

Rezistence škůdců ovoce k přípravkům na ochranu rostlin a antirezistentní strategie

Školení pro ovocnáře
Skalský Dvůr (20.2.2018),
Seč (1.3.2018)

Prof. RNDr. Ing. František Kocourek, CSc.,
ing. Jitka Stará, PhD.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Připraveno na základě projektu MZe č. QK1710200

Rezistence - ztráta účinnosti ochrany vlivem změn v citlivosti škůdce k aplikovaným přípravkům

Nově se projeví: schopnost hmyzu účinnou látku insekticidu tolerovat, detoxikovat, kompenzovat její účinky, nebo se jejímu působení vyhnout

**Rezistence škůdců ve světě: 14644 případů, 597 druhů škůdců, 336 účinných látek přípravků na ochranu rostlin
(www.pesticideresistance.org)**

Každoročně přibývá počet případů rezistence, případů křížové a mnohočetné rezistence

- **Zvyšují se škody na výnosech a kvalitě produktů**
- **Zvyšuje se potřeba další chemické ochrany**
- **Zvyšují se rizika výskytu reziduí pesticidů v potravinách a rizika pro životní prostředí**

Škůdci rezistentní k insekticidům v ČR

blýskáček řepkový, *Meligethes aeneus* - pyretroidy (**řepka**)

dřepčík olejkový, *Psylliodes chrysocephala* - v ČR neonikotinoidy,
v Německu pyretroidy (**řepka**)

krytonosec šešulový, *Ceutorhynchus obstrictus* – neonikotinoidy (**řepka**)

mšice broskvoňová, *Myzus persicae* - pyretroidy (**řepka, zelenina, viry**)

zápředníček polní, *Plutella xylostella* - pyretroidy (**řepka, zelenina**)

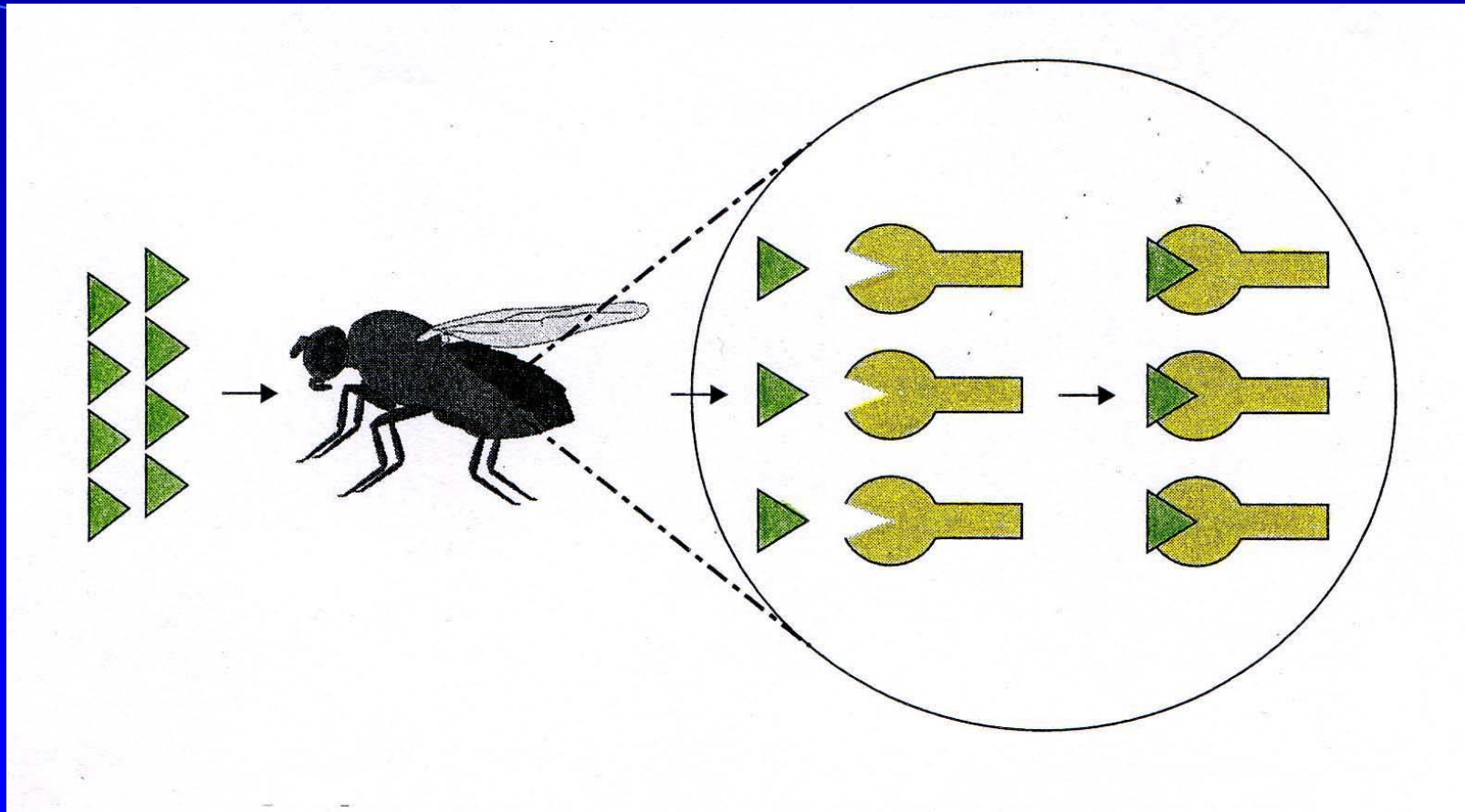
mandelinka bramborová, *Leptinotarsa decemlineata* – organofosfáty,
pyretroidy, 2 ze 3 neonikotinidů (**brambory**)

obaleč jablečný, *Cydia pomonella* - mnohočetná rezistence k přípravkům ze
tří skupin s odlišným mechanismem účinku a také rezistence
k baculovirům (**ovoce**)

mera skvrnitá, *Psylla pyri* - mnohočetná rezistence s proměnlivostí k
přípravkům s odlišným mechanismem účinku (**ovoce**)

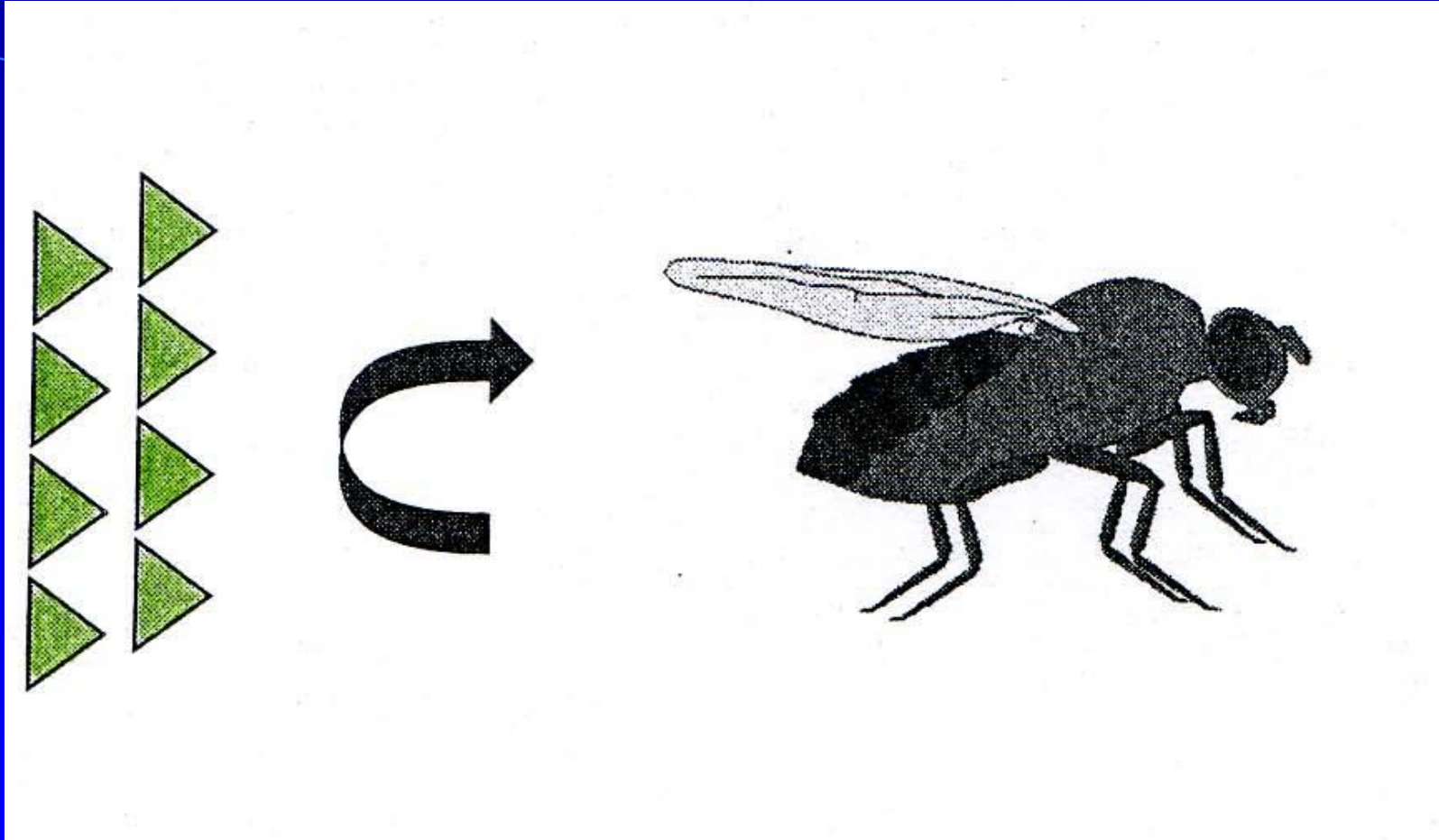
Mechanismy rezistence škůdců k insekticidům

Citlivá populace: působení insekticidu na citlivého jedince



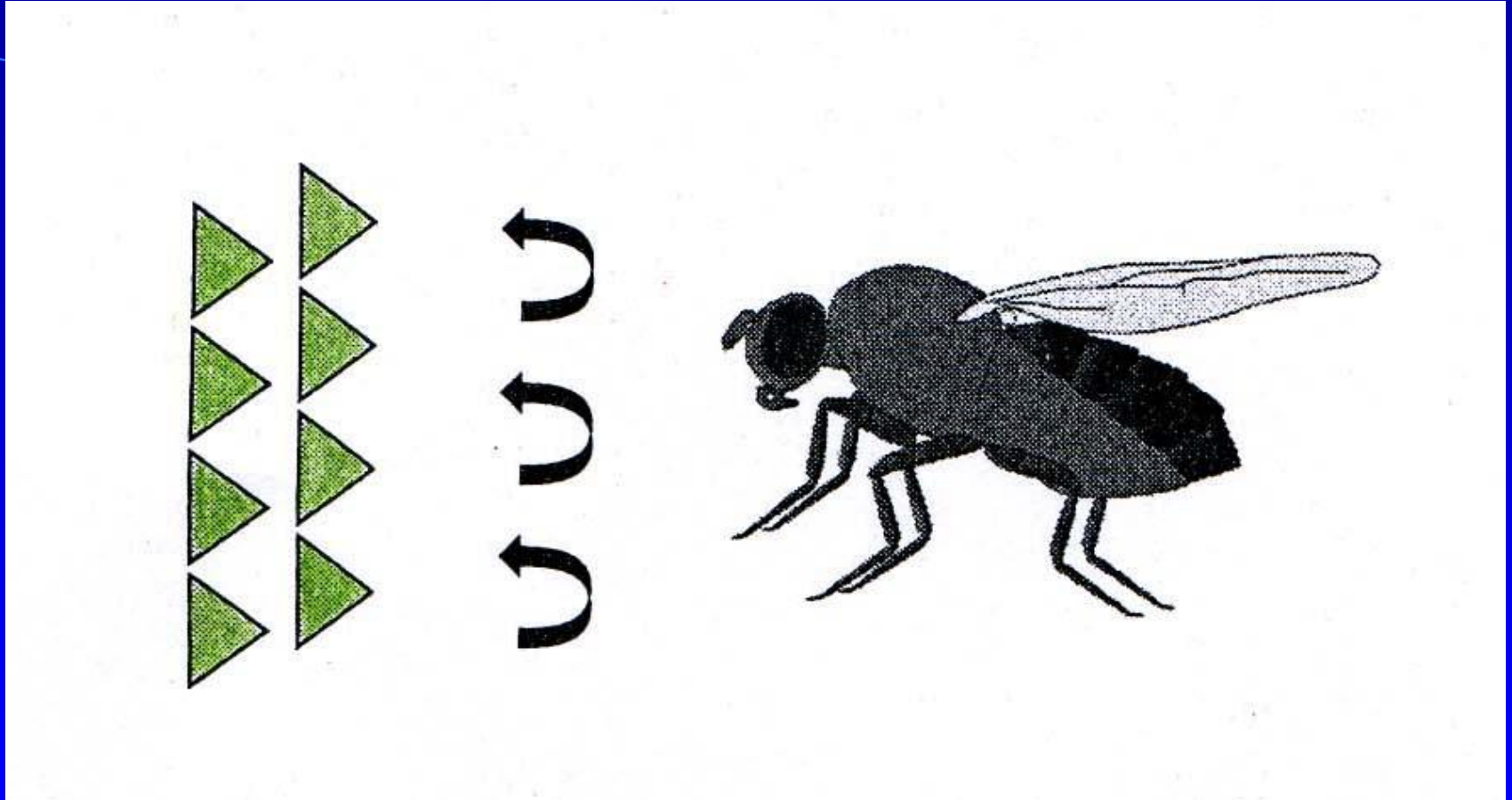
- navázání insekticidu na cílové místo
- narušení nervového systému, trvalá excitace, smrt

Rezistence podmíněná změnou chování, tj. vyhnutí se místu, kde byl insekticid aplikován



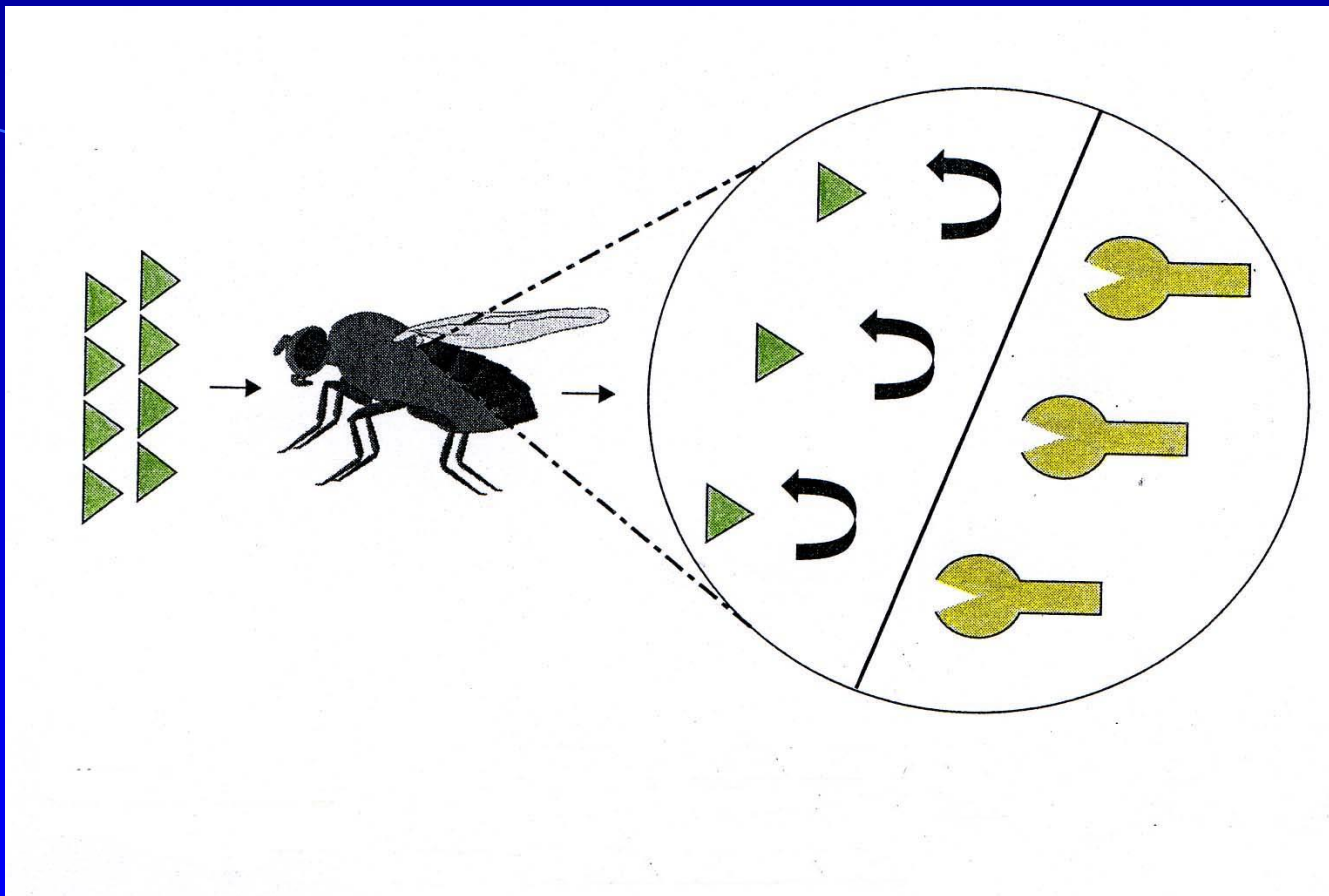
- hmyz se místu ošetřenému insekticidem vyhne

Redukce penetrace účinných látek pesticidu přes kutikulu



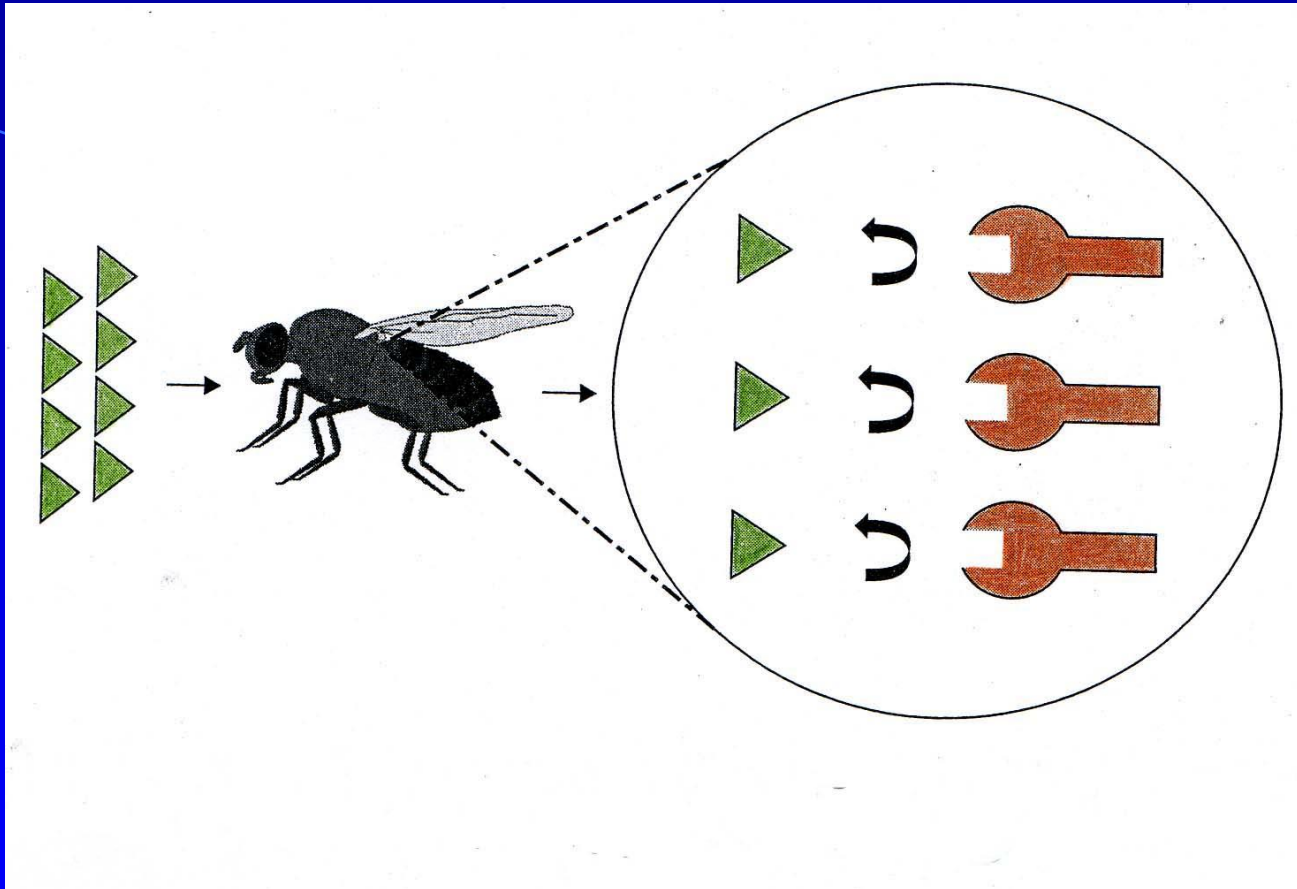
- zpomalení nebo zabránění průchodu insekticidu
- více času na postupnou detoxifikaci

Zvýšené ukládání nebo vylučování účinné látky pesticidu



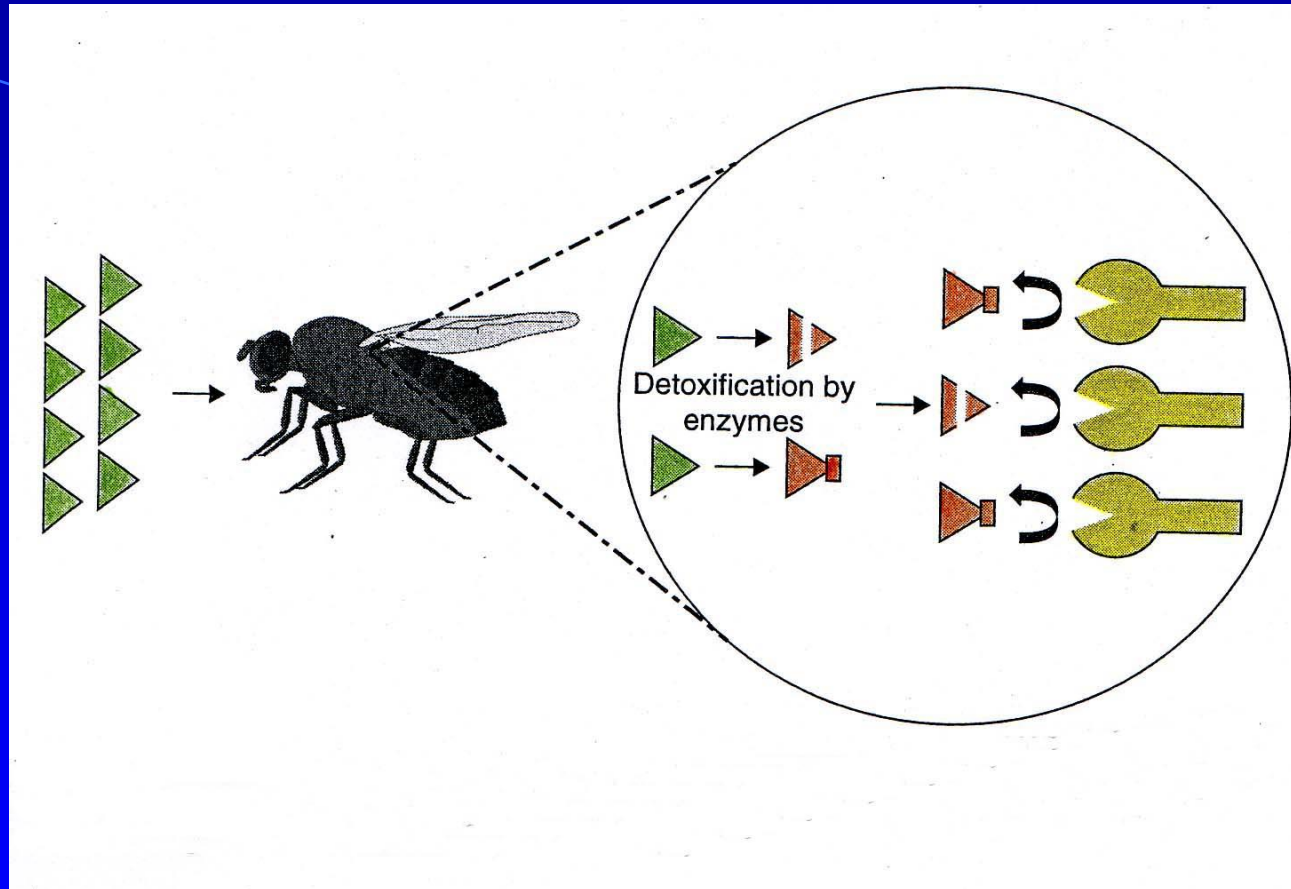
- pesticid je navázán na enzym a transportován mimo cílové místo, např. do tukového tělesa
- využití toxinu na svou obranu – např. *Danaus plexipus*

Redukce citlivosti nervového systému na místě působení insekticidu vlivem mutace genů



- bodová mutace v cílovém místě působení insekticidu (záměna báze nukleotidu, záměna aminokyseliny, změna terciální struktury proteinu)

Zvýšení metabolismu biologicky aktivních látek



- degradace pesticidu specifickými detoxifikačními enzymy

Metody diagnostiky rezistence

- 1) **metody biologické** (kontaktní – topikální, tarsální, ponořovací test; požerový test)
- 2) **metody genetické** (detekce bodových mutací genů – PCR)
- 3) **metody metabolické** (proteomické – detekce enzymů a jejich aktivity)

Metody biologické

- **hodnocení mortality**
- **stanovení tzv. střední letální koncentrace (LC_{50})**
- **porovnání LC_{50} testované populace a LC_{50} citlivé populace**
- **stanovení indexu rezistence $RR = LC_{50}$ rezistentní populace / LC_{50} citlivé populace škůdce)**
 - - čím vyšší je RR , tím vyšší je úroveň rezistence testované populace k danému přípravku

REZISTENCE OBALEČE JABLEČNÉHO (*CYDIA POMONELLA*) V ČR



- testování rezistence k přípravkům s ovicidním i larvicidním účinkem
- použití biologických metod hodnocení
 - testy účinnosti na housenky L5 - topikální aplikace
 - testy účinnosti na housenky L1 - ošetření semisyntetické diety a následné vysazení housenek
 - testy účinnosti na vajíčka – ošetření zaizolovaných větví jabloní a následné vypuštění dospělců k naklazení vajíček

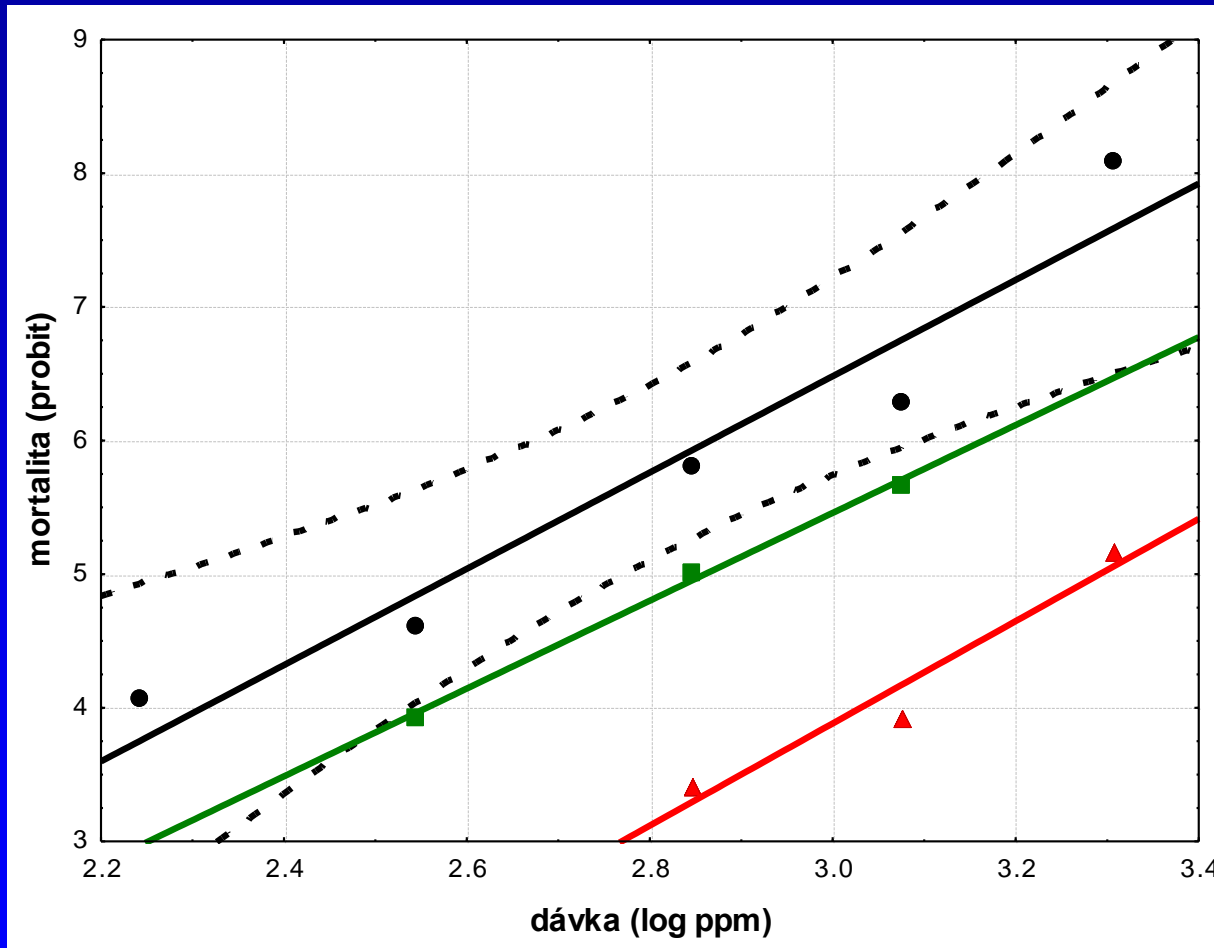
TESTY NA HOUSENKÁCH L1



TESTY NA HOUSENKÁCH L5

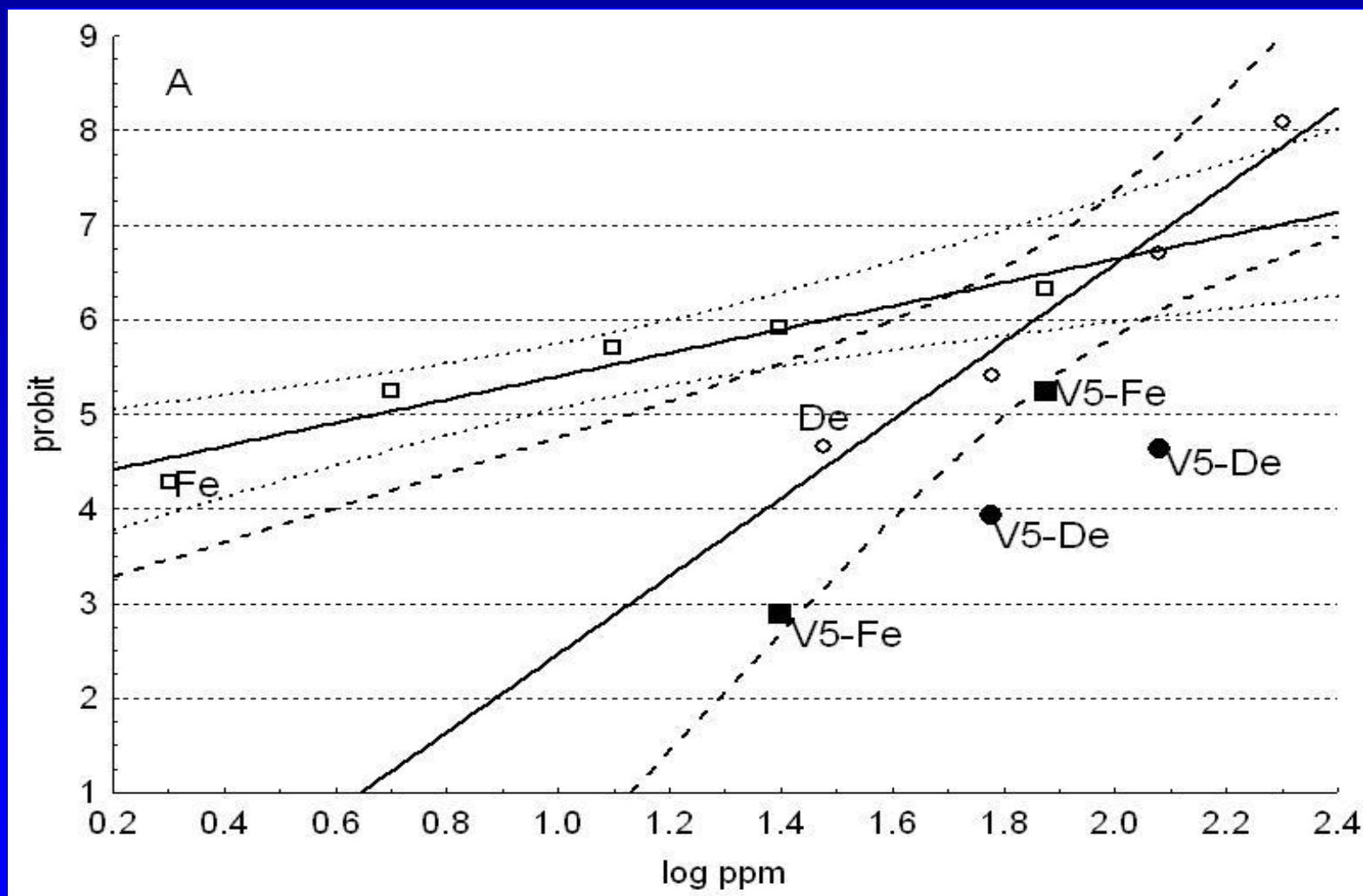


MORTALITA OBALEČE JABLEČNÉHO V ZÁVISLOSTI NA DÁVCE PŘÍPRAVKU ZOLONE 35 EC



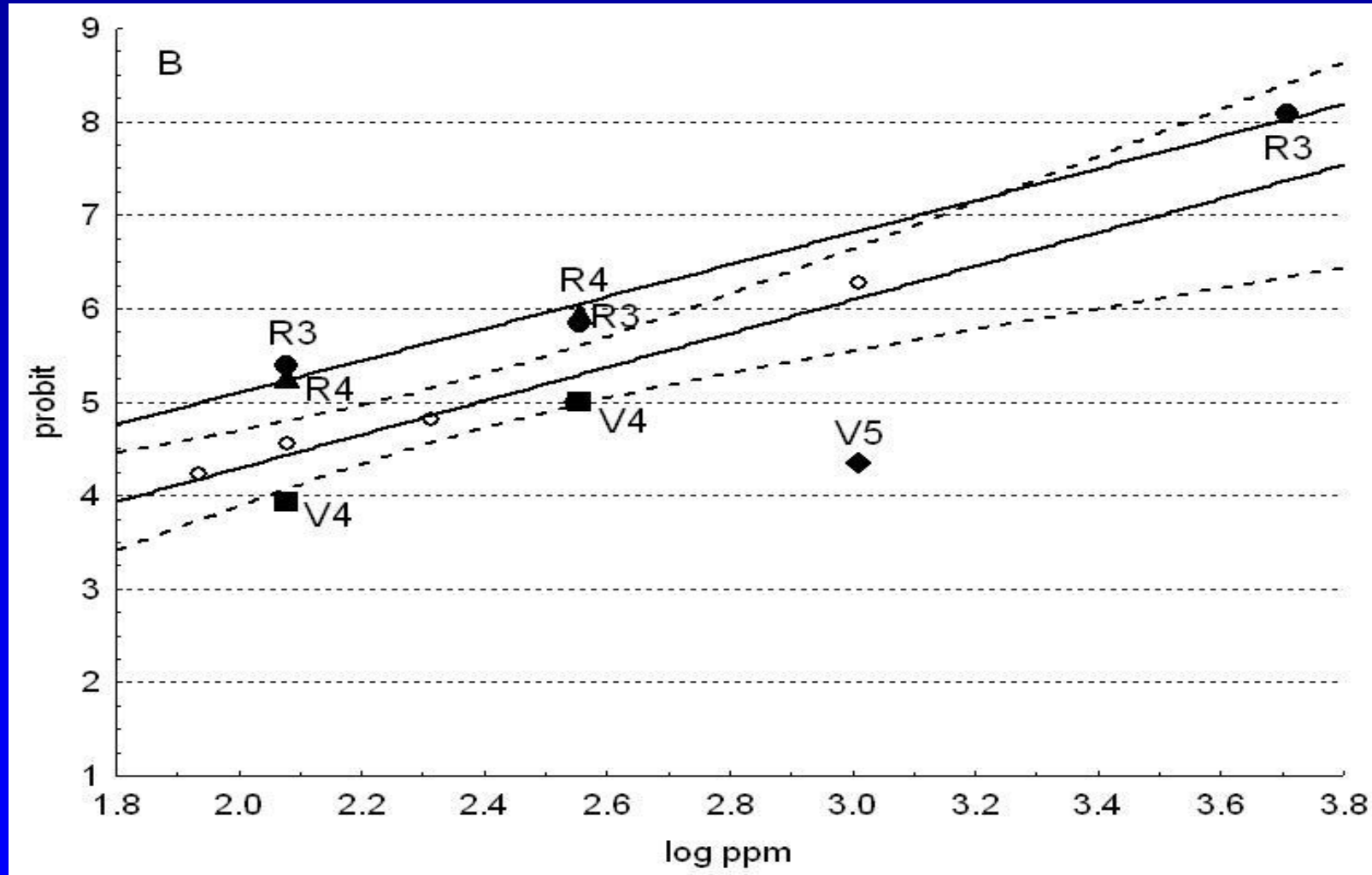
citlivá populace (černá), SČ (zelená), JM (červená)

Ovicidní účinnost fenoxycarbu (Fe) a diflubenzuronu (De) na citlivý laboratorní kmen obaleče jablečného a polní populaci z Velkých Bílovic (V5)



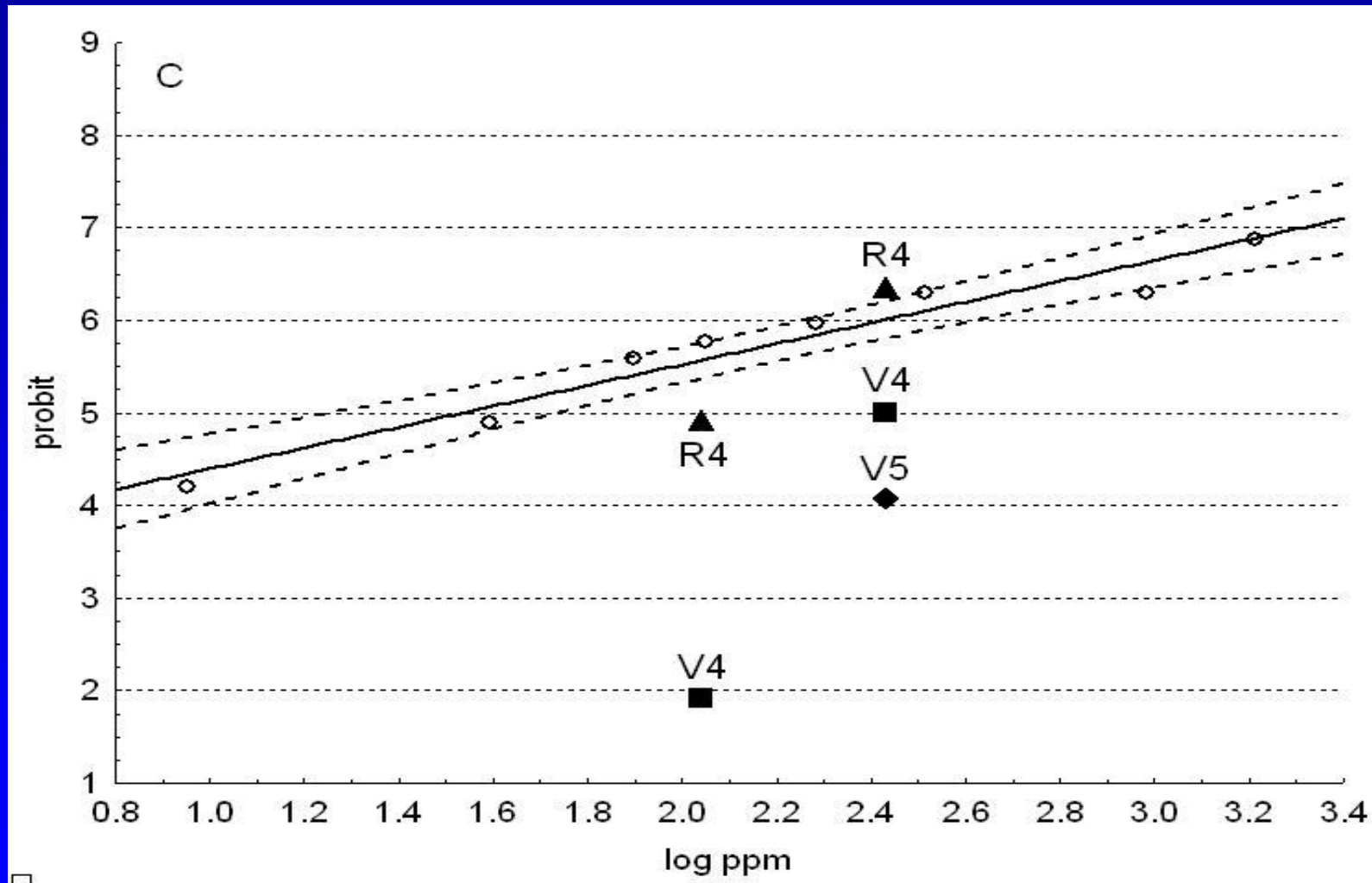
Závěr: Zjištěna rezistence k fenoxycarbu (RR = 14,21) i diflubenzuronu (4,24)

Larvicidní účinnost diflubenzuronu na citlivý laboratorní kmen obaleče jablečného a polní populace z Velkých Bílovic (V4,V5) a Ruzyně (R3,R4)



Závěr: Zjištěn náznak rezistence u populace z Velkých Bílovic (RR = 1,46)

Larvicidní účinnost teflubenuronu na citlivý laboratorní kmen obaleče jablečného a polní populace z Velkých Bílovic (V4,V5) a Ruzyně (R4)



Závěr: Zjištěna rezistence obou populací (V. Bílovice RR = 7,89 Ruzyně RR = 3,38)

Obaleč jablečný - zjištěné výsledky

U lokálních populací prokázána mnohočetná (multiple) rezistence k juvenoidům, inhibitorům tvorby chitinu a organofosfátům:

Insegar 25 WG RR=14,21 (jižní Morava)

Nomolt 15 SC RR=7,89 (jižní Morava)

RR=3,38 (střední Čechy)

Zolone 35 EC RR=4,73 (jižní Morava)

RR = 1,87 (střední Čechy)

Stará J., Kocourek F. 2007: Insecticidal Resistance and Cross-Resistance in Populations of *Cydia pomonella* (Lep.: Tortricidae) in Central Europe, *Journal of Economic Entomology* 100: 1587-1595

Přehled hlavních účinných látek přípravků využívaných v sadech k ochraně proti obaleči jablečnému

Účinná látka/ Příloha graf číslo	Model degradace C ₀	Model degradace k	Termín poslední aplikace	Rezistence nebo její riziko	Toxicita pro včely	Toxicita pro přirozené nepřátele
diflubenzuron	0,128	-0,017	do květu	xxx	0	xx
acetamiprid	0,071	-0,020	do 20.5.	?	0	xx
thiacloprid	0,050	-0,019	do 15.6.	?	0	xx
methoxyfenozide	0,298	-0,040	do 15.6.	x	0	0
indoxacarb	0,104	-0,033	do 30.6.	xx	0	0
chorpyrifos-methyl	0,112	-0,095	do 10.7.	xxx	xxx	xx
fenoxycarb	0,081	-0,030	do 10.7.	xxx	xxx	xx
spinosad	0,046	-0,179	do 10.7.	0	xxx	xx
baculoviry	x	x	bez omezení	xx	0	0
Bacillus thuringeinsis	x	x	bez omezení	x	0	0
feromony dezorientace	x	x	bez omezení	0	0	0

Účinná látka	Toxicita na taxony
diflubenzuron	pavouci, zlatoočky, slunéčka, ploštice, škvoři
acetamiprid	zlatoočky, slunéčka, ploštice, škvoři, parazitoidi
thiacloprid	slunéčka, parazitoidi, pavouci, ploštice, střevlíci
chlorpyrifos-methyl	slunéčka, parazitoidi, pavouci, ploštice, střevlíci, zlatoočky
fenoxycarb	ploštice, parazitoidi, zlatoočky
spinosad	parazitoidi



OBECNÉ ÚDAJE

ÚDAJE K APLIKACI

Přípravek (obch. název)	Zařazení	Účinná látka nebo agens	Toxicita člověk	Toxicita včely	Toxicita predátorů	Fyto- toxicita	Dávka (kg, l/ha)	Ochranná lhůta (dny)	Cílený organismus
BIOPREPAREDY									
Lepinox Plus	I, BT	<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	0	1	-	houzavky motýlů
SpinTor	I, BT	spinosad	-	-	sl, op, sl, šk	0	0,6	7	obaloch, květopas j.
Carpovirusine	I, BT	cepv	-	-	-	0	1	3	obaloch jabloňový
Madex	I, BT	cepv	-	-	-	0	0,1	AT	obaloch jabloňový
Heterorhabditis	BH	<i>H. bacteriophora</i>	-	-	-	-	0,5 ml/kg/m ²	-	biokonzec labečkový
BIOAGENS									
Biolaegens - TP	BR	<i>Typhlodromus pyri</i>	-	-	-	-	Škajstrom	-	avilušky
<i>Typhlodromus pyri</i>	BR	<i>Typhlodromus pyri</i>	-	-	-	-	Škajstrom	-	avilušky
FEROMONY (METODA DEZORIENTACE)									
Isomate C Plus	F	samičí feromony o. jablonoňáta	-	-	-	-	1000 ks	-	obaloch jabloňový
Isomate CLR	F	samičí feromony cílených druhů	-	-	-	-	1000 ks	-	o. jabloňový, o. zimolecový a o. zahradní
Isomate OFM rosso	F	samičí feromony cílených druhů	-	-	-	-	500 ks	-	o. švestkový, o. olivoňový
BOTANICKÉ INSEKTICIDY									
Spruzit-Flüssig	I, B	pyrethrin	-	toxický	sl, sl, zl, šk, aj	0	0,1%	2	zavi a šnvi škůdci
NeemAzal-T/S	I, B	azadirachtin	-	-	Pc	2	3	-	mšice
Quassia amara	I, B	dřevo z <i>Q. amara</i>	-	-	-	1	3-4,5	-	pilátka jabloňová
Rock Effect	F, B	olej z <i>P. pinnata</i>	-	-	NH	2	1-3%	1	mšice, avilušky
OLEJE									
Biolol	O, FP	olej řepkový	-	-	NH	3	1-3%	-	přisavující škůdci
Ekol	AD, AJ	olej řepkový	-	-	NH	3	1-1,5	AT	přisavující škůdci
Prev-82	-	pomerančový olej	-	-	-	2	0,3%	AT	moty, mšice, avilušky

VYSVĚTLIVKY

Zařazení přípravků: F=fungicid, I=insekticid, BT=bioprepárat, BR=biogena-produktor, BH=biogena-onťomopatogenní houbička, AD=adjuvum, AJ=adjuvant, O=olej, FP=fyzikální působení, P=parazitní pomocný prostředek, PE=opodpora závažnostního stavu, NB=neoploní

Toxicita: NH=toxicita neškodná, NK=nevýsadující klasifikace, Sl=slabě škodlivé, OP=odrávené plošice, P=prašičky, Sl=sluněčka, Š=škvorec, Z=zlatotočky

Fytotoxicita: 0=přípravek není fytotoxický, 1=malé riziko fytotoxicity, 2=střední riziko fytotoxicity, 3=vysoké fytotoxicita, (-)=údaj není poskytnutý, N=údaj chybí

Přípravky pro střídání proti obaleči jablečnému - antirezistentní strategie

1. **pyretroidy I** (ether pyrethroidy) (Trebon)
2. **pyretroidy II** (ester pyrethroidy) (Cyper, Alimethrin, Alfamethrin, Vaztak, Karate, Decis, Talstar)
3. **neonikotinoidy** (Mospilan, Calypso)
4. **organofosfáty** (Actellic, Reldan, Nurelle)
5. **inhibitory syntézy chitinu** (Alsystin, Dimilin, Nomolt)

Přípravky pro střídání proti obaleči jablečnému - antirezistentní strategie

6. **juvenoidy** (Insegar)

7. **MAC** (Integro)

8. **směsné přípravky na bázi organofosfátů a pyretroidů**(Nurelle)

9. **oxadiaziny** (Stocker, Explicit plus, Steward)

10. **Antradilimiamidy - chlorantraniliprol** (Coragen)

11. **Spinosad** (Spintor)

12. **Baculoviry** (Madex, Madex +, Carpovirusin)

13. **Bacillus thuringiensis** (Lepinox plus)

14. **přípravky na bázi feromonů** (Isomate C plus, Isomate CLR, Ecodian)

Entomopatogenní viry

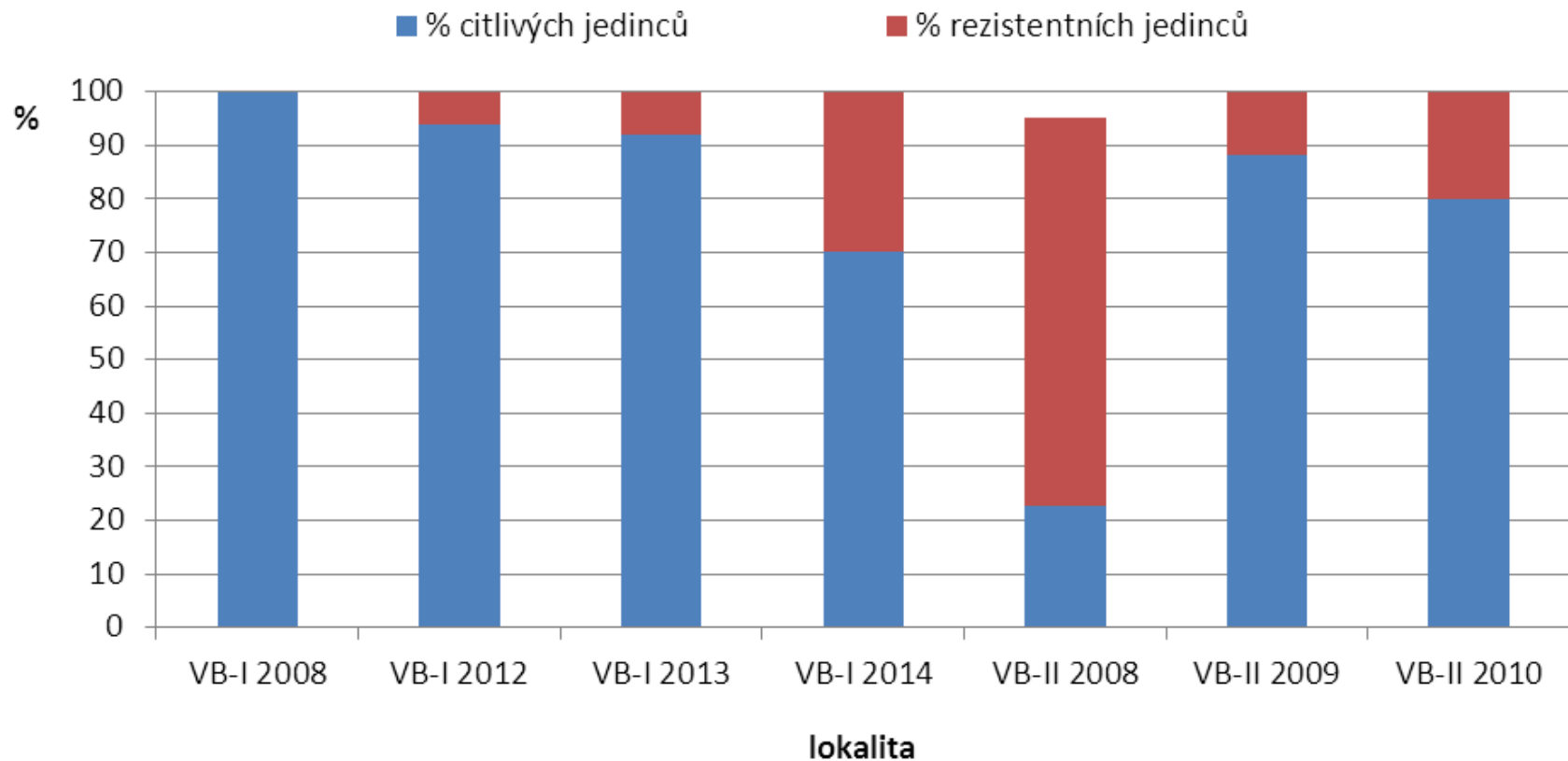
virulentní pro jeden nebo několik málo druhů motýlů,
nejselektivnější prostředky ochrany.

Virus granulózy obaleče jablečného (CpGV): účinkuje požerově,
v populacích téměř nepřežívá (nešíří se do dalších generací).

Virus granulózy obaleče zimolezového (AdorGV, AoGV): vleké
infekce (pozdní úhyn housenek), v populacích se uchovává a šíří se do
dalších generací



Podíl citlivých (uhynulých) a rezistentních (živých) housenek obaleče jablečného po 7 dnech biologického testu. Koncentrace CpGV-M ve dietě $10^4 - 3 \times 10^4$ OB/ml (2008) a 3×10^5 OB/ml (2009) (Velké Bílovice 2008 až 2013)



Obaleč jablečný - antirezistentní strategie pro režim ekologické produkce ovoce

Střídání přípravků a metod ochrany s různým mechanismem účinku

- Střídání přípravků na bázi **CpGV**, dvou odlišných izolátů po sobě v následujících letech, nebo po sobě v následujících generacích
- **Madex, Carpovirusine** (izolát CpGV-M) a **Madex Top** (izolát CpGv-V15) - pro tyto dva izoláty není dosud známý výskyt cross-rezistence
- Střídání přípravků na bázi **CpGV** s přípravky na bázi *Bacillus thuringiensis*.
- Střídání přípravků s přípravky na bázi účinné látky **spinosad**.
- Využívání **metody dezorientace**, zejména tam, kde rezistence k CpGv byla prokázána, nebo kde je riziko selekce rezistence vysoké vlivem dlouholetého ošetřování přípravky na bázi CpGv-M.

Metoda dezorientace – matting disruption



ISOMATE® C plus

Složení: feromon obaleče jablečného

ISOMATE® C LR

Složení: feromon obaleče jablečného + obaleče zimolezového + obaleče ovocného

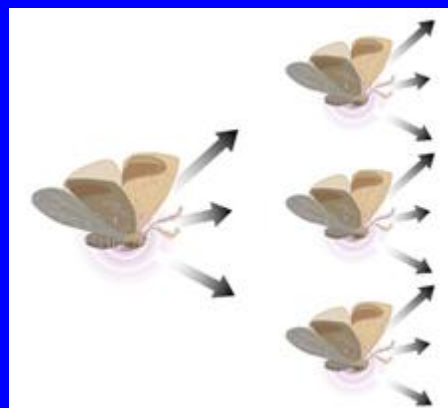
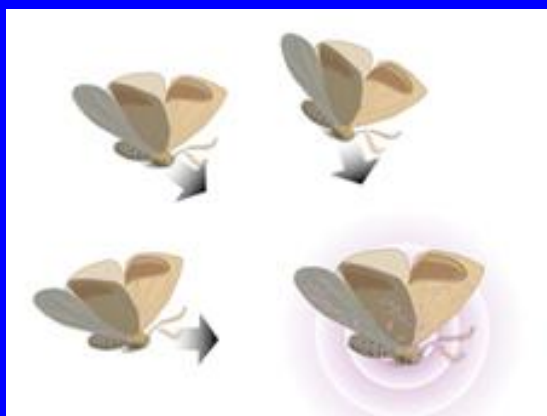


ECODIANE

Složení: feromon obaleče jablečného

Přilákej a změň pohlaví– *perspektiva využití*

Exosex™ Auto-Confusion



Mery na hrušních

rychlá selekce rezistentních populací k insekticidům,
úplné selhání ochrany, vysoké náklady na ochranu

- **mera skvrnitá (*Cacopsylla pyri*)**
 - hlavní škůdce (95 -98% výskytu)
- **mera ovocná (*Cacopsylla pyrisuga*)**
 - v Čechách (5 – 10% výskytu)
- **mera hrušňová (*Cacopsylla pyricola*)**
 - u nás vzácný druh (na jižní Moravě)



Monitoring výskytu mer

Vajíčka a nymfy před květem - **0,4 vajíčka na 1 n** - 25 větviček dvouletého dřeva o délce 20 cm (5m délky), úhlopříčně z výsadby hrušní.

Vajíčka a nymfy po odkvětu – **10/100 listů nebo 40/100 listových růžic** (úhlopříčně 25 růžic s listy a plody).

Sklepávání:

dospělci mer: **20/100 sklepů**

25 sklepů – po jednom sklepu ze stromu rovnoběžně rozmístěné na ploše výsadby/sklepávací ploše o ploše 0,25 m².



Účinnost přípravků na dospělce a nymfy mery skvrnité

- účinnost přípravků je rozdílná na dospělce a nymfy
- testované přípravky byly mnohem účinnější vůči nymfám než vůči dospělcům

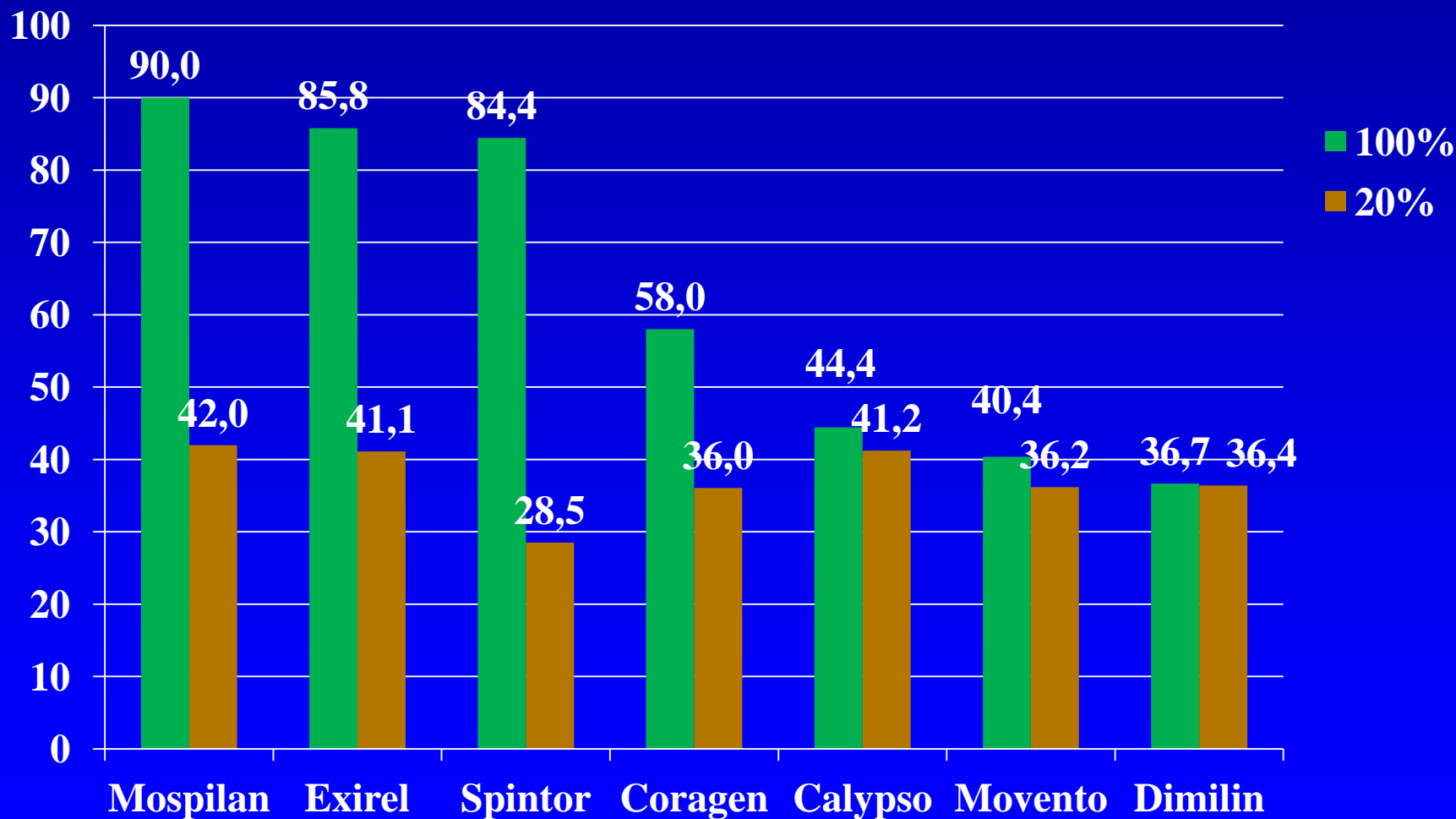
Účinnost na dospělce:

- nejvyšší účinnost na populaci Slaný (2017) v doporučené dávce vykazovaly přípravky Mospilan 20 SP, Spintor a Coragen a nereg. přípravek Exirel
- snížená účinnost přípravků Calypso 480 SC a Dimilin 48 SC

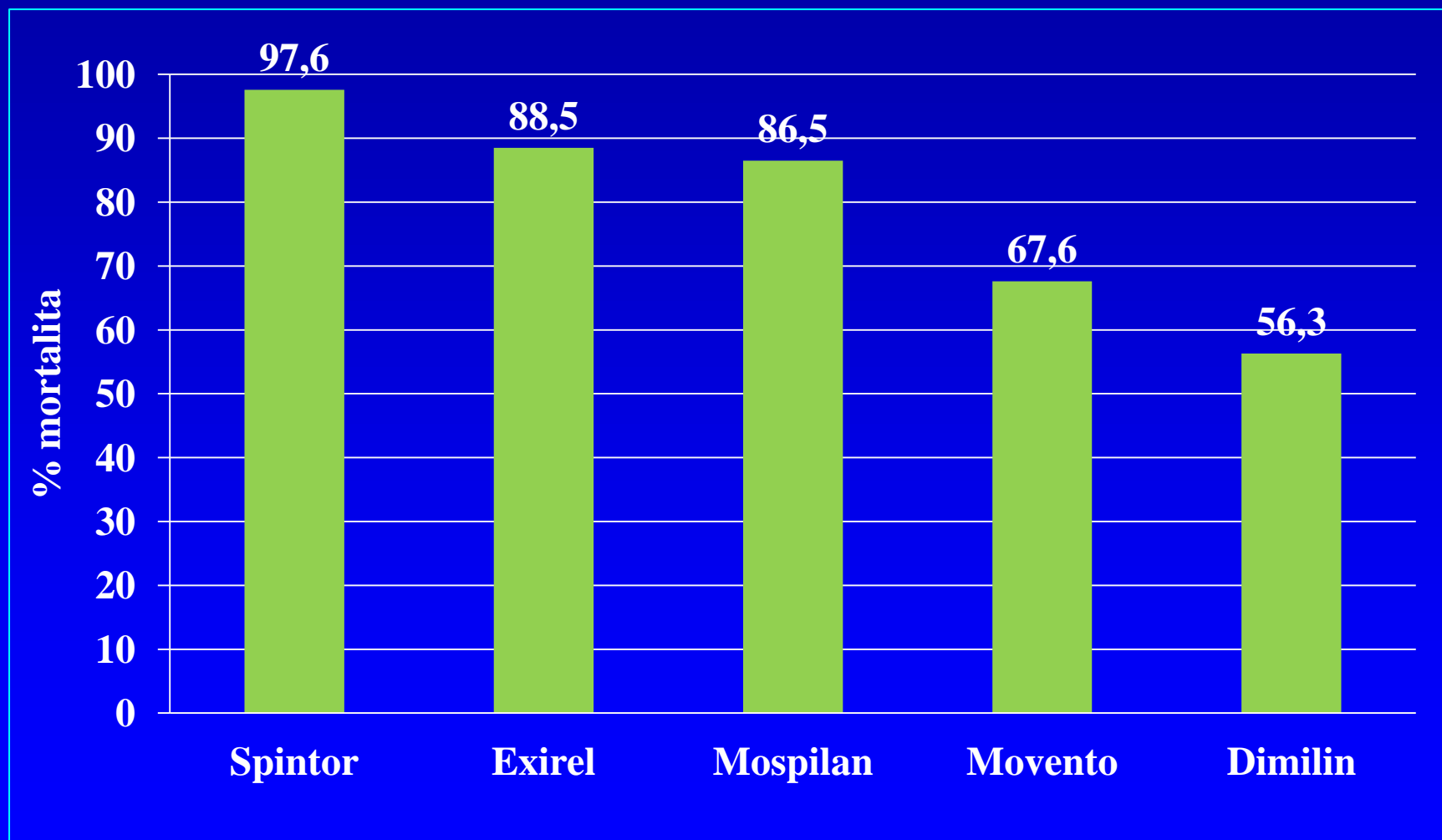
Účinnost na nymfy:

- nejvyšší účinnost na populaci Slaný (2017) v doporučené dávce vykazovaly přípravky Spintor a Mospilan 20 SP a nereg. přípravek Exirel
- snížená účinnost přípravku Dimilin 48 SC
- v testu z roku 2014 vykazoval vysokou účinnost na nymfy přípravek Spruzit (ekologické pěstování)

Biologická účinnost přípravků na **dospělce** mery skvrnité po topikální aplikaci ve 100% a 20% dávce



Mortalita nymf mery skvrnité po aplikaci přípravků na větve hrušní v registrovaných dávkách



HISTIRIE - co bylo? ROK 1995, ROK 2010

ROK 1995: mnohočetná rezistence k organofosfátům a pyretroidům – až 100 % ztráty, kácení hrušňových sadů

- **ochrana pomocí regulátorů růstu (Dimilin, Nomolt – ochrana účinná po více než 10 let)**

ROK 2010

- **Sanmite 20WP – nosný přípravek (zdvojená aplikace), povolen pouze 2x v sezóně (v současnosti rezistence a ukončení registrace)**
- **Vertimec 1,8EC – povolen pouze 1x v sezóně**
- **Calypso 480SC, Mospilan 20SP (větší negativní vliv na přirozené nepřátele)**
- **Nomolt 15SC (Dimilin) – selekce rezistence (počátek neúčinnosti)**
- **Spintor – registrován pouze do jabloní, ale na meru účinný**
- **Cascade 5EC (registrace ukončena) nebo Reldan 40EC (rezistence)**

ANTIREZISTETNÍ STRATEGIE – ROK 2018

Ovicidy a repelenty (před květem) – Ekol, kaolín

Ovolarvicidy - při maximu výskytu vajíček (při zjištění výskytu prvních nymf) - **nejvíce účinné na vylíhlé nymfy**

- **Mospilan 20SP** (acetamiprid) – pouze na první generaci (negativní vliv na přirozené nepřátele)
- **Spintor** (spinosad) – pouze na první generaci (negativní vliv na přirozené nepřátele)
- **Safran, Vargas, Vertimec 1,8 EC** (vše abamectin) – max. 2x za sezónu
- **Voliam Targo** (chlorantraniliprole + abamectin) – max. 1x za sezónu
- **Coragen 20 SC** (chlorantraniliprole)
- **Exirel** (cyantraniliprole) – není dosud registrován

Larvicidy:

- Síran draselný, draselná mýdla – přípravky s fyzikálním mechanismem účinku
- Spruzit (pyrethriny + ř.olej) – povolen pro ekologické pěstování

Metody genetické Rezistence mandelinky bramborové

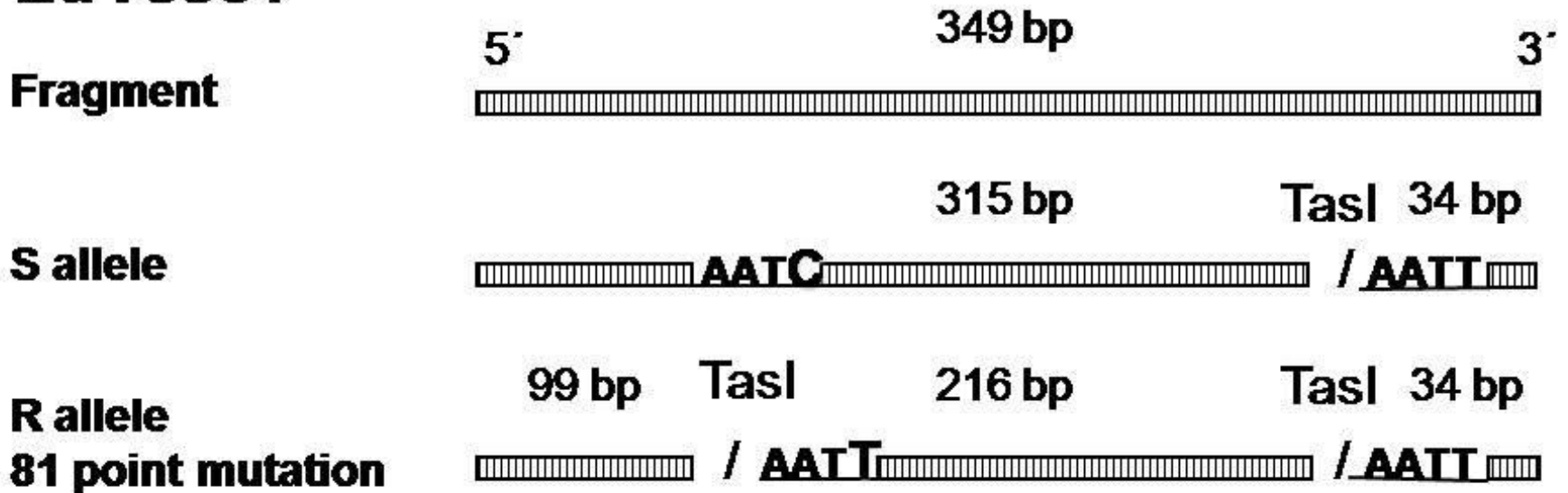


- použití metod molekulární diagnostiky Bi-PASA a RFLP pro detekci rezistence:
- k pyretroidům
 - výskyt bodové mutace báze C na T, která vede ke změně aminokyseliny leucin na fenylalanin (L1014F) v genu Vssc1 (voltage-sensitive sodium channel gene)
- k organofosfátům
 - výskyt bodové mutace báze A na G, která vede ke změně aminokyseliny serin na glycin (S291G) v genu AChE

Rezistence mandelinky bramborové k pyretroidům – typ *kdr*- mutace C na T v genu *LdVssc1*

RFLP

LdVssc1



S allele = citlivá alela

R allele = rezistentní alela

Sekvenování – zjištění výskytu mutací ve vybraném úseku genu

```
S      (181) ATGTCCAGTGAACGCGCGAGAACAAATCGGTAAAATTCTCATACAGGACTGTGGCTGCAAC
R1     (974) ATGTCCGGTGAACGCGCGAGAACAAATCGGTAAAATTCTCATACAGGACTGTGGCTGCAAC
R2     (181) ATGTCCGGTGAACGCGCGAGAACAAATCGGTAAAATTCTCATACAGGACTGTGGCTGCAAY
```

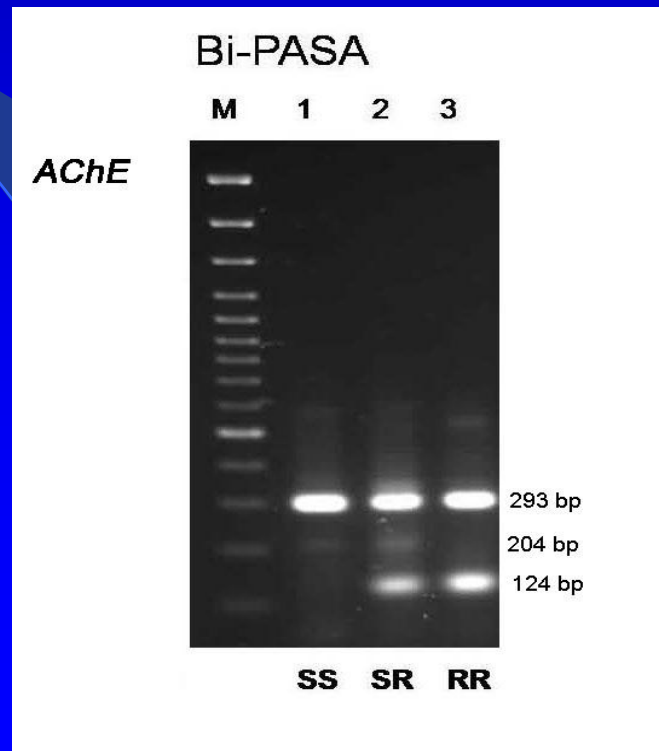
Y = C or T W = A or T

R1 = referenční sekvence rezistentního jedince

S = citlivý jedinec

R2 = rezistentní jedinec s tichými mutacemi

Detekce rezistentních genotypů metodou Bi-PASA



U lokálních populací ze středních a východních Čech prokázána multiple rezistence k pyretroidům a organofosfátům

Zichová T., Kocourek F., Salava J., Nadřová K., Stará J. 2010: Detection of resistance to organophosphates and pyrethroids in Central European *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods, *Pest Management Science*, 66(8): 853-860

podíl homozygotů rezistentních k pyretroidům

- 20.0% - 22.9%

podíl homozygotů rezistentních k organofosfátům

- 52.9% - 66.7%

podíl homozygotů rezistentních k pyretroidům i k organofosfátům

- 8.6% - 13.6%

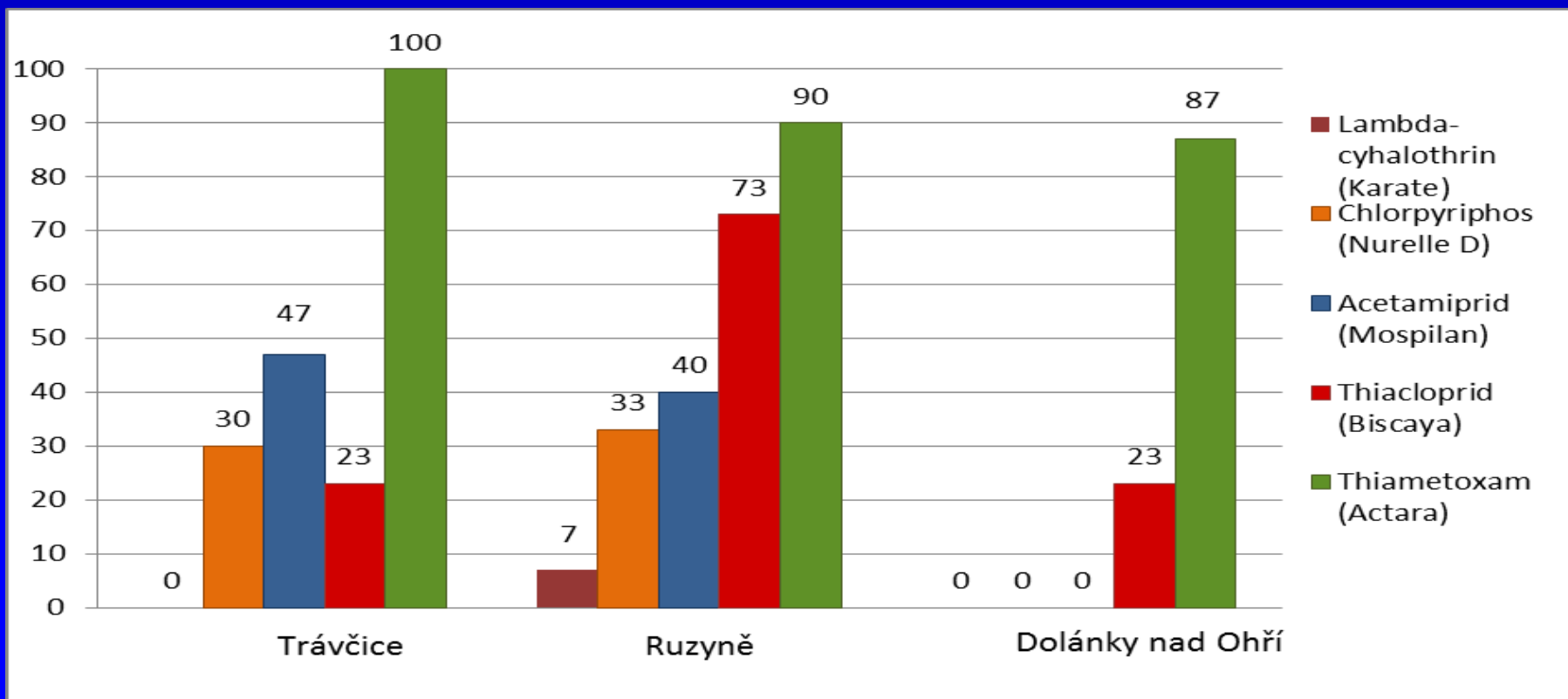
Mortalita larev L2 mandelinky bramborové po topikální aplikaci přípravků odpovídající 100% povolené polní dávky, 2017

Přípravky na bázi thiamethoxamu

- mnohem škodlivější pro včely a ostatní opylovače z řádu blanokřídlých,
- škodlivější pro řadu taxonů přirozených nepřátel škůdců

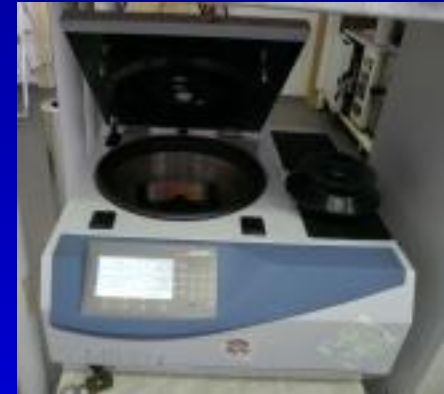
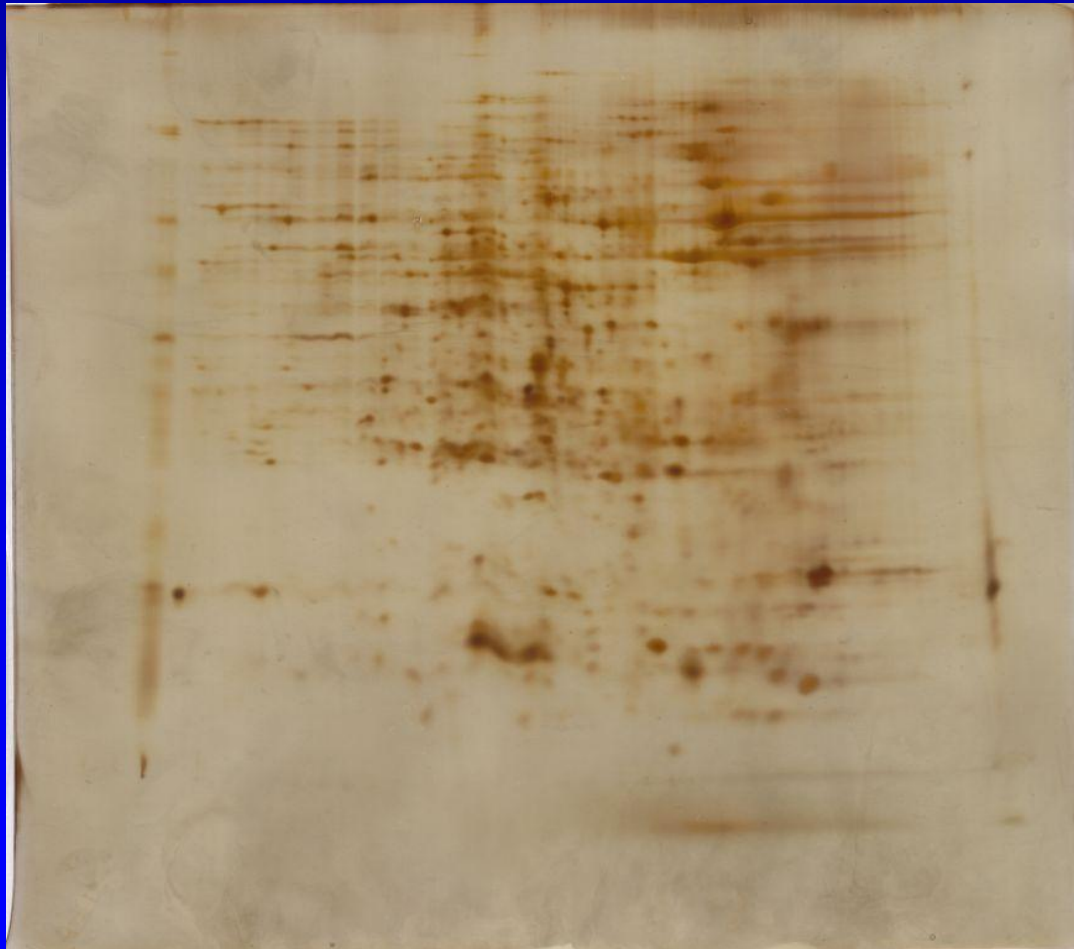
Narůstající rezistence mandelinky bramborové k neonikotinoidům

zvyšování rizik přípravků na včelu medonosnou a opylovače a řadu taxonů přirozených nepřátel škůdců



METODY METABOLICKÉ

OPTIMALIZOVANÉ DĚLENÍ PROTEINU 2D ELEKTROFORÉZOU PRO IDENTIFIKACI REZISTENCE NA PROTEINOVÉ ÚROVNI, BARVENO STŘÍBREM, IEF POUŽIT 13CM STRIP



Identifikace detoxifikačních enzymů: GST, P450 a monooxygenázy

Antirezistentní strategie – zásady pro orgány členských zemí EU

- Poskytování informací zemědělcům o hrozbě rezistence konkrétního škůdce a o strategiích, jak dalšímu vývoji rezistence zabránit
- Získávání informací o problematice rezistence od výrobců pesticidů a vyhodnocování získaných údajů
- Doporučení nesnižovat aplikovanou dávku přípravku
- Doporučení střídání přípravků z různých skupin účinných látek v závislosti na druhu škůdce (strategie založena na rozdílném mechanismu účinku)

Antirezistentní strategie

– shrnutí obecných zásad pro pěstitele

- používat pesticidy v minimální míře
- nepoužívat perzistentní pesticidy, které jsou dlouhodobě přítomny v prostředí
- střídat pesticidy z různých skupin účinných látek, střídat pesticidy s různým mechanismem účinku
- vytváření refugií, tj. určitého podílu plochy plodiny, která nebude pesticidy ošetřena (takové plochy umožňují udržovat v populaci jedince citlivé k pesticidu a zpomalují tak rozvoj rezistence)

Antirezistentní strategie

– shrnutí obecných zásad pro pěstitele

- používat tank-mix přípravků pouze v případě, že je takový způsob použití povolen výrobcem; nepoužívat tank-mix přípravků se stejným mechanismem účinku
- aplikovat pesticidy pouze v případě překročení prahových hodnot, aplikace pouze na plochy, kde byly prahové hodnoty překročeny (selektivní ošetření, okrajové ošetření)
- aplikaci přípravků nutno přizpůsobit teplotním podmínkám, tj. ošetřovat u pyretroidů při teplotách pod 20 °C, u organofosfátů nad 15 °C.

Děkuji za pozornost

