

# Ověření efektu PBO na nárůst citlivosti k pyretroidům u vybraných druhů řepkových škůdců vykazujících různé úrovně rezistence k této skupině insekticidů

Certifikovaná metodika

Ing. Marek Seidenglanz, Ph.D.<sup>1</sup>

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.<sup>1</sup>

Mgr. Lukáš Blažek<sup>1</sup>

Ing. Jaroslav Šafář, Ph.D.<sup>1</sup>

Ing. Jaroslav Kořínek<sup>2</sup>

Ing. Pavel Kolařík<sup>3</sup>

doc. Ing. Mgr. Eva Hrudová, Ph.D.<sup>4</sup>

Mgr. Petra Hanáková Bečvářová, Ph.D.<sup>1</sup>

Ing. Eva Plachká, Ph.D.<sup>2</sup>

Lenka Čihánková<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk, <sup>2</sup>OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., pracoviště  
v Opavě, <sup>3</sup>Zemědělský výzkum spol. s r.o., Troubsko, <sup>4</sup>Mendelova univerzita v Brně

## **Dedikace:**

Předkládaná metodika je výsledkem řešení projektu MZe QK21010332 „Mechanismus rezistence řepkových škůdců proti insekticidům, jejich výchozí citlivost k novým insekticidům a dopad insekticidních aplikací na vývoj larev škůdců a jejich přirozených nepřátel“.

## **Oponentní posudky vypracovali:**

Ing. Jakub Beránek, Ph.D., ÚKZÚZ, ředitel odboru, Odbor zdraví rostlin, Zemědělská 1752/1a, Černá Pole, 61300 Brno

Ing. Martin Lošák, RenoTechnologie, a.s., Lagnovská 669, 742 83 Klimkovice

Publikaci bylo uděleno Osvědčení č. ÚKZÚZ 195589/2025 o uznání v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

## **Vydal:**

© Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk, 2025.

ISBN 978-80-87360-80-4

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>6</b>
1.1	Vývoj rezistence u blýskáčka řepkového, dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého k pyretroidům .....	6
1.2	Mechanismy rezistence k pyretroidům u těchto škůdců .....	6
1.2.1	Necitlivost cílového místa (kdr a s-kdr typ rezistence) .....	6
1.2.2	Metabolická rezistence.....	14
1.2.3	Cytochrom P450 .....	15
1.3	Piperonyl butoxide (PBO) .....	20
1.4	Proč se snažit najít nejnižší účinnou dávku PBO.....	20
1.4.1	Vliv PBO na savce včetně člověka .....	21
1.4.2	Vliv PBO na necílovou arthropodní faunu .....	22
1.4.3	Riziko kumulace PBO v ekosystému.....	23
<b>2</b>	<b>Cíle metodiky</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Vlastní popis metodiky</b> .....	<b>25</b>
3.1	Organizace a koordinace aktivit spojených s testováním PBO.....	25
3.2	Odchyt dospělců cílových druhů škůdců v porostu, jejich transport do laboratoře a jejich krátkodobé udržování před založením testu .....	25
3.3	Založení testu, způsob hodnocení a záznam výsledků pozorování.....	27
3.3.1	Stanovení synergického účinku PBO pro lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate a etofenprox při společné aplikaci.....	28
3.3.2	Stanovení nejnižší efektivní dávky PBO .....	31
3.3.3	Vliv délky doby pre-expozice k PBO na jeho synergický efekt na pyretroid lambda-cyhalothrin .....	35
3.4	Analýza výsledků pozorování a jejich interpretace .....	38
<b>4</b>	<b>Srovnání „novosti postupů“</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>Popis uplatnění metodiky</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Ekonomické aspekty</b> .....	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité související literatury</b> .....	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>Seznam publikací, které předcházely metodice</b> .....	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Jména oponentů a názvy jejich organizací</b> .....	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Dedikace</b> .....	<b>54</b>
<b>11</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>55</b>

## Anotace

### Ověření efektu PBO na nárůst citlivosti k pyretroidům u vybraných druhů řepkových škůdců vykazujících různé úrovně rezistence k této skupině insekticidů

V předkládaném dokumentu jsou představeny a popsány tři metodické postupy (v částech 3.3.1., 3.3.2. a 3.3.3.) pro přípravu, vedení a hodnocení laboratorních pokusů, ve kterých je analyzován a kvantifikován synergický efekt piperonyl butoxidu (PBO) na nárůst účinnosti tří různých pyretroidů (lambda-cyhalothrin – LC, tau-fluvalinate – TF, etofenprox – ET) pro tři různé škůdce řepky: blýskáček řepkový (*B. aeneus*), krytonosec čtyřzubý (*C. pallidactylus*) a dřepčík olejkový (*P. chrysocephala*), u kterých byla v ČR prokázána rezistence k pyretroidům. V prvním experimentu (3.3.1.) jde o vyhodnocení synergického efektu PBO na účinnost LC, TF a ET, jsou-li PBO a pyretroidy aplikovány společně. Cílem druhého experimentu (3.3.2.) je zjistit nejnižší efektivní dávku PBO, to je dávka, která vrací k pyretroidům rezistentním populacím tří jmenovaných druhů škůdců citlivost k této skupině insekticidů. (Poznámka: vlivem synergického efektu této dávky PBO se testovaná populace stává opět vysoce citlivou k testovanému pyretroidu = je jí možné přiřadit stupeň 1 dle kategorizace *Insecticide Resistance Action Committee*, IRAC). Třetí experiment (3.3.3.) slouží k vyhodnocení vlivu délky doby pre-expozice k PBO na jeho synergický efekt na účinnost pyretroidu. Metodika také obsahuje popis současného stavu rezistence k pyretroidům u tří zmíněných škůdců v ČR, zasazení této situace do evropského kontextu ve smyslu časovém i geografickém a podrobný popis podstaty mechanismů rezistence, které jsou pro tři zmiňované škůdce řepky důležité. Součástí metodiky je dále stručný popis historie vývoje PBO a jeho dosavadní role v ochraně proti škodlivým organismům, vysvětlení důvodů pro jeho laboratorní testování za účelem jeho využití pro tlumení dopadů rezistence k pyretroidům v polních podmínkách a dále též popis rizik pro necílové organismy a člověka spojených s používáním této látky.

**Klíčová slova:** rezistence proti pyretroidům, piperonyl butoxide, inhibice Cytochromu P450, látky posilující efekt insekticidů, *Brassicogethes aeneus*, *Psylliodes chrysocephala*, *Ceutorhynchus pallidactylus*, lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox, letální dávky

## Annotation

### Validation of PBO effect on susceptibility increase to pyrethroids in several species of oilseed rape pests showing different levels of resistance against this group of insecticides

The guide presents and describes three methodological accesses (in parts 3.3.1, 3.3.2, and 3.3.3.) explaining how to establish, manage, and assess laboratory trials aimed at analysing and quantifying synergistic impact of piperonyl butoxide (PBO) on increase in effects of three different pyrethroids (lambda-cyhalothrin LC, tau-fluvalinate TF, etofenprox ET) on three different oilseed rape insect pests for which resistance against pyrethroids was already confirmed in Czech Republic: pollen beetle (*B. aeneus*), cabbage stem weevil (*C. pallidactylus*) and cabbage stem flea beetle (*P. chrysocephala*). The first experiment (3.3.1.) aims to evaluate of synergistic impact of PBO on LC, TF, and ET effects when the PBO and the pyrethroids are applied together (as a mixture). The objective of the second experiment (3.3.2.) is to find out the level of the lowest effective rate of PBO, it is such a rate, that returns susceptibility to pyrethroids to the populations of the three insect pests in which a resistance against the pyrethroids was confirmed (= so a code 1 can be assigned to such populations again; code 1 = highly susceptible population according to IRAC coding system). The third experiment (3.3.3.) targets the role of the length of pre-exposure to PBO (before the application of the pyrethroid is made) on its synergistic impact on the pyrethroid effect. The methodological guide also contains a description of the present situation with pyrethroid resistance in populations of the three insect pests in Czech Republic, a comparison of that with the situation in European countries from the geographical and temporal (developmental) points of view, and a detailed description of the mechanisms of resistance against pyrethroids that are crucial for the three insect pests. There is also a summary of PBO development history and the role that the active ingredient plays in protection against harmful insects. A certain part of the guide is also aimed at explaining why it is important to carry out the laboratory testing of the active ingredient concerning practical usage of it in systems of mitigating the impacts of the phenomenon of the resistance against pyrethroids under field conditions. The potential threats connected with the usage of PBO under field conditions for nontarget organisms and humans are also discussed in the presented guide.

**Key words:** resistance against pyrethroids, piperonyl butoxide, inhibition of Cytochrome P450, insecticide synergist, *Brassicogethes aeneus*, *Psylliodes chrysocephala*, *Ceutorhynchus pallidactylus*, lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox, LD values

# 1 Úvod

## 1.1 Vývoj rezistence u blýskáčka řepkového<sup>#</sup>, dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého k pyretroidům

Stručný popis vývoje rezistence u tří výše uvedených cílových škůdců k pyretroidům v České republice a v Evropě je popsán v části 6. Ekonomické aspekty. Důvodem je nesporná souvislost mezi vývojem rezistence u těchto důležitých řepkových škůdců a ekonomickými dopady, které z toho pro zemědělce vyplývají. Předkládaná metodika vychází z těchto souvislostí a cílí na způsob využití a implementaci PBO (synergista pyretroidních insekticidů) do systému integrované ochrany řepky proti zmíněným škůdcům. PBO je jeden z mála dostupných prostředků (= okamžitě využitelných na praktické úrovni), který lze nyní využít jako nástroj pro tlumení dopadů rezistence na praktické úrovni. Je ale potřeba vědět více o způsobu využití této látky v polních podmínkách, o tom, co lze od jejího začlenění do ochrany reálně očekávat pro řešení nedobrého stavu a také o možných negativních dopadech této látky na životní prostředí i samotného uživatele (člověka). Využití předkládané metodiky by mělo být zdrojem informací, které rozšíří znalosti ve všech těchto třech oblastech.

*#ve skutečnosti se na řepce vyskytuje více druhů blýskáčků (nyní spadajících do dvou různých rodů, Brassicogethes a Meligethes). B. aeneus vždy jasně dominuje, spolu se zástupci tohoto druhu se ve sběrech imag určených k testování do laboratoře dostávají i jedinci jiných druhů. Když je jejich podíl ve sběru vyšší (např. 20 % a více), může již dojít k ovlivnění výsledků, neboť tyto další druhy mají jinou bionomii, jiný okruh hostitelských rostlin, odlišnou vazbu k řepce olejce a tím pádem jsou pod odlišným (s vysokou pravděpodobností výrazně nižším) selekčním tlakem ze strany insekticidních aplikací (více ve Hrudová et al. 2023).*

## 1.2 Mechanismy rezistence k pyretroidům u těchto škůdců

V případě škůdců řepky (a polních plodin obecně) a jejich snížené citlivosti (rezistence) k pyretroidům je možné mluvit o dvou hlavních typech mechanismů rezistence. První je založen na modifikaci vazebného místa pro pyretroidní molekulu, druhý je způsoben nárůstem metabolické detoxifikace účinných látek prostřednictvím vyšších úrovní aktivity cytochromu P450 a esteráz (Vontas et al. 2010).

### 1.2.1 Necitlivost cílového místa (*kdr* a *s-kdr* typ rezistence)

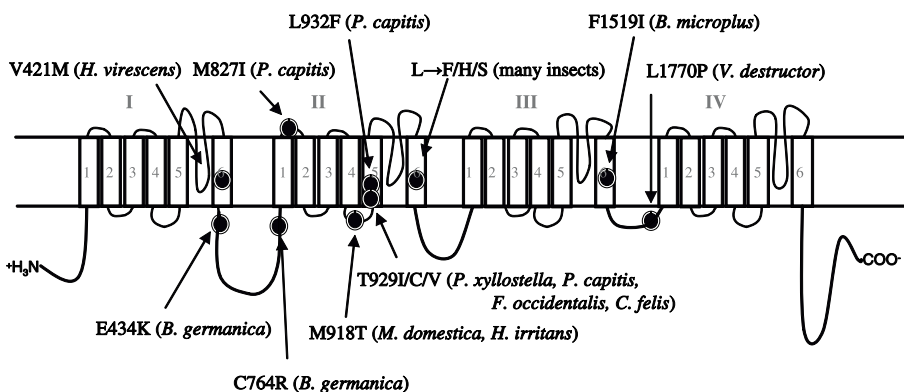
Místo, kde se pyretroidní molekuly v těle hmyzu vážou na receptory a kde také působí, jsou sodíkové pumpy. Sodíková pumpa je důležitá funkční část cytoplazmatické membrány nervových buněk (tedy nervových vláken – axonů) v centrální

nervové soustavě hmyzu. V pumpách je zprostředkováván přenos kladně nabitých sodíkových iontů z vnějšího prostředí buňky do vnitřního, což je velmi důležité pro správný přenos vzruchu po nervovém vlákne. Vzruch se šíří jako elektrický výboj, jehož základem je řízené a po axonu se šířící přepólování membrány – proces nemůže probíhat bez správné funkce sodíkové pumpy (Obrázek 1). Dojde-li k navázání určitého počtu molekul pyretroidní účinné látky na příslušná vazná místa na nervovém vlákne, je přenos sodíkových kationtů narušen a vzruch se po vlákne nešíří správně (projevem jsou slabé až těžké diskoordinace pohybu) nebo se nešíří vůbec (vnějším projevem je pak kompletní paralýza a následně smrt). Síla projevu je u citlivých jedinců úměrná použité dávce. Odpovídá tedy podílu vazebných míst obsazených molekulami pyretroidní účinné látky. Čím víc jich je obsazeno, tím silnější vnější projev, protože míra narušení přenosu informace po nervovém vlákne je větší.

Po velmi stručném popisu toho jak a kde pyretroidy v těle působí, je možné přistoupit k popisu prvního typu mechanismu rezistence. Tento typ rezistence byl popsán u různých druhů hmyzu (mouchy domácí a různých druhů komárů, švábů, několika druhů motýlů, mšic, třásněnek i brouků) i dalších členovců, např. roztočů (Inglese et al. 1996, Wang et al. 2003, Dong 2007). Příčinou jsou mutace, které se mohou vyskytnout na několika místech proteinového řetězce, jenž prochází v podobě vlákna skrze všechny čtyři domény sodíkové pumpy (Obrázek 1). Mutace, které se projevují sníženou citlivostí sodíkové pumpy k pyretroidům se z hlediska významu a síly dopadu dělí na *kdr* a *super kdr* (*kdr* = *knock down resistance*). Pro většinu druhů hmyzu, které rezistenci k pyretroidům získaly, jsou podstatné mutace projevující se v té části proteinového řetězce (sekvence aminokyselin), který spojuje segmenty 4 a 5 (popř. je součástí segmentu 5) nebo prochází segmentem 6 v doméně II sodíkové pumpy. V případě mutace (*kdr* nebo *s-kdr*) se pyretroidní účinná látka nemůže na membránu axonu navázat a funkci nervové buňky nenaruší – proto se tento typ mechanismu rezistence také někdy označuje (a zahrnuje v sobě termíny *kdr* i *s-kdr*) jako necitlivost cílového / vazebného místa (*target site insensitivity*).

*Kdr* typ je u blýskáčka řepkového a dřepčíka olejkového způsoben mutací, jejímž důsledkem je nahrazení leucinu (L) fenylalaninem (F) a to v části proteinového řetězce procházejícího segmentem 6 domény II. Tato mutace se označuje jako L1014F a byla potvrzena u řady hmyzích druhů. Na Obrázku 1 je označena černým puntíkem, ke kterému směřuje šipka od popisku *L→F/H/S* (*many insects*): leucin nemusí být nahrazen vždy jen fenylalaninem (jak je tomu u blýskáčka a také dřepčíka olejkového), ale také histidinem (H) nebo serinem (S). Hmyz s touto mutací (platí to i pro blýskáčka řepkového a dřepčíka olejkového) vykazuje středně silnou rezistenci k pyretroidům (tj. 10–20násobné snížení citlivosti k této skupině insekticidů).

*Super kdr* typ je způsoben mutacemi, které postihují aminokyselinovou sekvenci spojující segment 4 a 5 (to je mutace M918T/někdy L známá a potvrzená u několika druhů hmyzu) či část v segmentu 5. To je např. mutace T929I/C/V – ze škůdců s vazbou na řepku popsaná u záplavníka polního, *Plutella xylostella*, ale i několik dalších mutací, zejména na pozicích 925 a 932. Ve všech případech jde opět o doménu II sodíkové pumpy (Obrázek 1). Hmyz s mutacemi na těchto pozicích vykazuje již 100krát (a více) sníženou citlivost k pyretroidům. *S-kdr* má tedy výrazně větší praktický dopad než *kdr*. U evropských populací blýskáčka řepkového tyto mutace zatím nebyly nalezeny, i když se po nich pátrá (Obrázek 2). U dřepčíka olejkového již naopak jedna z mutací podmiňujících *s-kdr* typ rezistence nalezena byla (viz text níže), u k. čtyřzubého se takto zaměřený výzkum ještě nerozběhl (Nauenet al. 2012, Højland & Kristensen 2018, Willis et al. 2020).



Obrázek 1 –  $\alpha$ -podjednotka sodíkové pumpy hmyzu (a některých dalších členovců) skládající se ze čtyř homologních domén (I–IV). Každá z nich je složena ze šesti segmentů (1–6) procházejících skrze cytoplazmatickou membránu nervové buňky. Jednotlivé segmenty v rámci všech čtyř domén a současně i jednotlivé domény mezi sebou jsou vzájemně propojeny intracelulárními a extracelulárními smyčkami. Jde o řetězec, tedy sekvenci, aminokyselin – tj. na obrázku ilustrováno černou klikatící se čarou. Kanálek (pore), kterým prochází sodíkové ionty, je v každé ze čtyř domén a nachází se mezi segmenty 5 a 6. Jeho důležitou částí je i do membrány vnořená část aminokyselinové sekvence spojující tyto dva segmenty. Aminokyselinová skladba vnořené části smyčky je důležitá z hlediska determinace iontů (slouží jako filtr póru). O otevření (aktivaci) kanálku pro sodíkové ionty rozhodují (slouží jako sensor) kladně nabitě části sekvence aminokyselin soustředěné v segmentech 4 a 5 (způsobuje to především přítomnost lizinů a argininů), které se v reakci na přepólování membrány pohybují směrem ven (od kladného náboje), což vede k otevření kanálku pro sodíkové ionty. Deaktivace a rychlé uzavření kanálku souvisí s hydrofobní povahou (tzv. hydrophobic IFMT motif) centrální částí krátké spojky segmentů 3 a 4. Černé puntíky označují místa mutací (tedy místa, kde došlo k nahrazení původní aminokyseliny jinou) prokazatelně způsobujících snížení citlivosti k pyretroidům u různých druhů hmyzu nebo třeba i roztočů (*Varroa destructor*, mutace L1770P), (ilustrace převzata z publikace Dong 2007).

Nyní je na místě položit si a pokusit se odpovědět na tyto otázky: Jak výrazně necitlivost cílového místa jako typ rezistence ovlivňuje účinnost pyretroidů aplikovaných v porostech na blýskáčka řepkového, dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého? Do jaké míry je příčinou selhávání této skupiny pyretroidů na tyto škůdce u nás a v Evropě?

U blýskáčka řepkového hraje tento typ rezistence zřejmě zcela zanedbatelnou roli, což dokladují výsledky několika studií založených často na plošně velmi rozsáhlém monitoringu (např. Philipou et al. 2011, Nauen et al. 2012 + Obrázek 2). V Evropě byla zaznamenána poněkud vyšší frekvence mutace L1014F (*kdr*) pouze v dánských a švédských populacích. Výsledky získané autorským týmem této metodiky v souladu s výše zmíněnými publikacemi ukazují též na zcela zanedbatelný význam tohoto typu rezistence u českých populací blýskáčků. Od roku 2020 je v rámci rutinního monitoringu rezistence k pyretroidům pomocí lahvičkových testů část jedinců, kteří přežili kontaktní vystavení vysokým dávkám pyretroidů (lambda-cyhalothrin a tau-fluvalinate), zamrazována a následně testována molekulárními metodami (*pyrosequencing kdr/s-kdr diagnostic assay*) na přítomnost obou výše zmíněných mutací v genech pro sodíkovou pumpu. Za celou dobu monitoringu během sezón 2020 až 2024 byl nalezen pouze jeden jedinec s mutací pro *kdr* (L1014F). Ročně je otestováno několik desítek až set jedinců za tímto účelem. Dosud jediný v ČR nalezený pozitivní jedinec přežil kontaktní expozici registrované dávce tau-fluvalinatu trvající 24 hodin a pocházel z populace odebrané poblíž Českých Budějovic na jaře roku 2021 (Obrázek 3; Ludvíková & Seidenglanz 2023; + redakčně upravené zprávy z projektu QK21010332 za roky 2020–2024; – viz dedikace této metodiky). Příčina, proč pyretroidy na blýskáčka řepkového v ČR (ale i jinde v Evropě) zcela selhávají, je tedy jiná než necitlivost cílového místa. Důvodem je metabolická rezistence (viz část 1.2.2.).

U dřepčíka olejkového je situace odlišná v tom, že v jeho evropských populacích je mutace L1014F (ta je příčinou *kdr*) rozšířena podstatně více. A to jednak v geografickém smyslu a za druhé ji v populacích nese větší počet jedinců (je zde podstatně vyšší frekvence mutace). Velmi podrobný monitoring se prováděl v Německu na populacích postupně shromažďovaných v letech 2009–2014 (Zimmeret al. 2014a) a v Dánsku, Švédsku a Velké Británii na populacích získaných v letech 2014–2017 (Højland et al. 2015, Højland & Kristensen 2018). Willis et al. 2020 ještě na tyto studie zahrnující především severozápad Evropy navázali a publikovali výsledky rozsáhlých testů s populacemi z Velké Británie, které byly získány v letech 2018 a 2019. Ve všech výše zmíněných zemích byl *kdr* typ rezistence zaznamenán. A to ne v malé míře. Např. v poslední publikované práci na toto téma Willis et al. (2020) zjistili, že v roce 2019 bylo ve Velké Británii 36 % jedinců v populacích rezistentními homozygoty (RR) a 33 % jedinců rezistentními heterozygoty (SR; Willis et al. 2020

použili k detekci metodu TaqMan assay). Bothorel et al. (2018), kteří analyzovali genové sekvence fragmentů sodíkových pump 294 populací dřepčika olejkového sesbíraných v průběhu čtyř sezón (2015–2018) prakticky ze všech částí Francie, prokázali, že mutace L1014F je přítomná v 94 % z nich – to znamená ještě více než v Anglii.

Přes takto vysokou frekvenci L1014F mutace v populacích dřepčika olejkového nejde o hlavní důvod selhávání aplikací pyretroidů v polních podmínkách. Nesnižuje citlivost k pyretroidům natolik, aby se to v polních podmínkách projevilo viditelně (*kdr* je příčinou „jen“ 20–30% poklesu účinnosti pyretroidů – v praxi jsou výpadky mnohem vyšší). Navíc, jak vyplývá z výsledků pokusů Højlandové & Kristensena (2018), zřejmě neexistuje žádná významná pozitivní korelace mezi frekvencí této mutace v populacích dřepčika olejkového (výsledky molekulárních analýz) a fenotypovým projevem rezistence (výsledky lahvičkových testů). Populace, které z lahvičkových IRAC testů (*Adult vial tests*) vychází jako méně citlivé (nebo rezistentní, to je vyjádřeno např. hodnotami LD<sub>50</sub> v g a.i./ha) nemusí vůbec vykazovat vyšší frekvenci mutace L1014F. Naopak populace s vyšší frekvencí této mutace mohou z lahvičkových testů vyjít jako citlivé k testovaným pyretroidům.

Další odlišnost mezi blýskáčkem řepkovým a dřepčikem olejkovým je, že v jeho populacích byl zaznamenán i výskyt *s-kdr*. A to ve francouzských (Bothorel et al. 2018) a britských (hlavně anglických) populacích (Willis et al. 2020). Za touto rezistencí, jak bylo vysvětleno výše, může stát více mutací (nejčastěji se uvádějí tyto: M918L/T, L925I, T929I/C/V, L932F). V anglických populacích dřepčika olejkového byl potvrzen výskyt L925I a frekvence rezistentních homozygotů (RR) byla 2.5 % v roce 2018 a 6.6 % v roce 2019. Frekvence rezistentních heterozygotů (SR) byla 17.5 % (rok 2018) respektive 19.7 % (rok 2019). To nejsou zanedbatelné hodnoty (Willis et al. 2020). Ve Francii, jak vyplývá z výsledků Bothorel et al. (2018), je tou nejčastější mutací způsobující *s-kdr* M918L. Byla detekována v 19 % populací dřepčika olejkového, přičemž otestováno bylo 294 populací z celé Francie postupně získávaných během let 2015 až 2018. Geografické rozložení frekvencí této mutace v populacích není rovnoměrné. V některých centrálních regionech Francie je vyšší než 80 % (Obrázek 5a). Z výsledků také vyplývá, že v řadě regionů Francie se v populacích vyskytuje více různých mutací. Z nich některé jsou spojovány i s jinými druhy hmyzu. Jde např. o T929N (u dvou populací i T929I), která byla popsána u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*, Rinkewich et al. 2013) a L925I, což je ta nejčastější *s-kdr* mutace v anglických populacích (viz výše), ale byla zaznamenána také u molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*, opět Rinkewich et al. 2013). Tyto mutace se vyskytovaly buď samostatně nebo v kombinacích s dalšími (někdy až pět různých mutací u jedné populace) u 34 % populací dřepčika olejkového (Obrázek 5b).

Přesto jsou, jak ukazují pokusy s inhibítorem cytochromu P450, látkou PBO (viz níže), i u dřepčíka olejkového polní selhání pyretroidních aplikací, ke kterým dochází v posledních letech zjevně stále častěji a na větším území (vývoj je popsán v kapitole 6. Ekonomické aspekty; Willis et al. 2020, Stará & Kocourek 2019, Kocourek et al. 2024), způsobeny hlavně metabolickou rezistencí. A zde je tedy s blýskáčkem řepkovým opět shoda. Willis et al. (2020) se podařilo opakovaně na anglických populacích dřepčíka olejkového (shromážděných v letech 2018 a 2019) vykazujících vysoké frekvence mutace L1014F (*kdr*) a též nezanedbatelné frekvence mutace L925I (*s-kdr*) a již zcela odolávajících kontaktní expozici registrované dávce lambda-cyhalothrinu (lahvičkový test) prokázat, že se i u nich vrací citlivost k pyretroidům po zablokování cytochromu P450 (jde hlavně o monoxygenázy) použitím PBO (Obrázek 4).

U krytonosce čtyřzubého, u kterého už také byly zaznamenány problémy s rezistencí (viz vývoj situace v kapitole 6. Ekonomické aspekty), není známo, do jaké míry jsou v populacích tohoto druhu výše zmíněné typy mutací (způsobujících buď *kdr* nebo *s-kdr* typ rezistence) rozšířeny. Nebylo to zatím předmětem žádné vědecké studie, nebyly dosud publikovány žádné výsledky na toto téma.

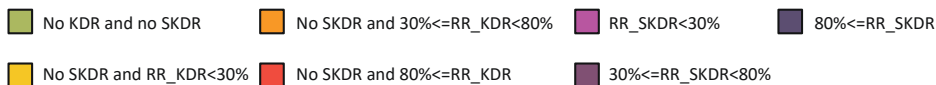
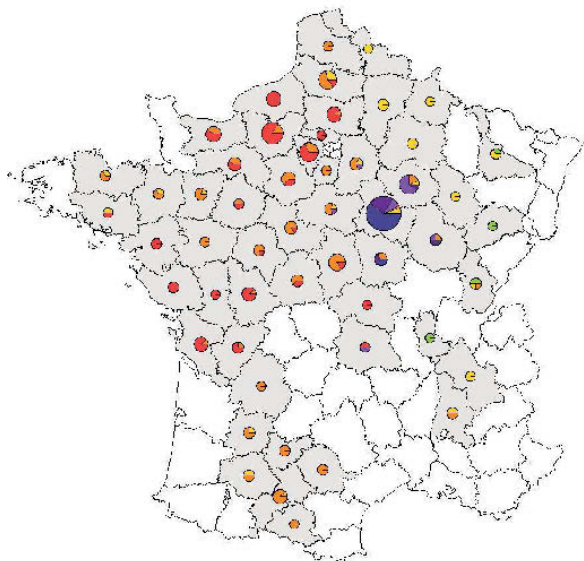


Obrázek 2 – Vlajčkou jsou označeny lokality, ze kterých byly v rámci celoevropského monitoringu probíhajícího v letech 2006 až 2010 odebrány populace blýskáčka řepkového (*Brassiogethes* sp.), u nichž byla potvrzena *kdr* rezistence (tedy mutace L1014F). Bylo testováno celkem 400 populací z různých míst a do vlastního testu (molekulární analýza zaměřená na potvrzení přítomnosti mutace L1014F - *kdr* a M918T – *s-kdr*) se dostali pouze ti jedinci z různých populací, kteří v IRAC lahvičkovém testu (IRAC Adult Vial Test) přežili kontaktní expozici 20% a 100% dávce lambda-cyhalothrinu nebo tau-fluvalinatu. Tzn. mutace způsobující rezistenci *kdr* anebo *s-kdr* se hledaly pouze v DNA těch jedinců, o kterých se pomocí lahvičkového

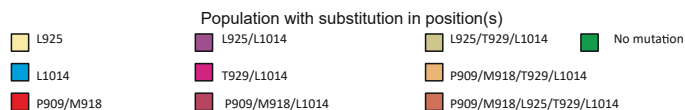
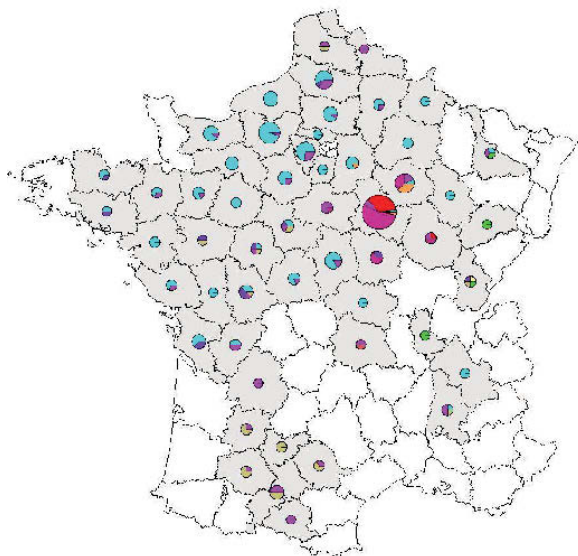
testu zjistilo, že jsou rezistentní (fenotypově – na základě chování). Původ všech otestovaných populací je označen kolečky (tmavší kolečka = místa, kde byly sběry v průběhu let 2006–2010 provedeny opakovaně, proto je zde  $n > 1$ ). Mutace vedoucí k závažnější rezistenci typu *s-kdr* (pátralo se po M918T) nebyla nalezena u žádného z jedinců (ilustrace převzata z publikace Nauen et al. 2012).



Obrázek 5a – Disperze a frekvence mutací L1014F (podmiňuje rezistenci typu kdr, zde KDR) a M918L (podmiňuje rezistenci typu s-kdr, zde SKDR) u francouzských populací dřepčíka olejkového (*Psylliodes chrysocephala*) testovaných v letech 2015 až 2018. Otestováno celkem 294 populací. Velikost kruhů odpovídá počtu otestovaných populací z dané oblasti (pohybuje se v intervalu od 1 do 38). RR = rezistentní homozygot. Převzato z publikace: Bothorel et al. (2018)



Obrázek 5b - Disperze a frekvence kombinací různých mutací (nejen L1014F, která podmiňuje rezistenci typu kdr a M918L, která podmiňuje rezistenci typu s-kdr) kumulujících se a kombinujících se ve francouzských populacích dřepčíka olejkového (*Psylliodes chrysocephala*) testovaných v letech 2015–2018. Otestováno celkem 294 populací. Velikost kruhů odpovídá počtu otestovaných populací z dané oblasti (pohybuje se v intervalu od 1 do 38). RR = rezistentní homozygot. Převzato z publikace: Bothorel et al. (2018)



### 1.2.2 Metabolická rezistence

Druhý mechanismus rezistence se označuje jako metabolická rezistence. Jak již z výše uvedeného vyplývá, je u řepkových škůdců, na něž zde cílíme, tou hlavní příčinou polních selhání pyretroidních aplikací, a tedy tím hlavním mechanismem rezistence. Jako metabolická rezistence se označuje proto, že jde v principu o lepší schopnost rezistentních jedinců metabolizovat (a tedy detoxifikovat) účinnou látku pyretroidu díky vyšší aktivitě některých enzymů. S rezistencí hmyzích škůdců k insekticidům (a obecně s detoxifikačními procesy u různých typů organismů, a to třeba i prokaryotických) jsou obecně spojovány tři skupiny enzymů. Glutathion S-transferázy, esterázy a cytochrome P450 (*P450s*, *CYPs*). Na možnou souvislost mezi rezistencí evropských populací blýskáčka řepkového a vyšší aktivitou cytochromu P450 jako první zřejmě upozornili Philipou et al. (2011). Zimmer C & Nauen R (2011b) sérií pokusů s rezistentními populacemi blýskáčků k pyretroidům se specifickými inhibitory výše zmíněných tří skupin enzymů (Tabulka 1) v kombinaci s různými pyretroidy (ty byly aplikovány buď sólo nebo v kombinaci s některým inhibítorem) to pak potvrdili. Důvodem metabolické rezistence blýskáčka řepkového je tedy vyšší aktivita cytochromu P450. Glutathion S-transferázy zde nehrají žádnou roli a esterázy zřejmě též žádnou anebo malou (Zimmer et al. 2014b). A v podstatě to samé platí i pro dřepčíka olejkového (Højland & Kristensen 2018, Willis et al. 2020). Jaké enzymatické skupiny (popř. mutace – viz část 1.2.1.) stojí za poklesem citlivosti k pyretroidům u populací krytonosce čtyřzubého se téměř nic neví. Podstatné rozšíření znalostí ale může přinést využívání této metodiky. Z pilotních pokusů, které posloužily jako základ pro sestavení této metodiky, prováděných autorským týmem s populacemi krytonosce čtyřzubého (zatím nepublikovaná data) vyplývá, že i v jejich případě se dostavuje výrazný synergický efekt PBO projevující se zvýšením citlivosti k pyretroidům (a tedy poklesem jejich hodnot  $LD_{50-90}$ , velmi dobře i pro k. čtyřzubého tuto situaci vystihuje Obrázek 4). Takže i v jejich případě půjde o zvýšení aktivity cytochromu P450, esteráz nebo obou skupin. Podíl vlivu esteráz v jejich případě ještě nelze vyloučit, protože se dosud pracovalo jen s PBO – PBO inhibuje nejen cytochrom P450 ale i (alespoň částečně) esterázy. Navrací-li se tedy po použití PBO citlivost k pyretroidům, nelze ještě vyloučit, že rezistence je způsobena i vyšší aktivitou esteráz. To by se musely testy rozšířit i o specifické inhibitory esteráz (tj. DEF, viz Tabulka 1), aby se jejich podíl na rezistenci buď potvrdil nebo vyloučil – tímto způsobem se vyloučil vliv esteráz na metabolickou aktivitu zatím jen u blýskáčka i dřepčíka, ne u krytonosce čtyřzubého. I když proto tedy zatím neexistují potvrzující výsledky, lze se domnívat, že typy rezistence (jejich fyziologická a molekulární podstata) nebudou u k. čtyřzubého příliš odlišné od toho, co bylo popsáno u předešlých dvou druhů škůdců. K. čtyřzubý k sobě nepoutá takovou pozornost jako blýskáček řepkový a dřepčík olejkový, závažným škůdcem zůstává jen ve střední Evropě (Heimbach & Müller 2013, Seidenglanz et al. 2009, 2022).

Tabulka 1 – Tři hlavní skupiny enzymů spojované s detoxifikačními procesy u různých skupin organismů a jejich inhibitory

enzymatická skupina	specifický inhibitor její aktivity
glutathion S-transferáza	diethyl maleate (DEM)
esterázy	S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF), také piperonyl butoxide (PBO) <sup>1</sup>
cytochrom P450	piperonyl butoxide (PBO) <sup>1</sup> , tebuconazole <sup>2</sup> , 1-aminobenzotriazole

<sup>1</sup>mechanismus účinku PBO byl popsán až dvacet let po jeho uvedení na trh (viz Perry & Buckner 1970) a až téměř do konce dvacátého století se myslelo, že jde o specifický inhibitor monoxygenáz cytochromu P450; v roce 1998 ale Gunning et al. zjistili, že inhibuje i esterázy.

<sup>2</sup>fungicid a růstový regulátor ze skupiny triazolů; ve vědecké literatuře se především řeší jeho inhibiční vliv na lidský cytochrom P450 (je to jeden z hlavních důvodů, proč se nad touto látkou vznáší nebezpečí zákazu, viz např. Yang et al. 2018, Habenschus et al. 2021; prakticky nic se neví o tom, jestli by tuto látku bylo možné využít k mitigaci dopadů rezistence u řepkových škůdců – jde ale o cíl dalšího výzkumu řešitelského týmu, který předkládá tuto metodiku)

### 1.2.3 Cytochrom P450

Dosud získané výsledky ukazují, že zásadní enzymatickou skupinou umožňující rezistenci k pyretroidům u řepkových škůdců, na které se tato metodika zaměřuje, je Cytochrome P450. Cytochrome P450 (CYP, P450) je souborné označení pro enzymy obsahující skupinu HEM (HEME, HAEM) jako kofaktor, které většinou (ne ale výlučně) působí jako terminální oxidázy v tzv. monoxygenázových systémech (Tabulka 2). Jde o početně obrovskou skupinu proteinů, které lze nalézt téměř ve všech živých organismech (myšleno jako superfamily CYP – viz Obrázek 6; Huang et al. 2013). U hmyzu bylo do současné doby popsáno více než 1000 různých CYP genů (Zhou & Huang2002), které spadají do různých tzv. *families*: CYP4, CYP6, CYP9, CYP12, CYP15 a další (*family* je určena číslem za zkratkou CYP). Z těchto *families* jsou s rezistencí k insekticidům spojovány CYP4, CYP6, CYP9 a CYP12 (Feyereisen2005, Guo et al. 2012).

Počet CYP genů se mezi různými druhy hmyzu více či méně liší. Např. 91 CYP genů bylo identifikováno u *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná), 158 u nebezpečného přenašeče lidských patogenů moskyta *Aedes aegypti* (český název je komár tropický), 78 u bource morušového (*Bombyx mori*) a 146 CYP genů bylo identifikováno u obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Adams et al. 2000, Strobe et al. 2008, Xia et al. 2004, Wan et al. 2019). A jen pro srovnání u slíďáka *Pardosa pseudoannulata* to je 120 CYP genů (Wang et al. 2021).

CYP6 je unikátní pro hmyz (třída Insecta). Enzymy patřící do *family* 6 (tedy různé *subfamilies* – viz Obrázek 6) katalyzují oxidaci sekundárních metabolitů a různých exogenních (zvenku do těla vstupujících) látek, takže není divu, že jsou, dojde-li k nárůstu jejich aktivity (to je podmíněno zvýšením jejich koncentrace v tkáních a toto je zase podmíněno nárůstem genové exprese příslušných CYP6 genů), dů-

vodem, proč hmyz dokáže přežít expozici vysokých dávek některých xenobiotik, třeba insekticidů (Bergé et al. 1998). A nejde jen o pyrethroidy. Studie na *Locusta migratoria* (saranče stěhovavá) ukázaly, že úroveň exprese CYP6 genů rozhoduje o citlivosti / rezistenci tohoto rovnokřídlého hmyzu nejen k pyreteroidům, ale též ke karbamátům (Zhang et al. 2019). Zvýšená exprese (*overexpression*) genu CYP6CM1 u významného po celém světě rozšířeného škůdce, molice *Bemisia tabaci*, je příčinou rezistence k neonikotinoidům (Li et al. 2015). U jednoho z nejdůležitějších světových škůdců (z hlediska ekonomických dopadů), housenek mûry černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*), Wang et al. (2018) zjistili, že s nárůstem úrovně exprese CYP6 lze spojovat nejen pokles citlivosti k několika skupinám syntetických insekticidů s různým mechanismem účinku, ale také snížení jejich citlivosti k řadě toxinů, které se vytváří v napadených rostlinách (*phytochemicals*) jako projev jejich obranných reakcí proti herbivorům. U housenek obaleče východního (*Grapholita molesta*; viz také Obrázek 6) Han et al. (2022) prokázali jasnou příčinnou souvislost mezi nárůstem exprese CYP6 a poklesem citlivosti k malathionu (insekticid ze skupiny organofosfátů), deltamethrinu (pyrethroid) a dokonce i k zástupci diamidů (ú.l. chlorantraniliprole).

Z hlediska možných dopadů aktivity enzymů Cytochromu P450 na snížení efektu pyreteroidů na určitou populaci škůdce (např. dřepčika olejkového) není bez zajímavosti, že úroveň exprese konkrétního CYP6 genu se může lišit mezi jednotlivými vývojovými stadii – rozdíl není jen mezi vajíčkem, larvou a dospělcem, ale i mezi jednotlivými larválními instary. V praxi to znamená, že dospělci dřepčika olejkového na tom mohou být jinak než larvy. Hladiny cytochromu P450 u nich mohou být různé, a tedy i jejich schopnost přežít pyreteroidní aplikace může být různá. Bohužel, u řepkových škůdců se o tom zatím vůbec nic neví. Přitom u druhů, kde škody způsobují dvě různá vývojová stadia, jako je právě dřepčík olejkový (škodí jak dospělec, tak larva), by bylo dobré to z praktických důvodů vědět. Han et al. (2022) ve své práci s obalečem východním (*G. molesta*) srovnávali úrovně exprese několika CYP6 genů (CYP6AB112, CYP6AB113, CYP6AB114, CYP6AB115, CYP6AB116, CYP6AB117, CYP6AN35 a CYP6B74) v různých vývojových stadiích (vajíčko, I. – V. larvální instar, kukla a dospělec) tohoto druhu motýla. Autoři zjistili, že se jednotlivá stadia výrazně liší expresí CYP6 genů celkově (nejvíce vybavené enzymy CYP6 byly housenky třetího instaru), ale také to, že některé z osmi sledovaných CYP6 genů byly pro určité vývojové stadium charakteristické (míra jejich exprese zde byla signifikantně vyšší než v jiných stadiích). Tak např. dospělci disponovali signifikantně vyššími hladinami enzymu CYP6AN35 než ostatní vývojová stadia, pro housenky čtvrtého instaru byla charakteristická vyšší exprese CYP6B74, pro vajíčka CYP6AB116 atd. Navíc vše ještě bylo ovlivněno tím, jakým insekticidům byli jedinci během vývoje vystaveni. Např. expozice organofosfátu (ú.l. malathion) byla příčinou zvýšení aktivity (důsledek nárůstu úrovně exprese) jiných CYP6 než

Tabulka 2 – Vysvětlení některých pojmů vztahujících se k Cytochromu P450 (označován zkráceně též jako: P450 nebo CYP)

pojem		vysvětlení
Hem (Heme, Haem)		jedná se o do podoby kruhu tvarovanou molekulu obsahující atom železa (Fe), která je součástí hemoglobinu; přítomnost složky hem umožňuje navázání molekuly kyslíku O <sub>2</sub>
cofactor		jedná se o nebiřkovinovou součást (např. ion nějakého kovu) enzymu, která umožňuje a podmiňuje jeho katalytickou funkci
jaký je rozdíl mezi oxidací katalyzujícími enzymy:	monoxygenázy	právě tato skupina oxidací katalyzujících enzymů hraje nejdůležitější roli v metabolické rezistenci; katalyzují vnesení jednoho atomu O z molekuly kyslíku O <sub>2</sub> do oxidovaného substrátu / produktu (např. molekula pyretroidu), zatímco druhý atom O je redukován na vodu. proto se této skupině také někdy říká <i>Mixed Function Oxygenases</i>
	dioxygenázy	při oxidaci katalyzované touto skupinou enzymů se vnáší oba atomy O z molekuly O <sub>2</sub> do substrátu / produktu
	oxidázy	tyto enzymy katalyzují oxidační reakce během nichž nedochází k vnášení ani jednoho z atomů O z molekuly O <sub>2</sub> do oxidovaného substrátu

expozice ú.l. deltamethrin či cyantraniliprole u stejného vývojového stadia (např. u housenek třetího instaru).

Velký pokrok v sekvenování genomu a transkriptomu, který nastal v první dekádě tohoto století, usnadnil a urychlil cestu k objevení již poměrně velké řady hmyzích CYP genů, a hlavně umožnil jejich funkční charakterizaci. Tedy popsal, jakou roli hrají v rezistenci proti pyretroidům nebo dalším insekticidům (Chiu et al. 2008, Zhu et al. 2010, Stevenson et al. 2011, Mitchel et al. 2012, Jousen et al. 2012, Riveron et al. 2013).

U brouků (řád *Coleoptera*) byl jako první gen P450 spojovaný s metabolickou rezistencí k insekticidům popsán v roce 2010, jedná se o CYP6BQ9 u potměníka *Tribolium castaneum*. Jde o výsledek práce Zhu et al. (2010). Tito autoři zjistili, že u jedinců *T. castaneum* vykazujících rezistenci k deltamethrinu dochází k 200násobnému zvýšení koncentrace proteinu CYP6BQ9 (pro označení genu i jeho expresního produktu se používá stejný kód) fungujícího jako monoxygenáza. Také prokázali, že CYP6BQ9 katalyzuje metabolizaci deltamethrinu prostřednictvím hydroxylace. Vzniká 4-hydroxy derivát tohoto pyretroidu, který je hydrofilní a poměrně snadno ho lze vyloučit z těla, aniž by došlo k vyvolání typické reakce s účinkem insekticidu spojované. Zimmer & Nauen pak v publikaci vydané o rok později (2011b) na základě výsledků pokusů s různě rezistentními jedinci blýskáčka řepkového (ve skutečnosti šlo o *in vitro* pokusy s microsómy připravenými z buněk blýskáčka řepkového) prokázali, že také u tohoto druhu dochází u rezistentních jedinců k intenzivnější hydroxylaci pyretroidní účinné látky a tvorbě 4-hydroxy derivátu (v jejich případě 4-hydroxy deltamethrinu), a že vyšší koncentrace tohoto

Tabulka 3 - Násobek změny (nárustu nebo poklesu) v expresi každého z deseti identifikovaných CYP genů u jednotlivých populací blýskáčků v porovnání se stavem u vysoce citlivé referenční populace (70-10a). Převzato z publikace Zimmer et al. (2014b)

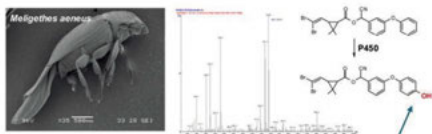
Populace		Změna exprese u konkrétního CYP genu									
		CYP6BQ23	CYP6-like 1	CYP6-like 2	CYP4-like 1	CYP4-like 2	CYP4-like 3	CYP4-like 4	CYP4-like 5	CYP4-like 6	CYP4-like 7
70-10 <sup>a</sup>	s	1 ± 0,501	1 ± 0,122	1 ± 0,218	1 ± 0,362	1 ± 0,119	1 ± 0,272	1 ± 0,163	1 ± 0,249	1 ± 0,229	1 ± 0,163
127-10	s	1,45 ± 0,224	0,382 ± 0,08	0,159 ± 0,029*	0,455 ± 0,2	0,204 ± 0,013*	0,469 ± 0,166	0,102 ± 0,016**	2,26 ± 0,583*	0,52 ± 0,063	0,185 ± 0,004**
8-10	r	491 ± 169***	1,44 ± 0,173	0,503 ± 0,04	1,07 ± 0,669	0,687 ± 0,181	0,625 ± 0,073	0,495 ± 0,06	1,67 ± 0,403	1,02 ± 0,023	0,678 ± 0,042
57-10	r	548 ± 82,0***	0,874 ± 0,052	0,632 ± 0,039	1,18 ± 0,526	1,10 ± 0,247	0,705 ± 0,096	0,503 ± 0,04	2,42 ± 0,682	1,22 ± 0,122	0,743 ± 0,045
68-10	r	337 ± 87,0***	0,513 ± 0,105	0,725 ± 0,253	0,307 ± 0,042	1,10 ± 0,302	0,69 ± 0,133	1,19 ± 0,064	1,80 ± 0,288	1,08 ± 0,205	0,501 ± 0,171
79-10	r	938 ± 62,6***	1,33 ± 0,22	0,911 ± 0,127	2,29 ± 1,33	0,81 ± 0,119	1,30 ± 0,104	1,49 ± 0,341	1,51 ± 0,476	0,669 ± 0,079	0,711 ± 0,051
96-10	r	493 ± 81,5***	1,58 ± 0,559	0,433 ± 0,124	4,39 ± 1,72	0,979 ± 0,115	0,834 ± 0,05	0,862 ± 0,105	3,23 ± 1,63	1,59 ± 0,5	1,06 ± 0,22
106-10	r	549 ± 117***	0,878 ± 0,288	0,584 ± 0,111	2,57 ± 1,24	0,861 ± 0,095	1,21 ± 0,382	0,682 ± 0,07	126 ± 0,325	0,742 ± 0,03	0,807 ± 0,155
120-10	r	269 ± 85,2***	2,15 ± 0,943	0,627 ± 0,187	2,33 ± 0,995	0,63 ± 0,193	1,74 ± 0,26	1,03 ± 0,064	1,19 ± 0,492	1,04 ± 0,125	1,02 ± 0,192

<sup>a</sup> Referenční populace 70-10 (původ: Ukraine, vysoce citlivá k pyretroidům); s = citlivá populace, r = rezistentní populace

Statistická průkaznost: \*\*\* P value < 0,001; \*\* P value < 0,01; \* P value < 0,05 (všechny ostatní změny v expresi genu nejsou statisticky významné odlišné od referenční populace 70-10)

produktu hydroxylace pozitivně koreluje s úrovní fenotypového projevu rezistence. Potvrdili tak, že za rezistenci blýskáčka řepkového stojí cytochrom P450 (viz levá polovina Obrázku 6). Když se tedy Zimmer et al. (2014b) pustili do hledání konkrétního CYP genu, který tuto vyšší aktivitu cytochromu P450 (a hydroxylaci pyretroidních molekul) u rezistentních blýskáček podmiňuje, měli již na co navazovat. Při izolaci, determinaci a kvantifikaci P450 genů (Real-time qRT-PCR) postupovali stejně jako Karunker et al. (2008), kteří u molice *Bemisia tabaci* identifikovali jedenáct CYP genů zodpovědných za odbourávání různých xenobiotik – mimo jiné i gen pro CYP6CM1, jehož několikanásobná nadprodukce (*overexpression*) způsobuje neúčinnost pyretroidů na tohoto škůdce. Zimmer et al. (2014b) použili tento přístup, protože genomická a transkriptomická data pro P450 blýskáčka řepkového nebyla k dispozici. Z deseti identifikovaných částečných genových sekvencí (*partial gene sequences*) pouze jedna, CYP6BQ23, korelovala s úrovní rezistence blýskáčka řepkového k pyretroidům. Jinak řečeno, pouze u CYP6BQ23 došlo k „overexpresi“ u rezistentních populací blýskáček v porovnání se stavem u referenční vysoce citlivé populace, Tabulka 3). Nárůst exprese CYP6BQ23 u rezistentních populací se pohyboval od 269násobku (populace 120-10) do 938násobku

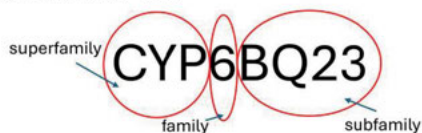
#### Metabolická rezistence u řepkových škůdců: nárůst aktivity cytochromu P450 – jde zejména o monoxygenázy



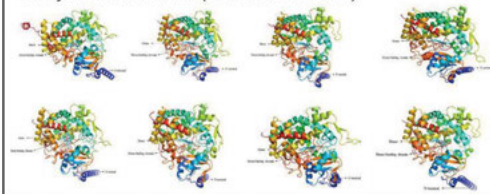
Enzymy cytochromu P450 obvykle přeměňují (convertují) xenobiotika (různé toxiny, např. pesticidy) v procesu hydroxylace na hydrofilní deriváty, které lze z těla snadno vyloučit. Zimmer & Nauen (2011) prokázali, že množství vyprodukovaného **4-hydroxy deltamethrinu** (v microsomes z několika různě rezistentních populací blýskáčka řepkového) koreluje s fenotypovým projevem rezistence k pyretroidům. Vyšší aktivita cytochromu P450 = vyšší rezistence k pyretroidům.

Zimmer C & Nauen R (2011b) Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pest. Biochem. Physiol.* 100, 264-272.

U rezistentních blýskáček dochází k až 900-krát zvýšené expresi jednoho z genů cytochromu P450:



Předpokládaná terciární struktura osmi CYP6 genů z motýla *Grapholita molesta* z vyznačením polohy HAEM a vazných míst na HAEM (dle Han et al. 2022)



Obrázek 6 – Popis role cytochromu P450 v detoxifikačních procesech hmyzu a v rezistenci blýskáčka řepkového k pyretroidům (levá část obrázku). Konkrétní gen pro jednu z monoxygenáz (CYP6BQ23) k jejíž nadměrné produkci u rezistentních jedinců blýskáčka řepkového dochází (pravá horní část obrázku), jak prokázali ve své studii Zimmer et al. (2014) a příklad terciárních struktur několika dalších CYP6 genů (family 6, tedy CYP6 je unikátní pro hmyz) obaleče *Grapholita molesta* (obaleč východní). Poznámka: označení konkrétního genu (např. CYP6BQ23) odpovídá i označení konkrétního produktu jeho exprese – v tomto případě tedy monoxygenáze CYP6BQ23

(populace 79-10). I když nelze vyloučit, že se na metabolizaci pyretroidů u rezistentních populací blýskáčka řepkového podílejí i produkty exprese dalších CYP genů, CYP6BQ23 hraje zásadní roli (viz také Obrázek 6 – vpravo nahoře).

### 1.3 Piperonyl butoxide (PBO)

PBO není nová látka. Její využívání v ochraně proti hmyzím škůdcům v roli synergisty (= posilovač účinnosti) insekticidů trvá již asi sedmdesát let. Vše začalo potřebou zvýšit a prodloužit účinnost insekticidů na bázi pyrethra (přírodní předchůdce syntetických pyretroidů, získávány například z kopretiny starčkolisté (*Chrysanthemum cinerariifolium*)). Tyto látky se tehdy používaly k hubení moskytů, přenašečů původců různých chorob běžných v tropech a subtropích (malárie, horečka dengue, žlutá horečka, *chikungunya*, tularémie, *filariasis*, různé druhy encephalitid a asi dvacet dalších chorob; Rivera-González et al. 2021). Dříve se ještě místo termínu synergista používal pojem „*extender*“ (*extender* = něco, co rozšiřuje efekt, dopad, působnost něčeho jiného). Úsilí v hledání vhodných „*extenderů*“ / synergistů pro pyrethrum (má relativně krátký reziduální efekt, rychle podléhá rozkladu v důsledku expozice slunečního záření) vyvrcholilo po několika těžkých epidemiích chorob, jejichž původce moskyti přenáší. Výsledkem zvýšeného výzkumného úsilí byl také objev PBO a způsob, jak ho získávat ze šikimolu, jinak také safroly, organické sloučeniny ze skupiny fenylyl propenů. První zmínka o objevu PBO pochází pravděpodobně z roku 1947 od Wachse. Komerčně se PBO používá od počátku padesátých let 20. století (Wachs et al. 1950). V průběhu několika následujících dekád se z PBO stal pravděpodobně nejdůležitější synergista insekticidů, což souvisí s objevy (a postupným uváděním na trh) insekticidů na bázi rotenonu, karbamátů, chlorovaných uhlovodíků (DDT a spol.) a syntetických pyretroidů (Pohanish 2015), jejichž účinnost posiluje. V poslední době byl součástí asi 2500 insekticidních formulací registrovaných v různých částech světa k různým účelům (Rivera-González et al. 2021). Jeho hlavní využití (a tomu odpovídající relativní spotřeba) není v pozici synergisty insekticidů aplikovaných proti škůdcům v polních podmínkách. Alespoň dosud tomu tak nebylo (Daiss & Edwards 2006). Problémy působené rezistencí hmyzích škůdců k pyretroidům a rostoucí hospodářské dopady tohoto fenoménu mohou rozložení spotřeby PBO k různým účelům začít v nejbližší budoucnosti měnit. Jeho využití jako synergisty polních pyretroidních aplikací zřejmě nabude na významu (Dewaret al. 2014). Určitou formou potvrzení tohoto tvrzení je i snaha směřující k uplatnění a využívání této metodiky.

### 1.4 Proč se snažit najít nejnižší účinnou dávku PBO

Jak bylo zmíněno výše, PBO se dosud více spotřebovává jinde než při ošetřování polních plodin během jejich vegetace. Místa, kde může dojít (a také dochází) ke

kontaktu s touto účinnou látkou, jsou hlavně různé provozy, kde se zemědělská produkce (rostlinného i živočišného původu) zpracovává a skladuje, stáje a obytné budovy. Jako formy možné expozice se uvádí rostlinná / živočišná produkce (potraviny), povrchová voda, vzduch a prach (Rudel et al. 2003, Woudneh & Oros 2006, Horton et al. 2011). Větší riziko je v oblastech, kde se PBO vzhledem ke geografické poloze více spotřebovává při hubení přenašečů původců nebezpečných chorob lidí a hospodářských zvířat (tropy, subtropy; Rivera-González et al. 2021). Přijít do kontaktu s rezidui PBO v potravinách lze vzhledem ke globálnímu obchodu kdekoliv (Abdelmajid & Duverna 2016, 2017 + veřejně přístupné výroční zprávy USDA).

#### 1.4.1 Vliv PBO na savce včetně člověka

Možné dopady PBO na savce byly hodnoceny již před uvedením této látky na trh. Wachs et al. (1950) informoval o minimálním negativním dopadu této látky na savce na základě výsledků získaných ze série experimentů zaměřených na stanovení úrovní orální chronické toxicity. V této době ještě nebyla známa biochemická a fyziologická podstata synergického účinku PBO: a to je inhibice 1) cytochromu P450, tedy enzymů ze skupiny oxygenáz (to se zjistilo v sedmdesátých letech 20. století; viz např. Mathews & Cassida 1970, Perry & Buckner 1970, Sun & Johnson 1972) a 2) další skupiny enzymů, esteráz, které jsou také často asociovány s rezistencí hmyzu k insekticidům. Na to se přišlo až v poslední dekádě 20. století, viz např. Gunning et al. 1998, Moores et al. 1998, Young et al. 2002, 2003 a Tabulka 1. Z této doby pochází také další nové studie zaměřené jednak na hodnocení inhibiční aktivity PBO pro savčí a lidský cytochrom P450 a také na možné negativní dopady PBO na embryonální vývoj savců. Na základě vlastních výsledků Jones et al. (1998) konstatovali, že savčí a lidský cytochrom P450 je PBO inhibován pravděpodobně jen zcela nevýznamně a že PBO má pravděpodobně pro savce velmi nízký teratogenní potenciál\*. Avšak relativně nové studie prováděné na myších a potkanech přinesly poněkud znepokojivé výsledky. Potvrzují, že prenatální expozice PBO vede jak k morfologickým, tak behaviorálním abnormalitám u narozených jedinců (Tanaka & Inomata 2015, 2016, Tanaka et al. 2019, Everson et al. 2019). Tento teratogenní efekt je důsledkem teprve relativně nedávno objevené (vzhledem k délce období, po které je PBO hojně užíván) fyziologické aktivity, kterou se tato látka ve vývojových pochodech projevuje. Jde o blokaci tzv. „*sonic hedgehog signaling pathway*“ (*Shhs*; Wang et al. 2012). *Shhs* má zásadní vliv na správný průběh celé řady embryonálních vývojových procesů zahrnujících morfogenezi mozku, obličej a končetin (Chiang et al. 1996). Výsledky výše zmíněných studií ukazují, že PBO může inhibovat *Shhs* svým antagonistickým účinkem na *Shhs* transdukční protein SMO (*pozor; aktivita Shhs může být narušena či blokována i z řady jiných důvodů, nespojovat jen s PBO; poznámka autorů*). Blokace *Shhs* vlivem PBO je zcela jiný proces než inhibice cytochromu P450 touto látkou, jedná se o dva procesy, které spolu nesouvisí. Narušení *Shhs* vede k různým vývojovým vadám postihujících, jak

již bylo naznačeno výše, zejména mozek (narušení procesu rozdělení mozku na levou a pravou hemisféru), obličej (např. rozštěp vrchního patra) a končetiny (např. zkrácení). Intenzita projevu vývojových poškození je dána dobou, kdy během embryonálního vývoje k narušení *Shhs* vlivem působení PBO došlo (Seifert et al. 2009, Lipinski et al. 2010, Heyne et al. 2015). Podrobně shrnuto v Rivera-González et al. 2021. Při vědomí těchto možných negativních dopadů je nutné hledat nejnižší dávky PBO, které ale dostatečně zvyšují účinek pyreteroidních insekticidů, jejichž efekt na cílové organismy (např. blýskáček řepkový, dřepčík olejkový, krytonosec čtyřzubý) vlivem metabolické rezistence (projev zvýšení aktivity cytochromu P450) v posledních letech značně klesl nebo klesá.

*\*Co jsou to teratogeny: Jedná se o látky, které mohou způsobit nedědičné defekty plodu (fetus). Tyto jsou důsledkem jejich toxického působení na embryo během jeho vývoje v těle matky (Rivera-González et al. 2021).*

#### 1.4.2 Vliv PBO na necílovou arthropodní faunu

Využívání PBO pro překonání rezistence významných škůdců řepky k pyreteroidům musí být také vnímáno jako faktor zvyšující nebezpečnost pyreteroidů pro necílové organismy (zejména hmyz), které jsou v porostech řepky zastoupeny často ve velmi hojných počtech a plní důležité ekosystémové služby – jinak řečeno jsou prospěšní jako opylovači, parazitoidi, predátoři (viz předcházející metodiky vydané tímto autorským týmem: Seidenglanz et al. 2024b,c). Tyto organismy jsou i k samostatně aplikovaným pyreteroidům významně citlivější než škůdci (viz např. parazitoidi řepkových škůdců: Seidenglanz et al. 2024a) a přidání PBO do postřikové jichy je tak může reálně ještě více ohrozit. Jde zejména o ty druhy, které se v porostech vyskytují ve stejnou dobu jako škůdci (ti jsou často jejich hostitelé) a jsou k aplikovaným postřikům více exponované: např. parazitoidi larev škůdců, na které se tato metodika soustředí, jsou na tom hůře, než predátoři jejich larev – střevlíci pohybující se po povrchu půdy v již zapojených porostech v jarním a letním období.

Zřejmě nejsledovanějším necílovým organismem, který je využíván v testech určených ke zjištění možných negativních dopadů pesticidů na arthropodní faunu je včela medonosná. Hodnoty akutní toxicity různých insekticidů pro včely jsou poměrně dobře zdokumentované a existuje na toto téma velké množství vědecké literatury (např. Barnett et al. 2007, Fletcher & Barnett 2003, Thompson 2003, Moores et al. 2012, Dewar et al. 2014). Poměrně málo se ale ví o vlivu interakcí mezi různými účinnými látkami pesticidů na jejich dopad na včely (a další necílové organismy), jsou-li aplikovány společně ve formě tank-mixů. Pilling a Jepson již v roce 1993 publikovali, že pyreteroidy (autoři pracovali s lambda-cyhalothrinem) mají výrazně větší negativní dopad na včely, jsou-li aplikovány společně s EBI fungicidy (EBI = ergosterol biosynthesis inhibitors – *jinak řečeno, jde o azolové*

*fungicidy*). V jejich studii měl největší synergický efekt (= nejvíce zvyšoval negativní dopad lambda-cyhalothrinu na včely) propiconazole.

Johnson et al. (2006) hodnotili synergický efekt inhibitorů tří různých skupin detoxifikačních enzymů (DEF, DEM, a PBO – viz Tabulka 1) na změnu toxicity tří pyretroidů pro včely. Pracovali s cyfluthrinem, lambda-cyhalothrinem a tau-fluvalinatem. Tau-fluvalinate je významně méně toxický pro včely než oba další pyretroidy. Toxicita pro včely všech tří pyretroidů (včetně tau-fluvalinatu) podstatně vzrostla, byl-li současně s pyretroidem aplikován PBO. Synergický efekt DEF (inhibitor carboxylesteráz) byl v porovnání s PBO výrazně slabší a vliv DEM (inhibitor glutathion S-transferáz) zcela zanedbatelný. Johnson et al (2006) tedy společnou aplikaci pyretroidu a PBO vyhodnotili jako pro včely rizikovou. Moores et al. (2012) použili k testování téhož značně odlišný přístup a metodiku poněkud bližší reálné situaci, co se týče dávek, kterým je hmyz v polních podmínkách vystavován, a došli k odlišným výsledkům. Pracovali ovšem pouze s tau-fluvalinatem jako pyretroidem s proklamovaným nejnižším negativním dopadem na včely. Na druhou stranu tato vlastnost z tau-fluvalinatu dělá insekticid, se kterým včely přichází relativně často (častěji než s jinými insekticidy) do kontaktu. V závěru své studie Moores et al. (2012) tvrdí, že PBO lze použít v kombinaci s tau-fluvalinatem tak, aby se podařilo dosáhnout zvýšení efektu na blýskáčka, aniž by se projevil negativní dopad na včely. I v jejich studii se však vyskytují určité těžkosti týkající se převoditelnosti jimi použitých laboratorních dávek (koncentrací) na polní podmínky. Rozporu mezi oběma studiemi (Johnson et al. 2006 versus Moores et al. 2012) si všimli i koordinátoři projektu „*Eco.Syn: The potential for overcoming insecticide-resistance in arable crop pests using synergists*“ Dewar et al. (2014). Otázka možných negativních dopadů použití PBO společně s pyretroidy na včely tak není zdaleka uzavřená. A co se týče dopadů tank-mixů PBO s pyretroidy na další zástupce necílové arthropodní fauny, tam je informací ještě méně (Dewar et al. 2014).

#### 1.4.3 Riziko kumulace PBO v ekosystému

Existuje riziko, že by při větším zapojení PBO do IOR řepky mohlo dojít k ohrožení organismů ve vodě či v půdě? Amweg et al. (2006) se zabývaly vlivem PBO na zvýšení toxicity pyretroidů (pracovali s permethrinem) na drobné vodní korýše (Amphipoda) a to jak ve vodě, tak v substrátu nasyceném vodou (tento reprezentoval podmínky na říčním dně). Došli ke zjištění, že k výraznému zvýšení toxicity testovaného pyretroidu (oproti jeho aplikaci sólo) na tyto organismy dochází až při obohacení o takové koncentrace PBO, které při aplikaci doporučených dávek (jak v domácnostech, či v polních ekosystémech) nemohou být ve vodním prostředí dosaženy. Antonious et al (2004) v článku „*Pyrethrins and Piperonyl Butoxide Adsorption to Soil Organic Matter*“ dochází k závěru, že průnik pyretroidů do půdního prostředí a jejich mobilita v půdním prostředí (a tedy i možnost průniku do

spodních nebo povrchových vod) není zvýšena tím, jestli jsou nebo nejsou obohaceny o PBO. PBO tedy nijak nezvyšuje nebezpečnost pyretroidů (alespoň ne dramaticky) pro organismy obývající půdní nebo vodní prostředí. Detekovatelné negativní dopady na vodní a půdní ekosystém se tedy zapojením PBO do IOR polních plodin (a tedy i řepky) za normálních podmínek nezvýší. Nízké riziko (ale vždy existující – nelze vyloučit chyby, nepředpokládané jevy a záměrnou vůli škodit) spojené s používáním PBO indikují i výsledky dalších studií (Ankley et al. 1991, Ankley & Collyard 1995, Arnold 1999). Jde vesměs o americké studie. V Evropě byl dosud PBO v rámci IOR polních plodin využíván, a tedy i z hlediska dopadů na různé typy ekosystému studován, jen velmi málo (i když již nějaké studie existují: např.: Dáder et al. 2019).

## 2 Cíle metodiky

1. Poskytnout odborné veřejnosti (výzkumným pracovištím, univerzitám, inspektorům ÚKZÚZ ale především agronomům a zemědělským poradcům) metodu, která je jednoduchá, technicky nenáročná, přitom však poskytuje přesné a mezinárodně srovnatelné výsledky v kvantifikaci kontaktního efektu PBO (prostřednictvím inhibice enzymů cytochromu P450) na nárůst citlivosti vybraných druhů řepkových škůdců (blýskáček řepkový, dřepčík olejkový, krytonosec čtyřzubý) k pyretroidům.
2. Pokusit se rozšířit aktivní zájem o problematiku rezistence insekticidů u hmyzích škůdců a monitoring vývoje změn v této oblasti mezi agronomy, tedy pracovníky, kteří bezprostředně o použití insekticidů rozhodují a vývoj rezistence ovlivňují.
3. Získat více znalostí o geografické i sezónní variabilitě v synergickém účinku PBO (různých dávek této látky) na zvýšení citlivosti populací konkrétních druhů řepkových škůdců (blýskáček řepkový, dřepčík olejkový a krytonosec čtyřzubý) k testovaným pyretroidům (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox).
4. Kvantifikovat efekt konkrétních dávek PBO (v g PBO/ha) na změny v citlivosti testovaných druhů řepkových škůdců k pyretroidům (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox) vyjádřený jako pokles hodnot LD50-95 odhadnutých pro tyto pyretroidy (v g ú.l./ha).
5. Přispět (alespoň částečně) ke zmírnění v zemědělské praxi se zjevně projevujících dopadů rezistence (případ blýskáčka řepkového) a poklesu citlivosti (případ dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého) řepkových škůdců k insekticidům ze skupiny pyretroidů a předejít tak možnému poklesu ploch této plodiny (těžko nahraditelný přerušovač obilných sledů).

### 3 Vlastní popis metodiky

#### 3.1 Organizace a koordinace aktivit spojených s testováním PBO

Autorská pracoviště připraví testovací sady (+ potřebné pomůcky k provedení testu) a jejich distribuci k zájemcům o testování. Zajistí též zaškolení zájemců o testování, aby věděli, jak test správně provést. Zájemci o testování mohou být agronomové, zemědělství poradci, pracovníci zemědělského výzkumu, inspektoři ÚKZÚZ, studenti zemědělských nebo biologických oborů středních a vysokých škol.

Autorská pracoviště zájemcům o testování předají také tabulky pro záznam prvotních dat a vysvětlí, jak výsledky testu zaznamenat a jakým způsobem je předat zpět na některé z autorských pracovišť za účelem jejich detailní analýzy. Tyto tabulky jsou součástí příloh k této metodice.

#### 3.2 Odchyt dospělců cílových druhů škůdců v porostu, jejich transport do laboratoře a jejich krátkodobé udržování před založením testu

Sběry k. čtyřzubého a b. řepkového je dobré provádět od druhé poloviny března, v průběhu dubna a května. Blýskáčka řepkového lze v dostatečných počtech nachytat i v průběhu června. K tomu je možné využít i porosty řepky jarní, hořčice, máku setého, květnatých pásů a meziplodin obsahujících brukvovité komponenty. Dřepčík olejkový se v porostech nejlépe sbírá ve druhé polovině září a v první polovině října. V některých letech se podaří dostatečně početný vzorek imag d. olejkového shromáždit i v období hromadného líhnutí nové generace dospělců (červen, červenec). Sběry se pak mohou provádět na dozrávajících porostech (brouci se po určitou dobu po vylíhnutí zdržují ve vrchních patrech těchto porostů) nebo na místě svozu sklizené produkce – ve skladech, na stěnách vleček se semeny atd. Důvodem je, že čas sklizně se někdy protne (neplatí to ale pro každou sezonu) s obdobím intenzivního líhnutí a opouštění půdy imagy nové generace.

Obecně platí, že sběry z porostů je vhodné provádět za takových podmínek, aby odběr probíhal poměrně snadno a rychle. To je dáno volbou pole – nemá cenu snažit se získat vzorek z pole, kde brouci nejsou. Další podmínkou, která ovlivňuje to, kdy odběr provádět, je potřeba získat jedince v dobré kondici. To znamená spíše se vyhnout sběrům z mokrého porostu a za deště. Spíše tedy provádět sběry v odpoledních hodinách za slunečného počasí. K odběru nejsou také vhodné větrné dny.

Nejjednodušší a nejrychlejší způsob sběru dospělců všech tří druhů v porostech je smýkání (Obrázek 7a). Pro transport nasmykaného hmyzu z pole do laboratoře (nebo jednoduše na místo, kde bude test prováděn) a pro krátkodobé uchovávání hmyzu



Obrázek 7a,b – 7a (vlevo): Smýkadlo je užitečná pomůcka pro každého agronoma, zemědělského poradce atd. Výborně se hodí pro sběr hmyzu pro účely této metodiky. 7b (vpravo): Klec na hmyz uzavíratelná zipem je vhodná pro krátkodobé uchovávání hmyzu. Je vzdušná, nehrozí zde problémy s kondenzací vodních par na vnitřních stěnách jako tomu může být v plastových boxech. Z klece se také pohodlně a snadno přenáší hmyz do testovacích lahvíček pomocí exhaustoru. Klec se v laboratoři (pracovně, kanceláři) natočí tak, aby strana opačná k té, která obsahuje zip, směřovala ke zdroji světla (lampa, okno). To způsobí, že hmyz v kleci se přesune na stěnu směřující ke světlu. Klec lze pak částečně otevřít a postupně vybírat jedince vhodné pro testy, kteří se pohybují na protější vnitřní stěně klece a nemají tendenci prchat ven vytvořeným otvorem, kterým člověk do klece vkládá exhaustor (Obrázek 7c)

v relativně příznivých podmínkách v čase mezi odběrem a započítáním testu (někdy i dva či tři dny) se dobře hodí klec na hmyz uzavíratelná zipem (Obrázek 7b). Na poli se nasmykány hmyz bez třídění do takové klece snadno ze smýkadla přesype. Je-li prováděno během dne více sběrů na různých místech, opatří se klec popiskem, na kterém je uvedeno místo, datum a čas sběru. Před přesypáním hmyzu ze smýkadla se ještě do klece uloží části hostitelských rostlin jako potrava pro odchycený hmyz. Pro blýskáčka řepkového jde o části květenství obsahující poupata či květy, v případě dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého jde o listy. Poskytnout odchyceným jedincům potravu je důležité zejména v takovém případě, kdy se ví, že doba mezi pořízením sběru a založením testu bude delší než 24 hodin.

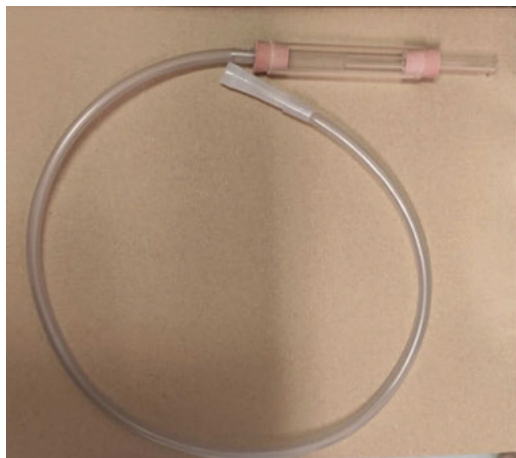
Alternativně lze pro sběr hmyzu využít metodu sklepávání a pro transport shromážděného hmyzu plastové boxy s uzavíratelným víkem. Ujistit se, zda víko dobře těsní, je nutné. Obzvláště blýskáček řepkový dokáže najít i velmi malé netěsnosti a využít toho k úniku. Ve víku je dobré udělat díru, která se zape molitanem (lze použít houba na umývání nádobí). Do plastového boxu je navíc oproti klecím nutné vložit i papírový ubrousek, aby jímál vzdušnou vlhkost a zabránil kondenzaci vodních par na vnitřních stěnách boxu – kapičky jsou pro brouky smrtelná past – může zde zahynout spousta jedinců a naprosto tak znehodnotit úsilí sběratele.

### 3.3 Založení testu, způsob hodnocení a záznam výsledků pozorování

Jaké množství jedinců určitého druhu je potřeba shromáždit na jedné lokalitě, aby bylo možné provést laboratorní test? Potřebný počet jedinců na test se odvíjí od zvoleného typu testu (viz níže test 3.3.1 nebo 3.3.2) a počtu testovaných látek (ne vždy je nutné do testu zahrnout všechny tři pyretroidy). Důležitým údajem pro udělení si představy o celkovém počtu brouků (platí pro všechny tři druhy stejně) potřebném na plánovaný test je také informace, že do jedné lahvičky se vkládá 5–10 vitálních jedinců. Vždy je navíc potřeba počítat s určitou rezervou (20–30 %), neboť ne všichni získaní jedinci (ať už smykem nebo sklepem) se dopraví do místa provedení testu v životném stavu. Do testovacích lahviček (vialek) je nutné z klece (plastového boxu) pomocí exhaustoru (Obrázek 7c,d) přenášet jen takové jedince, kteří jsou aktivní a nezranění. Cílem je, aby jediným stresovým faktorem působícím na jedince během testu byl vliv testovaného pyretroidu (s PBO nebo bez PBO) a nemuseli se ještě vypořádávat s dalšími negativními vlivy (např. s důsledky poškození nasbíraných jedinců během sběru), což vede ke zkreslení výsledků testu. Není pak možné bezpečně odlišit, co přičíst působení testovaných látek, a co jiným vlivům (přítomnost dalších negativních vlivů se pozná vyšší mortalitou v kontrolách – akceptovatelná je do 20 %).

Zájemci o využívání této metodiky, kteří si ale netroufají na provedení testu samotného (viz níže; *ti, kterým nebude vadit, že neuvidí výsledky testu na vlastní oči, ale rádi by se dozvěděli, jak se chovají populace zmiňovaných škůdců na jejich polích*), mají ještě dvě další možnosti, jak se na výzkumu účinků PBO podílet a jak se dostat k výsledkům testování. Mohou se stát jen sběrači – shromáždí vzorek hmyzu a pošlou ho po domluvě na některé z pracovišť autorského kolektivu, kde bude samotný test proveden a výsledky jim budou předány. Další možností je domluvit se s autory této metodiky i na odběru populace – to je ovšem z časových a kapacitních důvodů autorů limitováno.

Tato metodika je návodem pro provedení tří různých typů testů (3.3.1, 3.3.2 a 3.3.3), ve kterých je zjišťován synergický vliv PBO na účinnost pyretroidů. Testy se navzá-



Obrázek 7c,d – Exhaustor slouží k přenosu brouků z transportní klece (nebo plastového boxu) do testovacích lahvíček, což jsou vialky se zamačkávacím víčkem, jejichž vnitřní stěny byly ošetřeny určitou dávkou některé z testovaných látek. Průměr tubusu

exhaustoru a hrdla vialky jsou zvoleny tak, aby bylo možné exhaustor do vialky mírně zanořit, a přitom jím prostor hrdla vyplnit, přenášení dospělci mají menší šanci po vyklepání z exhaustoru z lahvičky uniknout. To má praktický význam zejména u rychle se pohybujících druhů jako jsou blýskáček řepkový a dřepčík olejkový. S krytonoscem čtyřzubým je po této stránce práce snazší

jem liší přípravou testovacích sad (to se provádí na řešitelských pracovištích), způsobem hodnocení, délkou trvání, do jisté míry i náročností pro hodnotitele a také svým poněkud jiným cílem / zaměřením.

Metodicky jde ve všech třech případech o tzv. lahvičkové testy (*adult vial tests*, IRAC; IRAC = *Insecticide Resistance Action Committee*), které byly vytvořeny a jsou v Evropě široce užívány pro účely testování vývoje rezistence v populacích řepkových škůdců k pyretroidům a dalším skupinám účinných látek. Testy představovány v této metodice jsou adaptací těchto testů. Výhodou je, že lze výsledky pocházející z těchto testů srovnávat s výsledky získanými v původních IRAC testech. V podstatě jde o rozšíření původních IRAC testů. Není potřeba žádná vybava navíc, nejsou odborně ani materiálně náročné.

### 3.3.1 Stanovení synergického účinku PBO pro lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate a etofenprox při společné aplikaci

Záměrem tohoto testu je napodobit (simulovat) situaci, ke které dochází v polní praxi, při níž je doporučováno aplikovat PBO společně s pyretroidem. Cílem testu je zjistit, jestli PBO při společné aplikaci s pyretroidem zvyšuje jeho účinnost, kvantifikovat jeho případný synergický efekt a statisticky ho analyzovat.

Kvantifikací synergického efektu PBO na zvýšení účinnosti pyretroidu se myslí:

- 1) zjistit nárůst mortality při určitých dávkách pyretroidu vlivem přítomnosti PBO
- 2) vypočítat změnu v  $LD_{50-95}$  pro pyretroid vlivem přítomnosti PBO

Statistickou analýzou se myslí potvrzení nebo vyloučení toho, jestli je synergický efekt PBO na účinnost pyretroudu statisticky významný nebo ne (viz část 3.4).

Záměr je testovat populace blýskáčka řepkového na všechny tři druhy pyretroudu (samostatně versus v kombinaci s PBO), u populací krytonosce čtyřzubého a dřepčíka olejkového je testování tau-fluvalinatu z praktického hlediska neúčelné, tato látka se v praxi na tyto dva škůdce nepoužívá. Z výzkumného hlediska to do určité míry zajímavé je.

V Tabulce 4 jsou uvedeny navržené dávky pro jednotlivé pyretroudy, když jsou tyto látky testovány samostatně i v kombinaci s určující dávkou PBO. Určující dávka PBO byla stanovena na základě získaných výsledků laboratorních testů, které předcházely vytvoření této metodiky. Její hodnota je 45 g PBO/ha. Jde o dávku, která nezpůsobovala u testovaných jedinců žádného ze tří testovaných druhů škůdců nějaké viditelné příznaky poškození. Na druhé straně však u testovaných populací výrazně zvyšovala účinnost pyretroudu.

Z Tabulky 4 je též možné udělat si představu o celkové potřebě dospělců určitého druhu, které je nutné shromáždit, aby bylo možné test provést. Je-li např. cílem vyhodnotit (kvantifikovat) synergický efekt PBO na účinnost všech tří pyretroudu na populaci blýskáčka řepkového z konkrétní lokality, je potřeba 5–10 jedinců naplnit 9 lahviček LC (když jsou dávky LC3-5 připraveny každá ve třech opakováních; dávka LC2 se u blýskáčka nezařazuje), 9 lahviček TF, 9 lahviček ET, 9 lahviček LC+P, 9 lahviček TF+P, 9 lahviček ET+P, 3 lahvičky kontroly K a 3 lahvičky kontroly s PBO (K-P). To je 60 lahviček. To znamená  $60 \times 5$  až  $60 \times 10$  vitálních jedinců, tedy 300 až 600 brouků. S rezervou 30 % je to: 390 až 780 jedinců/lokalitu. Když se u některých dávek použijí jen dvě opakování, jde rozsah pokusu snížit; kontroly K ani K-P v tomto smyslu ale nekrátit a zachovat vždy tři opakování. V případě dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého navíc nemá smysl, jak již bylo zmíněno výše, do testu zahrnovat tau-fluvalinate.

Po založení testu (to je po přenesení brouků pomocí exhaustoru do ošetřených a popsaných lahviček) experiment trvá 24 hodin (délka expozice je tedy 24 hodin). Poté jsou brouci z lahvičky jemně vyklepaní na bílý papír formátu A4 do středu kružnice na tomto papíru tužkou nakreslené. Toto se dělá v dobře osvětlené místnosti, aby bylo možné detailně pozorovat projevy chování na papír vyklepaných jedinců. Do hodnotící tabulky se nejprve k příslušné dávce a opakování (tedy ke konkrétní lahvičce) poznačí celkový počet jedinců vyklepaných z lahvičky a poté po asi 1 minutě dlouhém pozorování počet jedinců, kteří vykazují citlivou reakci. To jsou jedinci mrtví a evidentně těžce postižení (jedinci živí, ale zcela paralyzovaní, jedinci

Tabulka 4 - Testované dávky pyretroidů lambda-cyhalothrin (LC), tau-fluvalinate (TF), etofenprox (ET) a určující dávka (*discriminating rate*) PBO pro test s blýskáčkem řepkovým, krytonoscem čtyřzubým a dřepčikem olejkovým

testované dávky LC vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky ET vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky LC + PBO vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF + PBO vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky ET + PBO vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	kontrola <sup>5</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO <sup>6</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)
0,06 (LC2) <sup>2</sup>	1,92 (TF2)	2,30 (ET2)	0,06 + 454 (LC2+P) <sup>2</sup>	1,92 + 45 (TF2+P)	2,30 + 45 (ET2+P)		
0,30 (LC3)	9,6 (TF3)	11,5 (ET3)	0,30 + 45 (LC3+P)	9,6 + 45 (TF3+P)	11,5 + 45 (ET3+P)		
1,50 (LC4)	48 (TF4) <sup>3</sup>	57,5 (ET4) <sup>3</sup>	1,50 + 45 (LC4+P)	48 + 45 (TF4+P) <sup>3</sup>	57,5 + 45 (ET4+P) <sup>3</sup>		0 + 45 (K-P)
7,50 (LC5) <sup>3</sup>	xxx	xxx	7,50 + 45 (LC5+P) <sup>3</sup>	xxx	xxx		0 + 0 (K)

<sup>1</sup>každá dávka bude připravena ve dvou až třech opakováních; tzn., že např. u dávky LC2 budou připraveny dvě až tři vialky označené LC2a, LC2b a popř. i LC2c

<sup>2</sup>dávka LC2 bude do testu zařazena jen v případě krytonosce čtyřzubého a popř. i dřepčika olejkového. V případě blýskáčka řepkového je zbytečná.

<sup>3</sup>tyto dávky v případě všech tří pyretroidů odpovídají registrované dávce

<sup>4</sup>určující dávka (*discriminating rate*) PBO pro testy se všemi třemi pyretroidy i hmyzími škůdci je 45 g PBO/ha, výše této dávky vzešla z experimentů, které předcházely vytvoření této metodiky a probíhaly na pracovišti Agritec v letech 2022–2024

<sup>5</sup>obě kontroly, K i K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a tři lahvičky K-P: K-Pa, K-Pb, K-Pc.

v těžkých křečích či jedinci neschopní koordinovaného pohybu a po pár krocích opakovaně padající).

Test by měl probíhat při teplotě 18–22 °C. Není-li k dispozici termostat, kde lze tuto teplotu nastavit, může test probíhat v podstatě při normální pokojové teplotě. Komplikací mohou být horké letní dny, kdy teploty vystupují výrazně nad 22 °C. Za této situace je nutné umístit lahvičky s brouky do chladnější místnosti. To může být např. sklep, šero nebo tma nevadí. Mnohem větší negativní dopad na průběh testu mají vysoké teploty než odlišnosti ve světelném režimu. Je nutno se též vyvarovat umístění lahviček na místě, kde jsou vystaveny přímému slunečnímu svitu.

Tabulka pro záznam prvotních dat (tedy toho, co pozorovatel po 24 hodinách vidí) je součástí této metodiky jako Příloha 1a-c. Vyplněná tabulka s prvotními daty (= výsledky testu) a s identifikačními údaji o testované populaci (testovaný druh, datum sběru populace, lo-

kalita, údaje o plodině – růstová fáze v době sběru, pokud možno i údaje o alespoň nedávno v porostu provedených aplikacích) se vrací zpět na některé z autorských pracovišť (buď na papíře nebo v elektronické podobě). Tabulky s primárními daty z testů se postupně od všech hodnotitelů přes jednotlivá autorská pracoviště (nebo přímo) shromáždí na pracovišti Agritec Šumperk, kde se provede souborná statistická analýza dat a vytvoří celkové výsledkové tabulky (viz část 3.4).

### 3.3.2 Stanovení nejnižší efektivní dávky PBO

V tomto testu jde o nalezení nejnižší dávky PBO, která výrazně posiluje účinnost pyretroidu (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox) na blýskáčka řepkového, krytonosce čtyřzubého a dřepčíka olejkového a současně má (sama o sobě bez mixu s pyretroidem) na projevy škůdce minimální dopad (alespoň co se týče viditelných projevů). Pro účely této metodiky nazýváme takovou dávku PBO nejnižší efektivní dávkou. Výrazným posílením účinnosti se myslí dosažení takového stavu, při kterém se testovaná populace stává opět vysoce citlivou. To znamená, že ji je možné klasifikovat stupněm 1 dle doporučení IRAC pro lahvičkové testy (IRAC = *Insecticide Resistance Action Committee*). Vysoce citlivá populace je taková (a je jedno, jestli jde o blýskáčka, krytonosce či dřepčíka), která po expozici registrované dávky ale i 5× nižší dávky určitého pyretroidu (bez ohledu na to, o který se jedná) vykazuje 100% citlivost (po 24 hodinách expozice jsou v lahvičkách jen mrtví nebo těžce postižení jedinci – viz vysvětlení v části 3.3.1).

Cíl nalézt nejnižší efektivní dávku PBO jednak odpovídá nutnosti řešit problematiku rezistence řepkových škůdců k pyretroidům a nabízet praxi nějaká uplatnitelná východiska, ale též se vyhnout možným negativním dopadům, které by s větším rozšířením používání PBO v polní praxi mohly vzniknout (viz část 1.4. této metodiky).

Gradients dávek pyretroidů i PBO a označení lahviček připravených autorskými pracovišti pro tento experiment jsou představeny v Tabulkách 5a-c. Z těchto tabulek si je také možné udělat představu o organizaci testu a počtu brouků, kteří jsou na provedení testu potřeba. Do lahviček se opět vkládá 5 až 10 jedinců, test probíhá 24 hodin při teplotě 18–22 °C.

Poznámka k metodice pro tento test a k Tabulkám 5a-c: Založí-li se test s jednou populací (např. blýskáčka řepkového) a bude se pracovat se všemi třemi (nebo třeba jen dvěma) pyretroidy, kontroly jsou společné. Tzn. pro celý test budou tři lahvičky K (opak. a–c), tři lahvičky K-P3 (opak a–c) atd. pro další K-P. Kontrolní lahvičky se tedy připravují pro testovanou populaci nikoliv pro každý z testovaných pyretroidů, jak by se mohlo z Tabulek 5a–c zdát.

Tabulka 5a – Testované dávky pyretroidu lambda-cyhalothrin (LC) a PBO pro test s blýskáčkem řepkovým, krytonoscem čtyřzubým a dřepčím olejkovým, který je zaměřen na nalezení nejnižší efektivní dávky PBO

testované dávky LC vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky LC + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky LC + PBO <sup>4</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky LC + PBO <sup>5</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky LC + PBO <sup>6</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	kontrola <sup>6</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO3 <sup>7</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO4 <sup>7</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO5 <sup>7</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO6 <sup>7</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)
1,50 (LC4) <sup>3</sup>	1,50 + 15 (LC4+P3) <sup>5</sup>	1,50 + 15 (LC4+P4) <sup>5</sup>	1,50 + 45 (LC4+P5) <sup>5</sup>	1,50 + 60 (LC4+P6) <sup>5</sup>	0 + 0 (K)	0 + 5 (K-P3)	0 + 15 (K-P4)	0 + 45 (K-P5)	0 + 60 (K-P6)
7,50 (LC5) <sup>4</sup>	7,50 + 15 (LC5+P3) <sup>5</sup>	7,50 + 15 (LC5+P4) <sup>5</sup>	7,50 + 45 (LC5+P5) <sup>5</sup>	7,50 + 60 (LC5+P6) <sup>5</sup>	0 + 0 (K)				

<sup>1</sup>každá dávka bude připravena ve dvou až třech opakováních; tzn., že např. u dávk LC4 budou připraveny dvě až tři vialky označené LC4a, LC4b a popř. i LC4c

<sup>2</sup>označení dávek PBO formou PBO3, PBO4, PBO5 a PBO6 pochází z testů prováděných před sestavením této metodiky; autorský tým se rozhodl tento způsob označení dávek ponechat i pro účely této metodiky: PBO3 = 5 g ú.l./ha; PBO4 = 15 g ú.l./ha; PBO5 = 45 g ú.l./ha; PBO6 = 60 g ú.l./ha

<sup>3</sup>tato dávka LC je 5x nižší dávka než dávka registrovaná

<sup>4</sup>tato dávka LC je registrovaná dávka

<sup>5</sup>jde o to zjistit, která dávka PBO v kombinaci s těmito dvěma dávkami LC způsobí v obou případech 100% citlivou reakci u testované populace – taková dávka PBO je nejnižší efektivní dávka

<sup>6,7</sup>všechny kontroly, K i všechny čtyři K-P, budou pro jeden test; tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a stejným způsobem tři lahvičky ke každé K-P

Tabulka 5b - Testované dávky pyretroidu tau-fluvalinatu (TF) a PBO pro test s blýskáčkem řepkovým, který je zaměřen na nalezení nejnižší efektivní dávky PBO. Populace krytonosce čtyřzubého a dřepčíka olejkového nemá praktický význam pro tento test využít

testované dávky TF vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky TF + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	kontrola <sup>6</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO3 <sup>7</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO4 <sup>7</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO5 <sup>7</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO6 <sup>7</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)
9,60 (TF3) <sup>3</sup>	9,60 + 5 (TF3+P3) <sup>5</sup>	9,60 + 15 (TF3+P4) <sup>5</sup>	9,60 + 45 (TF3+P5) <sup>5</sup>	9,60 + 60 (TF3+P6) <sup>5</sup>	0 + 0 (K)	0 + 5 (K-P3)	0 + 15 (K-P4)	0 + 45 (K-P5)	0 + 60 (K-P6)	
48 (TF4) <sup>4</sup>	48 + 5 (TF4+P3) <sup>5</sup>	48 + 15 (TF4+P4) <sup>5</sup>	48 + 45 (TF4+P5) <sup>5</sup>	48 + 60 (TF4+P6) <sup>5</sup>						

<sup>1</sup>každá dávka bude připravena ve dvou až třech opakováních; tzn., že např. u dávky TF3 budou připraveny dvě až tři vialky označené TF3a, TF3b a popř. i TF3c

<sup>2</sup>označení dávek PBO formou PBO3, PBO4, PBO5 a PBO6 pochází z testů prováděných před sestavením této metodiky; autorský tým se rozhodl tento způsob označení dávek ponechat i pro účely této metodiky: PBO3 = 5 g ú.l./ha; PBO4 = 15 g ú.l./ha; PBO5 = 45 g ú.l./ha; PBO6 = 60 g ú.l./ha

<sup>3</sup>tato dávka TF je 5x nižší dávka než dávka registrovaná

<sup>4</sup>tato dávka TF je registrovaná dávka

<sup>5</sup>je o to zjistit, která dávka PBO v kombinaci s těmito dvěma dávkami TF způsobí v obou případech 100% citlivou reakci u testované populace – taková dávka PBO je nejnižší efektivní dávka

<sup>6,7</sup>všechny kontroly, K i všechny čtyři K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a stejným způsobem tři lahvičky ke každé K-P

Tabulka 5c - Testované dávky pyretroidu etofenprox (ET) a PBO pro test s blýskáčkem řepkovým, krytonoscem čtyřzubým a dřepčím olejkovým, který je zaměřen na nalezení nejnižší efektivní dávky PBO

testované dávky ET vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky ET + PBO <sup>2</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky ET + PBO <sup>4</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky ET + PBO <sup>5</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	testované dávky ET + PBO <sup>6</sup> vyjádřené v g ú.l./ha (označení na lahvičce <sup>1</sup> )	kontrola <sup>6</sup> : dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO <sup>3</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO <sup>4</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO <sup>5</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)	kontrola PBO <sup>6</sup> :dávka pyretroidu a PBO v g ú.l./ha (označení na lahvičce)
11,50 (ET3) <sup>3</sup>	11,50 + 5 (ET3+P3) <sup>5</sup>	11,50 + 15 (ET3+P4) <sup>5</sup>	11,50 + 45 (ET3+P5) <sup>5</sup>	11,50 + 60 (ET3+P6) <sup>5</sup>	0 + 0 (K)	0 + 5 (K-P3)	0 + 15 (K-P4)	0 + 45 (K-P5)	0 + 60 (K-P6)
57,50 (ET4) <sup>4</sup>	57,50 + 5 (ET4+P3) <sup>5</sup>	57,50 + 15 (ET4+P4) <sup>5</sup>	57,50 + 45 (ET4+P5) <sup>5</sup>	57,50 + 60 (ET4+P6) <sup>5</sup>					

<sup>1</sup>každá dávka bude připravena ve dvou až třech opakováních; tzn., že např. u dávky ET3 budou připraveny dvě až tři vialky označené ET3a, ET3b a popř. i ET3c

<sup>2</sup>označení dávek PBO formou PBO3, PBO4, PBO5 a PBO6 pochází z testů prováděných před sestavením této metodiky; autorský tým se rozhodl tento způsob označení dávek ponechat i pro účely této metodiky: PBO3 = 5 g ú.l./ha; PBO4 = 15 g ú.l./ha; PBO5 = 45 g ú.l./ha; PBO6 = 60 g ú.l./ha

<sup>3</sup>tato dávka ET je 5x nižší dávka než dávka registrovaná

<sup>4</sup>tato dávka ET je registrovaná dávka

<sup>5</sup>jde o to zjistit, která dávka PBO v kombinaci s tímto dvěma dávkami ET způsobí v obou případech 100% citlivou reakci u testované populace – taková dávka PBO je nejnižší efektivní dávka

<sup>6</sup>všechny kontroly, K i všechny čtyři K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a stejným způsobem tři lahvičky ke každé K-P

Hodnocení brouků po vyklepání z lahviček na bílý papír s kružnicí je obdobné jako v případě testu 3.3.1. Tabulka pro záznam výsledků testu (tabulka pro prvotní data) je součástí této metodiky jako Příloha 2a,b,c. Stejně jako v případě 3.3.1, vyplněná tabulka s prvotními daty (= výsledky testu) a s identifikačními údaji o testované populaci (testovaný druh, datum sběru populace, lokalita, údaje o plodině – růstová fáze v době sběru, pokud možno i údaje o alespoň nedávno v porostu provedených aplikacích) se vrací zpět na některé z autorských pracovišť (buď na papíře nebo v elektronické podobě). Tabulky s primárními daty z testů se postupně od všech hodnotitelů přes jednotlivá autorská pracoviště (nebo přímo) shromáždí na pracovišti Agritec Šumperk, kde se provede souborná statistická analýza dat a vytvoří celkové výsledkové tabulky (viz část 3.4).

### 3.3.3 Vliv délky doby pre-expozice k PBO na jeho synergický efekt na pyretroid lambda-cyhalothrin

Důvodem pro provedení tohoto testu je shromáždit více informací o časovém průběhu inhibiční aktivity PBO na cytochrom P450 a jeho synergickém efektu na účinnost pyretroidu. Jako referenční pyretroid zde slouží lambda-cyhalothrin. Postup, který je popisován níže, lze také využít pro další pyretroidy a metodiku tak rozšířit. Z hlediska zaměření tohoto testu však postačí pracovat pouze s jedním z pyretroidů. V praxi se PBO a pyretroid aplikují současně v tank-mixu. Otázkou ovšem je, jestli je tento způsob aplikace skutečně vhodný. Vhodný z hlediska časového. Jestli by nebylo lepší aplikaci PBO provést v předstihu před aplikací pyretroidu, jehož účinnost má být působením synergisty zvýšena. Tento test (jeho metodika) reaguje na publikované údaje ve vědecké literatuře na toto téma a je určen spíše pro pracoviště disponující alespoň základním laboratorním vybavením.

#### **Vysvětlení důvodu, proč provádět tento test:**

Farnham (1986) již poměrně dávno ve své práci upozornil na to, že některé látky fungující jako synergisté insekticidů (mezi nimi PBO) se nedostávají přes kutikulu hmyzu tak snadno, a tak rychle jako molekuly insekticidů, jejichž účinek podporují. Inhibiční efekt se tedy může dostavit později, než by bylo z hlediska podpory účinku rychleji do těla hmyzu pronikajících molekul pyretroidů třeba. Byl to také Farnham (1986), kdo jako první na základě výsledků pokusů s pyretroidem (1R-trans)-tetramethrin, jehož účinek na populace mouchy domácí (*Musca domestica*) vykazující první známky nižší citlivosti k pyretroidům podporoval prostřednictvím PBO, vyjádřil názor, že tuto látku je optimální aplikovat asi dvě hodiny v předstihu před pyretroidem. Young et al. (2005) ve studii s housenkami černopásky bavlníkové (*H. armigera*) prokázali pomocí testů *in vitro* i *in vivo*, že vysoká úroveň inhibice enzymů zodpovědných za rezistenci k pyretroidům se dostavila po 4 hodinách od aplikace PBO (šlo o apikální aplikaci PBO na thorax housenek). Mortalita housenek vysoce rezistentních k pyretroidům vzrostla na 100 %, když k aplikaci pyretroidu došlo

4–8 (v případě zeta-cypermethrinu) nebo 4–6 (v případě fenvaleratu) hodin po aplikaci PBO. Když se ale odstup mezi aplikací PBO a pyrethroidů (platilo pro oba) začal prodlužovat nad tuto mez, mortalita housenek začala opět klesat. To znamená, že použitím PBO způsobená inhibice enzymů, které metabolizují (a tím pádem detoxifikují) pyrethroidy není trvalá. Metabolická aktivita enzymů se u housenek vrátila na původní úroveň 21 hodin od aplikace PBO a mortalita vyvolávaná oběma pyrethroidy zase klesla na velmi nízké hodnoty. To je závažné zjištění, které může velmi podstatně zasáhnout do reálné využitelnosti PBO v polních podmínkách. V případě *H. armigera* je ale metabolická rezistence k pyrethroidům založena především na vyšší aktivitě esteráz, zatímco u řepkových škůdců jsou příčinou rezistence monooxygenázy cytochromu P450 (viz Tabulka 1, 2 a Obrázek 6), i když jasně potvrzeno je to jen u blýskáčka, vysoce pravděpodobné to je u dřepčíka olejkového a u krytonosce čtyřzubého to lze očekávat, ale žádné informace zatím nejsou k dispozici.

Odlišná podstata metabolické rezistence u řepkových škůdců v porovnání např. s černopáskou bavlníkovou může vést k odlišným výsledkům podobně zaměřených experimentů. To, jestli je v případě řepkových škůdců nutné PBO aplikovat v předstihu před pyrethroidem, aby se dostavil synergický efekt na účinnost pyrethroidu, či jestli aplikace PBO v předstihu přináší alespoň nárůst jeho synergického efektu na účinnost pyrethroidu v porovnání s aplikací ve stejnou dobu (jako tank-mix) by měl zodpovědět test představovaný právě v této části metodiky.

Způsob založení, vedení a vyhodnocení experimentu je detailně popsán v Tabulce 6. V tomto testu se na rozdíl od testů předcházejících pracuje s vialkami, které jsou (s výjimkou pro variantu LC4+P5) ošetřeny buď jen PBO nebo jen určitou pyrethroidní účinnou látkou. Určující (*discriminating dose*) dávka pro lambda-cyhalothrin je v případě testování blýskáčka řepkového a dřepčíka olejkového 1,5 g ú.l./ha, v případě k. čtyřzubého bude používána poloviční dávka 0,75 g ú.l./ha. Určující (*discriminating dose*) pro PBO je v případě všech tří testovaných druhů 45 g ú.l./ha. Určující dávky pro LC a PBO byly vybrány na základě výsledků testů, které byly prováděny na pracovišti Agritec v rámci řešení projektu, na který je tato metodika dedikována a které posloužily jako podklad pro vytvoření této metodiky.

Hodnocení projevů brouků po vyklepání z lahviček na bílý papír s kružnicí je obdobné jako v případě testu 3.3.1. a 3.3.2. Tabulka pro záznam výsledků testu (tabulka pro prvotní data) je součástí této metodiky jako Příloha 3. Stejně jako v případě 3.3.1 a 3.3.2 je potřeba dbát o to, aby v této tabulce byly vyplněny vyžadované údaje: prvotní data (= výsledky testu), identifikační údaje o testované populaci (testovaný druh, datum sběru populace, lokalita), údaje o porostu, ze kterého byl odběr hmyzu pořízen (růstová fáze v době sběru, pokud možno i údaje o alespoň nedávno v porostu

Tabulka 6 - Určující (discriminating) dávky PBO, lambda-cyhalothrinu (LC) a organizace testu zaměřeného na vyhodnocení vlivu délky pre-expozice blýskáčka řepkového (*B. aeneus*), dřepčika olejkového (*P. chrysocephala*) a krytonosce čtyřzubého (*C. pallidactylus*) k PBO na úroveň jeho synergického efektu na účinnost pyretroidu lambda-cyhalothrinu na tyto škůdce řepky

Stručný popis varianty	označení na lahvičce (opakování)	určující dávka PBO vyjádřená v g ú.l./ha	určující dávka LC vyjádřená v g ú.l./ha	doba pre-expozice k určující dávce PBO (hodiny)	doba expozice k určující dávce LC (hodiny)	celková doba brouků v lahvičce / lahvičkách <sup>3</sup>	počet brouků / opakování (= na lahvičku)
kontrola, lahvičky ošetřené pouze acetonem lahvičky ošetřené pouze LC	K (a,b,c)	0	0	0z	0	15	5 až 10
	LC4 (a,b,c)			0	5	5	5 až 10
lahvičky ošetřené kombinací LC a PBO	LC4+P5(a,b,c)			0	5 (společně s PBO)	5	5 až 10
2-hod. pre-expozice v lahvičkách ošetřených pouze PBO, pak přenos <sup>1</sup> do lahviček ošetřených pouze LC	2hp5 / LC4 (a,b,c)			2	5	2 + 5 = 7	5 až 10
4-hod. pre-expozice v lahvičkách ošetřených pouze PBO, pak přenos <sup>1</sup> do lahviček ošetřených pouze LC	4hp5 / LC4 (a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	4	5	4 + 5 = 9	5 až 10
6-hod. pre-expozice v lahvičkách ošetřených pouze PBO, pak přenos <sup>1</sup> do lahviček ošetřených pouze LC	6hp5 / LC4 (a,b,c)			6	5	6 + 5 = 11	5 až 10
8-hod. pre-expozice v lahvičkách ošetřených pouze PBO, pak přenos <sup>1</sup> do lahviček ošetřených pouze LC	8hp5 / LC4 (a,b,c)			8	5	8 + 5 = 13	5 až 10
10-hod. pre-expozice v lahvičkách ošetřených pouze PBO, pak přenos <sup>1</sup> do lahviček ošetřených pouze LC	10hp5 / LC4 (a,b,c)			10	5	10 + 5 = 15	5 až 10
přenos brouků z lahviček ošetřených PBO do lahviček s LC se provádí pomocí trychtýře – brouci se jemným poklepem vysypou z PBO lahvičky do trychtýře posazeného na LC lahvičce; jde o velmi snadný úkon vyžadující jen krátké zacvičení (vhodné je zkusit si to před vlastním testem na několika cvičných případech).							Σ/test:
							120–240

<sup>1</sup>přenos brouků z lahviček ošetřených PBO do lahviček s LC se provádí pomocí trychtýře – brouci se jemným poklepem vysypou z PBO lahvičky do trychtýře posazeného na LC lahvičce; jde o velmi snadný úkon vyžadující jen krátké zacvičení (vhodné je zkusit si to před vlastním testem na několika cvičných případech).

<sup>2</sup>v případě blýskáčka řepkového a dřepčika olejkového a pro tento test určující dávka LC 1,5 g ú.l./ha; při testování krytonosce čtyřzubého je lepší použít poloviční dávku LC, to je 0,75 g ú.l./ha.

<sup>3</sup>brouci se hodnotí po vysypání na bílou plochu stejným způsobem jako při testu popsaném v části 3.3.1. a 3.3.2.; tabulka pro zápis primárních dat je součástí této metodiky jako Příloha 3.

provedených aplikacích). Tabulky s primárními daty z testů se postupně od všech hodnotitelů přes jednotlivá autorská pracoviště (nebo přímo) shromáždí na pracovišti Agritec Šumperk, kde se provede souborná statistická analýza dat a vytvoří celkové výsledkové tabulky (viz část 3.4).

### 3.4 Analýza výsledků pozorování a jejich interpretace

Tabulky s primárními daty ze všech tří typů testů (3.3.1, 3.3.2 a 3.3.3) se postupně od všech hodnotitelů přes jednotlivá autorská pracoviště (nebo přímo) shromáždí v Agritecu Šumperk, kde se provede souborná statistická analýza dat a vytvoří celkové výsledkové tabulky (viz část 3.4).

Test 3.3.1 je metodicky nastaven tak, aby po shromáždění primárních dat mohly být vypočítány hodnoty letálních dávek ( $LD_{50,90,95}$ ) pro všechny tři druhy testovaných pyretroidů (LC, TF, ET) a všechny tři druhy sledovaných škůdců, a to zvláště pro situace, kdy jsou hodnocené populace exponovány pouze gradientu narůstajících dávek samotného konkrétního pyretroidu a situace, kdy jsou ty samé populace vystaveny opět stejnému gradientu dávek testovaného pyretroidu (viz Tabulka 4) avšak obohaceného o určující (*discriminating*) dávku PBO. Tato dávka byla na základě předběžných pokusů prováděných před vytvořením této metodiky stanovena na 45 g PBO/ha; tato hodnota může být na základě nově získaných výsledků upravena – předpokládá se získání mnohem většího množství dat, než kterými autorský tým doposud disponuje. Pro každou z testovaných populací se tak zjistí hodnoty LD pro konkrétní pyretroid bez PBO a s PBO. Výpočet (přísně vzato jde o odhad) hodnot LD se provádí pomocí probitové regrese (program Polo Plus, Leora software, USA), výsledky lze též vyjádřit graficky (Obrázek 8). Neboť hodnoty  $LD_{50,90,95}$  se stanovují i s intervaly spolehlivosti (*95% Confidence Limits*), lze na základě následného srovnávání zjistit, zda obohacení pyretroidu o určující dávku PBO u dané populace přineslo statisticky významný pokles hodnot LD (a tedy signifikantní nárůst účinnosti pyretroidu) anebo ne. Dále pak, neboť se předpokládá, že se bude pracovat s různě velkými soubory populací, zjistit u jakého podílu z nich skutečně ke statisticky významnému pozitivnímu vlivu PBO došlo. Tyto výsledky lze dále analyzovat např. dle hlediska geografického, časového atd. A samozřejmě separátně dle použitého pyretroidu a druhu škůdce. Tímto způsobem zpracované výsledky (seřazené do přehledných tabulek a srozumitelných grafických výstupů, veřejně dostupných) nabízí široký prostor k jejich praktické interpretaci, a to i ze strany odborníků, kteří se přímo na experimentální činnosti nepodílejí, ale v dané problematice se orientují.

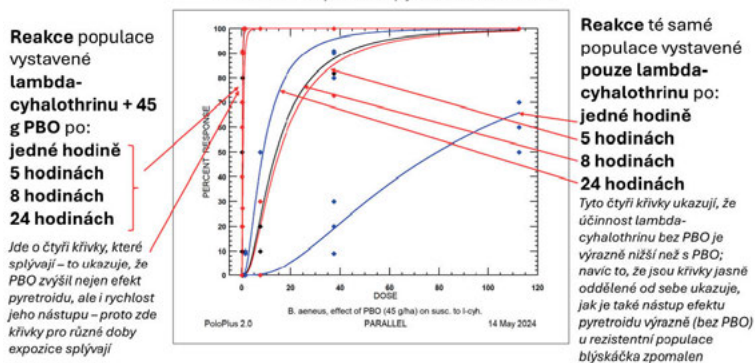
Test 3.3.2 sleduje poněkud odlišný, i když významově související, cíl. To vede i k odlišnému přístupu ke zpracování získaných výsledků a k užití jiných metod

analýzy dat. Pro jednotlivé testované populace a kombinace dávek a účinných látek se stanoví stupně citlivosti dle IRAC:

- *Stupeň 1*: vysoce citlivá populace; mortalita (= podíl mrtvých + těžce postižených jedinců) u této populace je po expozici registrované i 5× nižší dávce testovaného pyretroidu na 24 hodin 100 %; a to buď bez PBO nebo s přidáním některé z testovaných dávek PBO (5, 15, 45 a 60 g PBO/ha; viz Tabulky 5a,b,c)
- *Stupeň 2*: citlivá populace; 100 % mortalita vyvolaná již jen registrovanou dávkou testovaného pyretroidu (bez PBO či s PBO); mortalita vyvolaná 5× nižší dávkou, než je dávka registrovaná, je nižší než 100 %
- *Stupeň 3*: středně rezistentní populace; mortalita vyvolaná registrovanou dávkou pyretroidu (bez PBO či s PBO) je nižší než 100 %, ale ne nižší než 90 %.
- *Stupeň 4*: rezistentní populace; mortalita vyvolaná registrovanou dávkou pyretroidu (bez PBO či s PBO) je nižší než 90 %, ale ne nižší než 50 %.
- *Stupeň 5*: vysoce rezistentní populace; mortalita vyvolaná registrovanou dávkou pyretroidu (bez PBO či s PBO) je nižší než 50 %.

Bude provedena analýza variance rozptylů (ANOVA) hodnot mortalit pro jednotlivé testované pyretroidy a jejich dávkové kombinace s PBO a následně budou testovány (LSD testy) rozdíly mezi průměrnými hodnotami zaznamenaných úrovní mortalit. Na základě přímého srovnání zaznamenaných hodnot a také za využití regresní analýzy budou stanoveny nejnižší efektivní dávky PBO pro tři testované pyretroidy ve spojení s konkrétními druhy škůdců. K analýze dat bude využit software Statistica,

Jak se mění citlivost rezistentních populací blýskáčka řepkového k pyretroidům při současné expozici k pyretroidům i PBO:



Obrázek 8 – Křivky mortality ukazující nárůst citlivě reagujících jedinců (= mrtví + těžce postižení jedinci) vyjádřený v procentech (osa Y) v závislosti na růstu dávek pyretroidu

(zde lambda-cyhalothrin, LC; dávky na ose X jsou v g ú.l./ha), kterým byli kontaktně vystaveni. První část populace blýskáčka řepkového byla vystavena pouze gradientu stoupajících dávek LC, u druhé části té samé populace byl ke každé dávce LC přidán PBO (vždy 45 g PBO/ha). Reakce brouků byly zjišťovány po jedné, pěti, osmi a 24 hodinách.

version 14 (Tibco software Inc., USA) a Polo Plus (Leora software, USA). Zpracované výsledky seřazené do přehledných tabulek a srozumitelných grafických výstupů (veřejná dostupnost je podmínkou a cílem) by měly jako výstup posloužit k snadné interpretaci a využitelnosti dat odbornou veřejností.

Pro zpracování primárních dat získaných z pokusů prováděných dle metodiky pro test 3.3.3 bude využita především ANOVA a následné testování rozdílů mezi průměrnými hodnotami mortalit (různé LSD metody dle povahy rozložení dat) vyvolaných různými kombinacemi PBO a LC charakteristickými odlišnostími délky doby pre-expozice k PBO s cílem potvrdit nebo vyloučit dopad určité délky doby pre-expozice k PBO na následnou účinnost pyretroidu na konkrétní druh (respektive populaci) škůdce. K analýze dat bude tedy využit především software Statistica, version 14 (Tibco software Inc., USA). I zde platí, že zpracované výsledky seřazené do přehledných tabulek a srozumitelných grafických výstupů (veřejná dostupnost je podmínkou a cílem) mají jako výstup posloužit k snadné interpretaci a využitelnosti dat odbornou veřejností.

#### **4 Srovnání „novosti postupů“**

Tato metodika je sestavena tak, aby byla v souladu s doporučenými postupy (Adult Vial Tests IRAC; <https://irac-online.org/>), které jsou široce v EU (a též v ČR) využívány k monitoringu vývoje rezistence u různých druhů a skupin řepkových škůdců k insekticidům (zde jde především o pyretroidy). Autorský tým předkládané metodiky má s aktivitami tohoto druhu bohaté zkušenosti. Metodická návaznost předkládané metodiky na postupy používané k testování škůdců řepky k pyretroidům není náhodná, je záměrná. Tento přístup totiž umožní snadnější přijetí předkládané metodiky zejména u těch potenciálních experimentátorů (hodnotitelů), kteří již nějaké zkušenosti z IRAC lahvičkovými testy (*Adult Vial Tests*) mají a ověřili si, že nejsou náročné na provedení.

Zásadní záležitostí (a zcela novou) pro možnost připravit představovanou metodiku bylo sestavení vhodných gradientů (tedy spekter) testovaných dávek pyretroidů kombinovaných s určitými vhodně zvolenými dávkami PBO, aby bylo možné získané výsledky řádně analyzovat (vyjádřit hodnoty LD, stanovit stupně citlivosti / rezistence) a kvantifikovat přínos PBO k opětovnému navýšení citlivosti řepkových škůdců k pyretroidům. To by nebylo možné bez poměrně vysokého počtu provedených pilotních pokusů (mnohdy neúspěšných), které této metodice předcházely. Byly prováděny po dobu tří sezón 2022–2024.

## 5 Popis uplatnění metodiky

Cílem autorů předkládané metodiky bylo vypracovat a následně poskytnout odborné veřejnosti (výzkumným pracovištím, univerzitám, inspektorům ÚKZÚZ, ale především agronomům a zemědělským poradcům) metodu, která je jednoduchá, technicky nenáročná, přitom však poskytuje přesné a mezinárodně srovnatelné výsledky v kvantifikaci kontaktního efektu PBO (prostřednictvím inhibice enzymů cytochromu P450) na nárůst citlivosti vybraných druhů řepkových škůdců (blýskáček řepkový, dřepčík olejkový, krytonosec čtyřzubý) k pyretroidům.

Dostatečně technicky i uživatelsky jednoduchá, a tedy široce využitelná (např. agronomy bez laboratorního vybavení) metodika umožní rozšířit experimentální činnost tohoto zaměření. To znamená 1) zapojit do testů více experimentátorů, 2) zvýšit počet otestovaných vzorků a 3) rozšířit velikost území, ze kterého jsou vzorky odebírány. To znamená celkově zvýšit vědeckou hodnotu získaných výsledků a jejich praktickou uplatnitelnost (přímý dopad na změnu postupů v ochraně porostů řepky proti výše uvedeným druhům řepkových škůdců).

Části metodiky, které vyžadují náročnější laboratorní vybavení, software či specifické *know how*, budou prováděny na některém z pracovišť autorského kolektivu. To znamená, že se zde připraví roztoky pro jednotlivé dávky a popř. i testovací sady. Vše potřebné pro provedení vlastního testu se distribuuje ke konkrétnímu hodnotiteli (= tvůrce primárních dat) z těchto míst. Naopak od hodnotitele zpět se vrací tabulky s primárními daty (Přílohy 1 a 2) na pracoviště Agritec za účelem jejich detailní analýzy (probitová regrese – stanovení hodnot LD a jejich konfidenčních limitů, analýza variance atd.) a souhrnné interpretace pro všechna shromážděná data. Celková zpráva obsahující kompletní výsledky (tedy získané od všech hodnotitelů) a jejich interpretaci se opět distribuuje ke všem hodnotitelům. K dalším uživatelům (pěstitelé řepky obecně) se získané výsledky dostávají formou dalších běžně k šíření výsledků výzkumu používaných výstupů: odborné články, přednášky na akcích pro pěstitele atd.

Hodnotitelem může být v podstatě kdokoliv, kdo projeví o tuto problematiku zájem. Cílem je, aby byl test proveditelný v podmínkách běžného zemědělského provozu a agronom (popř. jeho poradce, inspektor ÚKZÚZ) si mohl otestovat populace škůdců pocházející z konkrétních (pro něho zajímavých) polí a vidět jasně srozumitelný výsledek (vyznění testu je srozumitelné i bez následné detailní statistické analýzy). Metodika je ale také vhodná pro výzkumná pracoviště a univerzity, neboť snadnost provedení nejde na úkor hodnoty získaných výsledků. Mohou ji např. využít studenti pro bakalářské, diplomové či doktorské práce.

## 6 Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty spojené s uplatněním této metodiky nesouvisí ani tak s možnými finančními přínosy jako spíše v zabránění možným finanční ztrátám. Komplikace vyvolané nemožností účinně kontrolovat blýskáčka řepkového v porostech řepky pyretroidními přípravky začaly být v Evropě (Heimbach et al. 2006, Slater et al. 2011, Zimmer & Nauen 2011a,b, Heimbach & Müller 2013, Brandes 2016) a též v ČR (Seidenglanz et al. 2013, Tóth et al. 2013) zcela zjevné po roce 2007. Tedy v době, kdy situace s dostupností insekticidních účinných látek s odlišným mechanismem účinku nebyla sice již dobrá, co se týče možností pro zavedení účinné antirezistentní strategie, ale podstatně lepší než v současné době: byly k dispozici insekticidy na bázi některých organofosfátů, neonikotinoid thiacloprid, oxadiazine indoxacarb, pymetrozine a neonikotinoidní mořidla. Během několika následujících let došlo k řadě zákazů insekticidních účinných látek a zastavit nebo jen brzdit vývoj rezistence u populací blýskáčka řepkového v Evropě k pyretroidům nebylo možné. Nyní (rok 2024) je u blýskáčka řepkového možnost zvrátit vývoj směřující k rezistenci k pyretroidům již ztracena (Hrudová et al. 2023, Kocourek et al. 2024). Využití synergistů insekticidů (PBO), které blokují oxigenázy cytochromu P450, k obnovení citlivosti blýskáčka řepkového k pyretroidům se jeví jako jedna z posledních alternativ, kterou lze v současné době využít, aby bylo možné tohoto škůdce v polních podmínkách kontrolovat. Dostupné insekticidy jsou totiž právě jen pyretroidy a jeden neonikotinoid, acetamiprid, jehož efekt na blýskáčka řepkového je obecně nižší, a navíc se i v jeho případě objevují problémy s rezistencí (Kocourek et al. 2018, 2024). Proto je nutné vědět, jak a v jakých dávkách PBO použít, aby to bylo bezpečné, účinné a ekonomicky únosné. To je jedním z cílů této metodiky. Nemožnost úspěšně kontrolovat blýskáčka řepkového v porostech řepky, když je jeho výskyt v citlivé růstové fázi pro plodinu (BBCH 50–60) výrazně nadprahový, vede až k 70% ztrátám na výnosu (např. Wiczorek et al. 2014).

U dřepčíka olejkového se vývoj směřující k rezistenci proti pyretroidům začal zrychlovat v sezónách následujících po zákazu neonikotinoidních mořidel (Højland et al. 2015, Højland & Kristensen 2018), ke kterému došlo v roce 2014. Ve Velké Británii (White & Cowlrick 2016) byly první rozsáhlejší selhání pyretroidních aplikací proti dřepčíkům v polních podmínkách zaznamenány v letech 2015 a 2016 (White & Cowlrick 2016), k dalšímu (skokovému) zhoršení pak došlo v letech 2018 a 2019 (Willis et al. 2020). Podobný, i když o něco pomalejší vývoj rezistence k pyretroidům, byl zaznamenán u populací dřepčíka olejkového i v dalších evropských zemích, a to v Německu, Dánsku a Francii (např. Højland & Kristensen 2018, Willis et al. 2020). V České republice se situace vyvíjí podobně jako v Německu (Stará & Kocourek 2019, Seidenglanz et al. 2021b,c, 2023, 2024a,b,c). Poslední výsledky získané během podzimu 2024 naznačují, že došlo k výraznému skokovému

zhoršení (Kocourek et al. 2024), které velmi připomíná situaci zaznamenanou na Britských ostrovech v letech 2018 a 2019 (viz Willis et al. 2020). Vzájemné relativní zastoupení dvou hlavních mechanismů rezistence (*target site insensitivity* a *metabolic resistance*) je s vysokou pravděpodobností u populací dřepčíka olejkového poněkud jiné než u populací blýskáčka řepkového (viz Úvod), přesto i zde se jeví možnost využít PBO jako jedna z mála praktických dostupných alternativ, které mohou alespoň částečně zmírňovat dopady rezistence proti pyretroidům u tohoto škůdce. U dřepčíka olejkového je v některých zemích (Německo, Francie, Velká Británie) možné proti larvám tohoto škůdce používat foliární aplikace na bázi diamidu cyantraniliprole. Tato látka však není plnohodnotnou alternativou za pyretroidy, neboť je zcela neúčinná na dospělého tohoto škůdce. Nenajde-li se v krátké době nějaké prakticky použitelné řešení, škody na porostech způsobené dřepčíkem olejkovým a s tím související ekonomické dopady na zemědělce budou vysoké (*autoři nedokážou předložit nějakou konkrétní zcela hypotetickou částku a považují to také za zbytečné*; Seidenglanz et al. 2024a).

Když Heimbach & Müller v roce 2013 publikovali výsledky několikaletého (2005–2011) monitoringu zaměřeného na změny v citlivosti vybraných druhů řepkových škůdců k pyretroidům v Německu, zaznamenali, že ze tří druhů krytonosců (k. řepkový, k. čtyřzubý a k. šešulový) na tom byl k. čtyřzubý podstatně hůř než další dva druhy. Hodnoty LD<sub>00</sub> pro lambda-cyhalothrin byly u populací k. čtyřzubého téměř třikrát vyšší (v průměru kolem 1.5 g a.i./ha) než u populací k. řepkového a asi dvojnásobně vyšší než u k. šešulového. U nás byl zaznamenán velmi podobný vývoj, i když se s monitoringem začalo později, a to od roku 2015 (Seidenglanz et al. 2020a,b, 2021a,b). Na základě shromážděných výsledků (Seidenglanz et al. 2022, Kocourek et al. 2024) je možné sledovat, jak se postupně během let 2017 až 2024 zvětšoval rozdíl mezi úrovněmi rezistence / citlivosti českých populací k. čtyřzubého a k. šešulového. Zatímco u k. šešulového (podobné je to i u k. řepkového) je situace víceméně stabilní, zaznamenány dosud byly jen citlivé a vysoce citlivé populace k lambda-cyhalothrinu, u k. čtyřzubého je variabilita výrazně vyšší, kromě citlivých populací lze narazit na středně rezistentní i rezistentní populace ke zmíněnému referenčnímu pyretroidu. Na druhou stranu u k. čtyřzubého nedošlo zatím k tak výraznému skokovému zhoršení, které bylo popsáno u dřepčíka olejkového. V době přípravy této metodiky (počátek roku 2025) na tom tedy byl k. čtyřzubý o něco lépe než oba výše uvedené druhy škůdců. Přesto i v jeho případě platí, že rezistence k pyretroidům je závažný problém, který již nyní na některých místech v ČR komplikuje ochranu porostů (Kocourek et al. 2024).

## 7 Seznam použité související literatury

- Abdelmajid N. & Duverna R. (2016). United States National Residue Program for Meat, Poultry and Egg Products: 2016 Residue Sample Results. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service.
- Abdelmajid N. & Duverna R. (2017). United States National Residue Program for Meat, Poultry and Egg Products: 2017 Residue Sample Results. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service.
- Adams M. D., Celniker S.E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Amweg E.L., Weston D.P., Johnson C.S., You J., Lydy M.J. (2006). Effect of piperonyl butoxide on permethrin toxicity in the amphipod *Hyaella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Online. 25(7), 1817–1825. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1897/05-440r.1
- Ankley G. T. & Collyard S.A. (1995). Influence of piperonyl butoxide on the toxicity of organophosphate insecticides to three species of freshwater benthic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. Online. 110(2), 149–155 [vid. 2025-12-16]. ISSN 0742-8413. Dostupné z: doi:10.1016/0742-8413(94)00098-U
- Ankley G. T., Dierkes J.R.; Jensen D.A., Peterson G.S. (1991). Piperonyl butoxide as a tool in aquatic toxicological research with organophosphate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Online. 21(3), 266–274 [vid. 2025-12-16]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/0147-6513(91)90065-W
- Antonious G.F., Gayatri A. Patel G.A., Snyder J.C., Coyne M.S. (2004). Pyrethrins and Piperonyl butoxide adsorption to soil organic matter. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. Online. 39(1), 19–32 [vid. 2025-12-16]. ISSN 0360-1234. Dostupné z: doi:10.1081/PFC-120027436
- Arnold T. (1999). The fate and behaviour of Piperonyl butoxide in the environment. In: *Piperonyl Butoxide*. Online. No publisher: Academic Press, s. 105–119 [vid. 2025-12-16]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012286975-4/50009-7
- Barnett, E. A., Charlton, A. J., Fletcher, M. R. (2007). Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994–2003. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63(11), 1051-1057.
- Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1376), 1701-1705.
- Bothorel S., Robert C., Ruck L., Carpezat J., Lauvernay A., Leflon M., Siegwart M. (2018). Resistance to pyrethroid insecticides in cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*) and rape winter stem weevil (*Ceutorhynchus picipit-*

- arsis) populations in France. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC-WPRS Bulletin* 136, 89-104.
- Brandes M. (2016). Effects of different insecticide applications on population development of pollen beetle (*Meligethes aeneus* (Fabricius)) on oilseed rape (*Brassica napus* L.). Dissertation zur Erlangung des *Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen*. Göttingen, November 2016.
- Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J. L., Westphal H., Beachy P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Chiu T. L., Wen Z., Rupasinghe S. G., & Schuler M. A. (2008). Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(26), 8855-8860.
- Dáder B., Vinuela E., Moreno A., Plaza M., Garzo E., Del Estal P., Fereres A. (2019). Sulfoxaflor and natural Pyrethrin with Piperonyl butoxide are effective alternatives to neonicotinoids against juveniles of *Philaenus spumarius*, the European Vector of *Xylella fastidiosa*. *Insects*. Online. 10(8), 225 [vid. 2025-12-16]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects10080225
- Daiss R. & Edwards D. (2006). Reregistration Eligibility Decision for Piperonyl Butoxide (RED). Office of Pesticide Programs. United States Environment Protection Agency, Washington, D.C.
- Dewar A. M., Moores G., Johnston M., Borzatta V., Bass C., Mazzone E., Gurkan O., Titèra D., Szolagyi J. (2014). EcoSyn: The potential for overcoming insecticide resistance in arable crop pests using synergists. *Aspects of Applied Biology* 127, 1-4.
- Dong K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate neuroscience*, 7, 17-30.
- Everson J. L., Sun M. R., Fink D. M., Heyne G. W., Melberg C. G., Nelson K. F., Doroodchi P., Colopy L. J., Ulschmid C. M., Martin A. A., McLaughlin M. T., Lipinski R. J. (2019). Developmental toxicity assessment of piperonyl butoxide exposure targeting sonic hedgehog signalling and forebrain and face morphogenesis in the mouse: an in vitro and in vivo study. *Environmental Health Perspectives*. 127(10), 107006.
- Farnham A.W. (1986). The effect of various intervals between treatments on the synergism of a pyrethroid (1R-trans)-tetramethrin, in houseflies, in *Proc British Crop Protection Conference – Pests Dis*, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp645-647.
- Feyereisen R. (2005). Insect cytochrome P450. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*; Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2005; Volume 4, pp. 1-77.

- Fletcher, M. A. R. K., & Barnett, L. (2003). Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bulletin of insectology*, 56(1), 141-145.
- Gunning R.V., Moores G.D., Devonshire A.L. (1998). Inhibition of pyrethroid resistance esterases by piperonyl butoxide in Australian *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii*. In: *Piperonyl butoxide: the insecticide synergist*, pp. 215-226. Ed. Glynne Jones. London: *Academic Press*.
- Guo, Y. Q., Zhang, J. Z., Yang, M. L., Yan, L. Z., Zhu, K. Y., Guo, Y. P., & Ma, E. B. (2012). Comparative analysis of cytochrome P450-like genes from *Locusta migratoria manilensis*: expression profiling and response to insecticide exposure. *Insect Science*, 19(1), 75-85.
- Han, H., Yang, Y., Hu, J., Wang, Y., Zhao, Z., Ma, R., ... & Guo, Y. (2022). Identification and characterization of CYP6 family genes from the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) and their responses to insecticides. *Insects*, 13(3), 300.
- Habenschus M. D., Blascke Carrão D., Perez de Albuquerque N. C., Perovani I. S., Moreira da Silva R., Nardini V., Lopes N.P., Dias L. G., Moraes de Oliveira A. R. (2021). In vitro enantioselective inhibition of the main human CYP450 enzymes involved in drug metabolism by the chiral pesticide tebuconazole. *Toxicology Letters* 351, 1-9.
- Heimbach U., Müller A. Thieme T. (2006). First steps to analyse pyrethroid resistance of different of oilseed rape pests in Germany. *Nachrichtenbl Dt Pflanzenschutz* 58, 1-5.
- Heimbach U. & Müller A. (2013): Incidence of pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany. *Pest. Manag. Sci.* 69, 209-216.
- Heyne, G. W., Melberg, C. G., Doroodchi, P., Parins, K. F., Kietzman, H. W., Everson, J. L., ... & Lipinski, R. J. (2015). Definition of critical periods for Hedgehog pathway antagonist-induced holoprosencephaly, cleft lip, and cleft palate. *PLoS one*, 10(3), e0120517.
- Horton M. K., Rundle A., Caman D. E., Boyd Barr D., Rauh V. A., Whyatt R. M. (2011). Impact of prenatal exposure to piperonyl butoxide and permethrin on 36-month neurodevelopment. *Pediatrics* 127, 699-706.
- Højland D. H., Nauen R., Foster S.P., Williamson M. S., Kristensen M. (2015). Incidence, spread and mechanisms of pyrethroid resistance in European populations of the cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Plos One* 10 (12), e0146045.
- Højland, D. H., & Kristensen, M. (2018). Target-site and metabolic resistance against  $\lambda$ -cyhalothrin in cabbage stem flea beetles in Denmark. *Bulletin of insectology*, 71(1), 45-49.
- Huang, Y., Shen, G. M., Jiang, H. B., Jiang, X. Z., Dou, W., & Wang, J. J. (2013). Multiple P450 genes: Identification, tissue-specific expression and their responses to insecticide treatments in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(1-2), 1-7.

- Ingles, P. J., Adams, P. M., Knipple, D. C., & Soderlund, D. M. (1996). Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26(4), 319-326.
- Johnson, R. M., Wen, Z., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2006). Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. *Journal of economic entomology*, 99(4), 1046-1050.
- Jones DG (1998). Piperonyl Butoxide – the insecticide synergist. Academic Press: 1st Edition. Elsevier, 323 pp.
- Joußen, N., Agnolet, S., Lorenz, S., Schöne, S. E., Ellinger, R., Schneider, B., & Heckel, D. G. (2012). Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15206-15211.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas J., Gorman K., Denholm I., Morin, S. (2008). Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(6), 634-644.
- Kocourek F., Hovorka T., Jursík M., Kazda J., Kolařík P., Plachká E., Skuhrovec J., Seidenglanz M., Šafář J. (2018). Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., ISBN 978-80-7427-251-6: 56 stran.
- Kocourek F., Seidenglanz M., Hrudová E., Kolařík P., Kořínek J. (2024). Zpráva za Plošný monitoring rezistence vybraných škůdců vůči účinným látkám pesticidů na území ČR v roce 2024 - zajištění plnění cílů NAP k bezpečnému používání pesticidů v roce 2024 (SMLOUVA O DÍLO č. č. 688-2024-18111 Č.j. MZE-38527/2024-18111).
- Li, J., Li, X., Bai, R., Shi, Y., Tang, Q., An, S., ... & Yan, F. (2015). RNA interference of the P450 CYP6CM1 gene has different efficacy in B and Q biotypes of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 71(8), 1175-1181.
- Lipinski, R. J., Song, C., Sulik, K. K., Everson, J. L., Gipp, J. J., Yan, D., ... & Rowland, I. J. (2010). Cleft lip and palate results from Hedgehog signaling antagonism in the mouse: Phenotypic characterization and clinical implications. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(4), 232-240.
- Ludvíková M., Seidenglanz M. (2023). Molekulární analýzy zaměřené na určení mechanismů rezistence u jedinců *Meligethes aeneus* F. fenotypově rezistentních k pyretroidům. *Úroda* 12, roč. LXXI, vědecká příloha, s.149–154, ISSN 0139-6013.

- Mathews H.B. & Cassida J.E. (1970). Properties of microsomal cytochrome in relation to sex, strain, substrate specificity and apparent inhibition by synergist and insecticide chemical. *Life Science*. 9, 989-1001.
- Mitchell, S. N., Stevenson, B. J., Müller, P., Wilding, C. S., Egyir-Yawson, A., Field, S. G., Hemingway J., Paine M.J.I., Ranson H., Donnelly, M. J. (2012). Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6147-6152.
- Moores, G. D., Devonshire, A. L., & Gunning, R. V. (1998). Piperonyl butoxide-specific synergist or multi-metabolic inhibitor? In *Abstracts 9th International Congress on Pesticide Chemistry: the Food-Environment Challenge, London, 2-7 August 1998* (pp. 4D-004).
- Moores, G. D., Węgorzek, P., Zamojska, J., Field, L., & Philippou, D. (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.
- Nauen R., Zimmer C.T., Andrews M., Slater R., Bass C., Ekbom B., Gustafsson G., Hansen L.M., Kristensen M., Zebitz C.P.W., Williamson M.S. (2012). Target-site resistance to pyrethroids in European populations of pollen beetle, *Meligethes aeneus* F. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103, 173-180.
- Perry A.S. & Buckner A.J. (1970). Studies on microsomal cytochrome P450 in resistant houseflies. *Life Sciences* 9, 335-350.
- Philippou D., Field L.M., Wegorek P., Zamojska J., Andrews M., Slater R., Moores G.D. (2011). Characterising metabolic resistance in pyrethroid insensitive pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) from Poland and Switzerland. *Pest Management Science*. 67, 239-243.
- Pilling E., Jepson P.C. (1993). Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pest Management Science*. 39, 293-297.
- Pohanish R.P. (2015). In: Pohanish RP (Ed.). *Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*, second ed. *William Andrew Publishing*, Oxford, pp. 629-724.
- Rinkewich F.D., Du Y., Dong K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106, 93-100.
- Rivera-González, K. S., Beames, T. G., & Lipinski, R. J. (2021). Examining the developmental toxicity of piperonyl butoxide as a Sonic hedgehog pathway inhibitor. *Chemosphere*, 264, 128414.
- Riveron, J. M., Irving, H., Ndula, M., Barnes, K. G., Ibrahim, S. S., Paine, M. J., & Wondji, C. S. (2013). Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving

- the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 252-257.
- Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R., & Brody, J. G. (2003). Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental science & technology*, 37(20), 4543-4553.
- Seidenglanz M., Poslušná J., Hrudová E. (2009). The importance of monitoring the *Ceutorhynchus pallidactylus* female flight activity for the timing of insecticidal treatment. *Plant Protection Science* 45(3), 103-112. DOI: 10.17221/37/2008-PPS
- Seidenglanz M., Poslušná J., Kolařík P., Rotrekl J., Hrudová E., Tóth P., Havel J., Plachká E., Bernardová M. (2013). Výsledky testování citlivosti blýskáčků (*Meligethes* spp.) na pyretroid lambda-cyhalothrin v roce 2013: mapa s odborným obsahem [online]. 1. vyd. Šumperk: AGRITEC, 2014. 33 s. ISBN 978-80-87360-26-2.
- Seidenglanz M., Šafář J., Muñoz M., Bajerová R., Hrudová E., Havel J., Kolařík P. (2021a). Mechanismus rezistence blýskáčka řepkového k pyretroidům v Česku. Řepka: odborná příloha časopisu *Úroda*. 2021, 69(4), 24–28. ISSN 0139-6013.
- Seidenglanz M., Kolařík P., Hrudová E., Havel J., Tánčík J., Bokor P., Kocourek F., Stará J., Vichová L., Bajerová R., Muñoz M., Šafář J. (2021b). Citlivost českých a slovenských populací řepkových škůdců k insekticidům. *Agromanuál*. 2021, 16(2), 42–45. ISSN 1801-7673.
- Seidenglanz M., Muñoz Arbeález M., Šafář J. (2021c). Poškozením od dřepčíka olejkového lze do jisté míry předcházet. *Úroda* 69(7), 41–45.
- Seidenglanz M., Šafář J., Muñoz Arbelález M., Heděnc P., Hrudová E., Bajerová R., Kolařík P. (2022). Problems in cabbage stem weevil control (*Ceutorhynchus pallidactylus* Marsh.) in winter oilseed rape. *Plant Protect Science* 58, 220–233.
- Seidenglanz M., Blažek L., Hanáková Bečvářová P., Muñoz Arbelález M., Šafář J., Kumar R. (2023). Vliv způsobu založení porostu řepky na disperzi dřepčíka olejkového a jeho přirozených nepřátel. *Úroda – vědecká příloha* 71(12), 179–186.
- Seifert, A. W., Bouldin, C. M., Choi, K. S., Harfe, B. D., & Cohn, M. J. (2009). Multiphasic and tissue-specific roles of sonic hedgehog in cloacal septation and external genitalia development. *Development*, 136(23), 3949-3957.
- Slater, R., Ellis, S., Genay, J. P., Heimbach, U., Huart, G., Sarazin, M., ... & Robin, F. (2011). Pyrethroid resistance monitoring in European populations of pollen beetle (*Meligethes* spp.): a coordinated approach through the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). *Pest management science*, 67(6), 633-638.
- Stará J. & Kocourek F. (2019). Cabbage stem flea beetle's (*Psylliodes chrysocephala* L.) susceptibility to pyrethroids and tolerance to thiacloprid in the Czech Republic. *PLOS ONE* 14(9), e0214702.
- Stevenson, B. J., Bibby, J., Pignatelli, P., Muangnoicharoen, S., O'Neill, P. M., Lian, L. Y., ... & Paine, M. J. (2011). Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector

- Anopheles gambiae metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 492–502.
- Strode, C., Wondji, C. S., David, J. P., Hawkes, N. J., Lumjuan, N., Nelson, D. R., ... & Ranson, H. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(1), 113–123.
- Sun, Y. P., & Johnson, E. R. (1972). Quasi-synergism and penetration of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 65(2), 349–353.
- Tanaka, T., & Inomata, A. (2015). Effects of Maternal Exposure to Piperonyl Butoxide (PBO) on Behavioral Development in F1-Generation Mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 104(6), 227–237.
- Tanaka, T., & Inomata, A. (2016). Reproductive and neurobehavioral effects of maternal exposure to piperonyl butoxide (PBO) in F1-generation mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 107(4-5), 195–205.
- Tanaka, T., Suzuki, T., & Inomata, A. (2019). Effects of piperonyl butoxide on exploratory behaviour in female mice. *Toxicology and Industrial Health*, 35(4), 314–323.
- Thompson H. M. (2003). Behavioural effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12, 317–330.
- Tóth P., Hrudová E., Sapáková E., Závadzká E., Seidenglanz M. (2013). Species of the genus *Meligethes* occurring in oil-seed crop fields in the Czech Republic. *Plant Protect Science* 49, 177–186.
- Vontas J., Ranson H., Williamson M.S. (2010). Pyrethroid insecticides and resistance mechanisms, In: LI Gilbert, SS Gill (Eds.), *Insect Control*, Elsevier, 2010, pp. 30–34.
- Wachs H. (1947). Synergistic insecticides. *Science*, Washington, pp. 530–531.
- Wachs H., Jones H.A., Bass L.W. (1950). New safe insecticides. Agricultural control. Chemicals. *American chemical society*, pp. 43–48.
- Wan, F., Yin, C., Tang, R., Chen, M., Wu, Q., Huang, C., ... & Li, F. (2019). A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10(1), 4237.
- Wang, R., Huang, Z. Y., & Dong, K. E. (2003). Molecular characterization of an arachnid sodium channel gene from the varroa mite (*Varroa destructor*). *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(7), 733–739.
- Wang, J., Lu, J., Mook Jr, R. A., Zhang, M., Zhao, S., Barak, L. S., ... & Chen, W. (2012). The insecticide synergist piperonyl butoxide inhibits hedgehog signaling: assessing chemical risks. *Toxicological sciences*, 128(2), 517–523.
- Wang, H., Shi, Y., Wang, L., Liu, S., Wu, S., Yang, Y., ... & Wu, Y. (2018). CYP6AE gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides. *Nature communications*, 9(1), 4820.

- Wang, Y., Tian, J., Han, Q., Zhang, Y., & Liu, Z. (2021). Genomic organization and expression pattern of cytochrome P450 genes in the wolf spider *Pardosa pseudoannulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 248, 109118.
- White S. & Cowlrick S. (2016). Project report no. PR586. Cabbage stem flea beetle larval survey. AHDB Cereal Oilseeds PR586:14, <https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Research%20Papers/Cereals%20and%20Oilseed/cabbage-stem-flea-beetle-larval-survey-2016-.pdf>
- Wieczorek P., Wegorek P., Protasewicz D., Zamojska J., Budziszewska M., Mrówczyński M., Obrepalska-Stepłowska A. (2014). Changes in the expression of mitochondrial cytochrome oxidase subunits due to pyrethroid intoxication in pyrethroid-resistant pollen beetles, *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 121 (2), 89–95.
- Willis C. E., Foster S. P., Zimmer C. T., Elias J., Chang X., Field L. M., Williamson M. S., Davies T. G. E. (2020). Investigating the status of pyrethroid resistance in UK populations of the cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). *Crop Protection* 138, 105316
- Woudneh, M. B., & Oros, D. R. (2006). Quantitative determination of pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in surface water by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 6957–6962.
- Yang, J. D., Liu, S. H., Liao, M. H., Chen, R. M., Liu, P. Y., & Ueng, T. H. (2018). Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental Toxicology*, 33(8), 899–907
- Young, S. J., Gunning, R. V., & Moores, G. D. (2002). Inhibition of *Bemisia tabaci*, B-type esterases by PBO. In *Proceedings of the 10th IUPAC International Congress on Pesticide Chemistry*. Basel: IUPAC.
- Young S. J. (2003). *In vivo* effect of PBO on esterases from *Helicoverpa armigera* and *Bemisia tabaci*, *World Cotton Conference*, Cape Town, pp 1169–1170.
- Young S. J., Gunning R.V., Moores G.D. (2005). The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* 61, 397–401.
- Xia Q., Zhou Z., Lu C., Cheng D., Dai F., Li B., Zhao P., Zha X., Cheng T., Chai C., et al. (2004). A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306, 1937–1940.
- Zhang X.Y., Dong J., Wu H. H., Zhang H. H., Zhang J. Z., Ma E. B. (2019). Knockdown of cytochrome P450 CYP6 family genes increases susceptibility to carbamates and pyrethroids in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Chemosphere* 223, 48–57.
- Zhou G. L., Huang J. L. (2002). Diversity and evolution of CYP6 family in insects. *Chinese Bulletin of Entomology* 39, 246-251.

- Zhu, F., Parthasarathy, R., Bai, H., Woithe, K., Kausmann, M., Nauen, R., ... & Palli, S. R. (2010). A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8557–8562.
- Zimmer C & Nauen R (2011a). Pyrethroid resistance and thiacloprid baseline susceptibility of European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae) collected in winter oilseed rape. *Pest Management Science* 67, 599–608.
- Zimmer, C. T., & Nauen, R. (2011b). Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 100(3), 264–272.
- Zimmer C., Müller A., Heimbach U., Nauen R. (2014a). Target-site resistance to pyrethroid insecticides in German populations of the cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 108, 1–7.
- Zimmer C.T., Bass C., Williamson M.S., Kausman M., Wölfel K., Gutbrod O., Nuen R. (2014b). Molecular and functional characterisation 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.

## 8 Seznam publikací, které předcházely metodice

- Hrudová E., Seidenglanz M., Tóth P., Poslušná J., Kolařík P., Havel J. (2023). Pollen Beetles in Oilseed Rape Fields: Spectrum and Distribution in Czech Republic during 2011–2013. *Agriculture* 2023, 13, <https://doi.org/10.3390>.
- Kocourek F., Hovorka T., Jursík M., Kazda J., Kolařík P., Plachká E., Skuhrovec J., Seidenglanz M., Šafář J. (2018). Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., ISBN 978-80-7427-251-6: 56 stran.
- Kocourek F., Seidenglanz M., Hrudová E., Kolařík P., Kořínek J. (2024). Zpráva za Plošný monitoring rezistence vybraných škůdců vůči účinným látkám pesticidů na území ČR v roce 2024 - zajištění plnění cílů NAP k bezpečnému používání pesticidů v roce 2024 (SMLOUVA O DÍLO č. č. 688-2024-18111 Č.j. MZE-38527/2024-18111).
- Ludvíková M., Seidenglanz M. (2023). Molekulární analýzy zaměřené na určení mechanismů rezistence u jedinců *Meligethes aeneus* F. fenotypově rezistentních k pyretroidům. *Úroda* 12, roč. LXXI, vědecká příloha, s.149–154, ISSN 0139-6013.
- Seidenglanz M., Poslušná J., Hrudová E. (2009). The importance of monitoring the *Ceutorhynchus pallidactylus* female flight activity for the timing of insecticidal treatment. *Plant Protection Science* 45(3), 103–112. DOI: 10.17221/37/2008-PPS.

- Seidenglanz M., Poslušná J., Kolařík P., Rotrekl J., Hrudová E., Tóth P., Havel J., Plachká E., Bernardová M. (2013). Výsledky testování citlivosti blýskáčků (*Meligethes* spp.) na pyretroid lambda-cyhalothrin v roce 2013: mapa s odborným obsahem [online]. 1. vyd. Šumperk: AGRITEC, 2014. 33 s. ISBN 978-80-87360-26-2.
- Seidenglanz M., Šafář J., Rubil N., Ruseňáková M., Roskóová V. (2020a). Control of cabbage stem weevil and pollen beetle with one insecticide application. *Plant Protection Science*, Vol. 56, No. 02: 92-100. ISSN 1212-2580 doi: 10.17221/187/2015-PPS.
- Seidenglanz M., Bajerová R., Šafář J. (2020b). Lze při extrémním výskytu stonkových krytonosců účinně ochránit porosty před poškozením? Sezona 2020 je velký zdroj informací do budoucna. Sborník příspěvků: Pěstování olejnin v sezoně 2019/20. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin SPZO s.r.o., 2020, s. 95–99, ISBN 978-80-87065-98-3.
- Seidenglanz M., Šafář J., Muñoz M., Bajerová R., Hrudová E., Havel J., Kolařík P. (2021a). Mechanismus rezistence blýskáčka řepkového k pyretroidům v Česku. Řepka: odborná příloha časopisu *Úroda*. 2021, 69(4), 24–28. ISSN 0139-6013.
- Seidenglanz M., Kolařík P., Hrudová E., Havel J., Tancík J., Bokor P., Kocourek F., Stará J., Vichová L., Bajerová R., Muñoz M., Šafář J. (2021b). Citlivost českých a slovenských populací řepkových škůdců k insekticidům. *Agromanuál*. 2021, 16(2), 42–45. ISSN 1801-7673.
- Seidenglanz M., Muñoz Arbeláez M., Šafář J. (2021c). Poškozením od dřepčika olejkového lze do jisté míry předcházet. *Úroda* 69(7), 41–45.
- Seidenglanz M., Šafář J., Muñoz Arbeláez M., Heděnc P., Hrudová E., Bajerová R., Kolařík P. (2022). Problems in cabbage stem weevil control (*Ceutorhynchus pallidactylus* Marsh.) in winter oilseed rape. *Plant Protection Science* 58, 220–233. <https://doi.org/10.17221/153/2021-PPS>.
- Seidenglanz M., Blažek L., Hanáková Bečvářová P., Muñoz Arbeláez M., Šafář J., Kumar R (2023). Vliv způsobu založení porostu řepky na disperzi dřepčika olejkového a jeho přirozených nepřátel. *Úroda – vědecká příloha* 71(12), 179–186.
- Seidenglanz M., Hanáková Bečvářová P., Charvát K., Chmelík V., Plachká E., Kolařík P., Kužilek M., Blažek L., Šafář J., Kožuch D., Zadražil F., Čihánková L., Kořínek J., Muñoz Arbeláez M., Hrudová E. (2024a). Výsledky monitoringu letové aktivity dřepčika olejkového (*Psylliodes chrysocephala*) ve vztahu ke krajinným charakteristikám. 1. vyd. Šumperk: Agritec, 2024. ISBN 978-80-87360-78-1.
- Seidenglanz M., Hrudová E., Kolařík P., Kořínek J., Blažek L., Šafář J., Hanáková Bečvářová P., Čihánková L., Plachká E (2024b). Metodika pro hodnocení časoprostorových asociací mezi disperzí škůdců a jejich antagonistů v porostech řepky. 1. vyd. Šumperk: Agritec, 2024. ISBN 978-80-87360-77-4.

Seidenglanz M., Šafář J., Hrudová E., Blažek L., Čihánková L., Kolařík P., Plachká E., Hanáková Bečvářová P., Kořínek J. (2024c). Metodika pro hodnocení citlivosti blanokřídlých parazitoidů škůdců řepky k pyretroidům. 1. vyd. Šumperk: Agritec, 2024. ISBN 978-80-87360-76-7.

Tóth P., Hrudová E., Sapáková E., Zavadzká E., Seidenglanz M. (2013). Species of the genus *Meligethes* occurring in oil-seed crop fields in the Czech Republic. *Plant Protect Sci* 49, 177-186.

## **9 Jména oponentů a názvy jejich organizací**

Ing. Jakub Beránek Ph.D., ÚKZÚZ, ředitel odboru, Odbor zdraví rostlin, Zemědělská 1752/1a, Černá Pole, 61300 Brno

Ing. Martin Lošák, RenoTechnologie, a.s., Lagnovská 669, 742 83 Klimkovice

## **10 Dedikace**

Předkládaná metodika je výsledkem řešení projektu MZe QK21010332 „Mechanismus rezistence řepkových škůdců proti insekticidům, jejich výchozí citlivost k novým insekticidům a dopad insekticidních aplikací na vývoj larev škůdců a jejich přirozených nepřátel“.

## 11 Přílohy

**Příloha 1:** Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního testování synergického efektu PBO na účinnost pyretroidu

**Příloha 2:** Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního hodnocení vlivu různých dávek PBO na jeho synergický efekt na lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate a etofenprox s cílem nalézt nejnižší efektivní dávku PBO

**Příloha 3:** Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního hodnocení vlivu délky doby pre-expozice k PBO na jeho synergický účinek pro lambda-cyhalothrin

**Příloha 1a: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního testování synergického efektu PBO na účinnost pyrethroidu**  
**Testované látky: lambda-cyhalothrin (LC) + PBO**

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru:

Lokalita sběru (GPS):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Hodnocení po 24 hodinách:

Datum a hodina přípravy zkušebních lahvíček:

Datum a hodina vkládání imag do lahvíček (= počátek testu):

Označení lahvíčky	testovaná dávka LC (g ú.l./ha)	testovaná dávka PBO (g ú.l./ha)	opak A		opak B		opak C	
			celkový počet imag / lahvíčku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvíčku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvíčku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)
LC54+P	7,50	45 <sup>5</sup>						
LC5 <sup>4</sup>	7,50	0						
LC4+P	1,50	45 <sup>5</sup>						
LC4	1,50	0						
LC3+P	0,30	45 <sup>5</sup>						
LC3	0,30	0						
LC2 <sup>3</sup> +P	0,06	45 <sup>5</sup>						
LC2 <sup>3</sup>	0,06	0						
K-P <sup>2</sup>	0	45 <sup>5</sup>						
K <sup>1</sup>	0	0						

<sup>1,2</sup>Obě kontroly, K i K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvíčky K: Ka, Kb, Kc; a tři lahvíčky K-P: K-Pa, K-Pb, K-Pc.

<sup>3</sup>Dávka LC2 bude do testu zařazena jen v případě krytonosce čtyřzubého a popř. i dřepčika olejkového. V případě blýskáčka řepkového je zbytečná.

<sup>4</sup>Dávka odpovídající registrované dávce pyrethroidu lambda-cyhalothrin.

<sup>5</sup>Určující dávka (discriminating rate) PBO.

**Příloha 1b: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního testování synergického efektu PBO na účinnost pyretroidu  
Testované látky: tauflualinate (TF) + PBO**

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru:

Lokalita sběru (GPS):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Hodnocení po 24 hodinách:

Označení lahvičky	testovaná dávka TF (g ú.l./ha)	testovaná dávka PBO (g ú.l./ha)	opak A		opak B		opak C	
			celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)
TF4 <sup>3</sup> +P	48,00	45 <sup>4</sup>						
TF4 <sup>3</sup>	48,00	0						
TF3+P	9,60	45 <sup>4</sup>						
TF3	9,60	0						
TF2+P	1,92	45 <sup>4</sup>						
TF2	1,92	0						
K-P <sup>2</sup>	0	45 <sup>4</sup>						
K <sup>1</sup>	0	0						

<sup>1,2</sup>Obě kontroly, K i K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: K<sub>a</sub>,K<sub>b</sub>, K<sub>c</sub>; a tři lahvičky K-P: K-P<sub>a</sub>, K-P<sub>b</sub>, K-P<sub>c</sub>.

<sup>3</sup>Dávka odpovídající registrované dávce pyretroidu tau-fluvalinate.

<sup>4</sup>Určující dávka (discriminating rate) PBO.

**Příloha 1c: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního testování synergického efektu PBO na účinnost pyretroidu  
Testované látky: etofenprox (ET) + PBO**

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru:

Lokalita sběru (GPS):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Hodnocení po 24 hodinách:

Označení lahvičky	testovaná dávka ET (g ú.l./ha)	testovaná dávka PBO (g ú.l./ha)	opak A		opak B		opak C	
			celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)
ET4 <sup>3</sup> +P	57,5	45 <sup>4</sup>						
ET4 <sup>3</sup>	57,5	0						
ET3+P	11,5	45 <sup>4</sup>						
ET3	11,5	0						
ET2+P	2,3	45 <sup>4</sup>						
ET2	2,3	0						
K-P <sup>2</sup>	0	45 <sup>4</sup>						
K <sup>1</sup>	0	0						

<sup>1,2</sup>Obě kontroly, K i K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a tři lahvičky K-P: K-Pa, K-Pb, K-Pc.

<sup>3</sup>Dávka odpovídající registrované dávce pyretroidu etofenprox.

<sup>4</sup>Určující dávka (discriminating rate) PBO.

**Příloha 2a: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního hodnocení vlivu různých dávek PBO na jeho synergický efekt na lambda-cyhalothrin (LC) s cílem nalézt nejnižší efektivní dávku PBO**

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru: Datum a hodina přípravy zkušebních lahviček:

Lokalita sběru (GPS): Datum a hodina vkládání imag do lahviček (= počátek testu):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Hodnocení po 24 hodinách:

Označení lahvičky	testovaná dávka LC (g ú.i./ha)	testovaná dávka PBO (g ú.i./ha)	opak A		opak B		opak C	
			celkový počet imag / počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)
LC5+P6	7,5	60						
LC5+P5	7,5	45						
LC5+P4	7,5	15						
LC5+P3	7,5	5						
LC5	7,5	0						
LC4+P6	1,5	60						
LC4+P5	1,5	45						
LC4+P4	1,5	15						
LC4+P3	1,5	5						
LC4	1,5	0						
K-P6 <sup>2</sup>	0	60						
K-P5 <sup>2</sup>	0	45						
K-P4 <sup>2</sup>	0	15						
K-P3 <sup>2</sup>	0	5						
K <sup>1</sup>	0	0						

<sup>1,2</sup>Všechny kontroly, K1 K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a tři lahvičky pro každý typ K-P pro všechny tři pyretroidy dohromady.

**Příloha 2b: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního hodnocení vlivu různých dávek PBO na jeho synergický efekt na tau-fluvalinate (TF) s cílem nalézt nejnižší efektivní dávku PBO**

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru:

Lokalita sběru (GPS):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Hodnocení po 24 hodinách:

Označení lahvičky	testovaná dávka TF (g ú.l./ha)	testovaná dávka PBO (g ú.l./ha)	opak A		opak B		opak C
			celkový počet imag / čet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / čet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	
TF4+P6	48	60					
TF4+P5	48	45					
TF4+P4	48	15					
TF4+P3	48	5					
TF4	48	0					
TF3+P6	9,6	60					
TF3+P5	9,6	45					
TF3+P4	9,6	15					
TF3+P3	9,6	5					
TF3	9,6	0					
K-P6 <sup>2</sup>	0	60					
K-P5 <sup>2</sup>	0	45					
K-P4 <sup>2</sup>	0	15					
K-P3 <sup>2</sup>	0	5					
K <sup>1</sup>	0	0					

<sup>1,2</sup> Všechny kontroly, K i K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a tři lahvičky pro každý typ K-P pro všechny tři pyretroidy dohromady.

**Příloha 2c: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního hodnocení vlivu různých dávek PBO na jeho synergický efekt na etofenprox (ET) s cílem nalézt nejnižší efektivní dávku PBO**

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru:

Datum a hodina přípravy zkušebních lahviček:

Lokalita sběru (GPS): Datum a hodina vkládání imag do lahviček (= počátek testu):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Hodnocení po 24 hodinách:

Označení lahvičky	testovaná dávka ET (g ú.l./ha)	testovaná dávka PBO (g ú.l./ha)	opak A		opak B		opak C	
			celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)
ET4+P6	57,5	60						
ET4+P5	57,5	45						
ET4+P4	57,5	15						
ET4+P3	57,5	5						
ET4	57,5	0						
ET3+P6	11,5	60						
ET3+P5	11,5	45						
ET3+P4	11,5	15						
ET3+P3	11,5	5						
ET3	11,5	0						
K-P6 <sup>2</sup>	0	60						
K-P5 <sup>2</sup>	0	45						
K-P4 <sup>2</sup>	0	15						
K-P3 <sup>2</sup>	0	5						
K <sup>1</sup>	0	0						

<sup>1,2</sup> Všechny kontroly, K i K-P, budou pro jeden test, tj. test jedné populace (tedy pro jednu sadu), připraveny ve třech opakováních. Tři lahvičky K: Ka, Kb, Kc; a tři lahvičky pro každý typ K-P pro všechny tři pyretroidy dohromady.

### Příloha 3: Tabulka pro záznam primárních dat z laboratorního hodnocení vlivu délky doby pre-expozice k PBO na jeho synergický účinek pro lambda-cyhalothrin

Testovaný druh hmyzu:

Datum a hodina sběru:

Lokalita sběru (GPS):

Stav porostu řepky (nebo jiné plodiny) v době sběru (růst. fáze):

Vše, co hodnotitel považuje ještě za důležité poznamenat ke stavu porostu, průběhu sběru, testování apod.:

Datum a hodina přípravy zkušebních lahviček:

Datum a hodina zahájení testu (= čas vložení imag do lahviček K):

označení na lahvičce (opakování)	dávka PBO vyjádřená v g.ú.l./ha	dávka LC vyjádřená v g.ú.l./ha	doba pre-expozice k určující dávce PBO (hodiny) <sup>1</sup>	doba expozice k určující dávce LC (hodiny)	celková doba brouků v lahvičce / lahvičekách <sup>3</sup>	opakování a		opakování b		opakování c	
						celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag / lahvičku	z toho počet imag vykazujících citlivou reakci (= mrtví + těžce postižení)
K (a,b,c)	0	0	0	0	15						
LC4 (a,b,c)	0	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	0	5	5						
LC4+P5(a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	0	5 (společně s PBO)	5						
2hP5 / LC4 (a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	2	5	2 + 5 = 7						
4hP5 / LC4 (a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	4	5	4 + 5 = 9						
6hP5 / LC4 (a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	6	5	6 + 5 = 11						
8hP5 / LC4 (a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	8	5	8 + 5 = 13						
10hP5 / LC4 (a,b,c)	45	1,5 (0,75) <sup>2</sup>	10	5	10 + 5 = 15						

<sup>1</sup>Přenos brouků z lahviček ošetřených PBO do lahviček s LC se provádí po uplynutí předepsané doby pre-expozice (pozor je odlišná u různých variant) pomocí trychtýře – brouci se jemným poklepem vysypou s lahvičky ošetřené PBO do trychtýře posazeného na LC lahvičce; jde o velmi snadný úkon vyžadující jen krátké zacvícení (vhodné je zkusit si to před vlastním testem na několika cvičných případech).

<sup>2</sup>V případě blyskáčka řepkového a dřepčička olejkového je pro tento test určující dávka LC 1.5 g.ú.l./ha; při testování krytonosce čtyřzubého je lepší použít poloviční dávku LC, to je 0,75 g.ú.l./ha.

<sup>3</sup>Brouci se hodnotí po vysypání na bílou plochu stejným způsobem jako při testu popsaném v části 3.3.1 a 3.3.2; tabulka pro zápis primárních dat je součástí této metodiky jako Příloha 3.



