrome P450 conferring resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45: 18-29. doi:10.1016/j.ibmb.2013.11.008.
- Seidenglanz M., Poslušná J., Rotrekl J., Kolařík P., Hrudová E., Tóth P., Havel J., Spitzer T., Bernardová M. (2015), Changes in *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) susceptibility to lambda-cyhalothrin in the Czech Republic between 2009 and 2011. *Plant. Prot. Sci.* 51, 13-32. doi: 10.17221/34/2014-PPS

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

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 28. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2019


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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvák 1668, 370 05 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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 poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za ochotu a odbornou pomoc při vypracování této práce.

Abstrakt

Práce se zabývá molekulární detekcí rezistence vůči pyretroidům u populací blýskáčka řepkového na základě genetických polymorfismů v genu VSSC tohoto škůdce. Vzorky populací blýskáčka řepkového byly sbírány v letech 2016–2018 převážně v jihozápadních Čechách. Analyzováno bylo celkem 57 populací blýskáčka řepkového s různým stupněm rezistence vůči pyretroidům. Nukleotidové mutace jednotlivých populací byly monitorovány ve dvou oblastech genu VSSC blýskáčka řepkového – DIIS4 – S5 linker/DIIS5 a DIIS6, které se nachází ve vazebné doméně VSSC. Tyto oblasti byly amplifikovány a následně sekvenovány Sangerovou metodou. V alignmentu z výsledných sekvencí byly vyhledávány mutace. Následně byl určen vliv těchto mutací na aminokyselinovou sekvenci a posouzen efekt na výslednou konformaci VSSC proteinu.

Klíčová slova: blýskáček řepkový, VSSC, pyretroidy, rezistence

Abstract

The thesis deals with molecular detection of resistance in populations of pollen beetle based on genetic polymorphisms in the VSSC gene of this pest. Population samples were collected in 2016–2018 in the Czech Republic, mainly in the Southwestern Bohemian Region. A total of 57 populations of pollen beetles with different degrees of resistance were analyzed. Nucleotide mutations of populations were monitored in two parts of the VSSC gene of pollen beetles - DIIS4 - S5 linker / DIIS5 and DIIS6 gene, which is located in the VSSC binding domain. These parts were amplified and sequenced by the Sanger method. In the alignment of final sequences, mutations were searched. After that, the effect of these mutations on the amino acid sequence was determined and the effect on the resulting VSSC protein conformation was assessed.

Key words: pollen beetle, VSSC, pyrethroids, resistance

Obsah

1 Úvod	11
2 Modelový organismus blýskáček řepkový	12
2.1 Morfologie vývojových stádií	12
2.2 Hostitelské plodiny	12
2.3 Bionomie	13
3 Průběh šíření rezistentních populací v Evropě	13
3.1 Test citlivosti populací	15
4 Ochrana proti blýskáčku řepkovému	15
5 Mechanismy rezistence	17
6 Gen VSSC	18
7 Cíle práce	20
8 Materiál a metodika	21
8.1 Sběr vzorků	21
8.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP	22
8.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
8.4 Klonování	24
9 Výsledky	24
9.1 Amplifikace úseků DIIS4 – S5 a DIIS6 z podjednotky alfa genu VSSC.....	24
9.2 Porovnání oblastí DIIS4–S5 a DIIS6 genu VSSC algoritmem BLAST.....	25
9.3 Analýza úseku DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5.....	26
9.4 Analýza úseku DIIS6	31
10 Diskuse.....	35
11 Závěr	40
Seznam použité literatury	41
Seznam obrázků.....	44
Seznam tabulek.....	44
Přílohy	45

1 Úvod

Řepka olejka je hojně pěstovanou plodinou v celé Evropě. V České republice je pěstovaná každoročně na ploše větší než 300 tis. ha a je tak nejvýznamnější pěstovanou olejinou. Pro pěstitele je řepka velmi výhodnou plodinou hned z několika důvodů. Jedním z nich je vysoká poptávka po této plodině, ke které vede nejen převažující využití v potravinářství pro výrobu řepkového oleje, ale i zavedení povinného přimíchávání biosložek do pohonných hmot.

Blýskáček řepkový (dále také b. řepkový) je v současnosti nejvýznamnějším škůdcem řepky olejky. Jeho škodlivost a šířící se rezistence vůči pyretroidům je často diskutována ať už mezi vědci či pěstiteli. Jeho negativní vliv na pěstování a výnosy řepky zaznamenaly téměř všechny země Evropy. Bez chemické ochrany může docházet na zasažených porostech k velkým agroekonomickým ztrátám. Z toho důvodu je stále vzrůstající rezistence tohoto škůdce k insekticidům velkým zemědělským problémem. Je důležité pochopit mechanismus rezistence pro předcházení dalšímu šíření rezistentních populací nejen vůči pyretroidům, ale v budoucnu možná i vůči dalším insekticidním látkám.

Přestože insekticidy neodmyslitelně patří k dnešnímu intenzivnímu zemědělství, je třeba brát v úvahu i důsledky používání těchto chemikálií na životní prostředí. Je nutné využívat biologických alternativ a snažit se snižovat používání obecně všech pesticidů na minimum. Právě nadměrným používáním pyretroidů vznikla rezistence u populací b. řepkového. V praxi běžně dochází k aplikaci insekticidů proti těmto škůdcům bez předešlé kontroly napadení porostu nebo k používání nevhodných dávek těchto insekticidů. Proto je důležité nejen objasnit mechanismus vzniku rezistence, ale také šířit tyto informace o anti-rezistentních opatřeních mezi pěstitele, kteří v konečném důsledku situaci nejvíce ovlivňují.

2 Modelový organismus blýskáček řepkový

2.1 Morfologie vývojových stádií

Blýskáček řepkový (*Meligethes aeneus*, *Coleoptera: Nitidulidae*; Obr. 1) je brouk s proměnou dokonalou. Vajíčka blýskáčka jsou 0,81 mm dlouhá a 0,29 mm široká. Mají šedobílou až mléčnou barvu a válcovitý, na koncích zaoblený tvar s hladkým a lesklým povrchem.



Obr. 1 Dospělci b. řepkového Zdroj: web2.mendelu.cz (2019)

Larvy jsou podlouhlé, až 4,4 mm dlouhé, mléčně bílé s černou hlavou. Ostatní tělní segmenty mají po obou dorzolaterálních stranách hnědočerné skvrny. Kukly jsou průměrně 2,35 mm dlouhé, krémově bílé, oválné a ventrálně zploštělé (Osborne, 1965).

Velikost dospělců se pohybuje mezi 1,9 – 2,7 mm. Mají oválný tvar se široce zaoblenou přední i zadní částí a poměrně širokou hlavou. Zbarvení je černé s výrazným kovovým, nazelenalým, modravým nebo purpurovým leskem, nohy mají mírně bledější zbarvení (Osborne, 1965).

2.2 Hostitelské plodiny

Mezi hlavní hostitelské plodiny blýskáčka řepkového v Evropě patří různé druhy řepky a hořčice. Jako škůdce je znám především pro jeho škodlivý efekt na řepku olejkou. Kvalita hostitelské plodiny ovlivňuje velikost vajíček blýskáčka řepkového (Ekbom a Popov, 2004). V době, kdy hlavní hostitelské rostliny nekvetou, se blýskáček řepkový krmí pylem květů velkého počtu druhů rostlin, zvláště na začátku jara a konci léta. Byl například hlášen i jako škůdce jahod (Cross a Easterbrook, 1998).

2.3 Bionomie

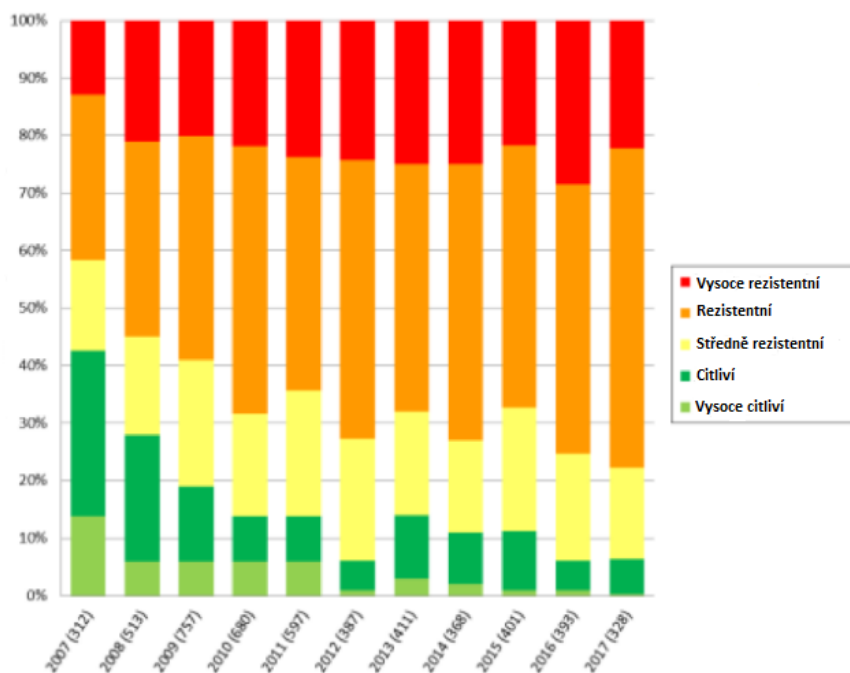
Blýskáček řepkový je univoltinní druh. Dospělci na jaře vylézají ze svých zimovišť v lesích nebo v jiných chráněných neobdělávaných místech. Aktivně létají při teplotách vyšších než 12–15 °C. Než se usídlí na své hostitelské plodině krmí se pylem všech dostupných kvetoucích rostlin. Vajíčka kladou do pupat hostitelských plodin. Zde se z vajíček líhnou larvy, které se stejně jako dospělci, krmí pylem. Vývoj trvá 9–13 dní. Poté larvy z pupat vypadávají na zem a zavrtávají se do půdy, kde se kuklí. Noví dospělci se živí opět pylem různých kvetoucích rostlin a následně přezimují (Alford a kol., 2003).

3 Průběh šíření rezistentních populací v Evropě

Po téměř dvě desetiletí byly v Evropě populace b. řepkového účinně regulovány syntetickými pyretroidními insekticidy. Pyretroidy působí na napětím řízené sodíkové kanály v centrálním nervovém systému hmyzu. Nedostatek jiných dostupných tříd insekticidů s různými způsoby působení vedl k silnému selekčnímu tlaku a rozšíření rezistentních populací po Evropě (Nauen, 2007).

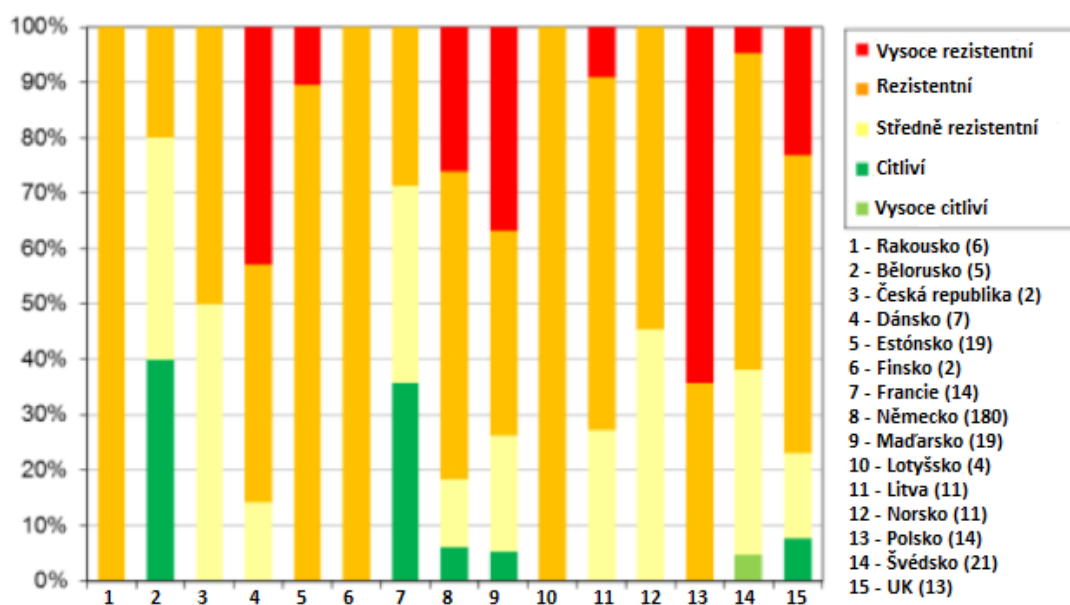
Rezistence vůči insekticidům byla poprvé zaznamenána v roce 1967 u polských populací b. řepkového. První případ rezistence k pyretroidům byl zaznamenán v roce 1999 v severovýchodní Francii (Slater a kol. 2011). Následně byly nalézány další rezistentní populace v mnoha zemích Evropy. Jedním z problémů bylo, že nebyla vyvinuta žádná standartní metoda pro detekci rezistence a nebylo možné rezistenci nijak jednotně kvantifikovat a monitorovat její šíření. V roce 2007 sdružení IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) sestavilo pracovní skupinu zabývající se rezistencí tohoto škůdce a vytvořila dnes již standardně využívanou metodu pro kontrolu rezistence b. řepkového, tzv. lahvičkový test (Slater a kol. 2011).

Počet populací rezistentních vůči pyretroidům se od roku 2007 neustále zvyšuje (obr.2). Je však důležité přihlídnout k faktu, že země a počet vzorků zařazených do průzkumu se během let měnil.



Obr. 2 Nárůst rezistentních populací v Evropě v letech 2007–2017 Zdroj: IRAC (2018)
(v závorkách jsou uvedeny celkové počty populací testovaných v daném roce)

V roce 2017 byly více než tři čtvrtiny testovaných populací v Evropských zemích rezistentní a jako citlivé bylo označeno celkově méně než 10 % populací (obr.3). Po počátečním snížení počtu citlivých populací mezi lety 2007 a 2010 však nedochází k výrazným změnám procentuálního zastoupení rezistentních populací. Vysoký stupeň rezistence vykazovaly i populace ze Španělska, Řecka a Rumunska v roce 2016. V roce 2017 nebyly populace z těchto zemí testovány (IRAC, 2018).



Obr. 3 Rezistence b. řepkového v zemích EU v roce 2017 Zdroj: IRAC (2018)

Příznivé je, že většina populací b. řepkového v Evropě zůstává citlivá vůči neonikotinoidním pesticidům. Ale i u těchto insekticidů se počty populací s nižší citlivostí zvýšily z 8 % na 16 %. Dokonce došlo i k nárůstu počtu populací, u kterých byla pozorována mortalita b. řepkového nižší než 50 %. Většina vzorků s takto nízkou mortalitou pocházela z Polska. Zatím také nic nenasvědčuje snížení citlivosti b. řepkového vůči organofosfátům a karbamátům (IRAC, 2018).

3.1 Test citlivosti populací

Tzv. lahvičkový test, vyvinutý německou organizací zabývající se rezistencí – IRAC, se používá pro zařazení zkoumaných organismů do skupin dle stupně rezistence k dané látce. Pro testování se využívá metodika Susceptibility Test Method No. 11. Do zkumavek se rovnoměrně rozetře 100 % a 20 % registrované dávky testovaného insekticidu. Vzorek každé populace se poté vloží do takto připravených zkumavek a do jedné kontrolní bez insekticidu. Po 24 hodinách se odečítá mortalita jedinců.

V případě, že je u vzorku 100% mortalita i u 20% koncentrace insekticidu, je tato populace označena za velmi citlivou s klasifikačním stupněm jedna. Pokud je u 100% koncentrace insekticidu stále 100% mortalita, ale u 20% dávky je mortalita nižší, je populace zařazena do klasifikačního stupně dva a považována za citlivou. Je-li mortalita u 100% dávky 90-99% je považována za středně rezistentní s klasifikačním stupněm tři. Jestliže se mortalita u 100% dávky pohybuje mezi 50-89 %, řadí se do klasifikačního stupně čtyři a je označena za rezistentní. Mortalita menší než 50 % při 100% dávce insekticidu řadí populace mezi vysoce rezistentní s klasifikačním stupněm pět (IRAC,2009).

4 Ochrana proti blýskáčku řepkovému

Pěstování řepky se při současném enormním výskytu blýskáčků řepkových neobejde bez ochrany proti tomuto škůdci. Největší ekonomické škody způsobí při časném výskytu na pomalu se vyvíjejících poupatech u slabších porostů. V takovém případě mohou hrozit až 70% ztráty výnosu. Obvykle bývá více ohrožena řepka jarní než ozimá, ta je schopna vzniklá poškození alespoň zčásti kompenzovat. Přesto je u obou odrůd často nezbytné použít chemickou ochranu porostu (Tóth a Hudec, 2007).

Pro snížení vzniku rezistence by se měla před samotnou aplikací pesticidů provést kontrola zamoření porostu a tím určit, zda je chemická ochrana nutná. Jedním ze způsobů detekce zamoření je spočítat průměrný počet blýskáčků řepkových na vrcholové květenství řepky. Zpravidla se spočítají škůdci na dvaceti odlišných místech. Na každém se spočítají brouci na pěti rostlinách vedle sebe a počty se zprůměrují. Detekuje se zvláště průměr po obvodu osevní plochy, to je do 50–100 m od okraje, a průměr ve středu osevní plochy. S ohledem na letovou aktivitu škůdců při teplotách nad 12 °C se doporučuje provádět detekci po 17 hodině večer nebo před 7 hodinou ráno (Muška, 2009).

Kritické hodnoty počtu brouků na rostlinu se liší v různých vývojových fázích řepky. Pro rostlinu ve fenologické fázi BBCH 51, kdy jsou poupata řepky ještě uzavřená, je kritický počet 1-2 škůdci na rostlinu. V růstové fázi BBCH 53 je porost ohrožen při výskytu průměrně 4 škůdců na rostlinu. Krátce před květem, v růstové fázi BBCH 55-57, je kritický počet škůdců na rostliny 5-6. Tato čísla se však v praxi dají považovat pouze za orientační vzhledem k vysokým kompenzačním schopnostem řepky u silných porostů (Kazda, 2012).

První chemické ošetření by se mělo aplikovat, jsou-li překročeny kritické hodnoty, v době začátku prodlužovacího růstu (BBCH 50-51). Rostliny jsou v této fázi asi 20 cm vysoké a základ květenství je krytý zelenými lístky. Provádí se buď okrajové ošetření do hloubky 50 m nebo se porost ošetřuje až do hloubky cca 100 m. Při této aplikaci dochází k hubení i dalších škůdců jako jsou krytonosec řepkový, krytonosec čtyřzubý a krytonosec šešulový (Kužma a kol., 1999).

Nejdůležitější v ochranně proti b. řepkovému je aplikace insekticidu v období prvních dorostlých pupat na okrajích vrcholových květenství, kdy v poupatech prosvítají korunní plátky (BBCH 59). Chemická ochrana se provádí při překročení výskytu škůdců v průměru dvou jedinců na jedno vrcholové květenství. Pokud po tomto ošetření dosáhne zamoření opět prahových hodnot, lze provést další ošetření ještě před květem. Jinak se další a obvykle poslední aplikace provádí v době tvorby větví prvního řádu až začátkem květu (BBCH 60). Je-li dlouhý začátek květu a počet škůdců přesahuje práh škodlivosti, který je v tomto případě v průměru 300 brouků na 100 postranních dosud nekvetoucích květenství, je možné ošetřit porost i po začátku květu. V takovém případě musejí být aplikovány insekticidní přípravky neškodné pro včely (Kužma a kol., 1999).

Dojde-li pouze k lokálnímu napadení některých míst v porostu, ošetřují se pouze tyto napadené části. Při jednotlivých aplikacích se používají insekticidy s odlišnými účinnými látkami. Aplikace se provádí buď před sedmou hodinou ráno nebo po sedmnácté hodině večer, kvůli snížené letové aktivitě škůdců. Při teplotách nižších než 15 °C jsou účinné jen látky na bázi pyretroidů (Kužma a kol. 1999).

Kromě chemických přípravků lze v ochraně proti blýskáčkovi řepkovému využít i biologickou ochranu. Jednou z obranných metod je vysetí jiné kvetoucí plodiny po obvodu hlavní plodiny, v tomto případě řepky. Tato plodina má nalákat škůdce na své květy, především v době poupat, kdy mohou být způsobeny největší škody (Seidenglanz a Poslušná, 2009). Kazda a kol. (2008) na základě svého pozorování popsali v souvislosti s blýskáčkem řepkovým tzv. okrajový efekt. To znamená, že škůdce způsobuje největší škody právě po okrajích osevních ploch. Největší zamoření škůdcem bývá jen několik desítek metrů od okrajů polí. Obsevem pro škůdce lákavou plodinou se tento okrajový efekt zesílí, nedojde k takovému napadení řepky, a umožní to případnou lokální chemickou ochranu.

Mimo striktně chemické nebo biologické postupy je nově využíván systém tzv. integrované ochrany rostlin. Tento systém spojuje biologické a chemické postupy tak, aby docházelo k minimálnímu škodlivému vlivu na životní prostředí a zároveň byly škodlivé organismy udrženy pod prahem škodlivosti (Kazda a kol. 2008).

5 Mechanismy rezistence

Pyretroidy jsou nejčastěji využívanými insekticidy proti b. řepkovému. Jejich časté používání vytvořilo obrovský selekční tlak, na jehož základě vznikly a rozšířily se rezistentní populace tohoto škůdce.

Známe jsou dva hlavní mechanismy rezistence vůči pyretroidům. Prvním je zvýšená detoxikace metabolitů. Tuto rezistenci způsobuje především zvýšená exprese monooxygenázy cytochromu P450. Konkrétně cytochrom P450 CYP6BQ23 je považován za hlavní detoxikační agens způsobující rezistenci k pyretroidům, díky své schopnosti hydroxylovat alkoholovou skupinu pyretroidů na méně toxický hydroxy-metabolit (Zimmer a kol., 2014)

Druhým mechanismem rezistence je tzv. knock-down rezistence (KDR). Při tomto typu rezistence dochází ke změně konformace cílového místa. Insekticid pak ztrácí

schopnost se do takto změněného cílového místa vázat, a snižuje se nebo zaniká účinek insekticidu na cílový organismus. KDR může být způsobena jednou nebo více bodovými mutacemi v cílovém místě. To následně vede k aminokyselinovým substitucím, které redukuje vazebnou afinitu pyretroidů (Wrzesińska a kol., 2014).

Rezistence u b. řepkového není omezena na konkrétní pyretroidní látku, jsou odolní převážně proti všem přípravkům na bázi pyretroidů. Proti jednotlivým látkám vzniká tzv. křížová rezistence, kdy populace rezistentní vůči jedné látce je zároveň rezistentní vůči jiné, strukturně podobné látce, přesto že si k ní rezistenci předem nevytvořila. Vlivem křížové rezistence je odolnost vyšší u sloučenin, které jsou strukturně podobné, např: lambda-cyhalothrin a deltametrin, ve srovnání se sloučeninami s odlišnou strukturální stavbou jako je bifenthrin, etofenprox a taufluvalinát (Zimmer a Nauen, 2011).

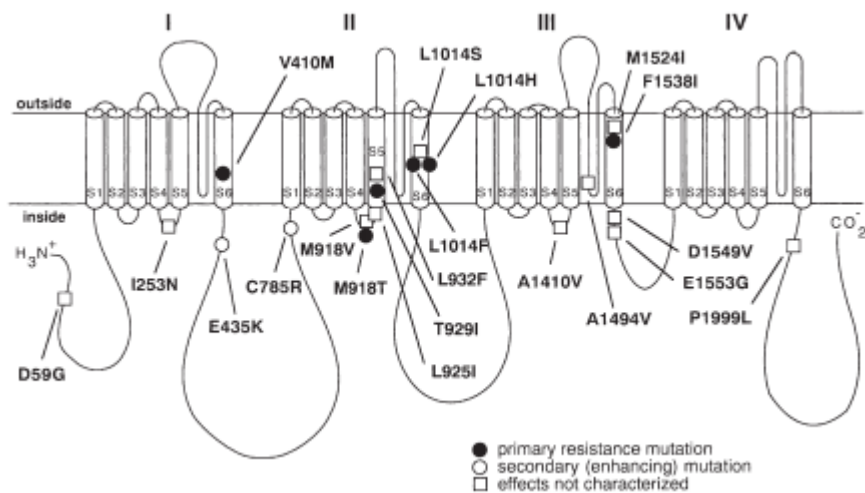
Už v minulosti používání insekticidu s účinnou látkou dichlor-difenyl-trichlorethan (DDT) způsobilo vznik křížové rezistence i vůči pyretroidům, které mají stejný mechanismus působení (Soderlund, 2008).

6 Gen VSSC

Pyretroidy jsou silnými neurotoxiny a pro jejich vysokou účinnost jsou nejčastěji používanou chemickou látkou v zemědělství. Cílovým místem působení této skupiny insekticidů jsou napětím řízené sodíkové kanály – VSSC (voltage-sensitive sodium channel). Proteiny pro VSSC jsou exprimovány v neuronových buňkách centrálního nervového systému hmyzu (Sattelle a Yamamoto, 1988, Narahashi, 1996). Iontový kanál je tvořen transmembránovým proteinovým komplexem. Tento komplex vytváří kanál skrz lipidovou dvojvrstvu plněný vodou. Prostřednictvím kanálu difundují specifické anorganické ionty dovnitř neuronových buněk pomocí elektrochemického gradientu (Zlotkin, 1999). Protein VSSC je cílovým místem primárně pro organochloridy a syntetické pyretroidy. Na rozdíl od iontových kanálů řízených ligandem jsou VSSC ovlivňovány více membránovým napětím než koncentrací neurotransmiterů (Ffrench-Constant a kol., 2004; Brogdon a McAllister, 1998).

VSSC hmyzu (Obr.4) jsou podobné různým savčím sodíkovým kanálům. Tvoří je jedna alfa podjednotka a čtyři beta podjednotky. Alfa podjednotka má molekulovou hmotnost 260 kDa a každá beta podjednotka 30–40 kDa. Podjednotka alfa se skládá ze čtyř homologních repetit (I-IV), každá se šesti transmembránovými segmenty (S1-

S6) (Catterall, 2000, Rinkevich a kol., 2013), které slouží k rychlému vyvolání akčního potenciálu přes membránu, jako odezva na elektrickou signalizaci. Dojde-li k depolarizaci membrány, sodíkový kanál se otevírá. Pokud je kanál otevřený, dochází k proudění sodíkových iontů přes membránu do buňky. Tento mechanismus je pro buňku, a tedy i organismus, životně důležitý a neurotoxiny mezi které patří např. pyretroidy, tento mechanismus blokují a způsobují úhyn organismu (Dong, 2007).



Obr. 4 Struktura VSSC

Zdroj: Soderlund & Knippe, 2003

Předpokládá se, že vazebné místo pro pyretroidy se ve VSSC nachází na hydrofobních stěnách domény II (DII) segmentu S4-S5, DIIS5, DIIS6 a DII P-smyčky. Většina mutací, nalezených v linkeru DIIS4-S5, DIIS5 a DIIS6, způsobila rezistenci vůči pyretroidům. (O'Reilly a kol., 2006).

7 Cíle práce

Cílem práce bylo na základě amplifikovaných oblastí genu VSSC rozlišit rezistentní populace b. řepkového od populací nerezistentních k pyretroidům. Záměrem molekulární analýzy byla amplifikace částí genu VSSC, jejich sekvenování a detekování nukleotidových substitucí s cílem určit smysl těchto substitucí v sekvenci aminokyselin a v konečném důsledku posoudit jejich vliv na konformaci výsledného proteinu. Účelem posouzení vlivu na konformaci VSSC bylo odlišit rezistentní populace b. řepkového na základě molekulární analýzy.

8 Materiál a metodika

8.1 Sběr vzorků

Vzorky populací blýskáčka řepkového byly sbírány v letech 2016–2018 (tab.1) na území České republiky. U vzorků z roku 2016 byla úroveň rezistence populací určena na základě interaktivní mapy se zvýrazněnými lokacemi podle zjištěného stupně rezistence. Mapu vytvořili Havel a kol. (2016) a je volně dostupná na Rostlinolékařském portálu (ÚKZÚZ). Vzorky pocházející ze stejné lokality i roku, byly sbírány v rozdílných časech nebo ve vzdálenosti do 10 km. Byly proto považovány za jednu populaci a využity pro detekci rozdílů v rámci stejných populací.

Tab.1 Seznam vzorků

Místo sběru	Datum sběru	Místo sběru	Datum sběru
ZF JU	4/2016	Blanice	5/2017
Val	5/2016	Čichtice	7/2017
Horažďovice	5/2016	Horažďovice	5/2017
Maněšovice	5/2016	Kozlov	5/2017
Babice	5/2016	Horažďovice	5/2017
Hostkovice	5/2016	Dasný	5/2017
Předín	5/2016	Bavorov	7/2017
Hory	5/2016	Hubenov	5/2017
Budíškovice	5/2016	Chýnov	5/2017
Studená	5/2016	Dobronice u Chýnova	5/2017
Vatín	5/2016	Záhostice	5/2017
ZF JU	6/2016	Dlouhá Lhota	5/2017
Kadov	7/2016	Haklovy Dvory	5/2017
Němčice	5/2017	Bavorov	4/2018
Stříbrňák	5/2017	Číčenice	4/2018
Čichtice	5/2017	Čichtice	5/2018
ZF JU	6/2017	Strunkovice n. Blanici	5/2018
Bílsko	5/2017	Milínov	5/2018
Bavorov	5/2017	Běšiny	5/2018
Koječín	5/2017	Obytce	5/2018
Strakonice	5/2017	Petrovičky	5/2018
Dlouhá Ves	5/2017	Bíluky	5/2018
Bavorov	6/2017	Zborovy	5/2018
Horažďovice	7/2017	Malý Bor	5/2018

Střelské Hoštice	5/2017	Strakonice	5/2018
Horažďovice	5/2017	Koječín	5/2018
Babín	5/2017	Němčice	5/2018
Bavorov	6/2017	Potočiště	5/2018
Lhenice	7/2017		

V roce 2016 bylo analyzováno celkem 13 populací (příloha 1), z roku 2017 bylo analyzováno celkem 29 populací (příloha 2) a v roce 2018 bylo sebráno celkem 15 populací blýskáčka řepkového (příloha 3). Stupně rezistence určené u populací z roku 2016 jsou: Horažďovice – 4, Babice – 5, Hostkovice – 4, Předín – 5, Studená – 5.

8.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP

Vzorky byly izolovány metodou využívající roztok CTAB-PVP (cetyltrimethylamoniumbromid – polyvinylpyrrolidon; Čurn a kol. 2012), která umožňuje získání velkého množství DNA, které je snadno uchovatelné a není náchylné k degradaci.

Ke vzorku populace b. řepkového se do mikrocentrifugačních zkumavek přidá 250 µl předeřhátého pufru CTAB-PVP, 2,5 µl merkaptoetanolu a vzorek se manuálně homogenizuje. Pro lepší rozdrčení lze přidat křemičitý písek. Homogenizované vzorky se inkubují 45 minut při 65°C. Následně se vzorky centrifugují 10 minut při 12 000 rpm a vytvořený supernatant se přepipetuje do nových mikrocentrifugačních zkumavek. K supernatantu se přidá 500 µl chloroformu s IAA (isoamylalkohol). Roztok se nechá 10 minut protřepávat a následně 5 minut centrifugovat při 12 000 rpm. Supernatant se opět převede do nových mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 80 µl 5% CTAB a 500 µl směsi chloroformu s IAA. Roztok se znovu nechá 10 minut protřepávat a 5 minut centrifugovat při 14 000 rpm. V čistých mikrocentrifugačních zkumavkách se vzniklý supernatant smíchá s 250 µl isopropanolu a nechá se přes noc při -20 °C.

Po vyjmutí z mrazáku se vzorky ve 4 °C centrifugují 5 minut při 14 000 rpm. DNA se usadí na dně zkumavky. Supernatant se slije, k DNA se přidá 300 µl 1x TE a následuje 45 minut inkubace při 37 °C. Roztok se smíchá s 600 µl ledového 96% etanolu a přes noc se nechá inkubovat při -20 °C.

Po inkubaci se vzorky 10 minut centrifugují ve 4 °C při 14 000 rpm. Odstraní se supernatant a přidá se 1 ml 70% etanolu, směs se lehce promíchá a nechá centrifugovat 2 minuty při 4 °C na 14 000 rpm. Supernatant se slije. Pro lepší čistotu

izolované DNA se tento krok zopakuje. Po odstranění supernatanu se vzorky nechají důkladně vysušit. Vysušená DNA se následně rozpustí ve 100 µl TE pufru ve 37 °C. Takto připravené vzorky se skladují při -20 °C.

8.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí PCR reakcí byly namnoženy úseky genu VSSC, konkrétně úseky DIIS4 – S5 a DIIS6 z podjednotky alfa. V prvním případě byla provedena analýza fragmentu DIIS4 – S5 linker/DIIS5 s použitím primerů MaVGb a MaINSR2 a v druhém případě byl analyzován fragment DIIS6, který ohraničují primery VMaOc a MaVPb (viz také Wrzesińská a kol. 2014).

Pro obě PCR reakce byla použita reakční směs obsahující 5 µl master mixu PPP (Top Bio), 0,5 µl forward a 0,5 µl reverse primerů, 3 µl vody Top Bio a 1 µl izolované DNA. PCR reakce s primery MaVGb a MaINSR2 (tab.2) začínala po počáteční denaturaci 3 minuty při 94 °C, následovalo 30 cyklů složených z 20 sekund denaturace při 94 °C, 20 sekund annealingu při 59 °C a 30 sekund elongace při 72 °C. Nakonec proběhla závěrečná elongace 7 minut při 72 °C.

Program pro reakční směs s primery VMaOc a MaVPb (tab.2) se lišil v teplotě annealingu – 51 °C a délce elongace – 20 sekund, jinak byl totožný.

Tab. 2 Primery pro oblasti DIIS4-S5 a DIIS6

Název	Sekvence	Pozice
MaVGb	CTCGAGCTGGGTTTGAAG	2647–2665
MaINSR2	ATTCCCCGCATAAACTCTAAA	2944–2965
VMaOc	CCAATTCGTGAGACAAATATTTAC	4531–4554
MaVPb	ACTTTTCTGGTCTTCCGTCA	4682–4702

Pro ověření množství a čistoty byl výsledný produkt analyzován gelovou elektroforézou na 2% agarózovém gelu. Namnožené fragmenty po PCR byly následně přečištěny pomocí ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific). K 10 µl PCR produktu byly přidány 2 µl ExoSAP-IT™. Vzorky byly umístěny do termobloku a inkubovány 15 minut při 37 °C a následně byl enzym deaktivován 15 minut při 80 °C.

Ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl primeru ve směru požadovaného sekvenování. Takto upravené vzorky byly odeslány k sekvenování Sangerovou metodou do externí laboratoře SeqMe s.r.o.

8.4 Klonování

Pro přesnější čtení začátků a konců obou úseků bylo několik fragmentů ze vzorových populací klonováno do bakterie *Escherichia coli* a následně osekvenováno.

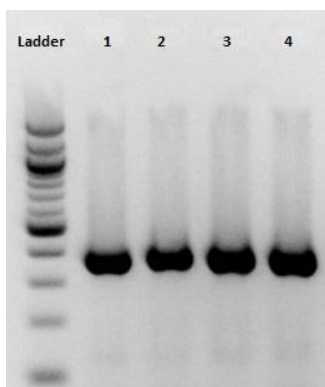
Po PCR byly produkty separované na gelové elektroforéze, z gelu izolované komerčním kitem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Macherey Naegel a zaklonovány pomocí kitu Invitrogene™ TOPO™ TA Cloning™ Kit (Thermo Fisher Scientific). Plazmidová DNA byla izolována kitem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) a následně sekvenována Sangerovou metodou v externí laboratoři SeqMe s.r.o.

9 Výsledky

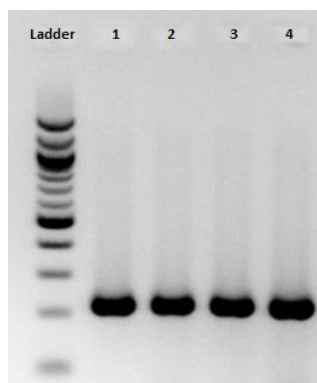
Analyzováno bylo celkem 57 populací b. řepkového, 13 populací z roku 2016, 29 populací z roku 2017 a 15 populací z roku 2018. Z každé populace byly analyzovány čtyři jedinci. Stupeň rezistence u vzorků z roku 2016 byl orientačně určen podle mapy, kterou vytvořili Havel a kol. (2016). Charakterizovány byly dva nukleotidové úseky nacházející se v alfa podjednotce genu VSSC: úsek DIIS4 – S5 linker/DIIS5 a úsek DIIS6.

9.1 Amplifikace úseků DIIS4 – S5 a DIIS6 z podjednotky alfa genu VSSC

Primery pro úsek DIIS4-S5 – MaVGB a MaINSR2 i primery pro úsek DIIS6 – VMaOc a MaVPb nasedaly na templátovou DNA bez problému. Pro oblast DIIS4-S5 amplifikovaly úseky dlouhé přibližně 320 bp (obr.5) a pro oblast DIIS6 vznikaly fragmenty o velikosti přibližně 210 bp (obr.6). Amplifikace obou fragmentů probíhala úspěšně, s vysokou přesností. Výsledné produkty byly kvalitní a v dostatečném množství. Rovněž úspěšně proběhla sekvenační analýza a všechny amplifikované fragmenty byly osekvenovány.



Obr. 5 Úsek DIIS4 – S5

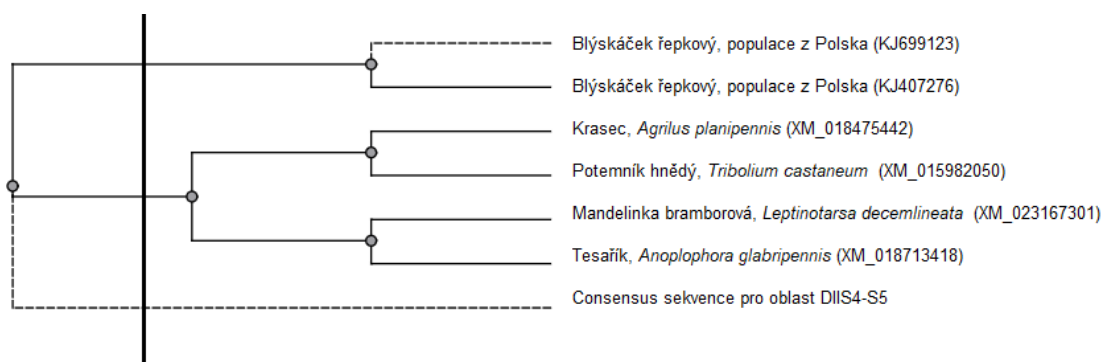


Obr. 6 Úsek DIIS6

9.2 Porovnání oblastí DIIS4–S5 a DIIS6 genu VSSC algoritmem BLAST

U obou charakterizovaných fragmentů byly srovnávány consensus sekvence s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST. Sekvence studovaných fragmentů byly porovnány se sekvencemi VSSC u jiných druhů hmyzu i se sekvencemi genu VSSC blýskáčků řepkových zařazených v databázi.

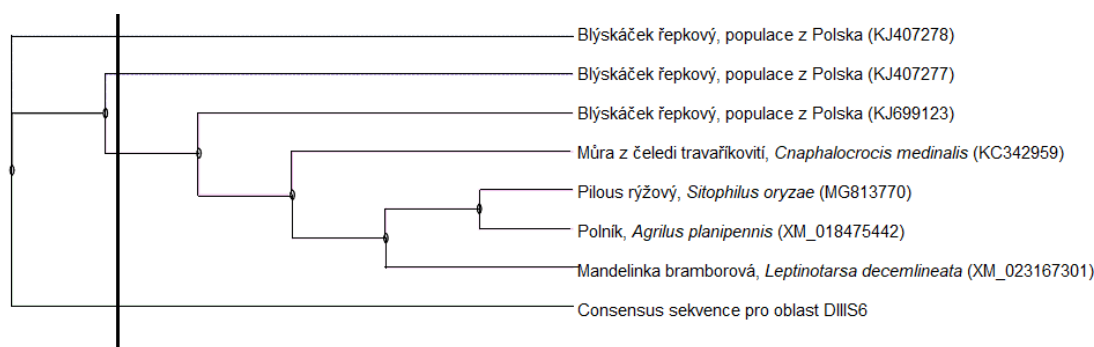
Úsek DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5 se shoduje s ostatními sekvencemi VSSC u blýskáčků řepkových v 99,38 – 99,62 % (KJ407276, KJ699123). Další druhy hmyzu zařazené do porovnání vykazovaly nižší shodu v této sekvenci – mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) v 86,29 % (XM_023167301), tesařík (*Anoplophora glabripennis*) v 85,08 % (XM_018713418), potemník hnědý (*Tribolium castaneum*) v 84,71 % (XM_015982050) a kravec (*Agrius planipennis*) v 82,35 % (XM_018475442, obr.7).



Obr. 7 Porovnání úseku DIIS4-S5 se sekvencemi VSSC u jiných organismů

Srovnání úseku DIIS6 ukázalo 98,4 – 100 % shodu s dalšími sekvencemi blýskáčka řepkového (KJ407278, KJ407277, KJ699123). Další porovnávané druhy hmyzu

vykazovaly nižší shodu v této sekvenci – můra z čeledi travaříkovití *Cnaphalocrocis medinalis* shodná v 89,77 % (KC342959), pilous rýžový (*Sitophilus oryzae*) shodný v 89,77 % (MG813770), polník (*Agrilus planipennis*) shodný v 88,64 % (XM_018475442) a mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) shodná v 88,64 % (XM_023167301, obr.8).



Obr. 8 Porovnání úseku DIIS6 se sekvencemi VSSC u jiných organismů

Při srovnávání sekvencí obou oblastí pomocí algoritmu BLAST a cDNA mouchy domácí (*Musca domestica*, X96668.1) byl detekován intron v oblasti DIIS4 – S5 dlouhý 64 bp od pozice 219 a v oblasti DIIS6 intron dlouhý 53 bp od pozice 122.

9.3 Analýza úseku DIIS4 – S5 linker/DIIS5

Z osekvenovaných vzorků populací Sangerovou metodou se vytvořil alignment a bylo detekováno několik bodových polymorfismů mezi populacemi. Mutace byly posuzovány vůči consensus sekvenci (obr.9). Consensus sekvence byla vytvořena z alignmentu sekvencí vzorků pro oblast DIIS4 – S5 linker/DIIS5.

```

GATCATTGAGATTGCTGAGAGTTTTCAAATGGCCAAATCGTGGCCGACTCTAAATTTACTTTATATCCATTATGGGCAGAACAAATGGGTGCTTTAGGTAATCTA
1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95  100 104
CTAGTAAGTCTAACGACTCTCAAAGTTTAAACGGTTTAGCACCGGCTGAGATTTAAATGAATATAGGTAATACCCGCTTGTGTACCCACGAAATCCATTAGAT

ACCTTCGTGTTGTGATTATTATATTTATATTCGCTGTGATGGGTATGCAACTTTTCGGCAAAAATTATACGGGTAAGGACATTGGGTAAAATATGTATGTAAG
105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 208
TGGAAGCACACACATAAATAATAAATAAAGGACACTACCCATACGTTGAAAAGCCGTTTTTAATATGCCCATTCCTGTAACCCATTTTATACATACATTC

TRCGATTGATATTTTATGTCATGTTCTTTTCAGATAACGTGGACAGGTTTCGGGACCAGATCTACCTCGTTGGAATTTACGGATTTTATGCATTCCTTTATG
209 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 312
AMGCTAACTATAAAATACAGTACAAGAAAAGTCTATTGCACCTGTCCAAGGCCTGGTGCTAGATGGAGCAACCTTAAAGTGCCATAAAATACGTAAGAAAATAC

ATAGTGTTTAGAG
313 320 325
TATCACAATCTC

```

Obr. 9 Consensus sekvence DIIS4 – S5 linker/DIIS5

Pro čtení celých zvolených oblastí byly vybrané vzorky klonovány pomocí plazmidů do bakterie *E. coli* a následně sekvenovány i s plazmidy. Pro oblast DIIS4 – S5 linker/ DIIS5 byla výsledná sekvence i s plazmidem 1530 bp dlouhá, vložený konstrukt obsahoval 383 bp (obr. 10).

```

CTCGAGCTGGGTTTGGGAAGGGGTGCAAGGTTTATCAGTGTTACGATCATTGAGATTGCTGAGAGTTTTCA
12  4  6  8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70
SAGCTCGACCCAAACCTTCCACAGTTCCAAATAGTCACAATGCTAGTAAGTCTAACGACTCTCAAAAGT

AATTGGCCAAATCGTGGCCGACTCTAAATTTACTTATATCCATTATGGGCAGAACAAATGGGTGCTTTAGG
71  75  80  85  90  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140
TTAACCGGTTTAGCACCGGCTGAGATTTAAATGAATATAGGTAATACCCGTCTTGTTACCCACGAAATCC

TAATCTAACCTTCGTGTTGTGTATTATTATATTTATATTCGCTGTGATGGGTATGCAACTTTTCGGCAAA
141 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210
ATTAGATTGGAAGCACACACATAATAATAATAATAAGCGACACTACCCATACGTTGAAAAGCCGTTT

AATTATACGGGTAAGGACATTGGGTAAAATATGTATGTAAGTTCGATTGATATTTTATGTCAATGTTCTTT
211 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280
TTAATATGCCCATTCCTGTAACCCATTTTATACATACATTCAAGCTAACTATAAAAATACAGTACAAGAAA

TCAGATAACGTGGACAGGTTTCCGGACCACGATCTACCTCGTTGGAATTTACGGATTTTATGCATTCTTT
281 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350
AGTCTATTGCACCTGTCCAAAGGCCTGGTGCTAGATGGAGCAACCTTAAAGTGCCTAAAATACGTAAGAA

TTATGATAGTCTTTAGAGTGTATGCGGGGAAT
351 355 360 365 370 375 380 383
AAACTATCACAAATCTCACAAATACGCCCTTA

```

Obr.10 Sekvence klonu DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5 ohraničená primery MaVGb a MaINSR2

V nukleotidových sekvencích bylo nalezeno několik mutací (obr.11,12,13). Některé polymorfismy byly zaznamenány u všech nasbíraných jedinců z jedné populace, další se objevovaly jen u části sbíraných jedinců z dané populace. U takových substitucí se lze domnívat, že se jedná o heterozygoty. K určení heterozygotnosti by však bylo zapotřebí dalších molekulárních analýz. Pro zjednodušení jsou tyto nejednotné substituce dále označeny za heterozygoty. Pozice detekovaných substitucí byla počítána od začátku čtené oblasti určené pomocí klonování.

Na 47. pozici u populace b. řepkového sbírané u Horažďovic v roce 2017 byla detekována heterozygotní alela pro substituci C/A, u populace sbírané u Chýnova v roce 2017 byla heterozygotní alela pro substituci C/T. Na 53. pozici se vyskytoval heterozygotní stav pro substituci G/A u populací brouků pocházejících ze Stříbrňáku z roku 2017 a z Bíluk z roku 2018. Na 66. pozici se vyskytovaly heterozygoti pro substituci T/A v populacích škůdců z Horažďovic, z Vatína, z Kadova a z pozemku ZF JU z roku 2016, ve vzorcích ze Záhostic a Haklových Dvorů z roku 2017 a v populacích z Bíluk a Malého Boru z roku 2018. Další heterozygotní substituce T/A byla nalezena na 141. pozici u populací sbíraných v Bavorově, v Horažďovicích, v Babíně a v Dasném z roku 2017 a na 144. pozici heterozygotní substituce T/C u populací z Dasného sbíraného v roce 2017.

Pozice 140 - 157

Dlouhá Ves/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Bavorov/2017	G	W	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Horažďovice/2017	G	W	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Střelské Hoštice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	Y
Horažďovice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Babín/2017	G	W	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Bavorov/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	C
Lhenice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Blanice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Čichtice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Horažďovice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Kozlov/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Horažďovice/2017	G	T	A	A	T	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T
Dasný/2017	G	W	A	A	Y	C	T	A	A	C	C	T	T	C	G	T	G	T

Obr. 11 Výběr nukleotidových substitucí z oblasti DIIS4-S5 linker/DIIS5

Na pozici 157 byly detekovány substituce u populací škůdce z Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018 z T na C a heterozygotní substituce T/C u populací sbíraných v Babicích v roce 2016 a Střelských Hošticích v roce 2017. Další heterozygotní substituce T/C se vyskytla u populace b. řepkového z roku 2017 sbíraného u Dobronic u Chýnova na pozici 192. Dále u populací z Dasného z roku 2017 a z Petroviček z roku 2018 byla odhalena heterozygotní substituce A/G na pozici 245 a na pozici 249 u populace sbírané v Hubenově v roce 2017 došlo k substituci G za A. Na pozici 252 byla detekována substituce C za T u populace škůdce z Hubenova z roku 2017 a heterozygotní substituce T/C u populací z Babic a Předína z roku 2016, z Lhenic a Haklových Dvorů z roku 2017, a ze Strakonice z roku 2018. Na pozici 253 byla odhalena substituce u populace pocházející z Hostkovic z roku 2016 z T na G a heterozygotní substituce T/G u populací b.

řepkového sbíraných na pozemku ZF JU a v Babicích v roce 2016, v Bavorově v roce 2017 a v Obytcích v roce 2018.

Pozice 244 - 254

Dasný/2017	T	R	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Bavorov/2017	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Hubenov/2017	T	A	T	G	T	G	A	G	C	T	C
Chýnov/2017	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Dobronice u Chýnova/2017	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Záhostice/2017	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Dlouhá Lhota/2017	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Haklovy Dvory/2017	T	A	T	G	T	A	A	G	W	T	C
Bavorov/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Čičenice/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Čichtice/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Strunkovice/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Milínov/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Běšiny/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Obytce/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	K	C
Petrovičky/2018	T	R	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Bíluky/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Zborovy/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	W	T	C
Malý Bor/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C
Strakonice/2018	T	A	T	G	T	A	A	G	T	T	C

Obr. 12 Mutace v oblasti DIIS4 – DIIS5

Na pozici 286 byla detekována heterozygotní substituce T/G u populací brouků sbíraných u Bavorova a Dobronic u Chýnova v roce 2017 a na pozici 289 heterozygotní substituci C/G u populace pocházející z Obytců z roku 2018. Dále byla objevena substituce u populace b. řepkového sbírané v Hostkovicích v roce 2016 z C na T a heterozygotní substituce C/T u populací z Babice z roku 2016, ze Střelských Hoštic a z Bavorova z roku 2017 a u populace sbírané v Obytcích v roce 2018 na pozici 295. Na pozici 334 byla detekována substituce G za C u populace škůdců z Hostkovic sbíraného v roce 2016 a heterozygotní substituce G/C u populací z Babic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. U populace pocházejícího z Hubenova z roku 2017 byla nalezena substituce T za A na 344. pozici. Další heterozygotní substituce C/T byla objevena na 354. pozici u populací pocházejících z pozemku ZF JU a z Bílska z roku 2017 a na 356. pozici heterozygotní substituce A/C u populace z Dasného z roku 2017.

Na 357. pozici byla následně odhalena heterozygotní substituce C/T u populací brouků sbíraných v Blanici, Čichticích, Horažďovicích, Kozlově a Dlouhé Lhotě z roku 2017 a heterozygotní substituce T/A u populace ze Záhostic z roku 2017. Na následující pozici – 358. byla odhalena heterozygotní substituce A/C u populací sbíraných v Haklových Dvorech v roce 2017 a v Petrovičkách v roce 2018. V této oblasti poslední heterozygotní substituce G/A byly objeveny na pozici 361 u populací b. řepkových pocházejících z Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018.

Pozice 356 - 361

Bavorov/2017	A	T	A	G	T	R
Lhenice/2017	A	T	A	G	T	G
Blanice/2017	A	Y	A	G	T	G
Čichtice/2017	A	Y	A	G	T	G
Horažďovice/2017	A	Y	A	G	T	G
Kozlov/2017	A	Y	A	G	T	G
Horažďovice/2017	A	Y	A	G	T	G
Dasný/2017	M	T	A	G	T	G
Bavorov/2017	A	T	A	G	T	G
Hubenov/2017	A	T	A	G	T	G
Chýnov/2017	A	T	A	G	T	G
Dobronice u Chýnova/2017	A	T	A	G	T	G
Záhostice/2017	A	W	A	G	T	G
Dlouhá Lhota/2017	A	Y	A	G	T	G
Haklovy Dvory/2017	A	T	M	G	T	G
Bavorov/2018	A	T	A	G	T	G
Čičenice/2018	A	T	A	G	T	G
Čichtice/2018	A	T	A	G	T	G
Strunkovice/2018	A	T	A	G	T	G
Milínov/2018	A	T	A	G	T	G
Běšiny/2018	A	T	A	G	T	G
Obytce/2018	A	T	A	G	T	R
Petrovičky/2018	A	T	M	G	T	G

Obr. 13 Vybrané bodové mutace oblasti DIIS4-S5 linker/DIIS5

Z nukleotidového alignmentu se pro zjištění smyslu detekovaných mutací vytvořil alignment aminokyselinový (obr.14, 15). U heterozygotních populací byla vytvořena aminokyselinová sekvence pro obě varianty nukleotidů.

Nukleotidové pozice 246 - 260

ZF JU/2016	V	S	A	I	D
ZF JU/2016	V	S	S	I	D
Val/2016	V	S	S	I	D
Horažďovice/2016	V	S	S	I	D
Horažďovice/2016	V	S	S	I	D
Manešovice/2016	V	S	S	I	D
Babice/2016	V	R	S	I	D
Babice/2016	V	S	A	I	D
Hostkovice/2016	V	S	A	I	D
Hostkovice/2016	V	S	A	I	D
Předín/2016	V	R	S	I	D
Předín/2016	V	R	S	I	D

Obr. 14 Vybrané aminokyselinové substituce oblasti DIIS4 – S5 linker/DIIS5

Nukleotidové pozice 332 - 361

Babice/2016	G	F	Y	A	F	F	Y	D	S	V
Babice/2016	R	F	Y	A	F	F	Y	D	S	V
Hostkovice/2016	R	F	Y	A	F	F	Y	D	S	V
Hostkovice/2016	R	F	Y	A	F	F	Y	D	S	I
Předín/2016	G	F	Y	A	F	F	Y	D	S	V

Obr. 15 Vybrané změny v aminokyselinové sekvenci DIIS4 – S5 linker/DIIS5

Na 47. nukleotidové pozici byla detekována změna aminokyseliny ze serinu na leucin u populace sbírané v Chýnově v roce 2017. U populací brouků pocházejících ze Stříbrňáku z roku 2017 a z Bíluk z roku 2018 došlo na 53. pozici k substituci z argininu na lysin. Na pozici 157 došlo k substituci z izoleucinu na valin u populací z Hostkovic, Babic z roku 2016, z Bavorova, Střelských Hoštic z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. Na pozici 245 u populací z Dasného z roku 2017 a z Petroviček z 2018 byla objevena substituce tyrozinu na cystein. Substituce ze serinu na arginin byly detekovány u populací škůdců z Babic a z Předína z roku 2016, z Lhenic a Haklových Dvorů z roku 2017 a ze Strakonice z roku 2018 na pozici 252. Na 253. pozici byla objevena substituce ze serinu na alanin u populací z pozemku ZF JU, Babic a Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. U populace z roku 2018 sbíraného u Obytců na pozici 289 došlo k substituci z argininu na glycin. Na pozici 334 byly objeveny substituce z glycinu na arginin u populací pocházejících z Babic a z Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. Dále na pozici 356 byly odhaleny substituce z kyseliny asparagové na alanin u populace z Dasného z roku 2017. U populací brouků pocházejících z Haklových Dvorů z roku 2017 a z Obytců z roku 2018 byla objevena substituce ze serinu na arginin na pozici 358. Nakonec na pozici 361 byly detekovány substituce z valinu na izoleucin u populací z Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018.

9.4 Analýza úseku DIIS6

K analýze úseku DIIS6 byla vytvořena consensus sekvence (obr.16) na základě alignmentu ze sekvencí zkoumaných populací b. řepkových. Consensus sekvence byla použita jako vzorová sekvence a byly podle ní detekovány mutace v oblasti DIIS6 u jednotlivých populací.

```

GTATTCTTCATCATATTTGGCTCGTTCCTTCACACTTAACCTATTTATAGGAGTAATCATCGACAATTTTAACGAGCAAAAAGGTAAGT
12  4  6  8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 93
CATAAGAAGTAGTATAAACCGAGCAAGAAGTGTGAATTGGATAAATATCCTCATTAGTAGCTGTTAAAATTGCTCGTTTTCTTTTCCATCA

TTGCATTATTTCACTAATGAATGTGTAACAKTATCGCAATATTTAAGCGGGTGGATCATTGGAAATGTTTCATGACGGAR
94  100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 173
AACGTAATAAAGTGATTACTTACACATTGTMATAGCGTTATAAATTCGCCACCTAGTAACCTTTACAAGTACTGCCTY

```

Obr.16 Consensus sekvence DIIS6

Pro přesné určení pozice jednotlivých substitucí byla daná oblast klonována a následně sekvenována i s plazmidy. Pro oblast DIIS6 byl výsledný produkt s plazmidem dlouhý 1407 bp a vložený konstrukt obsahoval 224 bp (obr. 17).

```

CCAATTCGTCGAGACAAATATTTACATGTATTTATATTTTGTATTCTTCATCATATTTGGCTCGTCTTCA
12  4  6  8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70
GGTTAAGCACCTCTGTTTATAAAATGTACATAAATATAAAACATAAGAAGTAGTATAAACCGAGCAAGAAAGT

CACTTAACCTATTTATAGGAGTAATCATCGACAATTTTAACGAGCAAAAGAAAAGGTAAGTTTGCAATTA
71  75  80  85  90  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140
GTGAATTGGATAAAATATCCTCATTAGTAGCTGTTAAAAATGCTCGTTTTCTTTTTCCATTCAAACGTAAT

TTTCACTAATGAACGTGTAACATATATCGCAATATTTAAGGCGGGTGGATCATTTGAAATGTTCAATGACGG
141 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210
AAAGTGATTACTTGCACATTGTAATAGCGTTATAAAATCCGCCACCTAGTAACCTTTACAAGTACTGCC

AAGACCAGAAAAAGT
211 215 220 225
TTCTGGTCTTTTCA

```

Obr. 17 Sekvence klonu DIIS6 ohraničená primery VMaOc a MaVPb

Při porovnávání sekvencí zkoumaných populací b. řepkového z consensus sekvencí pro oblast DIIS6 bylo odhaleno několik bodových mutací (obr.18,19,20). Pozice substitucí je počítána od začátku zkoumané oblasti včetně primerů. U populace b. řepkového sbírané v Záhosticích v roce 2017 byla detekována substituce z C na A na 61. pozici. Na pozici 76 byla zjištěna substituce z T na C u populace z Hostkovic z roku 2016 a heterozygotní substituce C/T u populací škůdců z Babice z roku 2016 a ze Střelských Hoštic a Bavorova z roku 2017. U populace pocházejícího z Hubenova z roku 2017 byla v pozici 82 objevena heterozygotní substituce G/A a u populace z Babice z roku 2016 heterozygotní substituce A/C na 94. pozici. Dále na 127. pozici byly zjištěny substituce z G na A u populací brouků z Hostkovic sbíraných v roce 2016 a z Obytců sbíraných v roce 2018 a heterozygotní substituce G/A u populací z Babice z roku 2016, ze Střelských Hoštic a z Bavorova z roku 2017.

Pozice 144 - 155

Babice/2016	T	S	A	C	T	A	A	T	R	A	A	T
Hostkovice/2016	T	G	A	C	T	A	A	T	R	A	A	T
Předín/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	T
Hory/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	T
Budíškovice/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	T
Studená/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	Y
Vatín/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	T
ZF JU/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	Y
Kadov/2016	T	C	A	C	T	A	A	T	G	A	A	Y

Obr.18 Výběr nukleotidových substitucí z oblasti DIIS6

Na pozici 135 byly zaznamenány substituce z T na A u populací pocházejících z Hostkovic z roku 2016, z Obytců z roku 2018 a heterozygotní substituce T/A u populací z Babice z roku 2016, ze Střelských Hoštic a Lhenic z roku 2017. Substituce z C na G u populací b. řepkového sbíraných u Hostkovic z roku 2016 a u Obytců z roku 2018 a heterozygotní substituce G/C u populace z Babice z roku 2016 byly

zaznamenány na 145. pozici. Dále na pozici 152 byly zaznamenány substituce z G na A u populace pocházející z Obytců z roku 2018, heterozygotní substituce G/C u populace škůdce ze Střelských Hoštic z roku 2017 a heterozygotní substituce G/A u populací z Babic, z Hostkovic z roku 2016 a z Bavorova z roku 2017. Další heterozygotní substituce C/T byly zjištěny na pozici 155 u populací ze Studené, z pozemku ZF JU a z Kadova z roku 2016, z Dlouhé Vsi, z Dasného a z Haklových Dvorů z roku 2017 a ze Zborov z roku 2018. U populace ze Střelských Hoštic z roku 2017 byla nalezena heterozygotní substituce C/T na pozici 162. Na pozici 164 byly odhaleny substituce z T na G u populací z Budiškovice z roku 2016 a z Horažďovic z roku 2017, heterozygotní substituce G/C u populace z Bavorova z roku 2017 a heterozygotní substituce T/G u populací z roku 2016 pocházejících z pozemku ZF JU, Valu, Horažďovic, Manešovic, Předína, Hor a Vatína, z roku 2017 u populací sbíraných ve Stříbrňáku, Čichticích, na pozemku ZF JU, Bílsku, Bavorově, Koječíně, Strakonících, Dlouhé Vsi, Střelských Hošticích, Horažďovicích, Babíně, Lhenicích, Kozlově, Dasném, Hubenově, Chýnově, Dobronicích u Chýnova, Dlouhé Lhotě a Haklových Dvorech a z roku 2018 u populací z Čičenic, Čichtic, Biluk, Zborov, Strakoníc, Koječína, Němčic a Potočiště.

Pozice 163 - 167

ZF JU/2016	A	K	T	A	T
Val/2016	A	K	T	A	T
Horažďovice/2016	A	K	T	A	T
Manešovice/2016	A	K	T	A	T
Babice/2016	A	T	K	A	T
Hostkovic/2016	A	T	A	T	T
Předín/2016	A	K	T	A	T
Hory/2016	A	K	T	A	T
Budiškovice/2016	A	G	T	A	T
Studená/2016	A	T	A	T	T
Vatín/2016	A	K	T	A	T
ZF JU/2016	A	K	T	A	T
Kadov/2016	A	T	A	T	T
Němčice/2017	A	T	A	T	T

Obr.19 Mutace v DIIS6

Pozice 172 - 178

Horažďovice/2017	A	T	A	T	T	T	A
Střelské Hoštice/2017	A	T	W	T	T	T	A
Horažďovice/2017	A	T	A	T	T	T	A
Babín/2017	A	T	A	T	T	T	A
Bavorov/2017	A	T	W	T	T	T	A
Lhenice/2017	A	T	A	T	T	T	A
Blanice/2017	A	T	A	T	T	T	A

Obr.20 Vybrané bodové mutace oblasti DIIS6

Dále na 165. pozici byla zjištěna heterozygotní substituce T/G u populace b. řepkového sbírané v Babicích v roce 2016. Na 174. pozici byly pozorovány substituce z A na T u populací z Hostkovic z roku 2016 a z Obytců z roku 2018 a heterozygotní substituce T/A u populací z pozemku ZF JU a z Babic z roku 2016, u populací ze Střelských Hoštic a z Bavorova z roku 2017. Nakonec byl odhalen heterozygotní stav G/A pro 213. nukleotid.

Z nukleotidového alignmentu pro úsek DIIS6 se vytvořil alignment aminokyselinový a byl zjišťován smysl detekovaných mutací (obr.21, 22). V případě heterozygotních populací, byly přepsány do aminokyselinové sekvence obě alelické varianty.

Nukleotidové pozice 140 - 160

Manešovice/2016	Y	F	T	N	E	C	V
Babice/2016	Y	F	T	N	K	C	V
Babice/2016	Y	L	T	N	E	C	V
Hostkovice/2016	Y	L	T	N	K	C	V
Hostkovice/2016	Y	L	T	N	E	C	V
Předín/2016	Y	F	T	N	E	C	V
Předín/2016	Y	F	T	N	E	C	V

Obr. 21 Aminokyselinové substituce v oblasti DIIS6

Nukleotidové pozice 150 - 171

Předín/2016	E	C	V	T	L	S	Q
Předín/2016	E	C	V	T	V	S	Q
Hory/2016	E	C	V	T	V	S	Q
Hory/2016	E	C	V	T	L	S	Q
Budiškovice/2016	E	C	V	T	V	S	Q
Budiškovice/2016	E	C	V	T	V	S	Q
Studená/2016	E	C	V	T	L	S	Q
Studená/2016	E	R	V	T	L	S	Q
Vatín/2016	E	C	V	T	V	S	Q
Vatín/2016	E	C	V	T	L	S	Q
ZF JU/2016	E	C	V	T	V	S	Q
ZF JU/2016	E	R	V	T	L	S	Q
Kadov/2016	E	R	V	T	L	S	Q
Kadov/2016	E	C	V	T	L	S	Q
Němčice/2016	E	C	V	T	L	S	Q

Obr. 22 Změny v aminokyselinové sekvenci DIIS6

Na nukleotidové pozici 145 došlo k substituci z fenylalaninu na leucin u populací brouků z Babic a z Hostkovic sbíraných v roce 2016 a u populací ze Střelských Hoštic, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. Na pozici 152 došlo k substitucím z kyseliny glutamové na lysin u populací pocházejících z Babic a z Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018 a na glutamin u populace ze Střelských Hoštic z roku 2017. Další substituce z cysteinu na arginin byla objevena na pozici 155 u populací ze Studené, pozemku ZF JU, Kadova z roku 2016, z Dlouhé vsi, Dasného a Haklových Dvorů z roku 2017 a ze Zborov z roku 2018. Nakonec u populací škůdce z roku 2016 pocházejících z pozemku ZF JU, Valu, Horažďovic, Manešovic, Předína, Hor a Vatína, z roku 2017 u populací sbíraných ve Stříbrňáku, Čichticích, na pozemku ZF JU, Bílsku, Bavorově, Koječíně, Strakonicích, Dlouhé Vsi, Střelských Hošticích, Horažďovicích, Babíně, Lhenicích, Kozlově, Dasném, Hubenově, Chýnově, Dobronicích u Chýnova, Dlouhé Lhotě a Haklových Dvorech a z roku 2018 u populací z Čičenic, Čichtic, Bíluk, Zborov, Strakonic, Koječína, Němčic a Potočiště byla detekována substituce z leucinu na valin na 164. pozici.

10 Diskuse

Byly analyzovány populace blýskáčka řepkového za účelem zjištění změn v sekvenci genu VSSC a odpovídajícím proteinu. Změny v sekvenci aminokyselin a struktuře proteinu pak mohou způsobovat KDR rezistenci u blýskáčků řepkových. Vybrány byly fragmenty pokrývající oblast DIIS4 – S5 linker/DIIS5 a DIIS6, kde byly prokázány bodové mutace v této oblasti u polských populací b. řepkových (Wrzesińské a kol. 2014). Údaje o těchto sekvencích z dalších populací blýskáčka řepkového doposud nejsou známy.

V genu VSSC byla již dříve prokázána mutace – L1014F (Nauen a kol., 2012). Tato mutace nebyla předmětem výzkumu v této práci. Byla sice u jiných druhů hmyzu spojována s KDR rezistencí vůči pyretroidům, nenachází se však ve vazebné oblasti VSSC (O'Reilly a kol., 2006). Navíc u blýskáčka řepkového byla nalezena pouze u populací z Dánska a Švédska (Nauen a kol. 2012).

Ve zvolených oblastech bylo nalezeno několik bodových mutací. Pouze některé z těchto mutací, však způsobily změnu v sekvenci aminokyselin a mohou tak mít vliv na výsledný exprimovaný protein. Mutace lokalizované v intronech zkoumaných oblastí neovlivní přímo konformaci VSSC, ale mohly by mít vliv na alternativní sestřih pre-mRNA a tím i na konečný protein.

V oblasti DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5 bylo nalezeno 21 mutací v několika populacích na různých pozicích. Některé z těchto substitucí se vyskytovaly jen u jedné nebo několika málo populací a jsou považovány spíše za náhodné mutace než za ustálené polymorfismy. Za polymorfismus by se dala považovat substituce z T na C na pozici 252, která způsobila změnu aminokyseliny ze serinu na arginin u populací z Babic a Předína z roku 2016, z Lhenic a Haklových Dvorů z roku 2017 a ze Strakonice z roku 2018. Další důležitá substituce byla odhalena na pozici 253, kde došlo ke změně nukleotidu z T na G, což způsobilo aminokyselinovou substituci také ze serinu na arginin u populací z pozemku ZF JU, Babic a Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. Další čtenější mutace se vyskytovala na pozici 334, došlo zde k substituci z G na C, což způsobilo změnu aminokyseliny z glycinu na arginin u populací z Babic a Hostkovic z roku 2016, z Bavorova z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. Žádná z těchto mutací se neshoduje s detekovanými polymorfismy u polských populací blýskáčka řepkového. Jediná mutace, která způsobila změnu aminokyselinové sekvence a současně byla pozorována i u polských

populací byla detekována na pozici 157 a vedla ke změně izoleucinu na valin (číslovaní dle mouchy domácí I936V) u populací z Hostkovic, Babic z roku 2016, z Bavorova, Střelských Hoštic z roku 2017 a z Obytců z roku 2018 (Wrzesińska a kol. 2014, Obrępalska-Stęplowska a kol. 2016).

Zajímavé je, že v populacích z roku 2016 z populací z Babic a z Hostkovic, u kterých byla určena rezistence stupně 5 a 4 se nachází mnoho nukleotidových substitucí, které ovlivnily i aminokyselinové změny a zároveň se vyskytují i u dalších zkoumaných populací. Pro přesnější informace by však bylo potřeba pomocí lahvičkového testu určit stupeň rezistence u více populací. Stejně jako u polských populací blýskáčka řepkového, které byly všechny shledány jako rezistentní, nebyly v této práci nalezeny u všech rezistentních populací významnější mutace (Slater a kol. 2011; Wrzesińska a kol. 2014). U populace pocházející ze Studené z roku 2016 nebyla nalezena žádná ani nukleotidová substituce, přesto že je u ní určen stupeň rezistence 5. U populace sbírané u Horažďovic v roce 2016 s určeným stupněm rezistence 4 se vyskytuje pouze jedna nukleotidová substituce, která neovlivňuje aminokyselinovou substituci. Vzorek populace sbíraný v Horažďovicích v roce 2017, u kterého by se mohl stupeň rezistence 4 očekávat na základě údajů z roku 2016 obsahoval sice 3 nukleotidové substituce, ale ani tyto mutace nezpůsobily změnu v aminokyselinové sekvenci a nelze tak předpokládat, že by ovlivňovaly výsledný protein. Vysoký stupeň rezistence u populací bez změn v aminokyselinových sekvencích je pravděpodobně způsoben metabolickou rezistencí, tedy zvýšenou expresí cytochromu P450 (Zimmer a kol., 2014). Zatímco v populacích s četnějšími aminokyselinovými substitucemi je pravděpodobná změna konformace VSSC proteinu a tím i KDR rezistence.

U populace sbírané na pozemku ZF JU v roce 2016 se na pozici 253 vyskytovala aminokyselinová substituce ze serinu na arginin a nukleotidová substituce na pozici 66 z T na A, u populace sbírané ve stejné lokalitě v roce 2017 se ani jedna z těchto substitucí neopakovala. Stejně tak u populace z Bavorova z roku 2017 bylo nalezeno 6 mutací z nichž 2 způsobilily aminokyselinovou substituci a ve stejné lokalitě v roce 2018 u populací nebyla detekována žádná mutace. To může být následek migrace populací nebo můžeme předpokládat, že dané mutace nejsou v populaci ukotveny a dále děděny.

V části DIIS6 bylo detekováno celkem 13 pozic s mutovanými nukleotidy. Stejně jako v předchozí oblasti se zde vyskytovaly nukleotidové substituce, které nezpůsobily změnu v aminokyselinové sekvenci a dá se předpokládat, že tedy nemají vliv na

výslednou expresi genu VSSC. Nejčastější mutací, která se vyskytovala u více než poloviny vzorků populací je substituce z T na G na 164. pozici, která způsobila aminokyselinovou změnu z leucinu na valin. U populací z Předína a Horažďovic s určeným stupněm rezistence 4 a 5 byla tato mutace pozorována. U populací z Babic, Studené a Hostkovic z roku 2016 s určeným stupněm rezistence také 4-5 se tato mutace nevyskytuje, nelze proto spolehlivě tvrdit, že by mutace v této pozici měla přímý vliv na KDR rezistenci.

Další významné mutace byly pozorovány na pozicích 145, 152 a 155. Zajímavé je, že mutace na 145. pozici z fenylalaninu na leucin a 152. pozici z kyseliny glutamové na lysin se vyskytují u všech vzorků společně, konkrétně u vzorků populací z Babic a Hostkovic z roku 2016, z Bavorova a Střelských Hoštic z roku 2017 a z Obytců z roku 2018. Bylo by však potřeba určit stupně rezistence u těchto populací pro zhodnocení vlivu těchto mutací na KDR rezistenci. Na 155. pozici došlo k aminokyselinové substituci z cysteinu na arginin u populací pocházejících ze Studené, pozemku ZF JU a Kadova z roku 2016, z Dlouhé Vsi, Dasného a Haklových Dvorů z roku 2017 a ze Zborov z roku 2018. Žádná z mutací této oblasti nebyla detekována zároveň i u polských populací blýskáčka řepkového (Wrzesińska a kol. 2014). Jsou-li tyto mutace příčinou KDR rezistence, lze vyloučit přenos mutantních alel pro rezistenci z polských populací blýskáčka řepkového. Pro určení geografického směru šíření rezistence by bylo zapotřebí detekovat mutace genu VSSC na rozsáhlejším území České republiky i v dalších zemích Evropy.

Stejně jako v oblasti DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5 se u vzorků populací z Babic a Hostkovic z roku 2016 s určeným stupněm rezistence 4 a 5 nachází větší počet mutací z nichž některé ovlivňují aminokyselinovou sekvenci. U populací z Předína, Horažďovic a Studené z roku 2016, u kterých je také určen stupeň rezistence 4-5 ani v této oblasti nebylo detekováno více významných substitucí a je proto pravděpodobné, že stupeň rezistence u těchto vzorků ovlivňuje více metabolická detoxikace než KDR rezistence. Pozitivní je, že bylo prokázáno překonání metabolické rezistence k pyretroidům použitím fipiperonylbutoxidu (PBO), který působí jako inhibitor P450, v kombinaci s tauvalinátem (Moore a kol. 2012).

Při srovnání populací sbíraných ve stejných lokalitách ve více letech bylo zjištěno, že u populace z Horažďovic z roku 2016 je na pozici 164 aminokyselinová substituce z leucinu na valin, ale u vzorků z této lokality z roku 2017 se tato mutace již nevyskytuje. U populace sbírané na pozemku ZF JU v roce 2016 byla detekována

mutace na pozici 155, která způsobila změnu aminokyseliny z cysteinu na arginin, ale u populace pocházející ze stejné lokace z roku 2017 se nevyskytuje. U populace z Bavorova z roku 2017 byla detekována na pozici 145 aminokyselinová substituce z fenylalaninu na leucin a na pozici 152 z kyseliny glutamové na lysin, ani jedna z těchto mutací se nevyskytuje u populace z Bavorova z roku 2018. Dále u populace ze Strakonic z roku 2016 byla detekována mutace cysteinu na arginin na pozici 155, která se nevyskytovala u vzorku populace z roku 2018. U populací pocházejících z Čichtic byla detekována aminokyselinová změna na 164. pozici z leucinu na valin u populací z roku 2017 i 2018. Tyto rozdíly mezi jednotlivými populacemi ze stejných lokací mohou být stejně jako u oblasti DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5 způsobeny migrací populací b. řepkového nebo se jedná o nahodilé mutace, které nejsou dědičně přenášeny. U populace z Čichtic lze předpokládat, že je mutace dědičná a bylo by zajímavé určit stupeň rezistence této populace, který by mohl přispět k určení korelace této mutace s KDR rezistencí.

Přesto, že bylo v jednotlivých populacích detekováno několik opakujících se aminokyselinových substitucí, nemusí tyto substituce mít vliv na vazbu VSSC s pyretroidy. Při modelování vznikajících proteinů z těchto sekvencí se zjistilo, že umístění jedné aminokyselinové substituce nemá u většiny modelů vliv na stabilitu konformace cílového místa. To potvrdilo i modelování proteinové struktury pro mutaci pozice 157 z izoleucinu na valin v oblasti DIIS4-S5, kde bylo prokázáno zachování vysokého stupně afinity k pyretroidu. Správně umístěná mutace může však ovlivnit proteinovou strukturu VSSC a snížit tak afinitu k pyretroidům. Strukturu neovlivní aminokyselinové substituce z valinu nebo glycinu na serin. Tyto aminokyseliny jsou si podobné ze strukturálního, chemicko-fyzikálního i funkčního hlediska (Wrzesińska a kol. 2014).

Nukleotidové substituce mohou ovlivňovat kromě strukturních vlastností také alternativní sestřih pre-mRNA a tím pak může docházet k substitucím aminokyselinovým a následně k ovlivnění funkčních vlastností kanálu (Hopkins a Pietrantonio, 2010). Hopkins a Pietrantonio (2010) objevili mutaci I936V, která byla nalezena i u polských populací b. řepkového v práci Wrzesiňské a kol. (2014). Tato mutace byla detekována v cDNA, v genomové DNA u stejného jedince nalezena nebyla. Dá se tedy předpokládat, že tato mutace vznikla jako následek úpravy pre-mRNA. U mutace I936V bylo prokázáno, že snižuje vazebnou afinitu k deltametrinu a fenfluthrinu, ale naopak zvyšuje účinnost permethrinu (Usherwood a kol., 2007).

Stejně tak v práci O'Reilly a kol. (2006) bylo pozorováno snížení účinnosti pyretroidů za přítomnosti valinu v 936. pozici.

Nejčastěji popisovaná mutace spojována s KDR rezistencí vůči pyretroidům u různých druhů škůdců je mutace L1014F (Chen a kol. 2010). Další častou mutací spojovanou s KDR rezistencí je mutace M918T, která bylo detekována i u polských populací b. řepkových (Wrzesińska a kol. 2014). Tyto dvě mutace se často nacházejí současně (Haddi a kol., 2012). Spojení mutací M918T a L1014F u mouchy domácí způsobilo v experimentálních podmínkách exprimované v oocytech *Xenopus leavis* úplnou necitlivost VSSC na vysoké koncentrace pyretroidů, cysmetrinu a cypermetrinu (Lee a kol. 1999). Při zkoumání evropských populací b. řepkového však nebyla mutace M918T nalezena, detekována byla pouze mutace L1014F samostatně (Nauen a kol. 2012).

Pro monitorování rezistence blýskáčků řepkových rutinními molekulárními metodami na základě molekulárních markerů ještě nebylo získáno dostatek informací o mechanismu vzniku rezistence. Detekování mutací VSSC genu a posuzování korelace s fenotypem tohoto škůdce však k zjednodušení molekulární detekce může vést. Motivací pro pokračování výzkumu na toto téma je především včasné určení rezistence a tím i zvolení správné strategie ochrany proti tomuto škůdci. Některé opakující se mutace, jako jsou L1014F a M918T, v rezistentních populacích sice již detekovány byly, nelze je však považovat za jediné mutace VSSC, které způsobí KDR rezistenci, a proto je nelze plošně využít jako marker pro časnou molekulární detekci (Nauen a kol. 2012; Wrzesińska a kol. 2014).

11 Závěr

Během výzkumu bylo odhaleno několik často se opakujících mutací, které vedly ke změně aminokyselinové sekvence. Tyto mutace mohou přispívat ke změně konformace VSSC a tím ke vzniku rezistence vůči pyretroidům. Pro potvrzení této hypotézy by však bylo zapotřebí víceleté detekování jednotlivých mutací a rozsáhlejší určení stupňů rezistence u jednotlivých populací. Důležité pro molekulární detekci rezistence u blýskáčků řepkových je také určení konzervovanosti jednotlivých mutací a posouzení jejich schopnosti přenosu z generace na generaci.

Dále může být zajímavé posouzení genové exprese ovlivněné těmito mutacemi porovnáním cDNA s genomovou DNA. Alternativní sestřih pre-mRNA může mít velký vliv na konformaci vznikajícího VSSC proteinu a nabízí tak další možnosti pro monitorování rezistence populací blýskáčka řepkového molekulárními metodami. Pro časnou detekci rezistence b. řepkového pomocí molekulárních metod může být užitečné zaměřit se na expresi cytochromu P450. Určení vztahu mezi stupeň rezistence a mírou exprese cytochromu P450 i detekce korelace mezi zvýšenou expresí cytochromu P450 a rozsahu mutací genu VSSC může pomoci objasnit komplexní mechanismus vzniku rezistence.

Dokud nebude objasněn mechanismus vzniku rezistence b. řepkového a navrhnout jiný postup pro zamezení šíření rezistentních populací, zůstává nejdůležitější metodou ochrany dodržování anti-rezistentních opatření v polních podmínkách.

Seznam použité literatury

- Alford, D., Nilsson, C., Ulber, B. (2003). Insect pests of oilseed rape crops. Biocontrol of oilseed rape pests. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 355 s.
- Brogdon, W. G., a McAllister, J. C. (1998). Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases. 4(4): 605-613 s.
- Catterall, W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26: 13–25 s.
- Cross, J. V., Easterbrook, M. A., (1998). Integrated management of flower pests of strawberry. Bulletin OILB/SROP, 21(10):81-87 s.
- Čurn, V., a 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.
- Ekbom, B., Popov, S.Y.A., (2004). Host plant affects pollen beetle (*Meligethes aeneus*) egg size. Physiological Entomology, 29: 118-122 s.
- Ffrench-Constant, R. H., a kol. (2004). The genetics and genomics of insecticide resistance. Department of Biology and Biochemistry, University of Bath.
- Haddi, K. a kol. (2012) Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). Insect Biochemistry and Molecular Biology 42: 506–513 s.
- Havel, J., a kol. (2016). Průběh šíření populací blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) rezistentních k pyretroidům v České republice. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., provozovna Opava1, Mendelova univerzita Brno 2, Zemědělský výzkum spol. s r.o. Troubsko 3, Agritec Plant Research s.r.o. Šumperk 4.
- Hopkins, B.W. a Pietrantonio, P.V. (2010) The *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) voltage-gated sodium channel and mutations associated with pyrethroid resistance in field-collected adult males. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40: 385–393 s.
- Chen, L. a kol. (2010) Molecular ecology of pyrethroid knockdown resistance in *Culex pipiens pallens* mosquitoes. PLoS ONE 5: e11681 s.
- IRAC (2009) Susceptibility Test Method 11. *Meligethes aeneus* Ver. 3
- IRAC Coleoptera Working Group (2018) Pollen Beetle Resistance Monitoring 2017, dostupné z: www.irc-online.org

- Kazda, J., a kol. (2008). Metodika integrované ochrany řepky. SPZO s.r.o. 78 s.
- Kazda (2012), Blýskáček řepkový. Agromanuál, 3: 46 s.
- Kužma, Š. a kol. (1999): Metodická příručka pro ochranu rostlin. Polní plodiny II. díl – živočišní škůdci, SRS odbor prostředků ochrany rostlin v Brně
- Lee, S.H. a kol. (1999). Mutations in the house fly *Vssc1* sodium channel gene associated with super-kdr resistance abolish the pyrethroid sensitivity of *Vssc1/tipE* sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 185–194 s.
- Moore a kol. (2012). The effect of a piperonyl butoxide/tau-fluvalinate mixture on pollen beetle (*Meligethes aeneus*) and honey bees (*Apis mellifera*). *Pest management science*, 68(5):795-800 s.
- Muška (2009). Blýskáček řepkový v řepce olejce. Agromanuál, 1: 26-27 s.
- Nauen, R. (2007). Pyrethroid resistance and its management in European populations of pollen beetles, *Meligethes aeneus* in winter oilseed rape, Proc. of the XVI International Plant Protection Congress, vol. 7B–3
- Nauen R. a kol. (2012) Target-site resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus* F., *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 179-180 s.
- Narahashi, T. (1996) Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 79: 1–14 s.
- Obřepalska-Stęplowska a kol. (2016) Insight into the *Meligethes aeneus* voltage-sensitive sodium channel structure and an attempt to select the best pyrethroid ligands. *Pest management science*. 72(1):162-71 s.
- O'Reilly, A.O. a kol. (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem J* 396: 255–263 s.
- Osborne P, (1965). Morphology of the immature stages of *Meligethes aeneus* (F.) and *M. viridescens* (F.) (Coleoptera, Nitidulidae). *Bulletin of Entomological Research*. 55:747-759 s.
- Rinkevich, F.D., Du, Y. a Dong, K. (2013) Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 106: 93–100 s.
- Sattelle, D.B., Yamamoto, D. (1988) Molecular targets of pyrethroid insecticides. *Adv Insect Physiol* 20: 147–213 s.

- Seidenglanz, M., Poslušná, J. (2009). Výskyt rezistence blýskáčka řepkového proti insekticidům v Evropě. *Rostlinolékař. Praha*: 12-15 s.
- Slater, R. a kol. (2011) Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest Manage. Science*. 67: 633-638 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.
- Soderlund, D. M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*. 64(6): 610-616 s.
- Tóth, P., Hudec, K. (2007). Škodcovia a choroby repky olejky. *Integrovaná ochrana. Naše pole, s.r.o.* 247 s.
- Usherwood, P.N. a kol. (2007) Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. *FEBS Letters* 581: 5485–5492 s.
- Wrzesińska, B. a kol. (2014) A survey of pyrethroid-resistant populations of *Meligethes aeneus* F in Poland indicates the incidence of numerous substitutions in the pyrethroid target site of voltage-sensitive sodium channels in individual beetles. *Insect Molecular Biology* 23(5): 682–693 s.
- Zimmer, C.T., Nauen, R. (2011) Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pestic Biochem Physiol* 100: 264–272 s.
- Zimmer, C.T. a kol. (2014) Molecular and functional characterization of CYP6BQ23, a cytochrome P450 conferring resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45: 18–29 s.
- Zlotkin, E. (1999). The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annual Review of Entomology*. 44: 429-455 s.

Internetové zdroje:

- Škúdcí olejnin [online]. In: [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/
- ÚKZÚZ [online]. In: [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal>

Seznam obrázků

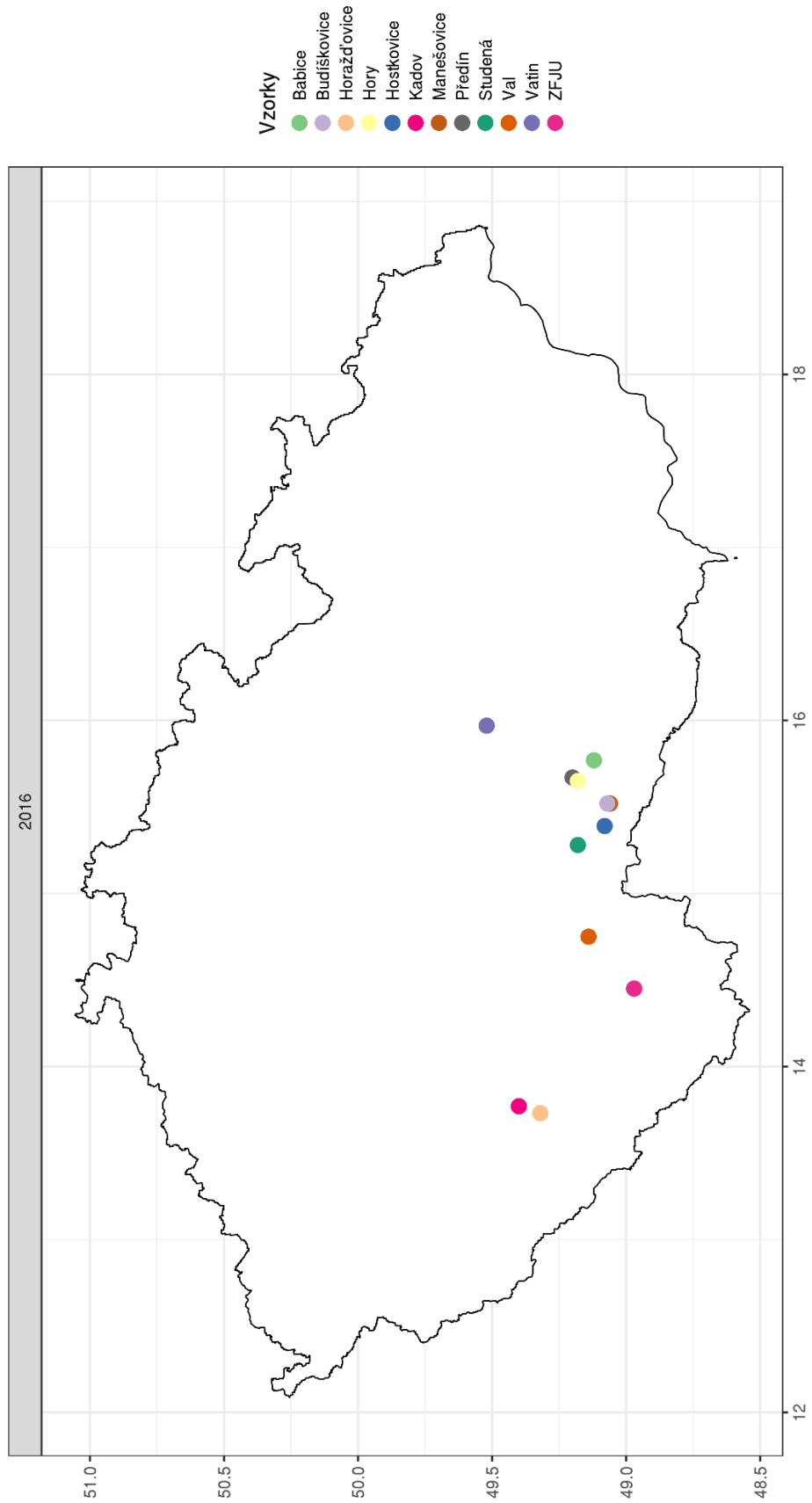
- Obr. 1 Dospělci b. řepkového
- Obr. 2 Nárůst rezistentních populací v Evropě v letech 2007–2017
- Obr. 3 Rezistence b. řepkového v zemích EU v roce 2017
- Obr. 4 Struktura VSSC
- Obr. 5 Úsek DIIS4 – S5
- Obr. 6 Úsek DIIS6
- Obr. 7 Porovnání úseku DIIS4-S5 se sekvencemi VSSC u jiných organismů
- Obr. 8 Porovnání úseku DIIS6 se sekvencemi VSSC u jiných organismů
- Obr. 9 Consensus sekvence DIIS4 – S5 linker/DIIS5
- Obr. 10 Sekvence klonu DIIS4 – S5 linkeru/DIIS5 ohraničená primery MaVGb a MaINSR2
- Obr. 11 Výběr nukleotidových substitucí z oblasti DIIS4-S5 linker/DIIS5
- Obr. 12 Mutace v oblasti DIIS4 – DIIS5
- Obr. 13 Vybrané bodové mutace oblasti DIIS4-S5 linker/DIIS5
- Obr. 14 Vybrané aminokyselinové substituce oblasti DIIS4 – S5 linker/DIIS5
- Obr. 15 Vybrané změny v aminokyselinové sekvenci
- Obr. 16 Consensus sekvence DIIS6
- Obr. 17 Sekvence klonu DIIS6 ohraničená primery VMaOc a MaVPb
- Obr. 18 Výběr nukleotidových substitucí z oblasti DIIS6
- Obr. 19 Mutace v DIIS6
- Obr. 20 Vybrané bodové mutace oblasti DIIS6
- Obr. 21 Aminokyselinové substituce v oblasti DIIS6
- Obr. 22 Změny v aminokyselinové sekvenci DIIS6

Seznam tabulek

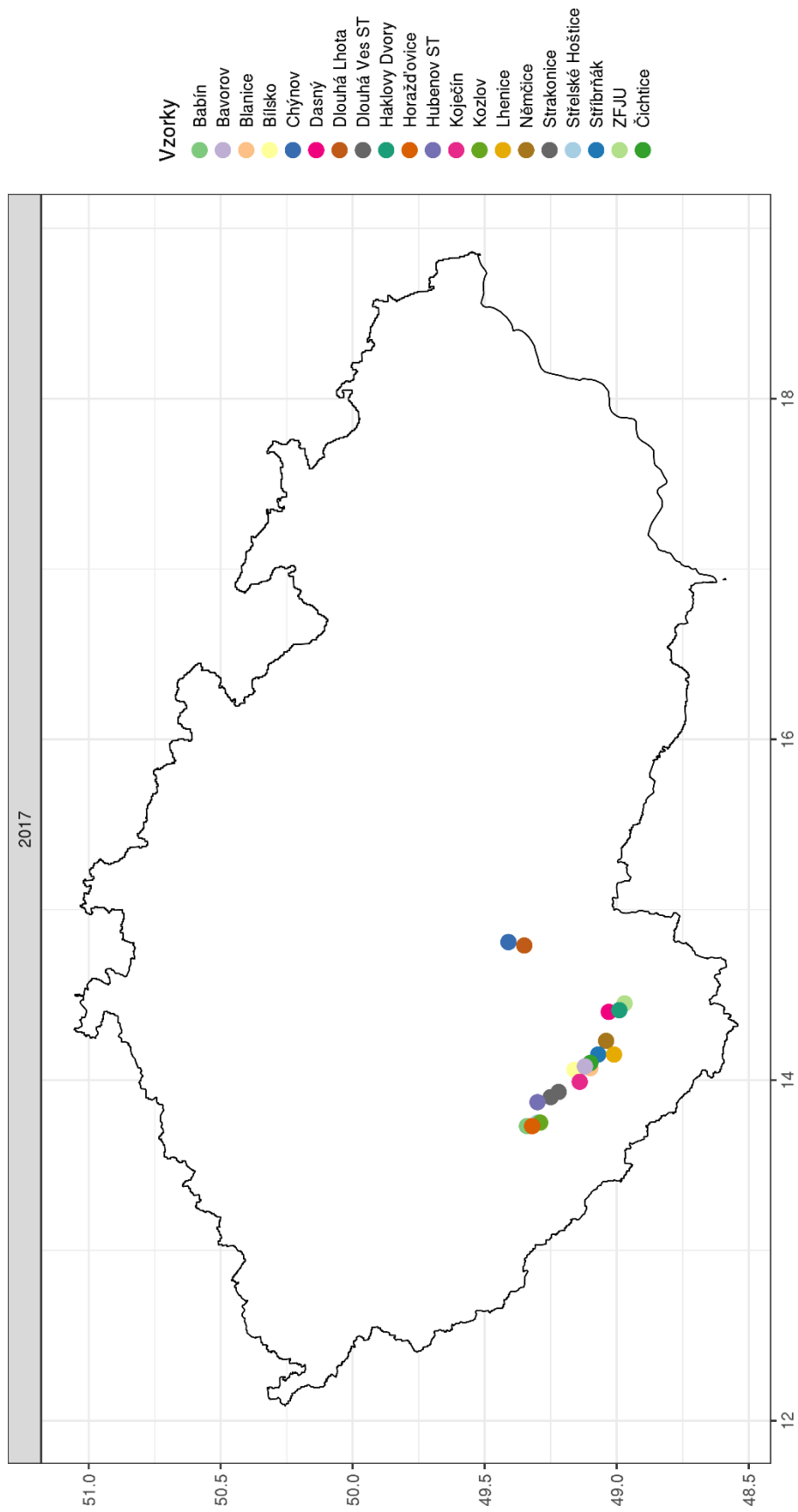
- Tab. 1 Seznam vzorků
- Tab. 2 Primery pro oblasti DIIS4-S5 a DIIS6

Přílohy

Příloha 1: Lokality sběru vzorků v roce 2016



Příloha 2: Lokality sběru vzorků v roce 2017



Příloha 3: Lokality sběru vzorků v roce 2017

