

**Testování synergického efektu fungicidů
ze skupiny inhibitorů demetylace (DMIs)
na účinnost pyretroidů
na blýskáčka řepkového,
krytonosce čtyřzubého
a dřepčíka olejkového**

Certifikovaná metodika

Ing. Marek Seidenglanz, Ph.D.¹

Ing. Jaroslav Kořínek²

doc. Ing. Mgr. Eva Hrudová, Ph.D.⁴

Ing. Pavel Kolařík³

Ing. Michaela Ludvíková, Ph.D.¹

Mgr. Lukáš Blažek¹

Lenka Čihánková¹

Mgr. Petra Hanáková Bečvářová, Ph.D.¹

Ing. Eva Plachká, Ph.D.²

Ing. Barbora Kvapilová¹

¹*Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk*, ²*OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., pracoviště v Opavě*, ³*Zemědělský výzkum spol. s r.o., Troubsko*, ⁴*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 přírodních nepřátel“.

Oponentní posudky vypracovali:

Ing. Jakub Beránek, Ph.D., ÚKZÚZ, ředitel odboru, Odbor zdraví rostlin, Zemědělská 1752/1a, Černá Pole, 613 00 Brno

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

Publikaci bylo uděleno Osvědčení č. ÚKZÚZ 202697/2025 o uznání v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Vydal: Agritec Plant Research s.r.o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk, 2025.

ISBN: 978-80-87360-81-1

Obsah

1 Úvod	6
1.1 Vývoj rezistence u blýskáčka řepkového#, dřepčika 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	13
1.2.3 Cytochrom P450	15
1.3 Proč se zaměřit na fungicidy ze skupiny inhibitorů demetylase (DMIS) jako inhibitory Cytochromu P450 a potenciální synergisty pyretroidů	20
1.4 Zvyšují DMI fungicidy, jsou-li aplikované společně s insekticidem, jeho toxicitu a nebezpečnost pro necílové organismy?	21
1.5 Zvyšují DMI fungicidy, jsou-li aplikované společně s insekticidem, jeho toxicitu a nebezpečnost pro další necílové organismy?	22
1.6 Zvýšilo by využití účinných látek DMI fungicidů jako komponent do společných aplikací s pyretroidy v rámci IOR řepky proti škůdcům riziko vývoje rezistence u houbových patogenů k této skupině fungicidů?	25
2 Cíle metodiky	26
3 Vlastní popis metodiky	27
3.1 Organizace a koordinace aktivit spojených s testováním vlivu DMI na nárůst toxicity pyretroidů	27
3.2 Odchyt dospělých cílových druhů škůdců v porostu, jejich transport do laboratoře a jejich krátkodobé udržování před založením testu	27
3.3 Založení testu, způsob hodnocení a záznam výsledků pozorování	29
3.3.1 Princip testu	31
3.3.2 Stanovení synergického účinku u různých účinných látek ze skupiny DMI pro lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate a etofenprox při společné aplikaci	32
3.3.3 Výpočet nejnižší efektivní dávky pro konkrétní účinnou látku ze skupiny DMI fungicidů	40
3.3.4 Celková interpretace výsledků	42
3.4 Propojení lahvičkového testu s molekulární analýzou přeživších jedinců	42
3.5 Výsledky lahvičkových testů jako podklad pro polní pokusy	43
4 Srovnání „novosti postupů“	44
5 Popis uplatnění metodiky	44
6 Ekonomické aspekty	45
6.1 Modelové příklady pro vyjádření ekonomických aspektů spojených s uplatněním výsledků, které je možné získat při používání této metodiky	47
6.1.1 Modelový příklad č. 1 pro certifikovanou metodiku	48
6.1.2 Modelový příklad č. 2 pro certifikovanou metodiku	48
7 Seznam použité související literatury	49
8 Seznam publikací, které předcházely metodice	58
9 Jména oponentů a názvy jejich organizací	60
10 Dedikace	60
11 Přílohy	61

Anotace

Testování synergického efektu fungicidů ze skupiny inhibitorů demetylace (DMIs) na účinnost pyretroidů na blýskáčka řepkového, krytonosce čtyřzubého a dřepčíka olejkového

V předkládané metodice je představen a popsán postup (v části 3) pro přípravu, vedení a hodnocení laboratorních pokusů, které umožňují analyzovat a kvantifikovat synergický efekt různých účinných látek fungicidů ze skupiny Inhibitorů Demetylace (DMIs) na nárůst účinnosti tří různých účinných látek pyretroidů (lambda-cyhalothrin – LC, tau-fluvalinate – TF, etofenprox – ET) pro tři různé škůdce řepky: blýskáčka řepkového (*B. aeneus*), krytonosce čtyřzubého (*C. pallidactylus*) a dřepčíka olejkového (*P. chrysocephala*), u kterých byla v ČR prokázána rezistence k pyretroidům. Metodika umožňuje zjišťovat nejnižší efektivní dávku (z hlediska synergického dopadu) pro testované účinné látky fungicidů ze skupiny DMIs. To je taková dávka konkrétního fungicidu, která vrací, je-li daný fungicid aplikován společně s pyretroidem, rezistentním populacím tří jmenovaných druhů škůdců plnou citlivost k této skupině insekticidů. (Poznámka: vlivem synergického efektu této dávky určitého DMIs fungicidu se testovaná populace stává opět vysoce citlivou k testovanému pyretroidu = je jí možné přiřadit stupeň 1 dle kategorizace *Insecticide Resistance Action Committee*, IRAC). 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 také stručný popis důvodů proč testovat možný synergický efekt DMIs na zvýšení toxicity pyretroidů a jakou roli by tato skupina fungicidů mohla hrát při tlumení dopadů rezistence k pyretroidům v polních podmínkách a dále též popis rizik pro necílové organismy spojených s používáním DMIs v kombinaci s pyretroidy.

Klíčová slova: rezistence proti pyretroidům, DMIs, azolové fungicidy jako synergisté pyretroidů, inhibice Cytochromu P450, *Brassicogethes aeneus*, *Psylliodes chrysocephala*, *Ceutorhynchus pallidactylus*, lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox, letální dávky

Annotation

Testing the synergistic impact of fungicides from the Demethylation Inhibitors (DMIs) group on pyrethroid effect on pollen beetle, cabbage stem weevil and cabbage stem flea beetle.

This guide presents and describes method (in part 3) for establishing, managing, and assessing laboratory trials aimed at analysing and quantifying synergistic impact of fungicides from Demethylation Inhibitors group (DMIs) 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 the Czech Republic: pollen beetle (*B. aeneus*), cabbage stem weevil (*C. pallidactylus*) and cabbage stem flea beetle (*P. chrysocephala*). The method enables to find out the level of the lowest effective rate for the tested DMIs active ingredients. It is such a rate of a fungicide active ingredient, that, when it is added to pyrethroid, returns full susceptibility against the pyrethroid to the insect pest populations 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 methodological guide also contains a description of the present situation with pyrethroid resistance in populations of the three insect pests in the 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. Another part of the methodology is also aimed at explaining why it is important to carry out the laboratory testing of the DMIs in relation to mitigating the impacts of the phenomenon of the resistance against pyrethroids under field conditions. The potential threats connected with the usage of DMIs in tank-mixes with pyrethroids under field conditions for nontarget organisms are also discussed.

Key words: resistance against pyrethroids, DMIs, azole fungicides as synergists for pyrethroids, inhibition of Cytochrome P450, *Brassicogethes aeneus*, *Psylliodes chrysocephala*, *Ceutorhynchus pallidactylus*, lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox, LD values

1 Úvod

1.1 Vývoj rezistence u blýskáčka řepkového[#], 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 za (přibližně) posledních patnáct let je popsán v části 6 Ekonomické aspekty. Důvodem pro zařazení stručného historického přehledu toho, jak se rezistence vyvíjela v různých částech Evropy, ale i u nás, je nesporná souvislost mezi postupným nárůstem významu tohoto problému a ekonomickými dopady, které z toho pro zemědělce vyplývají.

[#]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 al. 2010).

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

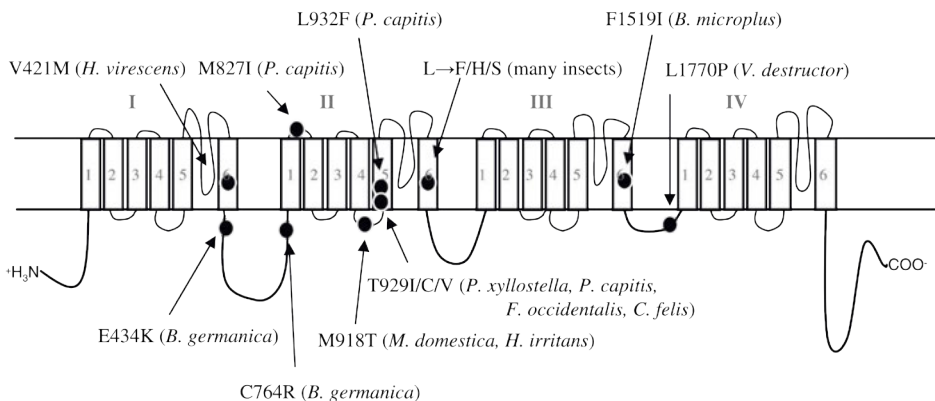
Místo, kde se pyretroidní molekuly po průniku do těla hmyzu (mohou se dostat do organismu různým způsobem – např. přes chodidla po přejití ošetřeného listu) vážou na receptory a působí také na sodíkové kanálky sodíkové pumpy. Sodíkové kanálky jsou důležitá funkční část cytoplazmatické membrány nervových 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 vlákně. Vzruch se šíří jako elektrický výboj, jehož základem je řízené a po axonu se šířící přepólování membrány – proces nemůže probíhat bez správné funkce sodíkových kanálků (**Obrázek 1**). Dojde-li k navázání určitého počtu molekul pyretroidní účinné látky na příslušná vazná místa nervového vlákna, je přenos

sodíkových kationtů narušen a vzruch se po vlákně 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 je vnější projev, protože míra narušení přenosu informace po nervovém vlákně 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 sodíkového kanálku (**Obrázek 1**). Mutace, které se projevují sníženou citlivostí sodíkového kanálku 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 sodíkového kanálku. 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. U škůdců s vazbou na řepku je popsána u zápledňáčka 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



Obrázek 1 – α -podjednotka sodíkového kanálku 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 „rozeznávání“ iontů – slouží jako filtr póru, kde se rozhoduje o tom, jestli je určitý iont vpuštěn nebo ne. 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 lysinu a argininu), 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 části 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).

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 minimálně jedna z mutací podmiňujících *s-kdr* typ rezistence nalezena byla (podle Willis et al. 2020 – testy z UK). Výsledky z Francie ukazují, že u zdejších populací se může kombinovat a kumulovat více mutací tohoto typu: viz velmi zajímavá a chmurná studie od Bothorel et al. 2018). U k. čtyřzubého se takto zaměřený výzkum ještě nerozběhl (Nauenet al. 2012, Hojland & Kristensen 2018).

Nyní je na místě 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?

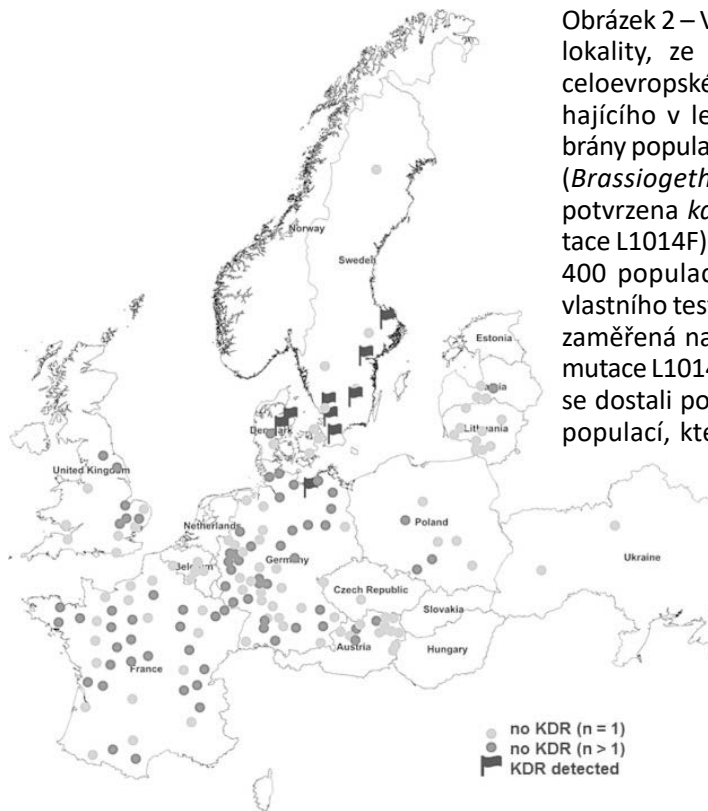
U blýskáčka řepkového hraje tento typ rezistence zřejmě zcela zanedbatelnou roli, což dokladují výsledky několika studií založených často na plošně velmi rozsáhlém monitoringu (např. Philipou et al. 2011, Nauen et al. 2012 + **Obrázek 2**). V Evropě byla zaznamenána vyšší frekvence mutace L1014F (*kdr*) pouze v dánských a švédských populacích. Výsledky získané autorským týmem této metodiky v souladu s výše zmíněnými publikacemi ukazují také 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 (vial tests) část jedinců, kteří přežili kontaktní vystavení vysokým dávkám pyretroidů (lambda-cyhalothrin a tau-fluvalinate, od roku 2025 také etofenprox), zamrazována a následně podrobena molekulárním testům (sekvenování / TaqMan 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 vyšších desítek až set jedinců za tímto účelem. Dosud jediný v ČR nalezený pozitivní jedinec (heterozygot) 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, ale také 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 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 v nemalé míře. Např. v poslední publikované práci na toto téma Willis et al. (2020) zjistili, že v roce 2019 bylo ve Velké Británii v průměru 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 kanálů 294 populací dřepčíka 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.

I přes takto vysokou frekvenci L1014F mutace v populacích dřepčíka 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 dřepčíka 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 LD₅₀ 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 dřepčíkem olejkovým je, že v jeho populacích byl zaznamenán i výskyt *s-kdr*. A to ve francouzských (Bothorelet al. 2018) a britských (hlavně anglických) populacích (Williset 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 dřepčíka 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 (Williset 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 dřepčíka 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 4**). 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 dřepčíka olejkového (**Obrázek 5**). Toto jsou velmi důležité poznatky, ze kterých vyplývají závažné důsledky: i) situace s rezistencí u dřepčíka olejkového je kompli-



Obrázek 2 – Vlajčkou jsou označeny lokality, ze kterých byly v rámci celoevropského monitoringu probíhajícího v letech 2006–2010 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

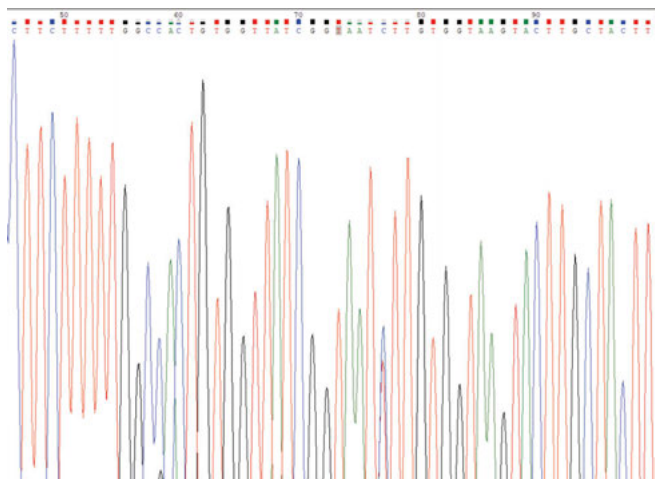
testu (IRAC Adult Vial Test) přežili kontaktní expozici 20% a 100% dávce lambda-cyhalothrinu nebo tau-fluvalinatu. Tzn. mutace způsobující rezistenci *kdr* anebo *s-kdr* se hledaly pouze v DNA těch jedinců, o kterých se pomocí lahvičkového testu zjis-

tilo, že jsou rezistentní (fenotypově – na základě chování). Původ všech otestovaných populací je označen kolečkem (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).

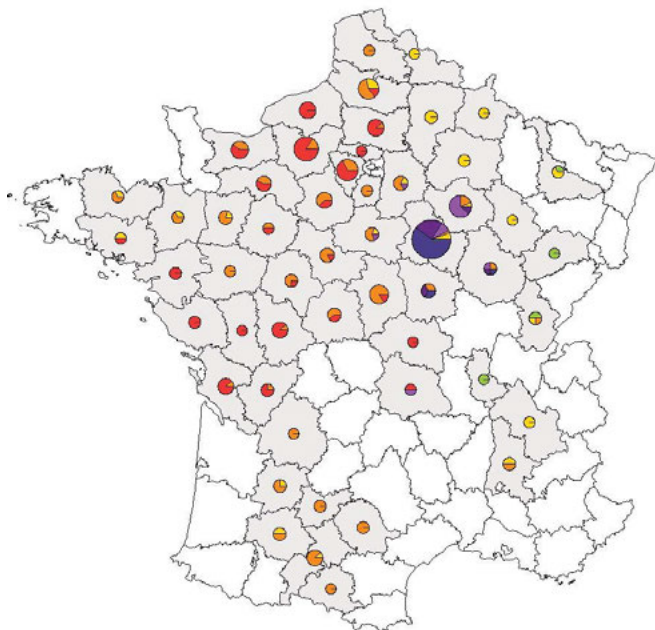
kovanější a nebezpečnější než v případě blýskáčka řepkového, i když se to na základě dosavadních zkušeností z pozice českého pěstitel takto nejeví (větší povědomí je zde o dopadech rezistence blýskáčků); ii) vliv mutací typu *s-kdr* je u tohoto druhu vyšší, což za dosavadních podmínek (= ochrana postavená prakticky jen na pyretroidech) musí nutně vyústit v neřešitelnou situaci; iii) pokud se situace u populací dřepčíka olejkového v ČR vyvine stejným způsobem jako ve Francii, bude ochrana proti dřepčíkovi olejkovému pomocí pyretroidů zcela neúčinná (nepomohou inhibitory cytochromu P450 – viz níže).

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*

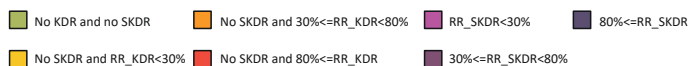
nebo *s-kdr* typ rezistence) rozšířeny. Nebylo to zatím předmětem žádné vědecké studie, nebyly dosud publikovány žádné výsledky na toto téma.



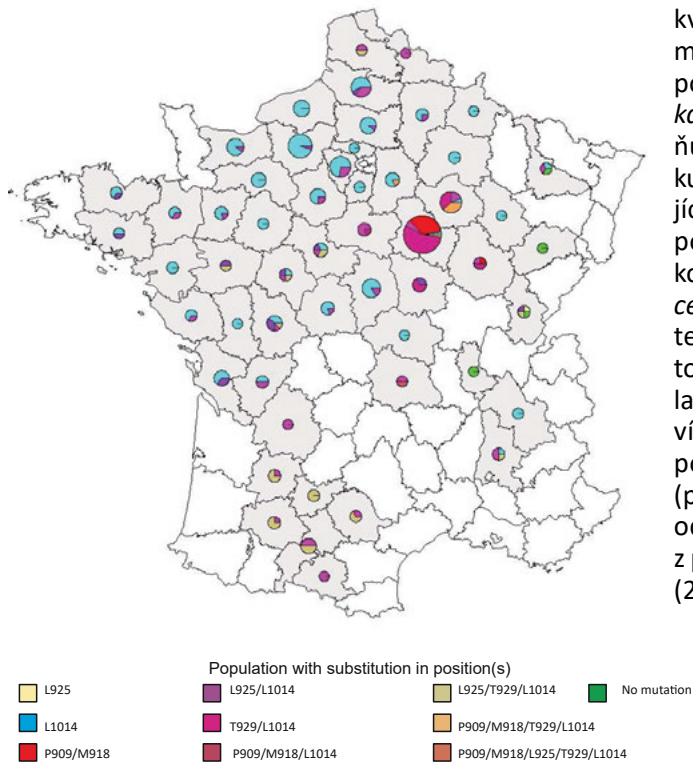
Obrázek 3 - Sekvence vzorku s heterozygotním (T/C) genotypem v oblasti *kdr* mutace L1014F (převzato z publikace Ludvíková & Seidenglanz 2023; T = Thymin, C = Cytosine). Záměna báze T za C vede k tomu, že na pozici 1014 aminokyselinové sekvence v doméně II (segment 6) pak není leucin ale fenylalanin. Výsledkem je pokles citlivosti k pyreetroidům o 20–30 %.



Obrázek 4 – 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 5 - 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 až 2018. Otestováno celkem 294 populací. Velikost kruhů odpovídá počtu otestovaných populací z dané oblasti (pohybuje se v intervalu od 1 do 38). 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 (nebezpečnou výjimku by mohl tvořit dřepčík olejkový, nejsou proto ale zatím žádné výsledky). Jako metabolická se tento typ rezistence 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 cytochrom 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) to následně potvrdily 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 samostatně nebo v kombinaci s některým inhibítorem). 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 (Zimmeret al.2014b). A v podstatě to samé platí i pro dřepčika olejkového (Højland&Kristensen2018, Willis et al. 2020). O tom, jaké enzymatické skupiny (popř. mutace – viz část 1.2.1.) stojí za poklesem citlivosti k pyretroidům u populací krytonosce čtyřzubého téměř nic není známo. Podstatné rozšíření znalostí ale může přinést využívání této metodiky. Z pilotních pokusů, které posloužily jako základ pro sestavení této metodiky a metodiky „Ověření efektu PBO na nárůst citlivosti k pyretroidům u vybraných druhů řepkových škůdců vykazujících různé úrovně rezistence k této skupině insekticidů“ (Seidenglanz et al. 2025), prováděných autorským týmem s populacemi krytonosce čtyřzubého (zatím nepublikovaná data) vyplývá, že i v jejich případě se dostavuje výrazný synergický efekt některých azolů (tebuconazole, metconazole, difenoconazole, prothioconazole, mefentrifluconazole) a PBO projevující se zvýšením citlivosti k pyretroidům (a tedy poklesem jejich hodnot LD₅₀₋₉₀). Takže i v jejich případě půjde o zvýšení aktivity cytochromu P450, esteráz nebo obou skupin. Podíl vlivu esteráz v jejich případě zatím nelze vyloučit, protože dosud nebylo provedeno dostatečné množství testů zaměřených na tento cíl. Navrací-li se tedy po použití některých azolů nebo 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

Tabulka 1 – Tři hlavní skupiny enzymů spojované s detoxifikačními procesy u různých skupin organismů (a jsou tedy často příčinou metabolického typu rezistence, když dojde k nárůstu jejich hladin aktivity) a jejich inhibitory (podle Zimmer et al. 2014b)

enzymatická skupina	specifický inhibitor její aktivity
glutathion S-transferáza	diethyl maleate (DEM)
esterázy	S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF), také piperonyl butoxide (PBO) ¹
cytochrom P450	piperonyl butoxide (PBO) ¹ , tebuconazole ² a pravděpodobně i další azoly ³ , 1-amino-benzotriazole

¹mechanismus 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.

²fungicid 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; v současné době chybí dostatek přesných experimentálních dat pro zjištění, jak by tuto látku bylo možné využít k mitigaci dopadů rezistence k pyretroidům u řepkových škůdců v praxi - jde ale o cíl této metodiky.

³ve vědecké literatuře pro toto tvrzení neexistují žádná přesná experimentálně získaná data, autorský tým vychází pouze z výsledků pilotních testů prováděných na řešitelských pracovištích v letech 2024 a 2025, ve kterých byl ověřován synergický efekt difenoconazolu, metconazolu, prothioconazolu a v několika málo experimentech i mefentrifluconazolu; dále toto tvrzení podporují i závěry některých vědeckých publikací (např. Zhong et al. 2025) a fakt, že DMIs ovlivňují aktivitu cytochromu P450 obecně a vykazují k této skupině enzymů vysokou afinitu – je zde tedy předpoklad pro jejich inhibici (např. Dahmen a Staub 1992).

se jejich podíl na rezistenci buď potvrdil nebo vyloučil – tímto způsobem byl vyloučen 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 – v Německu, Česku, Rakousku, Polsku a na Slovensku (Heimbach & Müller 2013, Seidenglanz et al. 2009, 2022).

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 Cytochrom P450. Cytochrom 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. monooxygenázových 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. 2013a). U hmyzu bylo do současné doby popsáno více než 1000 různých CYP genů (Zhou & Huang 2002), které spadají do různých tzv. *genových rodin*: CYP4, CYP6, CYP9, CYP12, CYP15 a další (*genová rodina* = *family* je určena číslem za zkratkou CYP). Z těchto *families* jsou s rezistencí k insekticidům spojovány CYP4, CYP6, CYP9 a CYP12 (Feyereisen 2005, 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, Strode et al. 2008, Xia et al. 2004, Wan et al. 2019). A jen pro srovnání, u slíďáka *Pardosa pseudoannulata* to je 120 CYP genů (Wanget al. 2021).

Family 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. Dojde-li k nárůstu jejich aktivity (to je podmíněno zvýšením jejich koncentrace ve tkáních a toto je zase podmíněno nárůstem genové exprese příslušných CYP6 genů), může to být důvodem, proč hmyz dokáže přežít expozici vysokým dávkám některých xenobiotik, třeba insekticidů (Bergéet 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 pyretroidům, ale též ke

karbamátům (Zhanget al. 2019). Zvýšená exprese (*overexpression*) genu CYP6CM1 u významného, po celém světě rozšířeného škůdce, molice *Bemisia tabaci*, je příčinou rezistence k neonicotinoidům (Liet al. 2015). U jednoho z nejdůležitějších světových škůdců (z hlediska ekonomických dopadů), housenek můry 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. 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) u housenek obaleče východního (*Grapholita molesta*; viz také **Obrázek 6**).

Z hlediska možných dopadů aktivity enzymů Cytochromu P450 na snížení efektu pyreteroidů na určitou populaci škůdce (např. blýskáčka řepkového nebo dřepčika olejkového) není bez zajímavosti, že úroveň exprese konkrétního CYP6 genu se může lišit mezi jednotlivými vývojovými stádii – 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 přežívat pyreteroidní aplikace může být odlišná. Bohužel, u řepkových škůdců o této situaci nejsou zatím žádné dostupné informace. Přitom u druhů, kde škody způsobují dvě různá vývojová stadia, jako je právě dřepčik 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 úroveň exprese několika CYP6 genů (CYP6AB112, CYP6AB113, CYP6AB114, CYP6AB115, CYP6AB116, CYP6AB117, CYP6AN35 a CYP6B74) v různých vývojových stádiích (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 významně vyšší než v jiných stádiích). 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 expozice ú.l. deltamethrin či cyantraniliprole u stejného vývojového stadia (např. u housenek třetího instaru).

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 ₂
cofactor		jedná se o nebiřkovinou součást (např. ion nějakého kovu) enzymu, která umožňuje a podmiňuje jeho katalytickou funkci
jaký je rozdíl mezi oxidací katalyzujícími enzymy:	monooxygenázy	právě tato skupina oxidací katalyzujících enzymů hraje nejdůležitější roli v metabolické rezistenci; katalyzují vnesení jednoho atomu O z molekuly kyslíku O ₂ do oxidovaného substrátu / produktu (např. molekula pyretroidu), zatímco druhý atom O je redukován na vodu. proto se této skupině také někdy říká Mixed Function Oxygenases
	dioxygenázy	při oxidaci katalyzované touto skupinou enzymů se vnáší oba atomy O z molekuly O ₂ do substrátu / produktu
	oxidázy	tyto enzymy katalyzují oxidační reakce během nichž nedochází k vnášení ani jednoho z atomů O z molekuly O ₂ do oxidovaného substrátu

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 popsat, jakou roli hrají v rezistenci proti pyretroidům nebo dalším insekticidům (Chiu et al. 2008, Zhu et al. 2010, Stevenson et al. 2011, Riveron et al. 2013).

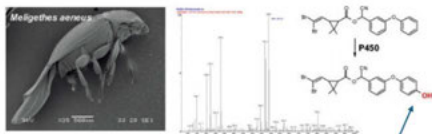
U brouků (řád Coleoptera) byl jako první gen P450 spojovaný s metabolickou rezistencí k insekticidům popsán v roce 2010, jedná se o CYP6BQ9 u potměníka *Tribolium castaneum* (Zhu et al. 2010). Tito autoři zjistili, že u jedinců *T. castaneum* vykazujících rezistenci k deltamethrinu dochází k 200násobnému zvýšení koncentrace proteinu CYP6BQ9 (pro označení genu i jeho expresního produktu se používá stejný kód) fungujícího jako monooxygenáza. 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 microsómami 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 produktu hydroxylace pozitivně koreluje s úrovní fenotypového projevu rezistence. Potvrdili tak, že za rezistencí blýskáčka

Tabulka 3 - Násobek změny (nárůstu nebo poklesu) v expresi každého z deseti identifikovaných CYP genů u jednotlivých populací blýskáčků v porovnání se stavem u vysoce citlivé referenční populace (70-10^a). 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 ^a	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

^a Referenční populace 70-10 (původ: Ukrajina, vysoce citlivá k pyretroidům); s = citlivá populace, r = rezistentní populace

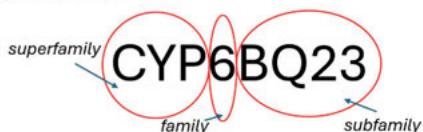
Statistická průkaznost: *** P value < 0,001; ** P value < 0,01; * P value < 0,05 (všechny ostatní změny v expresi genu nejsou statisticky významně odlišné od referenční populace 70-10)



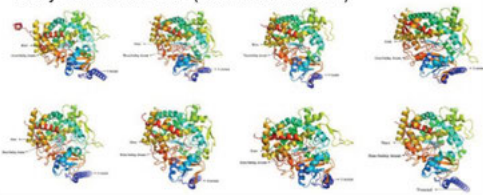
Enzymy Cytochromu P450 obvykle přeměňují (convertují) xenobiotika (různé toxiny, např. pesticidy) v procesu hydroxylace na hydrofilní deriváty, které lze z těla snadno vyloučit. Zimmer & Nauen (2011) prokázali, že množství vyprodukovaného **4-hydroxy deltamethrinu** (v microsomes z několika různě rezistentních 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 blýskáčků 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. (2014b) 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

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 blýskáčků podmiňuje, měli již na co navazovat. Při izolaci, determinaci a kvantifikaci CYP 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 několikásobně zvýšená exprese (*overexpression*) způsobuje neúčinnost pyretroidů na tohoto škůdce. Zimmer et al. (2014b) použili tento přístup, protože genomická a transkriptomická data pro Cytochrom 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“ (nadprodukcí) u rezistentních populací blýskáčků 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 (populace 79-10). I když nelze vyloučit, že se na metabolizaci pyretroidů u rezistent-

ních populací blýskáčka řepkového podílejí i produkty exprese dalších CYP genů, CYP6BQ23 hraje jistě zásadní roli (viz také **Obrázek 6** – vpravo nahoře).

1.3 Proč se zaměřit na fungicidy ze skupiny inhibitorů demethylace (DMI_s) jako inhibitory Cytochromu P450 a potenciální synergisty pyretroidů

DMIs (dle terminologie FRAC jsou DMIs skupina fungicidů) patří dle mechanismu účinku (opět dle FRAC) k inhibitorům biosyntézy sterolu (IBS). IBS se dělí právě na DMIs a morfoliny (*morpholines*). Skupina fungicidů DMIs se dělí (opět dle klasifikace FRAC) na tzv. chemické skupiny. To jsou pyrimidiny (pyrimidines: k nim patří např. ú.l. jako fenarimil, nuarimil atd.), piperaziny (piperazines: např. ú.l. triforine), imidazoly (imidazoles: z ú.l. např. prochloraz), triazoly (např. ú.l. tebuconazole, difenoconazole, metconazole, mefentrifluconazole atd.) a triazolinthiony (např. ú.l. prothioconazole).

Jak DMIs tak morfoliny blokuji syntézu ergosterolu. Ten je nezbytnou stavební a integrální (= důležitý pro soudržnost a funkčnost) složkou buněčné stěny houbových buněk (Dahlet al.1987). Obě skupiny se liší způsobem (na biochemické úrovni), jak proces biosyntézy ergosterolu inhibují. U morfolinů je inhibice syntézy ergosterolu důsledkem narušení aktivity *C-14 reduktázy* v houbových buňkách (Dahmena Staub1992). DMIs cílí na jinou skupinu enzymů. Narušují produkci enzymu *14- α -demethylázy* v houbových buňkách. Důsledkem je pak, stejně jako u morfolinů, narušení procesu syntézy ergosterolu. Z hlediska zaměření této metody je rozdíl v typech enzymů, které DMIs respektive morfoliny blokuji, klíčový. Klíčový proto, že to zásadním způsobem mění potenciál obou skupin fungicidů pro jejich využití jako synergistů pyretroidů. A to především takových synergistů, které umožní po jejich přidání k pyretroidům zvýšení (nebo lze také říct navrácení) toxicity / účinnosti této skupiny insekticidů na škůdce, kteří vykazují vysoké úrovně rezistence. Zde je potřeba podotknout, že musí jít o rezistenci metabolického typu. Jak bylo zmíněno výše, DMIs inhibují formaci *14- α -demethylázy*. Důležité je, že tento enzym, na rozdíl od *C-14 reduktázy*, patří do skupiny enzymů Cytochromu P450 (je to produkt genu CYP51). Tedy do stejné skupiny enzymů, které jsou u rezistentních jedinců blýskáčeků, dřepčičků atd. na výrazně vyšších hladinách než u citlivých jedinců. Enzymů, které jsou příčinou metabolické rezistence. Je tedy předpoklad, že po vstupu do hmyzího těla budou DMIs na biochemické úrovni účinkovat stejně jako na houbové organismy – budou inhibovat enzymy Cytochromu P450. Měly by tak navracet citlivost k pyretroidům u hmyzu, který je díky vysokým hladinám Cytochromu P450 schopný molekuly pyretroidních účinných látek v těle metabolizovat (oxidovat a detoxifikovat) dřív, než dojdou na místa působení (CNS – zde neurity nervových buněk – na nich sodíkové kanálky). Aby konkrétní ú.l. z chemické skupiny triazolů, imidazolů, triazolinthionů atd. mohla působit jako

účinný inhibitor Cytochromu P450 v těle hmyzu (např. rezistentního blýskáčka) a také jako synergista pro pyretroidní ú.l., musí do hmyzího těla snadno pronikat (stejně snadno jako pyretroid, se kterým je daná DMI ú.l. kombinována). Druhou podmínkou je, aby monooxygenázy Cytochromu P450 zodpovědné za rezistenci k pyretroidům měly vyšší afinitu k ú.l. fungicidu než k pyretroidní ú.l. Jinými slovy, DMIs musí monooxygenázy Cytochromu P450 vyvázat na sebe, aby se předešlo oxidaci pyretroidů, které tak budou moci dosáhnout místa účinku (sodíkový kanálek na nervovém vlákne, **Obrázek 1**). Tímto způsobem mohou DMIs navrátit účinnost pyretroidům i v případě, kdy tyto již ztratily účinnost díky metabolické rezistenci. To dokumentují studie na různých druzích škůdců, u kterých jsou velké problémy s rezistencí (často nejen k pyretroidům), jako je např. jeden z nejdůležitějších škůdců rýže v Číně, kříš *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), (Zhong et al. 2025), závažný škůdce bavlny *Pectinophora gossypiella* v (sub)tropických oblastech (Lepidoptera: Gelechiidae), (El-Refai et al., 2009) a závažný polyfágní škůdce rozšířený hlavně v Mediteránu *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), (Abdel-Hamid 2014). Nesmí to být ovšem rezistence typu „*necitlivost cílového místa / target insensitivity (kdr nebo super-kdr)*“ podmíněná výše podrobně popsanými mutacemi. Zejména v případě *super-kdr* by byl přínos synergického efektu DMIs pro pyretroidy pravděpodobně minimální a problém rezistence by jejich užití ve společných aplikacích s pyretroidy neřešilo. Jak ale vyplývá z kapitoly 1.2., u řepkových škůdců jde téměř výhradně (i když jistě pochyby jsou u dřepčíka olejkového) o metabolický typ rezistence.

Je zde tedy pádný důvod pro testování dopadů synergického efektu různých DMIs na různé pyretroidy (**lambda-cyhalothrin** jako zástupce běžných esterických pyretroidů, **tau-fluvalinate** – esterický pyretroid se značně odlišnou stavbou molekuly než jiné esterické pyretroidy, **etofenprox** jako zástupce éterických pyretroidů) u populací tří (v současnosti) nejdůležitějších škůdců řepky, kteří při vzájemném srovnání vykazují různé úrovně rezistence k pyretroidům: od snížené citlivosti (krytonosec čtyřzubý), převážně střední úrovně rezistence (dřepčík olejkový) až po vysokou úroveň rezistence (blýskáček řepkový).

1.4 Zvyšují DMIs fungicidy, jsou-li aplikované společně s insekticidem, jeho toxicitu a nebezpečnost pro necílové organismy?

To, že fungicidy fungují jako synergisté insekticidů dokazují práce publikované již v 80. a 90. letech dvacátého století (např. Colin a Belzunces 1992, Pilling a Jepson 1993, Thompson a Wilkins 2003). Většina prací na téma synergický efekt fungicidů na toxicitu insekticidů se po celou dobu používání těchto kombinací (80. léta dvacátého století až po současnost) zabývá daleko více jejich dopadem na necílové organismy než hodnocením vlivu fungicidů na nárůst účinnosti insekticidů na

škůdce. Existuje zde velký nepoměr vědecké literatury ve prospěch té, která se zabývá hodnocením negativních dopadů. Ve studiích zabývajících se dopady na necílové organismy hraje prim (téměř výhradně) včela domácí, popř. v některých i čmeláci (Almasriet al 2020). V pracích publikovaných během posledních asi třiceti let se objevovaly jako fungicidní partneři pro společnou aplikaci s pyretroidy hlavně tyto fungicidní účinné látky (z nichž mnohé již byly z registrů v EU staženy): iprodione, thiophanate-methyl, carbendazim, prochloraz, chlorothalonil, flusilazole, difenoconazole, propioconazole, tebuconazole (Van der Zee et al. 2012, Liao et al. 2017, Almasri et al 2020). Z výsledků těchto studií vyplývá, že téměř při jakékoliv kombinaci pyretroid + fungicid dochází ke zvýšení toxicity insekticidu pro včely v měřítku 10–100násobném. Existují ale také publikace, které tyto značně znepokojivé výsledky relativizují a upozorňují, že se často pracovalo s nereálně vysokými dávkami a včely byly testováním kombinacím vystavovány způsobem, ke kterému v polních podmínkách nemůže reálně docházet (např. Thompson a Wilkins 2003). Přesto je riziko pro včely a s vysokou pravděpodobností pro řadu dalších necílových organismů vyskytujících se v porostech řepky spojené s aplikacemi kombinace insekticid a fungicid vysoké. A nejde jen o včely (myšlena celá nadčeď včel). Ohrožení a snížení populací parazitoidů řepkových škůdců se může projevit nepředpokládaným nárůstem početnosti škůdců z dlouhodobějšího hlediska; zejména pokud jde o blýskáčka řepkového (viz např. Alford et al. 2003, Ulber a Nitzsche 2006, Williams 2010).

Proto je důležité zjistit tzv. nejnížší efektivní dávku pro každou potenciálně využitelnou ú.l. DMIs fungicidu, která se na základě výsledků testů provedených podle této metodiky bude jevit jako potenciálně využitelná (projeví se zde výrazný synergický efekt). Tedy zjistit nejnížší možnou dávku fungicidní ú.l., která bude ještě poskytovat dostatečný synergický efekt (tedy návrat k 100% mortalitě vyvolané registrovanou i pětinasobně nižší dávkou pyretroidu). Nalezení takové dávky pro konkrétní DMIs je také jedním z hlavních cílů předkládané metodiky (viz níže, kapitola 2 a 3).

1.5 Zvyšují DMIs fungicidy, jsou-li aplikované společně s insekticidem, jeho toxicitu a nebezpečnost pro další necílové organismy?

V současné době se za nejvýznamnější kontaminanty (dle počtu studií, např. v Platkiewiczet al. 2025), které mohou mít negativní dopady na člověka a řadu necílových organismů v různých typech životního prostředí, považují tyto skupiny látek: kosmetika (= *personal care products*, např. dle Wu et al. 2014), léky (= *pharmaceuticals*, např. dle: Bu et al. 2013, Dai et al. 2015), změkčovadla (= *plasticizers*, např. dle Wang et al. 2020), látky, které se chovají jako endokrinní disruptory (např. Guo et al. 2015), určité typy nehořlavých a samozhášivých materiálů (= flame

retardants, např. dle: Rauert et al. 2018), různé povrchově aktivní látky/tenzidy (= *surfactants*, např. dle: Assress et al. 2020) a také pesticidy (např. dle Li et al. 2023). Tyto dle účelu použití, respektive dopadů vymezené skupiny se mezi sebou prolínají: některá farmaka či pesticidy mohou být současně endokrinní disruptor apod.

Azoly, které, jak se postupně zjišťuje, zasahují do velkého spektra biologických procesů (popsáno např. v Platkiewicz et al. 2025), k sobě jako chemické skupině, přitahují pochopitelně velkou pozornost výzkumníků zabývajících se hodnocením environmentálních dopadů výše zmíněných skupin chemikálií. Azoly tvoří velkou skupinu různých látek, které se nenachází jen ve fungicidech (skupina DMIs), ale jsou důležitou součástí kosmetických přípravků a léků. Všechny tyto látky (bez ohledu na to, jestli jde o ú.l. fungicidů) inhibují enzym 14- α -demetylázu ze skupiny Cytochrom P450 (produkt genu CYP51), což vede v buňkách hub k zablokování konverze lanosterolu na ergosterol. Důsledkem je větší propustnost buněčných stěn, zastavení růstu hyf a smrt. To bylo již popsáno výše. To, že azoly inhibují i jiné enzymy Cytochromu P450 než jen 14- α -demetylázu v houbách, a že k tomu dochází i v tělech jiných organismů, je známo. Ostatně to, že lze pomocí nich inhibovat enzymy Cytochromu P450 (v tomto případě oxygenázy) u např. řepkových škůdců, na které se tato metodika zaměřuje, je podstatou jejich synergického efektu a předpokladem pro návrat jejich citlivosti k pyretroidům. To, že k tomu (tentokrát nezáměrně) může docházet i u včel, čmeláků a u v porostech přítomných blanokřídlých parazitoidů či dalších členovců, bylo popsáno již v části 1.4.

Azoly ale také zřejmě zasahují do endokrinního systému obratlovců. Není však přesně známo, kterých druhů se to vlastně reálně týká, jak je tato skupina organismů velká (respektive taxonomicky vymezená), a jak závažné dopady na ně běžně používané azoly skutečně mohou mít (García-Valcárcel&Tadeo2012). Ví se ale, že enzymů Cytochromu P450, se kterými azoly interagují v tělech obratlovců (vážou je na sebe a tím je inhibují – metabolická podstata je pořád stejná), je víc. Po expozici azolům může být značně snížena (závisí na dávce azolu) aktivita *aromatázy*, která katalyzuje konverzi androgenů na estrogeny. Negativní dopad tohoto typu byl prokázán u značně fylogeneticky vzdálených skupin obratlovců: u pstruha duhového (Monodet al. 1993), žab druhu *Xenopus tropicalis* (Gyllenhammaret al. 2009) i třeba člověka (Chenet al. 2013, Trösken et al. 2004). Podobným způsobem mohou být u různých organismů ovlivněny další metabolické procesy, do jejichž průběhu jako katalyzátory zasahují různé enzymy Cytochromu P450. Není ale ve skutečnosti možné najít jakým konkrétním způsobem a u jakých druhů. A už vůbec ne, jsou-li dávky používané v polních podmínkách v tomto smyslu zdrojem reálného nebezpečí.

Na jaké chemické skupiny se dělí skupina (*jde o terminologii FRAC: chemická skupina je něco jiného než skupina*) DMIs fungicidů, je popsáno v části 1.3. Azoly spadají do dvou chemických skupin v rámci DMIs. Tou nejdůležitější ch. skupinou jsou triazoly (dle významu pro ochranu rostlin i dle spotřeby). Trochu menší význam v ochraně rostlin mají imidazoly. Obě skupiny azolů se nachází v léčích (jak pro lidi, tak zvířata) i kosmetice. Na rozdíl od fungicidních přípravků na ochranu rostlin, ve farmakách a kosmetice jsou z azolů více zastoupeny imidazoly.

Triazoly mají v molekule pětičlenné cykly (jeden nebo dva), které tvoří tři atomy N a dva atomy C (v těchto cyklech jsou vždy dva atomy N vedle sebe, další mezi atomy C). Imidazoly mají v cyklu (ten je šestičlenný) vždy jen dva atomy N, které spolu nikdy nesousedí. Na základě strukturních vzorců se dají obě skupiny snadno odlišit. Tato odlišnost je také důležitá při hodnocení původu reziduí azolů nalézáných v různých prostředích, např. v různých typech vodních ekosystémů (nebo obecně vod). Zbytek obsahující pětičlenný cyklus se třemi N znamená triazol – a tedy nejspíš fungicid používaný v ochraně rostlin. Šestičlenný cyklus se dvěma atomy N ukazuje na imidazol – to indikuje původ z medicíny nebo kosmetiky.

Azoly jsou nalézány v různých typech povrchových vod prakticky od doby, kdy se na ně monitoring zaměřil. V městských odpadních vodách dominují azoly z farmak a kosmetiky. Tyto se dostávají i do řek. V řekách se pak vyskytují i azoly pocházející z fungicidů používaných v ochraně rostlin. Triazoly z fungicidů používaných v ochraně rostlin dominují v nádržích v zemědělsky obhospodařované krajině (Platkiewicz et al. 2025).

Triazoly i imidazoly byly a jsou nalézány v řekách po celém světě: např. o jejich záchytu a koncentracích v čínských řekách publikovali Chen et al. (2012), Huang et al. (2013b) nebo Liu et al. (2021). O jejich záchytech v řekách ve Švýcarsku publikovali Kahle et al. již v roce 2008, o záchytech azolů v německých řekách publikovali Wick et al. v roce 2010, jejich koncentrace v řekách v Polsku zdokumentovali Platkiewicz et al. (2025) a o situaci ve Španělsku se je možné dozvědět od Casada et al. (2014). Jak ale vyplývá z velmi obsáhlé, navíc nedávno publikované (2025) a nám geograficky blízké studie z Polska (Platkiewicz et al. 2025), veškeré jimi zaznamenané koncentrace azolů v povrchových vodách (nejen řekách ale i odpadních vodách a nádržích v krajině – i těch poblíž polí) jsou bezpečné pro vodní organismy. A toto je zásadní sdělení.

1.6 Zvýšilo by využití účinných látek DMIs fungicidů jako komponent do společných aplikací s pyretridy v rámci IOR řepky proti škůdcům riziko vývoje rezistence u houbových patogenů k této skupině fungicidů?

Záměrem této metodiky (podrobně v části: Cíle metodiky) je především představit postup, který umožní relativně snadné a rychlé testování (z hlediska času nutného na získání velkého množství prakticky důležitých dat) synergického efektu různých ú.l. fungicidů ze skupiny Inhibitorů Demetylase Sterolů (DMIs) na nárůst toxicity pyretridů pro škůdce řepky, kteří jsou buď k pyretridům zcela rezistentní nebo u nich dochází k poklesu citlivosti. Výsledkem používání metodiky tedy může být navržení některých ú.l. z této skupiny fungicidů jako vhodných synergistů k pyretridům. Jejich přínos (při společně aplikaci s pyretridem) spočívá v tom, že plného efektu (kontroly) na cílového škůdce bude opět možné dosáhnout registrovanou dávkou pyretridu. Jde tedy o to, jak řešit aktuální a významný problém s rezistencí nebezpečných škůdců, který je provázen (mimo jiné) častější potřebou neúčinné postřiky opakovat a v rozporu s legislativními podmínkami zvyšovat dávky oproti registrovaným. Jedním z dopadů rezistence je tedy i nárůst spotřeby insekticidů (zejména těch selhávajících) a míry zatížení životního prostředí těmito látkami. Plnému využívání konkrétních DMIs (vytipovaných jako vhodné pro tyto účely dle této metodiky) jako komponent do tank-mixů s pyretridy v polních podmínkách a jejich začlenění do IOR řepky musí předcházet polní testování s vyhodnocením všech možných dopadů (ověřit efekt na cílové organismy, vyhodnotit riziko pro a dopady na různé necílové organismy) a také (na základě dalších polních pokusů) navržení, jak daný tank-mix v rámci pěstební technologie co nejlépe využívat. To v případě DMIs znamená takové použití, aby jejich aplikace do porostu znamenala maximální možný přínos s nimi spojovaný: 1) efekt fungicidní / regulační + 2) synergický přínos. Využívání DMIs jako synergistů pyretridů tedy nesmí vést k jejich aplikacím v čase, kdy současně nemohou plnit ještě svoji vlastní roli fungicidu a/nebo regulátoru. Pokud by role DMIs ve společné aplikaci s pyretridem měla být jen synergická, je na místě uvažovat o volbě jiného synergisty – PBO (viz metodika Seidenglanz et al. 2025).

Použití DMIs jako synergistů v řepce by nemělo vést k nárůstu jejich spotřeby v porostech a k nárůstu selekčního tlaku směřujícího k urychlení vývoje rezistence houbových patogenů k této skupině fungicidů. V řepce jde zejména o získání a urychlení vývoje rezistence k DMIs u těchto patogenů: *Leptosphaeria maculans* / *L. biglobosa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria* sp.

DMIs, jak již bylo popisováno výše, inhibují v houbách enzym 14- α -demethylázu. Tím se zablokuje konverze lanosterolu na ergosterol, což je významná stavební a integrální součást buněčné stěny hub (Parker et al. 2014, Price et al. 2015). DMIs

tedy patří mezi tzv. „*single-site*“ fungicidy z hlediska místa a mechanismu účinku. Řada patogenů si vytvořila rezistenci proti různým triazolům po několika letech jejich intenzivního používání v polních podmínkách (zdokumentováno např. v: Brent & Hollomon 2007). Mezi jednotlivými ú.l. je u různých patogenních hub vyšší či nižší tendence ke křížové rezistenci (tímto se zabývali např. Hideo et al. 2021). U *L. maculans* a *Alternaria* spp. byl zaznamenán výskyt rezistentních populací ve všech významných řepkových oblastech: Austrálii, Kanadě, Číně a také v Evropě (např. Van de Wouw et al. 2017, 2021, Yang et al. 2018). O rezistenci (respektive o posunech v citlivosti) *L. maculans*/*L. biglobosa* k některým DMIs (a také SDHIs a QoIs) v ČR poprvé, relativně nedávno, referovali Fajemisin et al. (2022a,b).

Z toho plyne, že zvyšovat frekvenci aplikací DMIs do řepky není rozhodně žádoucí. Mitigace jednoho problému nesmí vést k vyvolání problému jiného – bylo by to pověstné vytloukání klínu klínem. Jestliže se pomocí díky předkládané metodice podaří vytipovat konkrétní ú.l. ze skupiny DMIs, které mají žádoucí synergický efekt na účinnost pyretroidů, musí se s výsledky nakládat a do praxe přenášet uvážlivě ve shodě s výše uvedeným.

2 Cíle metodiky

- 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 fungicidů ze skupiny inhibitorů demethylace (DMIs, především triazolů a triazolinthionů) prostřednictvím inhibice enzymů Cytochromu P450 na nárůst citlivosti vybraných druhů řepkových škůdců (blýskáček řepkový, dřepčík olejkový, krytonosec čtyřzubý) k pyretroidům.
- 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.
- Získat validní data o geografické i sezónní variabilitě v synergickém účinku různých DMIs (různých účinných látek a dávek) na (opětovné) zvýšení účinnosti testovaných pyretroidů (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox) na rezistenci ohrožené nebo rezistenci k pyretroidům vykazující řepkové škůdce: blýskáček řepkový, dřepčík olejkový a krytonosec čtyřzubý.
- Kvantifikovat efekt konkrétních dávek vybraných DMIs (v g ú.l./ha) na změny v citlivosti testovaných druhů řepkových škůdců k pyretroidům (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox) vyjádřené jako pokles hodnot LD₅₀₋₉₅

odhadnutých pro tyto pyretroidy (v g ú.l./ha), když jsou k nim konkrétní DMIs přidány.

- Stanovit pro každý hodnocený DMI fungicid, který v testech ukáže prakticky zajímavý synergický efekt v kombinaci s určitým typem pyretroidu, tzv. **nejnižší efektivní dávku**: tj. dávka DMIs fungicidu vyjádřenou v g ú.l./ha, která při společné aplikaci s konkrétním pyretroidem způsobí, že tento pyretroid v dávce odpovídající dávce registrované (i dávce 5× nižší) vyvolá po kontaktní expozici (24 hodin) v populaci škůdce 100 % mortalitu (to odpovídá IRAC definici pro vysoce citlivou populaci k určitému insekticidu).
- 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 (jakožto těžko nahraditelného přerušovače obilných sledů).

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Organizace a koordinace aktivit spojených s testováním vlivu DMIs na nárůst toxicity pyretroidů

Autorská pracoviště připraví testovací sady (+ potřebné pomůcky k provedení testu) a zajistí jejich distribuci k zájemcům o testování. Zprostředkuje 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 vhodné 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 mezplodin 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 shromáž-

dit 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 překrývá (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. Jako velmi nevhodný je považován sběr z mokrého porostu a za deště. Spíše je vhodnější 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 (jednoduše na místo, kde bude test prováděn) a pro krátkodobé uchování hmyzu 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 nasmykaný hmyz bez třídění do takové klece snadno ze smýkadla přesype. S výjimkou včel a pavouků – ty je vhodné vypustit, respektive vyházet ven ze smýkadla před přesypáním do transportní klece. 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. V tomto případě se klec (nebo transportní box) s hmyzem po dopravení na pracoviště, kde bude vlastní test prováděn, uloží (na čas, než k testu dojde) do tmavé chladné místnosti (10–15 °C) popř. do ledničky (vleze-li se tam transportní box či klec).

Alternativně lze pro sběr hmyzu využít metodu sklepávání a pro transport shromážděného hmyzu plastové boxy s uzavíratelným víkem. Je nutné ujistit se, zda víko dobře těsní, protože obzvláště blýskáček řepkový dokáže najít i velmi malé netěsnosti a využít jich k úniku. Ve víku je dobré udělat díru, která se zape molitanem (lze použít houbu na umývání nádobí). Do plastového boxu je navíc oproti klecím nutné vložit i papírový ubrousek, aby jímál vzdušnou vlhkost a zabránil kondenzaci



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**).

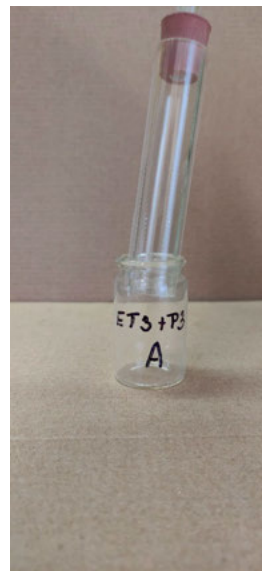
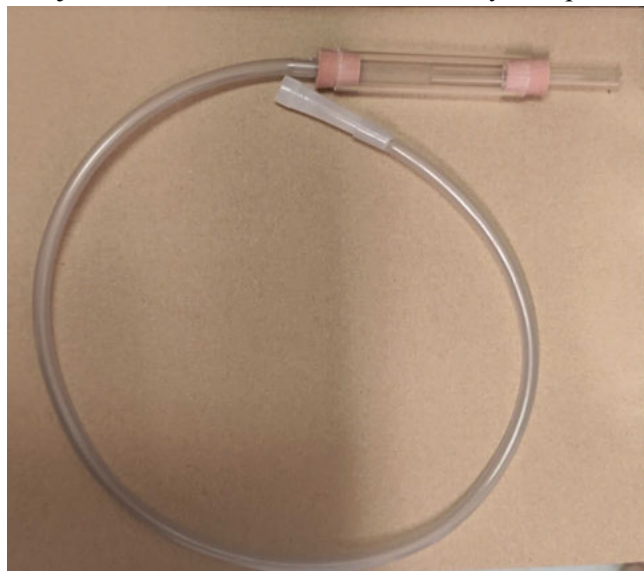
vodních par na vnitřních stěnách boxu – kapičky jsou pro brouky smrtelná past – může zde zahynout spousta jedinců a naprosto tak znehodnotit úsilí sběratele.

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? Důležitým údajem pro udělení si představy o celkovém počtu brouků (platí pro všechny tři druhy stejně) potřebném na plánovaný test je, že do jedné lahvičky se vkládá 5–10 vitálních jedinců. V případě dřepčika olejkového a krytonosce čtyřzubého je vhodné dávat 5 jedinců do jedné lahvičky. V případě blýskáčka je to 10 jedinců. Od tohoto údaje a rozsáhlosti testu (kolik pyretroidů bylo zahrnuto do testu, kolik DMIs fungicidů a kolik jejich vzá-

jemných kombinací; viz níže) se odvíjí celkový počet jedinců, který je potřeba na dané lokalitě (tedy z určitého porostu) shromáždit. 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 dobré kondici. Do testovacích lahvíček (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 DMI fungicidem nebo bez něho) a nic jiného, co může zvyšovat mortalitu (např. zranění), neboť to vede ke zkreslení výsledků testu. Přítomnost působení dalších negativních faktorů 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 DMI podílet. Mohou se stát jen sběrači – shromáždí vzorek hmyzu a pošlou ho po domluvě na některé



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 dřepčák olejkový. S krytonosem čtyřzubým je po této stránce práce snazší.

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.

3.3.1 Princip testu

Principiálně je tato metodika postavena na využití tzv. lahvičkového testu (*adult vial tests*, IRAC; IRAC = *Insecticide Resistance Action Committee*), který je v Evropě široce užíván pro účely testování vývoje rezistence v populacích řepkových škůdců k pyretroidům (v tomto případě jde o IRAC test č. 11, verze 3) a dalším skupinám účinných látek (např. IRAC test č. 021 na neonicotinoidy atd.). Tato metodika je postavena na adaptaci testu IRAC test č. 11, verze 3, protože tento test je, jak již bylo zmíněno výše, doporučen k testování citlivosti řepkových škůdců k pyretroidům. Specificky pro cíle této metodiky bylo ovšem nutné provést určité změny oproti IRAC 011 v. 3. Jde především o změnu testovaného spektra dávek jednotlivých pyretroidů. Gradient musí být jiný. Především bylo nutné zařadit výrazně nižší dávky testovaných pyretroidů, aby bylo možné vypočítat hodnoty $LD_{50,90,(95)}$ i v těch případech, kdy se vlivem synergického efektu podstatně zvyšuje toxicita insekticidu a hodnoty jeho LD tím pádem klesají. K sestavení vhodného spektra testovaných dávek ú.l. pyretroidů vedla řada pilotních testů prováděných na pracovištích autorů této metodiky hlavně během sezony 2025. V těchto testech se pracovalo s několika DMIs fungicidy. Nejvíce testů bylo provedeno s kombinacemi pyretroidů (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate a etofenprox) s ú.l. tebuconazole (ch. skupina triazoly). Dále byla provedena řada pilotních testů, ve kterých byly testovány kombinace uvedených tří pyretroidů s ú.l. prothiconazole (zástupce ch. skupiny triazolthionů), difenoconazole (ch. skupina triazoly), metconazole (ch. skupina triazoly) a několik dalších testů ještě s kombinacemi pyretroidů s ú.l. mefentrifluconazole (ch. skupina triazoly). Tyto pilotní testy vyjasnily, jak sestavit (co se týče dávek DMIs) kombinace fungicidů a pyretroidů, aby bylo možné z výsledků testů dostat odpovědi na otázky, na které tato metodika směřuje svými cíli. V tomto smyslu je tedy metodika zcela nová, originální, i když je principiálně postavena na používaném a rozšířeném přístupu. To má ostatně několik výhod:

1. Výsledky pocházející z těchto testů lze plně srovnávat s výsledky získanými v původních IRAC testech. Lze tedy např. tuto metodiku jednoduše použít pro rozšíření nyní prováděného monitoringu vývoje rezistence u řepkových škůdců k vybraným skupinám insekticidů testovaným samostatně (jde o Funkční úkol rezistence).
2. Lidé, kteří mají zkušenosti s originálními lahvičkovými testy *Adult vial tests*, mohou po krátkém zaškolení začít i se zde představenou rozšířenou verzí.
3. Tím, že jde o rozšíření původních IRAC testů, není potřeba žádná výbava navíc, nejsou odborně ani materiálně náročné.

3.3.2 Stanovení synergického účinku u různých účinných látek ze skupiny DMIs pro lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate a etofenprox při společné aplikaci

Základním cílem tohoto testu je zjistit, kterými ú.l. fungicidů ze skupiny DMIs se má smysl dále zabývat jako slibnými synergisty pyretroidů s praktickým potenciálem pro využití v ochraně porostů proti obtížně kontrolovatelným škůdcům řepky. Vytrýdit vhodné adepty ze skupiny DMIs fungicidů, kterými bude stát za to se zabývat detailněji (viz část 3.3.3, 3.4 a 3.5).

Konkrétně jde o každou ú.l. DMIs fungicidu, která bude zahrnuta do testu. Je nutné vyhodnotit, jestli při společné aplikaci s pyretroidem zvyšuje jeho toxicitu na cílového škůdce oproti aplikaci samotného pyretroidu a kvantifikovat tento případný synergický efekt. Cílem je do testů postupně zahrnout celý soubor do řepky registrovaných DMIs fungicidů. Otestovat jejich synergický přínos v kombinacích se všemi třemi referenčními pyretroidy (lambda-cyhalothrin, tau-fluvalinate, etofenprox) u dostatečného počtu populací tří cílových škůdců (blýskáček řepkový, dřepčik olejkový, krytonosec čtyřzubý) získaných z různých oblastí ČR.

Co se týče priorit, na které se zaměřit nejdříve, zde platí: Nejprve se soustředit hlavně na kombinace různých DMIs s lambda-cyhalothrinem jako zástupcem nejvíce používané skupiny pyretroidů (běžné esterické pyretroidy) a to u populací blýskáčka řepkového, který v současné době vykazuje (v porovnání s dvěma dalšími cílovými škůdci) nejvyšší úroveň rezistence k pyretroidům. Právě zde je situace kritická a vyžaduje nutně řešení. Z hlediska účelu této metodiky tedy zjistit, jestli by tímto řešením mohlo být využito synergického efektu některého nebo některých DMIs fungicidů. Testování kombinací s dalšími referenčními pyretroidy (popř. i acetamipridem) provádět pak jen u DMIs, které se jeví jako nejvíce slibné z testů s lambda-cyhalothrinem. Po blýskáčkovi má druhou nejvyšší prioritu pro testování dřepčik olejkový. U tohoto druhu testy s kombinacemi DMIs a pyretroidů navíc mohou hodně přispět k rozšíření znalosti o podstatě jeho rezistence k pyretroidům (viz kapitola 3.4, propojení s molekulárními analýzami). U tohoto druhu je totiž vyšší riziko *kdr* respektive *super-kdr* typu rezistence (viz kapitola 1.2.1). Až na třetím místě, je z hlediska priority, rozšíření testů na populace krytonosce čtyřzubého.

Metodika testu, jak bylo popsáno výše, vychází z lahvičkového IRAC testu 011 verze 3 (*Adult Vial Test 011 version 3*). Princip spočívá v kontaktní expozici jedinců určitého druhu (= vzorek populace dospělců z konkrétní lokality) vzrůstajícím dávkám pyretroidu, a to buď sólo nebo v kombinaci s určitou dávkou vybrané ú.l. DMIs fungicidu. Součástí testu je i varianta bez insekticidu a fungicidu (kontrola) a varianty pouze s fungicidem (to je nutné pro výpočet tzv. Interakčního poměru / *Interaction Ratio*). Testování probíhá ve vialkách o známém vnitřním povrchu.

Vnitřní stěny vialek jsou ošetřeny příslušnou dávkou pyretroidu, respektive kombinace pyretroidu a určité ú.l. DMI fungicidu (viz níže). Každá dávka nebo kombinace dávek je pro test připravena ve třech opakováních (tzn. že je reprezentována třemi vialkami). To platí i pro kontrolu. Jedinci určení k testování jsou do různě ošetřených vialek vkládáni po 5–10 (d. olejkový a k. čtyřzubý po pěti, blýskáček po deseti). Expozice, tedy pobyt brouků uvnitř lahviček (a tedy i délka testu), je 24 hodin, teplota by se během testu měla udržet mezi 18–20 °C a světelný režim by měl být: 12 hodin světlo / 12 hodin tma).

Jak sestavit gradient testovaných dávek pyretroidů i s nimi kombinovaných DMI bylo předmětem pilotních testů prováděných zejména v roce 2025. V těchto testech byly DMI reprezentovány tebuconazolem, difenoconazolem, metconazolem, prothioconazolem a mefentrifluconazolem. Roztoky (rozpuštědlem je aceton) pro jednotlivé dávky se připravují z analytických standardů účinných látek (Sigma Aldrich/Merck). To platí pro pyretroidy i DMI. Z těchto testů vzešla tato doporučení pro sestavení gradientů:

Tabulka 4a – Doporučený gradient dávek pro testování lambda-cyhalothrinu (LC) samostatně a v kombinaci s vybranou ú.l. DMI fungicidu a také fungicidu sólo (F) pro test zaměřený na stanovení synergického efektu DMI fungicidů na nárůst toxicity lambda-cyhalothrinu k některému ze tří cílových škůdců řepky

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	gradient dávek LC (g ú.l./ha)	dávka F (g ú.l./ha)	poznámka
kontrola	xxx	xxx	do vialek aplikován pouze aceton
F150	xxx	150	do vialek aplikován pouze F
F300	xxx	300	do vialek aplikován pouze F
LC	0,3 ¹ ; 1,5; 7,5; 37,5	xxx	do vialek aplikován pouze LC
LC + F150	0,012; 0,06; 0,3; 1,5; 7,5	150	do vialek aplikován LC i F; každá testovaná dávka LC je obohacena o 150 g testovaného F/ha
LC + F300	0,012; 0,06; 0,3; 1,5; 7,5	300	do vialek aplikován LC i F; každá testovaná dávka LC je obohacena o 300 g testovaného F/ha

¹tuto dávku nepoužívat u testu s blýskáčkem řepkovým

Doporučený gradient dávek pro testování lambda-cyhalothrinu samostatně a v kombinaci s vybranou ú.l. DMI fungicidu (a také fungicidu sólo) je uveden v **Tabulce 4a**. Toto rozložení je vhodné obecně pro všechny DMI fungicidy (nevztahuje se tedy ke konkrétnímu fungicidu) a také pro všechny tři druhy cílových škůdců. K této tabulce se vztahuje **Příloha 1a**, což je tabulka, která slouží pro záznam prvotních dat z testu tohoto typu.

Tabulka 4b – Doporučený gradient dávek pro testování tau-fluvalinatu (TF) samostatně a v kombinaci s vybranou ú.l. DMIs fungicidu a také fungicidu sólo (F) pro test zaměřený na stanovení synergického efektu DMIs fungicidů na nárůst toxicity tau-fluvalinatu k některému ze tří cílových škůdců řepky

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	gradient dávek TF (g ú.l./ha)	dávka F (g ú.l./ha)	poznámka
kontrola	xxx	xxx	do vialek aplikován pouze aceton
F150	xxx	150	do vialek aplikován pouze F
F300	xxx	300	do vialek aplikován pouze F
TF	1,92; 9,6; 48; 240	xxx	do vialek aplikován pouze TF
TF + F150	0,38; 0,96; 1,92; 9,6; 48	150	do vialek aplikován TF i F; každá testovaná dávka LC je obohacena o 150 g testovaného F/ha
TF + F300	0,38; 0,96; 1,92; 9,6; 48	300	do vialek aplikován TF i F; každá testovaná dávka LC je obohacena o 300 g testovaného F/ha

Doporučený gradient dávek pro testování tau-fluvalinatu samostatně a v kombinaci s vybranou ú.l. DMIs fungicidu (a také fungicidu sólo) je uveden v **Tabulce 4b**. Toto rozložení je také vhodné obecně pro všechny DMIs fungicidy (nevztahuje se tedy ke konkrétnímu fungicidu) a také pro všechny tři druhy cílových škůdců. K této tabulce se vztahuje **Příloha 1b**, což je tabulka, která slouží pro záznam prvotních dat z testu tohoto typu.

Tabulka 4c – Doporučený gradient dávek pro testování etofenproxu (ET) samostatně a v kombinaci s vybranou ú.l. DMIs fungicidu a také fungicidu sólo (F) pro test zaměřený na stanovení synergického efektu DMIs fungicidů na nárůst toxicity etofenproxu k některému ze tří cílových škůdců řepky

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	gradient dávek ET (g ú.l./ha)	dávka F (g ú.l./ha)	poznámka
kontrola	xxx	xxx	do vialek aplikován pouze aceton
F150	xxx	150	do vialek aplikován pouze F
F300	xxx	300	do vialek aplikován pouze F
ET	2,3; 11,5; 57,5; 287,5	xxx	do vialek aplikován pouze ET
ET + F150	0,46; 1,15; 2,3; 11,5; 57,5	150	do vialek aplikován ET i F; každá testovaná dávka LC je obohacena o 150 g testovaného F/ha
ET + F300	0,46; 1,15; 2,3; 11,5; 57,5	300	do vialek aplikován ET i F; každá testovaná dávka LC je obohacena o 300 g testovaného F/ha

Doporučený gradient dávek pro testování etofenproxu samostatně a v kombinaci s vybranou ú.l. DMIs fungicidu (a také fungicidu sólo) je uveden v **Tabulce 4c**. Toto rozložení je také vhodné obecně pro všechny DMIs fungicidy (nevztahuje se tedy

ke konkrétnímu fungicidu) a také pro všechny tři druhy cílových škůdců. K této tabulce se vztahuje **Příloha 1c**, což je tabulka, která slouží pro záznam prvotních dat z testu tohoto typu.

Po 24 hodinách jsou brouci z lahvíček jemně vysypáni na podložku s bílým papírem (formát A4) v dobře osvětlené místnosti. Pro zaznamenání výsledků pokusu se využijí tabulky pro zápis primárních dat (viz **Příloha 1a,b,c**). Pro každou lahvičku se zaznamenají dvě hodnoty do příslušných kolonek v tabulce: 1) celkový počet brouků, který byl do lahvičky vložen na začátku testu a 2) počet brouků, u kterých se projevila citlivá reakce (jde o mrtvé brouky nebo brouky, kteří jsou těžce postižení – těžká diskoordinace pohybu či úplná paralýza, těžká křeč). Při hodnocení testu je nutné zkontrolovat, jestli jsou jedinci, kteří se nepohybují, skutečně mrtví. To lze ověřit jemným dotykem (k podráždění použít štěteček, entomologickou pinzetu atd.), excitací LED světlem, nebo jemným fouknutím na neaktivního jedince. A hlavně při hodnocení příliš nespěchat – dát jedincům čas, ať se mohou projevit.

Na základě těchto dat se pro jednotlivé testované populace stanoví stupně citlivosti / rezistence dle IRAC na základě průměrné mortality (podíl mrtvých a těžce postižených z celkového počtu brouků v lahvičce korigovaný na mortalitu v kontrole) vyvolané dvěma dávkami testovaného pyretroidu. Za první jde o mortalitu způsobenou registrovanou dávkou pyretroidu (pro lambda-cyhalothrin: 7,5 g ú.l./ha; pro tau-fluvalinate: 48 g ú.l./ha; pro etofenprox: 57,5 g ú.l./ha) a za druhé 5× nižší dávkou pyretroidu (pro lambda-cyhalothrin: 1,5 g ú.l./ha; pro tau-fluvalinate: 9,6 g ú.l./ha; pro etofenprox: 11 5 g ú.l./ha).

- **Stupeň 1: vysoce citlivá populace**; to je taková populace, u které registrovaná i 5× nižší dávka testovaného pyretroidu způsobila mortalitu 100 %.
- **Stupeň 2: citlivá populace**; 100 % mortalita je vyvolaná již jen registrovanou dávkou testovaného pyretroidu
- **Stupeň 3: středně rezistentní populace**; mortalita vyvolaná registrovanou dávkou pyretroidu je nižší než 100 %, ale rovna nebo vyšší 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 %.

Toto se u jednotlivých populací vyjádří jak pro pyretroid testovaný sólo, tak pro pyretroid obohacený o 150 respektive 300 g ú.l./ha určitého fungicidu. Ze srovnání přiřazených stupňů citlivosti / rezistence k testovanému pyretroidu vypočítaných pro případ bez přidání fungicidu k pyretroidu i pro případy, ve kterých byla přidána nižší (150 g ú.l./ha) nebo vyšší dávka (300 g ú.l./ha) určitého fungicidu k pyretroidu,

je zřejmé, jestli přidání fungicidu způsobilo nárůst citlivosti (a tedy nárůst mortality u příslušných dávek) u testované populace a jestli se u dané populace vlivem přidání fungicidu změnil status rezistence. Jestli např. přešla ze stavu označeného stupněm rezistentní populace (st. 4) k lambda-cyhalothrinu do stavu označeného stupněm citlivá (st. 2) nebo vysoce citlivá populace (st. 1). To dobře demonstuje **Tabulka 5a**, ve které jsou uvedeny některé výsledky pilotních testů z roku 2025 se 30 populacemi b. řepkového pocházejících z různých oblastí ČR, které byly otestovány nejen

Tabulka 5a - Výsledky testování citlivosti českých populací blýskáčka řepkového (*B. aeneus*) na esterický pyretroid lambda-cyhalothrin (LC) sólo a LC obohacený o 150 g tebuconazolu (TEB) ha v roce 2025 (výsledky pilotních testů). Použitá metoda: Adult vial test IRAC O11 verze 3 a její adaptovaná verze pro společné testování lambda-cyhalothrinu a inhibitorů Cytochromu P450; doba expozice: 24 hodin

číslo populace	výsledky pro LC testovaný sólo					výsledky pro LC obohacený o 150 g TEB/ha				
	prům. mortalita vyvolaná dávkou 1,5 g/ha (%)	prům. mortalita vyvolaná registr. dávkou 7,5 g/ha (%)	stupeň citlivosti / rezistence dle IRAC	LD ₅₀ (g ú.l./ha)	LD ₉₀ (g ú.l./ha)	prům. mortalita vyvolaná dávkou 1,5 g/ha (%)	prům. mortalita vyvolaná registr. dávkou 7,5 g/ha (%)	stupeň citlivosti / rezistence dle IRAC	LD ₅₀ (g ú.l./ha)	LD ₉₀ (g ú.l./ha)
1	60,00	75,00	4	8,56	28,75	100,00	100,00	1	0,03	0,17
2	60,00	68,00	4	9,12	32,65	100,00	100,00	1	0,04	0,24
3	60,00	73,00	4	8,32	25,63	100,00	100,00	1	0,03	0,16
4	60,00	69,00	4	10,63	21,36	100,00	100,00	1	0,04	0,18
5	60,00	71,00	4	7,69	31,66	100,00	100,00	1	0,05	0,19
6	42,85	70,00	4	2,08	26,10	100,00	100,00	1	0,02	0,03
7	56,67	76,67	4	1,19	16,84	100,00	100,00	1	0,03	0,06
8	53,33	73,33	4	1,42	14,69	100,00	100,00	1	0,02	0,03
9	0,00	32,00	5	14,43	57,06	100,00	100,00	1	0,02	0,05
10	9,10	42,42	5	8,59	51,36	100,00	100,00	1	0,01	0,03
11	6,25	41,66	5	9,43	28,48	100,00	100,00	1	0,01	0,03
12	6,25	48,64	5	7,52	31,84	100,00	100,00	1	0,01	0,03
13	3,33	38,46	5	10,59	40,16	100,00	100,00	1	0,01	0,02
14	13,33	63,33	4	5,16	26,47	100,00	100,00	1	0,01	0,04
15	19,44	58,33	4	5,47	28,06	100,00	100,00	1	0,02	0,03
16	10,00	63,33	4	5,64	16,37	100,00	100,00	1	0,01	0,01
17	19,23	66,67	4	4,17	24,60	100,00	100,00	1	0,01	0,02
18	11,54	60,00	4	5,45	29,49	100,00	100,00	1	0,01	0,02
19	16,67	46,67	5	6,80	47,93	100,00	100,00	1	0,01	0,01
20	13,33	43,33	5	8,75	60,37	100,00	100,00	1	0,01	0,01
21	18,52	63,33	4	3,99	29,02	100,00	100,00	1	0,01	0,01
22	15,63	58,82	4	5,87	40,18	100,00	100,00	1	0,01	0,01
23	16,67	52,77	4	6,43	55,09	100,00	100,00	1	0,01	0,02
24	19,44	63,64	4	5,62	23,95	100,00	100,00	1	0,01	0,03
25	26,67	53,33	4	5,20	40,62	100,00	100,00	1	0,02	0,07
26	5,41	25	5	17,34	94,82	100,00	100,00	1	0,02	0,04
27	2,63	64,71	4	5,88	13,93	100,00	100,00	1	0,01	0,08
28	6,67	40	5	9,02	36,15	100,00	100,00	1	0,02	0,05
29	0,00	46,15	5	8,91	23,65	100,00	100,00	1	0,01	0,05
30	9,01	51,52	4	9,89	62,01	100,00	100,00	1	0,01	0,01

na lambda-cyhalothrin, ale také na lambda-cyhalothrin obohacený o 150 g tebuconazolu/ha.

Výpočet interakčního poměru (IR):

Pro vyjádření vztahu (typu interakce) mezi kombinovanými účinnými látkami pesticidů bude využit interakční poměr (= *interaction ratio*, IR). Podle Colin a Belzunces (1992), Piggot et al (2015) a Almasriet al. (2020) mohou tyto interakce nabývat tří odlišných (a odlišitelných) základních forem: 1) aditivní interakce, 2) antagonistická interakce a 3) synergická interakce. K určení, o jaký typ interakce jde, se využívá interakční poměr (IR), který se počítá podle vzorce navrženého Colin a Belzunces (1992), (vzorec 1):

$$\text{Vzorec 1:} \quad IR = \frac{(Mix - C)}{\sum_{n=0}^2 (Pn - C)}$$

Vysvětlení zkratk ve vzorci: Mix: mortalita vyvolaná kombinací účinných látek (zde pyretroid + fungicid); C: mortalita na neošetřené kontrole; (Mix - C): mortalita vyvolaná kombinací účinných látek korigovaná mortalitou na kontrole; $\sum (Pn - C)$: součet úrovní mortalit vyvolaných první a druhou účinnou látkou, když byly testovány samostatně po korekci na mortalitu v kontrole; n: počet testovaných účinných látek (v této metodice 2).

IR se vypočítá pro kombinace registrovaných dávek testovaných pyretroidů s oběma dávkami testovaného fungicidu (150 i 300 g ú.l./ha) a též pro kombinace 5× nižších dávek testovaných pyretroidů s oběma dávkami příslušného fungicidu.

Typ interakce mezi kombinovanými účinnými látkami pesticidů se podle vypočítané hodnoty IR určí takto:

- Když se IR = 1: aditivní interakce / aditivní efekt mezi pesticidy (trochu méně přísně se za aditivní interakci považuje i situace, když se IR pohybuje v intervalu 0,95–1,05).
- Když je IR > 1: synergická interakce / mezi účinnými látkami je synergický efekt.
- Když je IR < 1: jde o antagonismus mezi účinnými látkami v dopadu na cílový organismus.

V našem případě lze předpokládat, že úroveň mortality působené samotným fungicidem budou nulové nebo velmi nízké. Z hlediska sledovaného účelu této metodiky bude větší pozornost dále věnována (to znamená postoupí k dalšímu laboratornímu testování – viz část 3.3.3; a k polním pokusům – viz část 3.5) takovým účinným látkám ze skupiny DMIs fungicidů, které v kombinaci s registrovanou a 5× nižší dávkou testovaného pyretroidu budou u většiny populací daného škůdce vyvolávat

výrazný synergický efekt. To znamená, že hodnoty IR budou výrazně vyšší než 1. V případě populací s vysokou úrovní rezistence k testovanému pyretroidu (většina populací blýskáčka) musí být ale hodnoty IR blízké nebo vyšší než 2 (v případě kombinací registrovanou dávkou lambda-cyhalothrinu) či blízké / vyšší než 3 (v případě kombinací s 5× nižší dávkou lambda-cyhalothrinu), aby bylo možné uvažovat o využití konkrétního fungicidu jako dostatečně „silného“ v synergickém účinku na to, aby reálně snížil dopad metabolické rezistence k pyretroidům.

Výpočet letálních dávek

Tím, že je populace testovaného škůdce vystavena jak gradientu dávek samotného pyretroidu (LC, TF nebo ET) tak i stoupajícím dávkám téhož pyretroidu, k nimž je ale přidán určitý fungicid v konkrétní dávce, to znamená, že dávky pyretroidu

Tabulka 5b - Výsledky testování citlivosti českých populací krytonosce čtyřzubého (*C. pallidactylus*) na esterický pyretroid lambda-cyhalothrin (LC) sólo a lambda-cyhalothrin obohacený o 150 g tebuconazolu (TEB) / ha v roce 2025 (výsledky pilotních testů). Použitá metoda: Adult vial test IRAC 011 verze 3 a její adaptovaná verze pro společné testování lambda-cyhalothrinu a inhibitorů Cytochromu P450; doba expozi-ce: 24 hodin

číslo populace	výsledky pro LC testovaný sólo				výsledky pro LC obohacený o 150 g TEB / ha			
	prům. mortalita vyvolaná dávkou 1,5 g/ha (%)	prům. mortalita vyvolaná registr. dávkou 7,5 g/ha (%)	LD90 (g ú.l./ha)	Int. Spol. (95%)	prům. mortalita vyvolaná dávkou 1,5 g/ha (%)	prům. mortalita vyvolaná registr. dávkou 7.5 g/ha (%)	LD90 (g ú.l./ha)	Int. Spol. (95%)
1	81,25	100,00	2,02	1.22-5.94	100,00	100,00	0,39	0,23-1,07
2	82,61	100,00	1,92	1.22-4.35	100,00	100,00	0,05	0,04-0,10
3	80,00	100,00	2,09	1.36-4.34	100,00	100,00	0,44	0,26-1,08
4	86,67	100,00	1,76	1.13-3.60	100,00	100,00	0,39	0.20-1.68
5	86,67	97,06	2,64	1.58-5.82	100,00	100,00	0,29	0.19-0.62
6	77,78	100,00	2,11	1,40-5,00	100,00	100,00	0,09	0.07-0.16
7	26,67	86,67	10,98	5,56-39,96	100,00	100,00	0,57	0,32-1,77
8	26,67	100,00	8,69	3,18-127,14	100,00	100,00	0,17	0,12-0,44
9	86,67	100,00	2,39	1,49-5,24	100,00	100,00	0,28	0.19-0.56
10	93,33	100,00	1,11	0,69-2,91	100,00	100,00	0,37	0.24-0.74
11	93,33	100,00	1,51	0,94-3,70	100,00	100,00	0,45	0.28-0.94
12	90,00	100,00	1,95	1.23-4.04	100,00	100,00	0,25	0.17-0.49
13	82,35	94,74	3,43	2.09-7.17	97,14	100,00	0,46	0.28-1.04
14	16,67	95,65	5,92	4,17-11,04	100,00	100,00	0,23	0.16-0.43

Poznámka: zeleně podsvícené řádky označují populace k. čtyřzubého, kde přidání 150 g TEB/ha k testovaným dávkám LC vyvolalo statisticky významné ($p < 0,05$) snížení hodnoty LD90 pro LC. Tedy u těchto populací došlo přidáním 150 g TEB/ha k LC ke statisticky významnému nárůstu toxicity jeho na k. čtyřzubého. Jen u třech populací byl nárůst toxicity nesignifikantní. Není náhoda, že to jsou populace, které v rámci souboru vykázaly nejvyšší úroveň citlivosti k LC (inhibice Cytochromu P450 zde tedy pravděpodobně neměla takový význam – situace nemohla být příliš zlepšena)

stoupají, dávka fungicidu ale zůstává stejná (buď 150 nebo 300 g ú.l./ha), je možné pomocí probitové regrese vypočítat hodnoty LD ($LD_{50,90,95}$) pro testovaný pyretroid pro všechny tři případy: 1) když je testován samostatně, 2) když je každá jeho dávka v gradientu obohacena o 150 g určitého fungicidu/ha a 3), když je každá jeho dávka v gradientu obohacena o 300 g určitého fungicidu/ha. Pro každou hodnotu LD se zároveň vypočítávají 95% intervaly spolehlivosti. To umožňuje nejen srovnat absolutní hodnoty LD pro konkrétní pyretroid (bez fungicidu či s fungicidem), ale také zjistit, jestli je mezi těmito hodnotami statisticky významný nebo nevýznamný rozdíl. To dobře demonstuje **Tabulka 5b**, ve které jsou uvedeny výsledky pilotních testů z roku 2025 (již několikrát zmíněno) se 14 populacemi k. čtyřzubého pocházejícími z různých oblastí ČR, které byly otestovány nejen na lambda-cyhalothrin, ale také na lambda-cyhalothrin obohacený o 150 g tebuconazolu/ha.

Z hlediska sledovaného účelu této metodiky bude větší pozornost dále věnována (postoupí k dalšímu laboratornímu testování – viz část 3.3.3; a k polním pokusům – viz část 3.5) takovým účinným látkám ze skupiny DMIs fungicidů, které statisticky významně ($p < 0,05$) snižují hodnotu letálních dávek pyretroidu, ke kterému jsou přidány, protože to zároveň znamená, že signifikantně zvyšují toxicitu daného pyretroidu k danému škůdci, který je zrovna testován. A to zejména takovým DMIs fungicidům, které toho dosahují v nižší z obou testovaných dávek (tj. 150 g ú.l./ha). Jak ukazují výsledky pilotních testů uvedených v **Tabulce 5b**, triazolový fungicid (a růstový regulátor) tebuconazole toto kritérium splňuje.

Výpočet (přísně vzato jde o odhad) hodnot LD a 95% intervalů spolehlivosti pro tyto hodnoty se provádí metodou probitové regrese. Autorský tým, který tuto metodu předkládá, používá pro výpočet program Polo Plus (Leora software, USA).

Výpočet synergického poměru (SR)

Pro každou populaci se ještě vypočítají hodnoty tzv. synergického poměru (*synergistic ratio*, SR, vzorec 2), který vyjadřuje kolikrát se přidáním určité dávky konkrétního fungicidu k testovanému pyretroidu sníží jeho LD_{50} . Jinými slovy, kolikrát se zvýší toxicita daného pyretroidu přidáním určité dávky (150 nebo 300 g ú.l./ha) testovaného DMIs fungicidu. SR se počítá pro LD_{50} , protože tato letální dávka je zatížena menší chybou než hodnoty $LD_{90,95}$, i když tyto jsou zase zajímavější z praktického hlediska.

$$\text{Vzorec 2: } SR = \frac{LD_{50} \text{ pro pyretroid testovaný sólo}}{LD_{50} \text{ pro pyretroid obohacený o určitou dávku fungicidu}}$$

3.3.3 Výpočet nejnížší efektivní dávky pro konkrétní účinnou látku ze skupiny DMIs fungicidů

Nejnižší efektivní dávka (NED) pro určitou účinnou látku ze skupiny DMIs (F) je taková dávka fungicidu (F), která po přidání k testovanému pyretroidu způsobí nárůst jeho toxicity na takovou úroveň, že 100% mortalitu vyvolá u testované populace cílového škůdce (blýskáček řepkový, dřepčík olejkový, krytonosec čtyřzubý) jeho pětinasobně nižší dávka. To znamená, že vlivem přidání NED určitého F ke konkrétnímu pyretroidu dojde k poklesu pro něj stanovených hodnot LD_{90} a LD_{95} na testovaný druh škůdce pod hodnotu pětinasobně nižší dávky, než je dávka registrovaná. To u lambda-cyhalothrinu (LC) znamená pokles hodnot LD_{90} a LD_{95} pod hodnotu 1,5 g LC/ha, u tau-fluvalinatu (TF) jde o pokles LD_{90} a LD_{95} pod hodnotu 9,6 g TF/ha a u etofenproxu (ET) musí přidání daného F způsobit pokles LD_{90} a LD_{95} pod hodnotu 11,5 g ET/ha.

NED bude zjišťována jen pro takové F, které se na základě testů na hodnocení synergického efektu různých účinných látek DMIs fungicidů pro konkrétní pyretroidy budou jevit jako potenciálně využitelné v ochraně porostů řepky proti cílovým škůdcům. Výběr F bude tedy proveden na základě výsledků testů popsaných v části 3.3.2.

Princip testu zaměřeného na určení NED pro určitou ú.l. fungicidu je stejný jako v předcházejícím případě. Základem je tedy opět lahvičkový IRAC test (*Adult vial test, IRAC*) popsaný výše. To, co se mění, jsou kombinace insekticidů a F a gradient testovaných dávek. Zde je v podstatě obrácený přístup oproti testům popsaným v části 3.3.2. Pracuje se zde s vhodně zvoleným gradientem vybraných F, ke kterým se přidává pětinasobně nižší dávka LC, TF nebo ET (**Tabulky 6a,b,c**). Zde jde totiž o výpočet toho, jaká nejnížší dávka F po přidání k pětinasobně nižší dávce LC, TF nebo ET způsobí, že tyto insekticidy budou v této dávce působit v populaci 100% mortalitu. NED pro určitý F jsou vlastně hodnoty ED_{90} a ED_{95} pro daný F (je to obdoba výpočtu LD pro insekticid, zde jde ale o výpočet efektivních dávek, ED).

Tabulka 6a - Doporučený gradient dávek pro testování vybraných ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) s cílem nalézt jejich nejnížší efektivní dávku (NED) pro kombinaci s pyretroidem lambda-cyhalothrin (LC). Navržené kombinace a gradient dávek je vhodný pro všechny vybrané F. Vhodné též pro všechny tři druhy cílových škůdců

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	gradient dávek F (g ú.l./ha)	dávka LC (g ú.l./ha)	poznámka
kontrola	xxx	xxx	do vialek aplikován pouze aceton
LC1,5	xxx	1,5	do vialek aplikován pouze LC
F + LC1,5	18,75; 37,5; 75; 150; 300	1,5	do vialek aplikován F i LC; ke každé testované dávce F je přidán LC v dávce 1,5 g ú.l./ha

Tabulka 6b – Doporučený gradient dávek pro testování vybraných ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) s cílem nalézt jejich nejnížší efektivní dávku (NED) pro kombinaci s pyretroidem tau-fluvalinate (TF). Navržené kombinace a gradient dávek je vhodný pro všechny vybrané F. Vhodné též pro všechny tři druhy cílových škůdců

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	gradient dávek F (g ú.l./ha)	dávka TF (g ú.l./ha)	poznámka
kontrola	xxx	xxx	do vialek aplikován pouze aceton
TF9.6	xxx	9,6	do vialek aplikován pouze TF
F + TF9.6	18,75; 37,5; 75; 150; 300	9,6	do vialek aplikován F i TF; ke každé testované dávce F je přidán TF v dávce 9,6 g ú.l./ha

Tabulka 6c – Doporučený gradient dávek pro testování vybraných ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) s cílem nalézt jejich nejnížší efektivní dávku (NED) pro kombinaci s pyretroidem etofenprox (ET). Navržené kombinace a gradient dávek je vhodný pro všechny vybrané F. Vhodné též pro všechny tři druhy cílových škůdců

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	gradient dávek F (g ú.l./ha)	dávka ET (g ú.l./ha)	poznámka
kontrola	xxx	xxx	do vialek aplikován pouze aceton
ET11.5	xxx	11,5	do vialek aplikován pouze ET
F + ET11.5	18,75; 37,5; 75; 150; 300	11,5	do vialek aplikován F i ET; ke každé testované dávce F je přidán ET v dávce 11,5 g ú.l./ha

Samotné testování (doba expozice 24 hodin, 18–20 °C, 12 hodin světlo / 12 hodin tma) a hodnocení projevů brouků proběhne stejným způsobem jako v části 3.3.2. Pro zaznamenání údajů o testované populaci, detailů testu a pro zápis výsledků (primárních dat) z testu bude využita tabulka, která je v **Příloze 2**.

Výpočet hodnot ED_{90} a ED_{95} pro konkrétní F v kombinaci s pětinasobně nižší dávkou (než je dávka registrovaná) LC, TF nebo ET a 95% intervalů spolehlivosti pro tyto hodnoty se provede metodou probitové regrese. Autorský tým, který tuto metodiku předkládá, používá k těmto účelům program Polo Plus (Leora software, USA). Hodnoty ED_{90} respektive ED_{95} udávají, jaká dávka F musí být k pětinasobně nižší dávce (než je dávka registrovaná) daného pyretroidu přidána, aby tento v populaci cílového škůdce způsobil 90% respektive 100% mortalitu. Z hodnot ED_{90} respektive ED_{95} , jejich intervalů spolehlivosti a z křivek nárůstů mortality v závislosti na přidávané dávce F, lze pak odhadnout (ED_{100} pro konkrétní F totiž vypočítat nelze) hodnotu NED.

Výsledky získané v této části budou dále využity a ověřovány v polních pokusech (viz část 3.5).

3.3.4 Celková interpretace výsledků

Tabulky s primárními daty se postupně od všech hodnotitelů přes jednotlivá autorská pracoviště (nebo přímo) shromáždí v instituci Agritec Šumperk, kde se provede souborná statistická analýza dat a vytvoří celkové výsledkové tabulky. Interpretace výsledků bude zaměřena na posouzení jednotlivých DMIs, které byly otestovány spolu s určitými pyretroidy na konkrétní populace škůdců s cílem vybrat ty, které mají potenciální význam pro uplatnění jako synergisté pyretroidů v polních podmínkách. Tyto látky pak budou navrženy pro zařazení do polních pokusů.

3.4 Propojení lahvičkového testu s molekulární analýzou přeživších jedinců

Molekulární analýza je zaměřena na prokázání nebo vyvrácení přítomnosti *kdr* resp. *s-kdr* rezistence u blýskáčka řepkového (na dřepčíka olejkového a krytonosce čtyřzubého ji bude nutné optimalizovat) v různých oblastech ČR. Výše popsany postup testování citlivosti / rezistence dospělců k samotným pyretroidům a jejich kombinacím s konkrétními DMIs (viz část 3), které jsou založeny na sledování reakcí dospělců kontaktně vystavených vzrůstajícímu spektru dávek ú.l. pyretroidů (bez DMIs nebo s DMIs), bude také sloužit k výběru jedinců pro molekulární analýzy. Z jednotlivých populací budou k těmto analýzám vybráni jedinci, kteří přežijí (myslí se jedinci bez projevu citlivé reakce: normálně se pohybující jedinci či jen s lehkým projevem postižení) 24 hodin trvající expozici registrované nebo vyšším dávkám samostatně testovaných pyretroidů. A hlavně jedinci, kteří přežijí 24 hodin trvající expozici již 5 x nižší dávce (než je dávka registrovaná) testovaného pyretroidu v kombinaci s některou ú.l. DMIs fungicidů. Zejména tito jedinci jsou pro molekulární analýzu cenní, neboť přežití kombinace pyretroidu s inhibítorem cytochromu P450 může indikovat přítomnost *kdr* nebo *super-kdr* rezistence. Tito fenotypově rezistentní jedinci budou ihned po ukončení lahvičkového testu zamrazení (-72 °C) v označených epruvetách. Na nich bude uvedeno místo sběru populace, ze které jedinec (jedinci) pochází, datum sběru a varianta ošetření, kterou přežil(i).

Vzorky těchto dospělců budou postupně přepraveny (v k tomu vhodných boxech) do laboratoře Agritec Šumperk, kde bude provedena vlastní molekulární analýza.

Zde budou tito jedinci (každý se testuje zvlášť) analyzováni na přítomnost mutace zodpovědné za *kdr* a *s-kdr* typ rezistence. Budou homogenizováni v kapalném dusíku a pomocí Quickgene DNA tissue kit (Kurabo Industries, Německo) z nich bude izolována genomová DNA dle protokolu výrobce. Oblast domény II sodíkového kanálku v oblasti mutace *s-kdr* je amplifikována prostřednictvím metody PCR na základě metodiky dle Nauen et al. (2012); budou použity primery PB1, PB2, PB3 a PB4, složení reakční směsi a teplotní podmínky dle uvedené publikace. Pro

testování oblasti *kdr* budou využity primery nově navržené na základě sekvence dostupné v GenBank: AF354457.1, které jsou uvedeny v **Tabulce 7**.

Tabulka 7 - Primery pro amplifikaci domény II sodíkového kanálu v oblasti mutace *kdr*

PBtestF	AGAGTGTTATGCGGGGAATG
PBtestR	TGGTGCTGATAAGCTGGATG

Při použití uvedených primerů pro amplifikaci oblasti *kdr* bude složení reakční směsi pro PCR: 20–50 ng DNA, 1x Dream Taq PCR buffer, 100 µM každého nukleotidu, 0,4 µM každého primeru a 1 U Dream Taq polymerázy (Thermo Scientific). Teplotní profil PCR reakcí byl 94 °C /10 min + 35x (94 °C /30 s, 55 °C /30 sec., 72 °C/60 s) se závěrečnou elongací 72 °C /5 min. 10 µl vzorku po PCR reakci bude pro kontrolu naneseno na 1,5% agarózový gel barvený ethidium bromidem, nasvícen UV světlem a nasnímán.

Amplifikované sekvence oblastí mutací *kdr* a *s-kdr* budou následně purifikovány Isolate II PCR and gel kit (Meridian Bioscience) a odeslány na sekvenování. Získané sekvence budou analyzovány v programu Sequence Scanner (Applied Biosystems, Foster City, CA). Na základě sekvencí bude vyhodnocen genotyp jednotlivých brouků (SS/SR/RR – senzitivní versus rezistentní genotyp, viz také Obrázek 3).

3.5 Výsledky lahvičkových testů jako podklad pro polní pokusy

Výsledky laboratorních testů budou zdrojem výsledků, které bude nutné ověřovat v polních pokusech. Laboratorní pokusy poslouží k výběru slibných látek ze skupiny DMIs fungicidů, které se jeví jako vhodné inhibitory cytochromu P450 a mohly by posloužit jako účinní synergisté pyretroidních insekticidů, které díky metabolické rezistenci řepkových škůdců ztrácí, respektive již zcela ztratily, svou účinnost. Tyto slibné látky je nutné v podobě komerčních formulací (fungicidy na bázi těchto ú.l. registrované do řepky) v kombinaci s komerčními formulacemi pyretroidů otestovat v polních maloparcelních pokusech. Zaměřit se na vyhodnocení jejich účinnosti na cílové škůdce dle k tomu účelu běžně používaných metodik (např. příslušné meto-diky EPPO) a na vyhodnocení dopadů na necílové organismy (zejména na predátory a parazitoidy cílových škůdců ale i dalších škůdců řepky) a na rostliny v porostu (jestli jsou dopady vždy žádoucí – DMIs jsou více či méně silné růstové regulátory).

V laboratorních testech (a navazujících polních pokusech) je nutné pokračovat a hledat ještě další (nejen mezi fungicidy) možnosti do pozice synergistů. Určitou roli zde mohou hrát např. biologické insekticidy / biologicky aktivní látky, které aplikované samostatně neprojevují dostatečnou účinnost – jejich role se ale může začít jevit jinak, když si je představíme jako synergisty syntetických insekticidů.

Velkou možností do budoucna je také pokusit se cílit na endosymbionty hmyzu a poškozovat blýskáčka skrze ně (bez některých blýskáček nemůže přežít, rozmnožit se atd.).

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 v ČR k rutinnímu 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 (zcela novou) pro možnost připravit představovanou metodiku bylo sestavení vhodných gradientů (spekter) testovaných dávek pyretroidů kombinovaných s vhodně zvolenými dávkami konkrétních fungicidů ze skupiny DMIs, aby bylo možné získané výsledky řádně analyzovat (vyjádřit hodnoty LD, stanovit stupně citlivosti / rezistence) a kvantifikovat přínos těchto fungicidů 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 dvou sezón. V roce 2024 byly metodické postupy testovány na pracovišti Agritec, v roce 2025 se na testech podílela již také další pracoviště: OSEVA VaV, pracoviště Opava, MENDELU a ZVT Troubsko. V roce 2025 bylo také ověřeno, že testy jsou schopni provádět zemědělské poradci (SPZO) a agronomové v podmínkách běžného provozu, když jsou jim připraveny testovací sady (= ošetřené testovací lahvičky), poskytnuto základní vybavení pro snadné provedení testu (smýkadlo, box pro transport hmyzu, exhaustor, entomologická pinzeta) a tabulka pro záznam primárních dat.

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 fungicidů ze skupiny DMIs (především z chemických skupin triazolů a triazolinthionů) prostřednictvím inhibice enzymů cy-

tochromu P450 na návrat k citlivosti k pyretroidům u druhů řepkových škůdců, u kterých buď rezistence k této skupině insekticidů vážně hrozí (krytonosec čtyřzubý), nebo ji vykazují (blýskáček řepkový, dřepčík olejkový).

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. Tím se celkově zvýší vědecká hodnota získaných výsledků a jejich praktická uplatnitelnost (přímý dopad na změnu postupů v ochraně porostů řepky proti výše uvedeným druhům řepkových škůdců). A v konečném důsledku přispěje ke snížení spotřeby insekticidů.

Části metodiky, které vyžadují náročnější laboratorní vybavení, software či specifické *know how*, budou prováděny na některém z pracovišť autorského kolektivu. To znamená, že se připraví roztoky pro jednotlivé dávky a popř. i testovací sady (majoritně zajišťuje pracoviště Agritec). 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 kdokoli, kdo projeví o tuto problematiku zájem. Cílem je, aby byl test proveditelný v podmínkách běžného zemědělského provozu, aby 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 finančním ztrátám (viz modelový příklad uvedený níže). 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 v roce 2025 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 (např. DMIs, PBO), které blokují oxygenázy 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 slibně se jevící DMIs (konkrétní fungicidy) použít, aby to bylo bezpečné (včetně klasifikace k necílovým organismům např. včely), 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 (Williset 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 inhibitory monoxygenáz Cytochromu P450 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 diamidu cyantraniliprole. Tato látka však není plnohodnotnou alternativou za pyretroidy, neboť je zcela neúčinná na dospělce 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 LD₉₀ 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 (druhá polovina 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).

6.1 Modelové příklady pro vyjádření ekonomických aspektů spojených s uplatněním výsledků, které je možné získat při používání této metodiky

Rezistence proti dostupným insekticidům u důležitých škůdců řepky nutně vede k růstu meziročního kolísání výnosů a poklesu výnosů obecně. Možné dopady lze ilustrovat pomocí dvou modelových příkladů:

6.1.1 Modelový příklad č. 1 pro certifikovanou metodiku
 Modelový výnos **3,3 t/ha** a cena **12 100 Kč/t** (např. dle burzovní ceny, Agris, ČSÚ
 apod. – cena je také modelová a platná v okamžiku přípravy metodiky).
 Výnosová hodnota plodiny za normálních podmínek:

$$3,3 \times 12\,100 = 39\,930 \text{ Kč/ha}$$

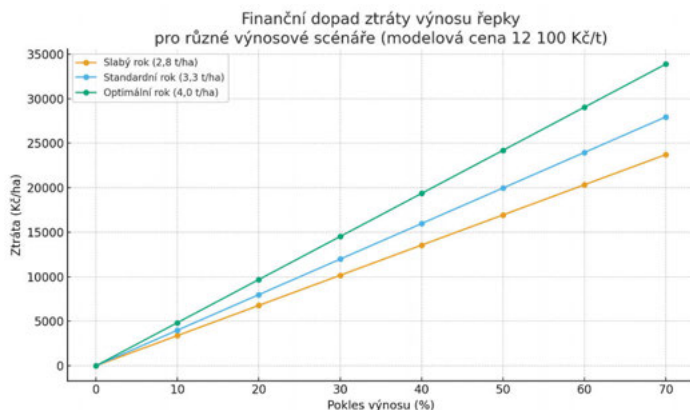
Modelová tabulka ztráty výnosu způsobené škůdci řepky (blýskáček řepkový,
 dřepčík olejkový, krytonosec čtyřzubý)

Pokles výnosu	Zbývající výnos (t/ha)	Finanční ztráta (Kč/ha)	Poznámka
0 %	3,3	0 Kč	výchozí stav
10 %	2,97	3 993 Kč	modelová ztráta × 0,1
20 %	2,64	7 986 Kč	lineární vztah
30 %	2,31	11 979 Kč	1/3 výnosu pryč
40 %	1,98	15 972 Kč	běžně již závažná ztráta
50 %	1,65	19 965 Kč	zásadní ekonomický dopad
60 %	1,32	23 958 Kč	téměř kolaps porostu
70 %	0,99	27 951 Kč	odpovídá předchozímu výpočtu

Orientační výsledek: každý pokles o 10 % výnosu znamená cca 4 000 Kč/ha ztrátu při těchto cenách a výnosech.

Možný závěr: Při průměrném výnosu 3,3 t/ha a ceně 12 100 Kč/t odpovídá každých 10 % ztráty výnosu přibližně 4 000 Kč/ha. Výpočet lze snadno upravit na lokální ceny a výnos.

6.1.2 Modelový příklad č. 2 pro certifikovanou metodiku
 Máme tři scénáře při ceně řepkového semene 12 100 Kč/t:
 Slabý rok: 2,8 t/ha
 Standardní rok: 3,3 t/ha
 Optimální rok: 4,0 t/ha



Graf ukazuje, jak roste ztráta v Kč/ha s poklesem výnosu v procentech pro každý scénář.

Možný závěr:

„*Ekonomický dopad ztráty výnosu řepky byl ilustrován na třech modelových scénářích (2,8; 3,3 a 4,0 t/ha) při ceně 12 100 Kč/t. Z grafu je patrné, že každých 10 % ztráty výnosu představuje řádově jednotky tisíc Kč na hektar a u výnosově nadprůměrných porostů dosahuje ztráta ještě vyšších absolutních hodnot. Metodika zaměřená na omezení selhání insekticidní ochrany tak může zabránit ztrátám v řádu desítek tisíc Kč/ha. Výpočet lze snadno upravit na lokální ceny a výnos.*“

7 Seznam použité související literatury

- Abdel- Hamid H.F.M. (2014). Toxicity of some insecticides and their mixtures with ergistrol biosynthesis inhibiting fungicides against the 2nd instar larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd). *Egyptian Journal of Agricultural Research* 92 (3), 935-946.
- 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.
- Alford DV, Nilsson C & B Ulber (2003). Insect pests of oilseed rape crops. In: DV Alford (ed), *Biocontrol of Oilseed Rape Pests*. Blackwell Science, Oxford, 9–41.
- Almasri H., Tavares D.A., Pioz M., Sené D., Tchamitchian S., Cousin M., Brunet J.-L., Belzunces L.P. (2020). Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111013.
- Assress H.A., Nyoni H., Mamba B.B., Msagati T.A.M. (2020). Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 187, 109868.
- 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 piciparsis*) 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.

- Brent K.J., Hollomon D.W. (2007): Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It be Managed? Brussels, Fungicide Resistance Action Committee, Crop Life International.
- Bu Q., Wang B., Huang J., Deng S., Yu G. (2013). Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: a review. *J. Hazard Mater.* 262, 189–211.
- Casado J., Rodríguez I., Ramil M., Cela R. (2014). Selective determination of antimycotic drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1339, 42–49.
- Chen Z.-F., Ying G.-G., Lai H.-J., Chen F., Su H.-C., Liu Y.-S., Peng F.-Q., Zhao J.-L. (2012). Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 3175–3188.
- Chen Z.-F., Ying G.-G., Ma Y.-B., Lai H.-J., Chen F., Pan C.-G. (2013). Typical azole biocides in biosolid-amended soils and plants following biosolid applications. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6198–6206.
- 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.
- Colin M.-E., Belzunces L.P. (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.: A convenient biological approach. *Pesticide Science* 36, 115–119.
- Dahl, C., Biemann, H.P., Dahl, J. (1987). A protein kinase antigenically related to pp60v-src possibly involved in yeast cell cycle control: positive in vivo regulation by sterol. *Proceedings of the National Academy of science of the United States of America*, Vol. 84, number 12, pp. 4012–4016.
- Dahmen H. a Staub T. (1992). Protective, curative and eradicator activity of difenoconazole against *Venturia inaequalis*, *Cercospora arachidicola*, and *Alternaria solani*. *Plant Disease* 76, 774–777.
- Dai G., Wang B., Huang J., Dong R., Deng S., Yu G. (2015). Occurrence and source apportionment of pharmaceuticals and personal care products in the Beiyun River of Beijing, China. *Chemosphere* 119, 1033–1039.
- Dong K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate neuroscience* 7, 17–30.
- El-Refai A.M., Abdel-Moneam A.E., Mohamed H.A., Mustafa S.A., Abdel-Hamid H.F.M. (2009). Synergism among some insecticides and ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides against *Pectinophora gossypiella* (Saund.). *Egyptian Journal of Agricultural Research* 87 (4), 1041.

- Fajemisin O., Mazakova J., Ryšánek P. (2022a). Emergence of fungicide sensitivity in *Leptosphaeria maculans* isolates collected from the Czech Republic to DMI fungicides. *Agriculture* 12, 237. doi: 10.3390/agriculture12020237.
- Fajemisin O., Mazakova J., Ryšánek P. (2022b). Evaluation of the sensitivity of *Leptosphaeria maculans* isolates causing phoma stem canker in oilseed rape in the Czech Republic to boscalid and dimoxystrobin fungicides. *Plant Protection Science* 58, 305–314.
- 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.
- García-Valcárcel A.I., Tadeo J.L. (2012). Influence of moisture on the availability and persistence of clotrimazole and fluconazole in sludge-amended soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 501–507.
- Gaurilčikienė, I., Butkutė, B., Mankevičienė, A., Paplauskienė, V. (2010). A Multi-Aspect Comparative Investigation on the Use of Strobilurin and Triazole-based Fungicides for Winter Wheat Disease Control. InTech. doi: 10.5772/13191.
- 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.
- Guo, L., Li Z., Gao P., Hu H., Gibson M. (2015). Ecological risk assessment of bisphenol A in surface waters of China based on both traditional and reproductive endpoints. *Chemosphere* 139, 133–137.
- Gyllenhammar I., Eriksson H., Söderqvist A., Lindberg R.H., Fick J., Berg C. (2009). Clotrimazole exposure modulates aromatase activity in gonads and brain during gonadal differentiation in *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquat. Toxicol.* 91, 102–109.
- 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 oilseed rape pests in Germany. *Nachrichtenbl Dt Pflanzenschutzd* 58, 1–5.

- Heimbach U. & Müller A. (2013): Incidence of pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany. *Pest Management Science* 69, 209–216.
- Hideo I., Bryson P.K., Kayamori M., Miyamoto T., Yamaoka Y., Schnabel G. (2021). Cross-resistance to the new fungicide mefentrifluconazole in DMI-resistant fungal pathogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 171, 104737. ISSN 0048-3575. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pestbp.2020.104737.
- 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 λ -c yhalothrin 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. (2013a). 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.
- Huang Q., Wang Z., Wang C., Peng X. (2013b). Chiral profiling of azole antifungals in municipal wastewater and recipient rivers of the Pearl River Delta, China. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 20, 8890–8899.
- 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.
- Kahle M., Buerge I.J., Hauser A., Müller M.D., Poiger T. (2008). Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7193–7200.
- 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 s.
- 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. 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.
- Li W. Xin S., Deng W., Wang B., Liu X., Yuan Y. Wang S. (2023). Occurrence, spatiotemporal distribution patterns, partitioning and risk assessments of multiple pesticide residues in typical estuarine water environments in eastern China. *Water Res.* 245, 120570.
- Liao, L.H., Wu, WY. & Berenbaum, M.R. (2017). Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Scientific Reports* 7, 15924.
- Liu J., Xia W., Wan Y., Xu S. (2021). Azole and strobilurin fungicides in source, treated, and tap water from Wuhan, central China: assessment of human exposure potential. *Sci. Total Environ.* 801, 149733.
- 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.
- Monod G., De Mones A., Fostier A. (1993). Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular oestradiol secretion by imidazole fungicides in Rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 35, 153–157.
- 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.
- 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.
- Parker J.E., Warrilow A.G.S., Price C.L., Mullins J.G.L., Kelly D.E., Kelly S.L. (2014). Resistance to antifungals that target *CYP51*. *Journal of Chemical Biology* 7, 143–161.
- Perry A.S. & Buckner A.J. (1970). Studies on microsomal cytochrome P450 in resistant houseflies. *Life Sciences* 9, 335–350.
- Philipou 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.
- Piggot J.J., Townsend C.R., Matthaei C.D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol. Evol.* 5, 1538–1547.
- 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.

- Platkiewicz J., Frankowski R., Cieślak A., Grzeškowiak T., Zgola-Grzeškowiak A. (2025). Long-term study of azoles in surface water and treated wastewater. *Journal of Environmental Management Online* 380, 124820 [vid. 2025-12-18]. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2025.124820
- Price C.L., Parker J.E., Warrilow A.G.S., Kelly D.E., Kelly S.L. (2015). Azole fungicides understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science* 8, 1054–1058.
- Rauert C., Schuster J.K., Eng A., Harner T. (2018). Global atmospheric concentrations of brominated and chlorinated flame retardants and organophosphate esters. *Environ. Sci. Technol.* 52, 2777–2789.
- 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.
- 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.
- 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* 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* 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.

- Seidenglanz M., Ludvíková M., Blažek L., Šafář J., Kořínek J., Kolařík P., Hrudová E., Hanáková Bečvářová P., Plachká E., Čihánková L. (2025): Ověření efektu PBO na nárůst citlivosti k pyreteroidům u vybraných druhů řepkových škůdců vykazujících různé úrovně rezistence k této skupině insekticidů, schválená, oponovaná metodika. 1. vyd. Šumperk: Agritec, 2025. ISBN 978-80-87360-80-4.
- 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.
- Thompson H. M. (2003). Behavioural effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology* 12, 317–330.
- Thompson H., Wilkins S. (2003). Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology* 56 (1), 131–134.
- 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.
- Trösken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Völkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr. Res.* 30, 387–394.
- Ulber B, Nitzsche O (2006). Phenology of parasitoids (Hym., Ichneumonidae, Tersilochinae) of oilseed rape pests in northern Germany in 1995-1997. IOBC/wprs Bulletin 29 (7), 173–179.
- Van de Wouw A.P., Elliott V.L., Chang S., Lopez-Ruiz F.J., Marcroft S.J., Idnurm A. (2017). Identification of isolates of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans* with resistance to the triazole fungicide fluquinconazole using a novel *In Planta* assay. *PLoS One* 15: e0188106. doi: 10.1371/journal.pone.0188106.
- Van de Wouw A.P., Scanlan J.L., Marcroft S.J., Smith A.J., Sheedy E.M., Perndt N.W., Harrison C.E., Forsyth L.M., Idnurm A. (2021): Fungicide sensitivity and

- resistance in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, across canola growing regions in Australia. *Crop and Pasture Science* 72, 994–1007.
- Van der Zee R., Pisa L., Andonov S., Brodschneider R., Charrière J. D., Chlebo R., Coffey M. F., Crailsheim K., Dahle B., Gajda A., Gray A., Drazic M. M., Higes M., Kauko L., Kence A., Kence M., Kezic N., Jiprijanovska H., Kralj J., Kristiansen P., Hernandez R. M., Mutinelli F., Nguyen B. K., Otten C., Özkirim A., Pernal A. F., Peterson M., Ramsay G., Santrac V., Soroker V., Topolska G., Uzunov A., Flemming V., Wei S., Wilkins S. (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *Journal of Apicultural Research* 51 (1), 100–114.
- 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.
- 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, 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 X., Zhu Q., Yan X., Wang Y., Liao C., Jiang G. (2020). A review of organophosphate flame retardants and plasticizers in the environment: analysis, occurrence and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 731, 139071.
- Wang Y., Akhavan A., Hwang S.F., Strelkov S.E. (2020): Decreased sensitivity of *Leptosphaeria maculans* to pyraclostrobin in Alberta, Canada. *Plant Disease* 104, 2462–2468.
- 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. & Cowrick 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>
- Wick A., Fink G., Ternes T.A. (2010). Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV- filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 2088–2103.

- 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.
- Williams IH (2010): Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests. Springer Science + Business Media B.V. 2010, 461 p.
- 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.
- Wu C., Huang X., Witter J.D., Spongberg A.L., Wang K., Wang D., Liu J. (2014). Occurrence of pharmaceuticals and personal care products and associated environmental risks in the central and lower Yangtze river, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 19–26.
- 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
- 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.
- Zhong Y., Wang Q., Sun F., Yu X., Liu Y., Shentu X. (2025). Effects of tebuconazole on insecticidal activity and symbionts in brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 208, 106283.
- 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., Kaussman 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* 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* 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* 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.
- Seidenglanz M., Ludvíková M., Blažek L., Šafář J., Kořínek J., Kolařík P., Hrudová E., Hanáková Bečvářová P., Plachká E., Čihánková L. (2025): Ověření efektu PBO na nárůst citlivosti k pyretroidům u vybraných druhů řepkových škůdců

vykazujících různé úrovně rezistence k této skupině insekticidů, schválená, oponovaná metodika. 1. vyd. Šumperk: Agritec, 2025. ISBN (dokončován schvalovací proces)

9 Jména oponentů a názvy jejich organizací

Ing. Jakub Beránek Ph.D., ÚKZÚZ, ředitel odboru, Odbor zdraví rostlin, Zemědělská 1752/1a, Černá Pole, 613 00 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 1a: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřenému na stanovení synergického efektu různých DMIs pro **lambda-cyhalothrin (LC)**. Tato tabulka je použitelná pro různé ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) i pro všechny tři cílové škůdce řepky.

Příloha 1b: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřenému na stanovení synergického efektu různých DMIs pro **tau-fluvalinate (TF)**. Tato tabulka je použitelná pro různé ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) i pro všechny tři cílové škůdce řepky.

Příloha 1c: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřenému na stanovení synergického efektu různých DMIs pro **etofenprox (ET)**. Tato tabulka je použitelná pro různé ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) i pro všechny tři cílové škůdce řepky.

Příloha 2a: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřenému na výpočet nejnižší efektivní dávky (NED) pro účinné látky ze skupiny DMIs fungicidů (F) jako synergistů pro pyretroid **lambda-cyhalothrin (LC)**

Příloha 2b: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřenému na výpočet nejnižší efektivní dávky (NED) pro účinné látky ze skupiny DMIs fungicidů (F) jako synergistů pro pyretroid **tau-fluvalinate (TF)**

Příloha 2c: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřeného na výpočet nejnižší efektivní dávky (NED) pro účinné látky ze skupiny DMIs fungicidů (F) jako synergistů pro pyretroid etofenprox (ET)

Příloha 1a: Tabulka pro záznam primárních dat k zaměřeného na stanovení synergického efektu různých DMIs pro lambda-cyhalothrin (LC). Tato tabulka je použitelná pro různé ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) i pro všechny tři cílové škůdce řepky.

Testovaný druh hmyzu:

Datum sběru:

Plodina / růstová fáze:

Provedené pesticidní aplikace v porostu (pokud známo):

Kdo provedl sběr (kontakt):

Laboratoř, která přijala sběr k testování:

Datum přijetí sběru:

Laboratoř, která připravila sadu testovacích lahviček:

Datum přípravy zkušebních lahviček:

Datum a hodina vkládání brouků do lahviček (= zahájení testu):

Testovaný fungicid (účinná látka):

Hodnocení po 24 hodinách:

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	dávka LC (g ú.l./ha)	dávka F (g ú.l./ha)	Opakování (lahvička) A		Opakování (lahvička) B		Opakování (lahvička) C	
			celkový počet imag vložených do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag vložených do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag vložených do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)
kontrola	0	0						
F150	0	150						
F300	0	300						
LC0,3 ¹	0,3	0						
LC1,5	1,5	0						
LC7,5	7,5	0						
LC37,5	37,5	0						
LC0,012+150	0,012	150						
LC0,06+150	0,06	150						
LC0,3+150	0,3	150						
LC1,5+150	1,5	150						
LC7,5+150	7,5	150						
LC0,012+300	0,012	300						
LC0,06+300	0,06	300						
LC0,3+300	0,3	300						
LC1,5+300	1,5	300						
LC7,5+300	7,5	300						

¹tuto dávku (variantu) nepoužívat u testu s blyskáčkem řepkovým

Příloha 1b: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřeného na stanovení synergického efektu různých DMIs pro tau-fluvalinate (TF). Tato tabulka je použitelná pro různé ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) i pro všechny tři cílové škůdce řepky.

Hodnocení po 24 hod		Datum sběru:		Lokalita (GPS) sběru:				
Testovaný druh hmyzu:		Plodina / růstová fáze:						
Provedené pesticidní aplikace v porostu (pokud známo):		Kdo provedl sběr (kontakt):						
Laboratoř, která přijala sběr k testování:		Datum přijetí sběru:						
Laboratoř, která připravila sadu testovacích lahviček:		Datum přípravy zkušebních lahviček:						
Datum a hodina vkládání brouků do lahviček (= zahájení testu):								
testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	dávka TF (g ú.l./ha)	dávka F (g ú.l./ha)	Opakování (lahvička) A		Opakování (lahvička) B		Opakování (lahvička) C	
			celkový počet imag vložných do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag vložných do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag vložných do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)
kontrola	0	0						
F150	0	150						
F300	0	300						
TF1,92	1,92	0						
TF9,6	9,6	0						
TF48	48	0						
TF240	240	0						
TF0,38+150	0,38	150						
TF0,96+150	0,96	150						
TF1,92+150	1,92	150						
TF9,6+150	9,6	150						
TF48+150	48	150						
TF0,38+300	0,38	300						
TF0,96+300	0,96	300						
TF1,92+300	1,92	300						
TF9,6+300	9,6	300						
TF48+300	48	300						

Příloha 1c: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřeného na stanovení synergického efektu různých DMIs pro etofenprox (ET). Tato tabulka je použitelná pro různé ú.l. ze skupiny DMIs fungicidů (F) i pro všechny tři cílové škůdce řepky

Hodnocení po 24 hod		Datum sběru:		Lokalita (GPS) sběru:	
Testovaný druh hmyzu:		Plodina / růstová fáze:			
Provedené pesticidní aplikace v porostu (pokud známo):		Kdo provedl sběr (kontakt):			
Laboratoř, která přijala sběr k testování:		Datum přijetí sběru:			
Laboratoř, která připravila sadu testovacích lahviček:		Datum přípravy zkušebních lahviček:			
Datum a hodina vkládání brouků do lahviček (= zahájení testu):		Testovaný fungicid (účinná látka):			
testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	dávka ET (g ú.l./ha)	dávka F (g ú.l./ha)	Opakování (lahvička) A	Opakování (lahvička) B	Opakování (lahvička) C
			celkový počet z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)
kontrola	0	0			
F150	0	150			
F300	0	300			
ET2,3	2,3	0			
ET11,5	11,5	0			
ET57,5	57,5	0			
ET287,5	287,5	0			
ET0,46+150	0,46	150			
ET1,15+150	1,15	150			
ET2,3+150	2,3	150			
ET11,5+150	11,5	150			
ET57,5+150	57,5	150			
ET0,46+300	0,46	300			
ET1,15+300	1,15	300			
ET2,3+300	2,3	300			
ET11,5+300	11,5	300			
ET57,5+300	57,5	300			

Příloha 2a: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřeného na výpočet nejnižší efektivní dávky (NED) pro účinné látky ze skupiny DMIs fungicidů (F) jako synergistů pro pyretroid lambda-cyhalothrin (LC)

Hodnocení po 24 hod		Datum sběru:		Lokalita (GPS) sběru:				
Testovaný druh hmyzu:		Plodina / růstová fáze:						
Provedené pesticidní aplikace v porostu (pokud známo):		Kdo provedl sběr (kontakt):						
Laboratoř, která přijala sběr k testování:		Datum přijetí sběru:						
Laboratoř, která připravila sadu testovacích lahviček:		Datum přípravy zkušebních lahviček:						
Datum a hodina vkládání brouků do lahviček (= zahájení testu):		Testovaný fungicid (účinná látka):						
testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	dávka F (g ú.l./ha)	dávka LC (g ú.l./ha)	Opakování (lahvička) A		Opakování (lahvička) B		Opakování (lahvička) C	
			celkový počet imag vložených do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag vložených do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imag vložených do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)
kontrola	0	0						
LC1,5	0	1,5						
F18,75+LC1,5	18,75	1,5						
F37,5+LC1,5	37,5	1,5						
F75+LC1,5	75	1,5						
F150+LC1,5	150	1,5						
F300+LC1,5	300	1,5						

Příloha 2c: Tabulka pro záznam primárních dat k testu zaměřeného na výpočet nejnižší efektivní dávky (NED) pro účinné látky ze skupiny DMIs fungicidů (F) jako synergistů pro pyreteroid etofenprox (ET)

Hodnocení po 24 hod Datum sběru: Lokality (GPS) sběru:

Testovaný druh hmyzu:

Plodina / růstová fáze:

Provedené pesticidní aplikace v porostu (pokud známo):

Kdo provedl sběr (kontakt):

Laboratoř, která přijala sběr k testování:

Datum přijetí sběru:

Laboratoř, která připravila sadu testovacích lahviček:

Datum přípravy zkušebních lahviček:

Datum a hodina vkládání brouků do lahviček (= zahájení testu):

Testovaný fungicid (účinná látka):

testovaná ú.l. nebo kombinace ú.l.	dávka F (g ú.l./ha)	dávka ET (g ú.l./ha)	Opakování (lahvička) A		Opakování (lahvička) B		Opakování (lahvička) C	
			celkový počet imaginých do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imaginých do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)	celkový počet imaginých do lahvičky	z toho počet citlivých (= mrtví + těžce postižení)
kontrola	0	0						
LC1,5	0	11,5						
F18,75+ET11,5	18,75	11,5						
F37,5+ET11,5	37,5	11,5						
F75+ET11,5	75	11,5						
F150+ET11,5	150	11,5						
F300+ET11,5	300	11,5						

