



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Bakalářská práce

Identifikace RNA elementů u hub

Autorka práce: Barbora Píchalová

Vedoucí práce: Mgr. Tonka Tomáš Ph.D.

České Budějovice
2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

V současné době se do popředí zájmu výzkumu dostávají interakce mezi houbami, mykoviry a životním prostředím. Říše *Fungi* zahrnuje ekologicky a ekonomicky významné druhy hub, které mohou působit jako patogeny či symbionti, nebo se mohou vyskytovat v půdě jako mykorhizní a endofytní houby. Navzdory jejich ekologickému, biomedicínskému a průmyslovému významu stále chybí fylogenetické studie celé řady hub a jejich virů. Pro pochopení základních vztahů mezi mykoviry a jejich houbovými hostiteli je zásadní studium biologických vlastností, distribuce a přenosu nejen samotných virů, ale také hub. Tato studie si klade za cíl identifikovat jednotlivé druhy hub a zjistit, zda se v nich nachází mykoviry. Pro výzkum diverzity byly využity vzorky hub sbíraných na území České republiky během roku 2020 a 2021. K jejich detekci a identifikaci byly zvoleny molekulárně genetické metody. DNA z hub byla izolována pomocí CTAB-PVP, úsek DNA byl amplifikován pomocí sekvence oblasti ITS, translačního elongačního faktoru TEF1- α genu a genu β -tubulinu. Na základě sekvencí byl pro vzorky vytvořen fylogenetický strom podle genetické podobnosti mezi jednotlivými rody. Pro detekci mykovirů byla využita metoda izolace dsRNA pomocí fenol-chloroformu a celulózy a vzorky byly vyhodnoceny pomocí agarózové elektroforézy.

Klíčová slova: Říše *Fungi*, mykoviry, dsRNA, fylogenetický strom

Abstract

Nowadays, the focus of fungus, mycovirus and environmental interactions has expanded. The kingdom of *Fungi* includes ecologically and economically important species of fungi that are pathogenic or symbiotic or can occur in the soil as mycorrhizal and endophytic fungi. Despite their ecological significance, biomedical and industrial importance, phylogenomic studies of *Fungi* and their viruses are lacking. To understand the basic interactions between mycoviruses and their fungal hosts, the study of the biological properties, distribution and transmission is required. This study aims to identify different species of fungi and determine the interaction between fungus and virus. Samples collected in the Czech Republic during 2020 and 2021 were used for diversity research and molecular genetic methods were chosen for their detection and identification. DNA was isolated using CTAB-PVP, the DNA segment was amplified and phylogenetically analyzed using the sequences of internal transcribed spacers (ITS), the translation elongation factor (TEF) 1-alpha gene and the beta-tubulin gene. Based on the sequences, a phylogenetic tree was created for the samples according to the genetic similarity between the individual genera. The method of dsRNA isolation using phenol-chloroform and cellulose was used for the detection of mycoviruses.

Keywords: The kingdom *Fungi*, mycoviruses, dsRNA, phylogenetic tree

Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem členům Katedry genetiky a zemědělských biotechnologií, především svému vedoucímu práce Mgr. Tomášovi Tonkovi Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a trpělivost. Tímto bych také ráda poděkovala své rodině a svému příteli za neutuchající podporu a trpělivost.

Obsah

Úvod.....	8
1 Houby.....	9
1.1 Endofytní houby	10
1.2 Entomopatogenní houby.....	11
1.3 Mykorrhizní houby	12
1.4 Molekulární techniky pro identifikaci hub	13
2 Víry jako původci onemocnění hub	16
2.1 Taxonomie virů	16
2.2 Rozšíření mykovirů	17
2.3 Dvouvláknové RNA (dsRNA) mykoviry	18
2.4 Přenos mykovirů.....	20
2.5 Hypovirulentní mykoviry	20
2.6 Aplikace mykovirů v ochraně rostlin	21
2.7 Detekce mykovirů	22
3 Cíl práce	24
4 Metodika	25
4.1 Metodika kultivace hub na živném médiu	25
4.2 Metodika izolace DNA z hub	25
4.3 Spektrofotometrické vyhodnocení koncentrace extrahované DNA	27
4.4 Metodika polymerázové řetězcové reakce (PCR).....	27
4.5 Elektroforetické vyhodnocení vzorků	28
4.6 Identifikace vzorků hub pomocí sekvenování a fylogenetická analýza	29
4.7 Metodika izolace dsRNA elementů z hub	30
5 Výsledky	32
5.1 Identifikace hub z neznámých vzorků.....	32

5.2	Detekce dsRNA mykovirů u identifikovaných hub	39
6	Diskuse.....	40
6.1	Identifikace vzorků hub.....	40
6.2	Detekce mykovirů u hub	41
7	Závěr	43
	Seznam použité literatury.....	44
	Seznam obrázků	50
	Seznam tabulek	51
	Seznam příloh.....	52
	Seznam použitých zkratk.....	55

Úvod

Říše *Fungi* tvoří hned po hmyzu skupinu organismů s druhou nejvyšší odhadovanou druhovou diverzitou. Jedná se o biologicky rozmanitou skupinu, jejíž členové zahrnují širokou škálu typově odlišných druhů s různorodým způsobem života. Vedle parazitických, symbiotických a mykorrhizních hub se v přírodě vyskytují houby žijící uvnitř rostlinných pletiv známých jako endofytní houby. Houby plní nepostradatelné funkce zejména při udržování a fungování ekosystémů a produkují řadu významných sekundárních metabolitů.

Výzkum diverzity jednotlivých druhů hub byl založen na izolaci z prostředí a kultivaci na živné půdě již od počátku jejich studia a tyto metody se využívají dodnes. Vedle prvotní klasifikace na základě morfologických znaků, se uplatňují především molekulárně genetické metody založené na informacích o nukleotidové sekvenci cílové genové oblasti, které mohou vést k určení druhu, častěji ale jen rodu nebo okruhu rodů. Pokroky v molekulárních technikách tvoří základ pro studium týkající se diverzity hub. Tvorba fylogenetického stromu poskytuje náhled do rozmanitosti této říše a umožňuje nám pochopit evoluční vztahy houbových linií, které daly vzniknout systému hub jaký známe dnes.

V poslední době se zvýšil zájem především o výzkum interakcí mezi houbami a viry. Ačkoliv většina mykovirů nezpůsobuje zjevné příznaky infekce, existuje několik virů, které ovlivňují morfologii, produkci spor, virulenci a růst u svých houbových hostitelů. Dnes jsou viry posuzovány především z hlediska potenciálního využití v programu integrované ochrany proti škodlivým činitelům a některým dalším patogenům na komerčně pěstovaných plodinách. Pro pochopení vztahů mezi viry a jejich hostiteli je nutný rozvoj metod detekce, díky kterým bude možné charakterizovat nové mykoviry.

1 Houby

Houby patří mezi heterotrofní organismy s eukaryotním typem buňky. Tvoří druhově bohatou skupinu organismů zahrnující čtyři hlavní kmeny pravých hub a to *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* a *Zygomycota*. V současné době bylo na *Index Fungorum* zaznamenáno přes 148 000 druhů hub a mnohé z nich nebyly dosud popsány (Hawksworth et al., 2017). Převážná většina hub jsou vláknité haploidní organismy, které se rozmnožují pohlavně nebo nepohlavně prostřednictvím spor a najdeme je téměř v každém prostředí díky vysoké plasticitě a schopnosti se adaptovat na různé nepříznivé podmínky. Tvoří důležitou složku ekosystémů a podílí se na interakcích s ostatními prokaryotickými i eukaryotickými organismy prostřednictvím mutualistických, dekompozičních a parazitických vztahů. Jsou využívány člověkem v zemědělském, farmaceutickém a potravinářském průmyslu a enviromentálních technologiích. Produkují širokou škálu extracelulárních enzymů, které rozkládají organickou hmotu v půdě a tím regulují koloběh prvků a živin. Tvoří půdní biomasu, ovlivňují strukturu půdy a její úrodnost, modifikují stanoviště pro jiné organismy a regulují dynamiku fyziologických procesů v půdním prostředí. Mimo to existují houby, které mohou sloužit jako biologická činidla regulující choroby a škůdce a růst jiných patogenních organismů (Carris et al., 2012).

Bioaktivní sloučeniny produkované houbami jsou velmi důležité pro zvýšení adaptability jak samotných hub, tak jejich hostitelských rostlin. Bylo prokázáno, že látky produkované houbami mají přímé účinky proti herbivornímu hmyzu a parazitickým houbám, které ohrožují hostitelskou rostlinu. V současné době existuje několik vysoce účinných přípravků na bázi druhů *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma polysporum* a *Trichoderma atroviride*, které jsou schváleny pro komerční použití v zemědělství, lesnictví a zahradnictví pro podporu růstu rostlin a jejich ochranu proti celé řadě patogenních hub (Harman et al., 2004). Dalším druhem produkujícím ochranné látky proti některým fytopatogenním houbám je druh *Simplicillium lamellicola*, který vykazuje vedle mykoparazitických účinků také insekticidní účinky (Shin et al., 2017). Mnoho registrovaných mykoinsekticidních přípravků na bázi entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii* můžeme najít na trhu jako látky určené k regulaci zástupců ze skupin *Aleyrodidae* (molice), *Terebrantia* (trásněnky) a *Aphidoidea* (mšice) na zelenině a okrasných květinách (Mascarin a Jaronski, 2016). Půdní houby mohou produkovat

řadu sekundárních metabolitů využívaných také ve farmaceutickém průmyslu. Nejznámějším je β -laktamové antibiotikum penicilin produkované druhem *Penicillium chrysogenum*, které má vysokou antibakteriální aktivitu proti širokému spektru patogenů (Toghueo a Boyom, 2020).

1.1 Endofytní houby

Endofytní houby jsou různorodé polyfyletické skupiny mikroorganismů, které kolonizují intracelulárně nebo intercelulárně živé tkáně hostitelské rostliny, aniž by vyvolaly jakýkoliv viditelný vnější znak infekce (Qin et al., 2018). Většina endofytních hub patří mezi druhy žijící v různých rostlinných orgánech s výskytem omezeným na několik málo buněk v určitém pletivu. Endofyti se do rostliny dostávají v průběhu svého života horizontální kolonizací. Houby do nich vstupují po překonání vnějších bariér, kterými jsou přirozené otvory pletiv jako jsou průduchy a lenticely, otvory po mechanickém narušení rostliny, nebo využívají speciální enzymy a sekundární metabolity k prorůstání do rostlinných pletiv přes buněčnou stěnu. Množství endofytních hub v daném pletivu závisí na druhu orgánu a stáří hostitelské rostliny (Koukol a Haňáčková, 2017).

Vztahy mezi endofytními houbami a jejich hostitelskými rostlinami mohou být symbiotické, antagonistické až mírně patogenní. Z ekologického hlediska mezi endofyty převažuje přísně řízený parazitický způsob života, kdy houby těží z přítomnosti uvnitř tkáně svého hostitele ještě před jeho odumřením (Padhi et al., 2013). Houby přijímají výživu a ochranu od hostitelské rostliny pro vlastní reprodukci, zatímco hostitelské rostlině poskytují vyšší konkurenční schopnost a vyšší toleranci vůči patogenním mikroorganismům, býložravcům a různým abiotickým stresům. Pokud dochází k oslabení hostitele z důvodu napadení jiným parazitickým organismem, nebo stresem z nevhodných klimatických podmínek, neškodný endofyt se pro svého hostitele může stát škodlivým. Důsledkem je vyčerpání živin vedoucí k odumírání hostitelské rostliny. Následně dochází k intenzivní kolonizaci odumřelých rostlin endofytními houbami žijícími saprotrofním způsobem života nejčastěji v půdě, které se podílí na jejich biologickém rozkladu (Jia et al., 2016).

Přestože jsou endofytní houby považovány za nové zdroje biologicky aktivních sloučenin, jejich skutečný potenciál je stále dosud neprozkoumán. Svůj biotechnologický a průmyslový význam získávají v důsledku schopnosti

vylučovat sekundární metabolity, které mohou sloužit jako látky pro regulaci chorob a škůdců na zemědělských plodinách, jako antimikrobiální a antifungální sloučeniny napomáhající inhibovat růst fytopatogenních mikroorganismů a další významné látky jako imunosupresiva a antibiotika. Mnoho přírodních produktů bylo izolováno z endofytních houbových rodů *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium* a *Penicillium* (Fadiji a Babalola, 2020).

1.2 Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou druhy hub, které parazitují na širokém spektru hostitelů patřících do několik řádů hmyzu a roztočů a mohou napadat všechna jejich vývojová stádia. Některé druhy hub infikují více než 700 zástupců z hmyzu jako jsou *Aleyrodidae* (molice), *Aphidoidea* (mšice), *Terebrantia* (trásněnky) a škůdci z řádu *Lepidoptera* (motýli) a *Coleoptera* (brouci), zatímco jiné druhy mají omezený rozsah hostitelů. Tyto houby jsou většinou vysoce specializovaní parazité, kteří vykazují morfologické adaptace na životní cyklus svého hostitele. Využívají příznivých podmínek prostředí k manipulaci hostitelů pro produkci spor a jejich rozšíření do okolního prostředí (Carris et al., 2012). Entomopatogenní houby jsou zastoupeny v mnoha řádech houbových kmenů, největší počet druhů se nachází v kmeni *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Deuteromycota*. Jedná se o velmi rozmanitou skupinu, která zahrnuje saprotrofní houby, entomopatogenní houby, rostlinné endofyty a mykoparazity. Jejich výskyt závisí na hustotě populace hostitelů, přítomnosti alternativního zdroje výživy, typu stanoviště a podmínkách prostředí zejména vysoké vlhkosti vzduchu (Dauda et al., 2018).

Mnoho entomopatogenních druhů má podobné strategie způsobu infekce. Když se konidie dostanou do kontaktu s hostitelem, přichytí se na povrch těla pomocí hydrofobních mechanismů, vytvoří pevnou vazbu s kutikulou a za příznivých podmínek vyklíčí. Pronikají přímou penetrací nebo prostřednictvím přirozených otvorů jako jsou dýchací otvory, ústní nebo řitní otvor do tělní tekutiny svého hostitele za tvorby řady specializovaných infekčních struktur a současného působení enzymů. Po proniknutí do kutikuly jsou houby uvnitř svého hostitele šířeny po celém těle hemocoelem a hostitel během tří až čtrnácti dní po infekci umírá. Houba prorůstá na povrch usmrceného hostitele a po jeho uhynutí vytvoří mycelium, kterým se může

šířit na nového hostitele, nebo se dostává zpět do půdního prostředí (Carris et al., 2012).

Entomopatogenní houby produkují nejen enzymy degradující kutikulu jako jsou chitinázy, proteázy a lipázy, ale během patogeneze vzniká několik mykotoxinů jako je beauvericin, beauverolides a destruxin, které hmyz usmrcují. Mezi druhy produkující mykoinsekticidní látky patří například *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium* sp. a *Isaria fumosorosea*, navíc některé druhy rodu *Lecanicillium* a *Beauveria* jsou známy jako antagonisté vůči rostlinným patogenním houbám prostřednictvím mykoparazitismu. Studie o schopnosti některých druhů entomopatogenních hub fungovat jako endofyti a kolonizátoři rhizosféry představuje nové možnosti jejich využití v praxi. Ukazuje se, že endofytický růst má negativní vliv na řadu hmyzích škůdců, kteří vytváří tunely do stonků a kořenů rostlin, navíc by mohly být využity jako mořidla semen nebo půdní inokuláty k různým plodinám pro vyšší toleranci k nepříznivým podmínkám prostředí (Chandler, 2017).

1.3 Mykorhizní houby

Mykorhizní houby jsou půdní houby, které kolonizují kořeny vyšších rostlin a tvoří s nimi symbiotické vztahy zvané mykorhiza. Tyto houby jsou v přírodě rozšířeny téměř ve všech půdách a mohou významně zlepšit příjem živin rostlinou a odolnost vůči abiotickým stresovým faktorům tím, že zprostředkovávají řadu komplexních systémů mezi rostlinou a houbou. Jsou to biotrofní organismy, které využívají rostlinné fotosyntetické produkty a lipidy ke svému životnímu cyklu, zatímco hostitelským rostlinám usnadňují růst ve stresových podmínkách jako je sucho, slanost, výkyvy teplot a přítomnost těžkých kovů v půdě. Houby mohou kolonizovat kořeny mnoha rostlin odlišného druhu, až 80 % rostlinných druhů může žít ve vztahu s mykorhizními houbami. Většina druhů mykorhizních hub patří do kmene *Ascomycota*, *Zygomycota* a *Basidiomycota* (Begum et al., 2019).

Mykorhizní houby jsou důležitými endosymbionty nezbytnými v půdním ekosystému. V půdě se vyskytují jako spory poskytující rezervoár inokula, který zde může přetrvávat několik desítek let, nebo se mohou vyskytovat jako hyfální síť společně s úlomky kořenů, pomocí kterých kolonizují své hostitelské rostliny. Po kontaktu mycelia s kořeny rostliny dochází k adhezi na povrchu kořenů a zhruba po dvou až třech dnech dochází ke tvorbě speciálních struktur, kterými houba

proniká přes buněčnou stěnu rostliny do kořenových buněk a ty se stávají místem intenzivní výměny živin mezi hostitelskou rostlinou a houbovým symbiontem (Treseder, 2013). Houby zlepšují přístup kořenů rostliny k větší půdní ploše, což má vliv na jejich lepší růst, výživu a dostupnost živin především fosforu a dusíku. Zlepšují vlastnosti a kvalitu půdy, mají vliv na její strukturu a texturu a mohou urychlit rozklad organické hmoty v půdě půdními mikroorganismy. Také zlepšují akumulaci sušiny a zvyšují absorpci vody, čímž se zlepšuje tolerance rostlin vůči suchu a slanosti.

Mykorrhizní houby mají široké uplatnění v zemědělství jako přírodní hnojiva využívaná při regulaci růstu a vývoje rostlin ve stresovém prostředí a v budoucnu by mohly sloužit jako náhrada za anorganická hnojiva. Jejich aplikace může účinně snížit používání chemických hnojiv, herbicidů a fungicidů (Heijden et al., 2015). Zástupci z rodu *Trichoderma* se používají jako biologická hnojiva vhodná téměř pro všechny zemědělské plodiny. Dalšími zástupci využívanými k ochraně rostlin proti patogenním houbám jsou mykorrhizní druhy *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* a *Botrytis cinerea* (Thapa et al., 2020).

1.4 Molekulární techniky pro identifikaci hub

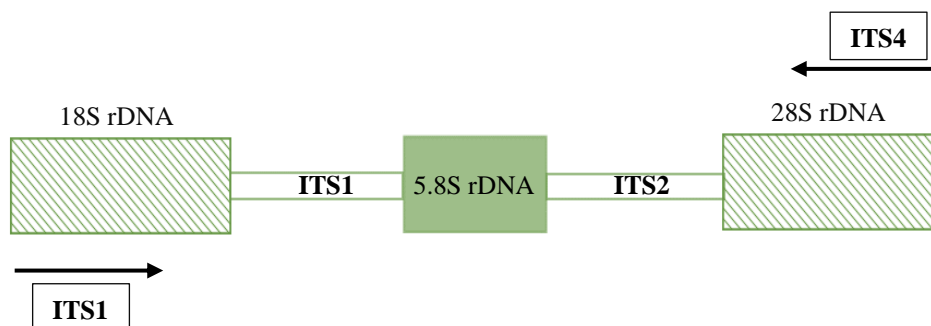
Mykologie jako věda se začala vyvíjet již od počátku 18. století zejména s objevem mikroskopu, přestože houby jsou známé a lidmi využívané organismy již po celá staletí. Ačkoliv od počátku rozvoje mykologie bylo objeveno mnoho nových druhů, stále se jedná o nedostatečně prozkoumanou skupinu organismů. Celkem bylo popsáno okolo 150 tisíc druhů hub, ale odhaduje se, že na Zemi se vyskytuje více než 6,28 milionů druhů (Baldrian, et al., 2021). Výzkum diverzity hub je nezbytný pro základní poznatky v ekologii celé řady ekosystémů a tvoří základ pro studie a poskytování neocenitelných zdrojů v oblasti aplikované mikrobiologie.

Metody založené na pozorování morfologických znaků sloužily v minulosti jako jediný prostředek pro identifikaci hub na úrovni druhů. Tyto metody využívají fenotypových znaků a soustředí se na struktury produkující spory vzniklé v důsledku nepohlavní a pohlavní reprodukce. Některé druhy hub nevytváří typické asexuální struktury, nebo tyto struktury mohou být často vysoce plastické, což výrazně ztěžuje jejich identifikaci. V dnešní době se jedná o metodu důležitou pro pochopení vývoje morfologických znaků v rámci taxonomických skupin, ačkoliv u některých vysoce

specializovaných linií hub nemusí dobře fungovat pro taxonomické zařazení na úrovni druhů (Raja et al., 2017).

Proto byly vyvinuty metody založené na sekvenaci nukleové kyseliny. Jedná se o přesnou, rychlou, univerzálně dostupnou a standardizovanou metodu utváření klasifikačních systémů a referenčních databází organismů založenou na informacích o nukleotidové sekvenci cílové genové oblasti, která je porovnávána se známými sekvencemi uloženými v databázi. K porovnání neznámé sekvence slouží například veřejně dostupné databáze *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* (INSDC) nebo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), pomocí kterých lze neznámý druh umístit do evolučního rámce s jinými homologními sekvencemi na základě fylogenetické příbuznosti (Raja et al., 2017). K identifikaci slouží krátký univerzální úsek DNA z určité oblasti genomu v organismu o délce zhruba 700 nukleotidů, který se používá jako jedinečný vzor k rozpoznání na úrovni druhu. Jednou z důležitých částí této metody je amplifikace cílených oblastí kódu DNA za využití metody polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí specifických primerů. Tyto primery musí být dostatečně univerzální, aby pokryly velkou skupinu taxonů a zároveň by měly produkovat amplikony, které jsou dostatečně rozmanité k odlišení příbuzných druhů. Bylo navrženo několik specifických primerů umožňujících amplifikaci sekvencí hub (Toju et al., 2012).

Mezi nejčastěji používané primery patří internal transcribed spacer (ITS) ribozomální DNA (rDNA). Nukleární rDNA jsou vysoce polymorfní nekódující oblasti obsažené v genomu v několika kopiích a lze je snadno amplifikovat. U eukaryotních organismů oblast ITS obsahuje dvě variabilní nekódující oblasti ITS 1 a ITS 2, které odděluje malá podjednotka 18S a velká podjednotka 26S genů jaderných ribozomů s vysoce konzervovaným 5.8S genem mezi nimi (Obr.1). U hub celá oblast obsahuje přibližně 600 až 800 bázových párů (bp) a patří mezi markery s nejvyšší pravděpodobností správné identifikace pro velmi širokou skupinu v celé říši hub (Fajarningsih, 2017).



Obrázek 1: Lokalizace primerů ITS

U některých houbových rodů jako je rod *Aspergillus*, *Penicillium* a *Trichoderma* k identifikaci na úrovni druhů použití samotného ITS markeru nemusí stačit a může být potřeba sekvenovat více genů kódujících proteiny. Geny kódující proteiny se využívají ve fylogenetické analýze kvůli jejich lepšímu rozlišení na vyšších taxonomických úrovních ve srovnání s rDNA geny. Mezi tyto geny patří translační elongační faktor (TEF) 1- α , což je gen kódující podjednotky komplexu elongačního faktoru a gen kódující β -tubulin, což je protein působící jako strukturální složka mikrotubulů (Sasikumar et al., 2012).

2 Viry jako původci onemocnění hub

Viry jsou submikroskopičtí obligátní intrabuněční parazité obsahující ve své nukleové kyselině komplex genetických informací nezbytných pro reprodukci v hostitelských buňkách. Viry infikují různé hostitelské organismy od bakterií přes jednobuněčná eukaryota, až po rostliny a živočichy. Celkový počet dosud známých virů přesahuje 9000 druhů a další nové druhy jsou objevovány téměř každý den (Abbas, 2016). Viry infikující různé druhy hub se označují jako mykoviry. První zpráva o mykovirech se objevila v roce 1962, kdy byly viry objeveny v komerčně pěstované houbě *Agaricus bisporus* (pečárka dvouvýtrusá). Byly pozorovány příznaky, mezi které patřily změny morfologie plodnic, poškození houbové tkáně a následné snížení celkové produkce. Tyto rané studie vedly k prvnímu pozorování virů jako původců onemocnění u hub (Lemke a Nash, 1974).

2.1 Taxonomie virů

První systematickou klasifikaci virů navrhl v roce 1939 americký lékař a vědec John Eugene Bennett. Viry byly seskupeny na základě morfologických a cytologických příznaků vyvolávajících u svých hostitelů, podle způsobu přenosu prostřednictvím vektorů a antigenních, chemických a fyzikálních vlastností. V roce 1948 Francis Oliver Holmes navrhl první taxonomický systém, který obsahoval řád *Virales* a podřády pro viry infikující bakterie, rostliny a zvířata. Systém Lwoff, Horne a Tournier (LHT systém) byl dokončen v roce 1966 a seskupoval viry do jednoho kmene *Vira* se dvěma podkmeny na základě přítomnosti ribonukleové nebo deoxyribonukleové kyseliny ve svém genomu. Každý podkmen zahrnoval třídy založené na symetrii virionových kapsid a ty se dále dělily na řád *Virales*, podřád *Viridales*, čeleď *Viridae*, podčeleď *Virinae*, rod a podrod *Vira* (Kuhn, 2021).

V roce 1971 zveřejnil americký virolog David Baltimore klasifikaci virů, která se používá dodnes souběžně s oficiální taxonomií virů. Seskupil viry do sedmi oddělených skupin označovaných jako *Baltimore classification (BC)*, které se dělí na základě typu nukleové kyseliny začleněné do virionů a typu reprodukce viru. Skupina *BC I* představuje viry obsahující genom dvouvláknové DNA (dsDNA). Viry této skupiny syntetizují mediátorovou RNA (mRNA) transkripcí z templátového vlákna DNA genomu. Skupina *BC II* zahrnuje viry s jednovláknovými DNA (ssDNA) genomy, strategie reprodukce viru zahrnuje transformaci ssDNA virového genomu

na dsDNA, který poté slouží jako templát pro transkripci mRNA. Skupinu *BC III* představují viry s dvouvláknovými RNA (dsRNA) genomy, které syntetizují mRNA transkripcí ze svého dsRNA templátového vlákna. Skupina *BC IV* zahrnuje pozitivní jednovláknové RNA (ssRNA) viry využívající genomovou RNA přímo jako mRNA. Do skupiny označené jako *BC V* patří negativní ssRNA viry, které syntetizují mRNA transkripcí ze svého genomového templátu RNA. Pozitivní ssRNA viry s DNA meziproduktem (ssRNA-RT) patří do skupiny *BC VI* a viry s dsDNA genomem a RNA meziproduktem (dsDNA-RT) patří do skupiny *BC VII*, kdy obě tyto skupiny se replikují prostřednictvím reverzní transkripce (Ryu, 2017).

V roce 1966 na Mezinárodním kongresu pro mikrobiologii v Moskvě představitelé společnosti *International Association of Microbiological Societies* (IAMS) založili mezinárodní výbor pro názvosloví virů *International committee for taxonomy of viruses* (ICTV) a vytvořili celosvětově uznávaný systém. V důsledku toho byly viry zařazeny podle morfologických, biofyzikálních a biochemických vlastností. Po příchodu metod sekvenování genomu byly viry rozděleny do jednotlivých příbuzenských skupin podle virových genomových sekvencí a fylogenetických vztahů. V současné době ICTV zahrnuje 39 tříd, 59 řádů, 189 čeledí, 2224 rodů a 9110 druhů virů k březnu roku 2021 (Walker et al., 2021).

2.2 Rozšíření mykovirů

Zájem o výzkum mykovirů v posledních desetiletích vzrostl. Mykoviry infikují jedlé houby z oddělení *Basidiomycota*, rostlinné a živočišné patogenní houby, houby nacházející se v půdě na kořenech rostlin nebo na rozkládající se organické hmotě, houby žijící v symbiotickém vztahu s rostlinami, či producenty průmyslových a farmaceutických enzymů. Do roku 1972 bylo identifikováno 55 různých mykovirů. Dnes je známo přes 300 mykovirů, které byly sekvenovány a zaregistrovány v databázích NCBI a jsou rozšířeny ve všech hlavních taxonomických skupinách hub (Kyrychenko et al., 2018).

Saprotrofní houby jsou zdaleka nejrozmanitější a nejdominantnější skupinou hub žijící v půdě a zahrnují několik ekologicky významných druhů. Půdu a kořeny rostlin obývají četné mikroskopické vláknité houby z rodů *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Umbelopsis* a *Rhizopus*, kdy u zástupců všech těchto rodů byly objeveny mykoviry (Sutela et al., 2019). Jedním z prvních mykovirů,

kteře byly podrobně studovány na biochemické, biofyzikální a ultrastrukturální úrovni byl virus objevený v houbě *P. chrysogenum* z kmene *Ascomycota* využívané při výrobě antibiotik. Zájem o farmaceutický výzkum antibakteriálních látek produkovaných těmito rody vedl k objevu dsRNA virového původu. Viry obsahující dsRNA byly následně objeveny u dalších druhů z rodu *Penicillium*, u komerčně pěstovaného rodu *Aspergillus* využívaného ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu a u rodu *Trichoderma*, který se používá k ochraně rostlin, především v zemědělství a lesnictví (Lee et al., 2017).

Další ekonomicky a ekologicky významnou skupinou hub jsou houby z kmene *Basidiomycota* vyskytující se na široké škále stanovišť. Představují významnou skupinu hub, které jsou schopny degradovat polymery rostlinného původu jako je celulóza a hemicelulóza v lesních a travních biotopech, což má obrovský význam pro koloběh prvků v přírodě a jejich činnost je nezbytná pro úrodnost půd. První mykoviry u vyšších hub byly izolovány z houby *A. bisporus* a příznaky byly pojmenovány jako *La France disease*. Následně byly izolovány mykoviry způsobující onemocnění dalších jedlých komerčně významných druhů hub z kmene *Basidiomycota* a to *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná), *Flammulina velutipes* (penízovka sametonohá) a *Lentinula edodes* (houževnatec jedlý) pěstovaných především v Japonsku a Číně (Kyrychenko et al., 2018).

Mezi významné houby patří také entomopatogenní druhy, které jsou schopné dlouhodobě růst v půdě a napadat různé zástupce hmyzu. U této skupiny byly nalezeny dsRNA elementy u druhu *B. bassina* a *Cladosporium* sp. (Sutella et al., 2019).

2.3 Dvouvláknové RNA (dsRNA) mykoviry

Mykoviry jsou široce rozšířeny po celém světě a jejich rozmanitost se za posledních několik let rapidně zvýšila zejména s rozvojem nových molekulárně genetických metod a rozšířeným používáním nejmodernějších technik hloubkového sekvenování. V houbách jsou stále nacházeny viry s novým genomovým složením a unikátními vlastnostmi, které nebyly dosud popsány (Walker et al., 2021). Mykoviry mají různé typy genomů. Podle ICTV mykoviry zahrnují osm čeledí s lineárními dsRNA genomy *Amalgaviridae*, *Chrysoviridae*, *Megabirnaviridae*, *Partitiviridae*, *Polymycoviridae*, *Quadriviridae*, *Reoviridae* a *Totiviridae* a jeden rod nepřirazený k žádné čeledi *Botybirnavirus*. Dále mykoviry obsahují pozitivní ssRNA genomy, jednu čeleď

s negativním ssRNA genomem, dvě čeledi s RNA genomy s typem reprodukce využívající reverzní transkripce a jednu rodinu s cirkulárním ssDNA genomem. Žádné mykoviry s dsDNA nebyly dosud plně charakterizovány na molekulární úrovni (Mata et al., 2020).

Výskyt a variabilita mykovirů byla nejčastěji stanovena na základě přítomnosti dsRNA elementů nalezených v mnoha běžných vláknitých houbách ve všech kmenech pravých hub *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Viry jsou schopny se ve svých hostitelích replikovat a profily dsRNA mohou být odlišné v rámci izolátů stejné houby. Dosud není známo, zda mnohočetné dsRNA elementy představují směs několika virů nebo jeden virus, ačkoliv vykazují smíšené infekce (Pearson et al., 2009). Aby mohly mykoviry infikovat svého hostitele a úspěšně se v něm replikovat, musely během své evoluce překonat řadu specifických biochemických problémů.

Mnoho hostitelských buněk má schopnost rozpoznat dsRNA elementy uvnitř cytoplazmy a reaguje na jejich přítomnost pomocí obranných mechanismů včetně indukce apoptózy, produkce interferonu, modifikace hostitelských mechanismů buněčné translace a potlačení RNA exprese. DsRNA viry obsahují vlastní transkripční enzymy a přenáší je s sebou do hostitelské buňky, což jim umožňuje syntézu funkční mRNA nezbytnou k iniciaci syntézy virových proteinů. Aby nedošlo k jejich rozpoznání a zničení uvnitř hostitelské buňky, viry uchovávají své genomy a mRNA syntetizující enzymy ve stabilní uzavřené proteinové kapsidě (Mertens, 2004).

Vnější kapsidové vrstvy jsou zodpovědné za transport transkripčně aktivního jádra virionu do cytoplazmatické hostitelské buňky a spolu s proteiny vykazují specifické adaptace na svůj hostitelský druh. Složitost struktur kapsid je extrémně variabilní. Většina dsRNA mykovirů má ikosaedrické kapsidové struktury sestaveny z různého počtu podjednotek uspořádaných do prostorových konformací. Vnější pláště kapsidy mají ochrannou roli a účastní se vstupu do buňky, vnitřní kapsida je přítomna ve všech virech a její funkcí je organizace virového genomu a enzymu polymerázy (Mata et al., 2020).

2.4 Přenos mykovirů

Houbové viry mají intracelulární způsob přenosu závislý na svých houbových hostitelích. K tomu využívají dva způsoby přenosu, horizontální přenos prostřednictvím protoplazmatické fúze a vertikální přenos během buněčného dělení a tvorby sexuálních a asexuálních spor (Cortesi et al., 2001). Přenos virů je regulován hostitelskými systémy a závisí na různých faktorech, na buněčných procesech a drahách souvisejících s buněčným transportem, metabolismu hostitelského organismu a v neposlední řadě signalizaci RNA (Shahi et al., 2019). K vertikálnímu přenosu jako primárnímu prostředku šíření mykovirů slouží spory. Nepohlavní spory jsou produkovány z modifikovaných hyf a mykoviry jsou přenášeny během sporulace do cytoplazmy. Přenos pohlavními sporama je méně častý a míra infekce je obvykle nižší u hub, jejichž pohlavní stádium se v životním cyklu vyskytuje častěji. K horizontálnímu přenosu mykovirů dochází mezi různými kmeny hub prostřednictvím hyfální anastomózy, během které dochází ke splnutí postranních větví hyf a dojde k výměně genetického a cytoplazmatického materiálu, včetně mykovirů obsažených v cytoplazmě svého hostitele. Úspěch závisí na kompatibilitě jednotlivých druhů, proto obvykle dochází k přenosu virů pouze mezi kmeny stejného druhu houby (Pearson et al., 2009).

2.5 Hypovirulentní mykoviry

V minulosti byly viry chápány spíše jako infekční agens, které ve svém hostiteli vyvolávají vnější projevy onemocnění. Byly zkoumány především škodlivé patogenní kmeny mykovirů, které způsobují závažná onemocnění a ekonomické ztráty na komerčně pěstovaných houbách. Postupně se začaly objevovat viry spojeny s asymptomatickými infekcemi. Jejich životní strategie ve velké míře nezpůsobuje hostiteli viditelná poškození, ale existuje několik mykovirů podílejících se na fenotypových změnách jako je nepravidelný růst mycelií na živném médiu, abnormální pigmentace a vliv na reprodukci hub (Sutela et al., 2019).

Biotechnologická aplikace mykovirů je spojena především s viry schopnými vyvolat sníženou virulenci označovanou jako hypovirulenci. Viry s hypovirulentním účinkem ovlivňují transkripční úroveň genů spojených se základními buněčnými funkcemi a jsou schopny potlačit expresi hostitelské RNA, která může chránit hostitelský organismus před jinými houbovými viry. Některé mykoviry mohou svým

hostitelským houbám poskytnout selektivní nebo konkurenční výhodu a mohly by najít uplatnění v biologické ochraně proti houbovým patogenům (Segers et al., 2007).

Souvislost mezi hypovirulencí kmenů hub a virovou infekcí byla poprvé prokázána na počátku 50. let 20. století. Kaštaný infikované houbou *Cryphonectria parasitica* vykazovaly symptomy jako jsou léze na stoncích a do červena zbarvené nekrotické léze na kůře stromu. Ukázalo se, že kmeny hub *C. parasitica* izolované z těchto lézí byly špatně pigmentované, měly sníženou schopnost tvořit spory a nedostatečnou schopnost syntetizovat některé metabolické látky. Z izolátů byla extrahována dsRNA a byly objeveny dva hypovirentní mykoviry dnes využívané k biologické ochraně kaštanů ve Spojených státech a v Evropě proti korové nekróze kaštanovníku (Kyrychenko et al., 2018). Další hypovirentní kmen používaný v biologické ochraně je kmen používaný proti patogenní houbě *Sclerotinia sclerotiorum* způsobující bílé hniloby u řepky a řady plevelných i volně rostoucích druhů rostlin, především zeleniny. Hypovirentní viry jsou přeneseny na patogenní kmeny hub, kde inhibují růst houbových lézí a zajišťují tak rostlině ochranu. Pro jejich úspěšné použití je třeba překonat bariéry vegetativní inkompatibility kmenů hub a zajistit tak účinný přenos mykovirů z hypovirentního kmene na cílový organismus (Abid et al., 2018).

2.6 Aplikace mykovirů v ochraně rostlin

Fytopatogenní houby jsou hlavními původci chorob u rostlin a způsobují značné ekonomické ztráty na mnoha pěstovaných plodinách po celém světě. Ačkoliv se fungicidy ukázaly jako úspěšné řešení při regulaci těchto patogenních hub, jejich používání je stále omezené s rozvojem rezistentních kmenů odolných vůči fungicidům a s rostoucími obavami z nežádoucích vedlejších účinků na životní prostředí a lidské zdraví. Potenciál mykovirů jako látek v integrované ochraně rostlin je vysoký, zejména díky jejich schopnosti snižovat virulenci u houbových rostlinných patogenů prostřednictvím hypovirentních kmenů. Ačkoliv pokroky ve vývoji a charakterizaci mykovirů jsou stále na vzestupu, jejich použití v ochraně rostlin je dosud omezené (Nuss, 2005). Pro pochopení účinku virů na své houbové hostitele jsou zásadním předpokladem znalosti o jejich biologických vlastnostech, popsání základních principů jejich životních cyklů, distribuce, přenosu a šíření napříč populacemi. Porozumění molekulárním mechanismům a aplikace vysoce

výkonných sekvenačních technologií je základním předpokladem pro jejich úspěšné studium. Výzkum mykovirových populací se dosud soustředí na jediný hostitelský druh a pouze několik z nich se zabývá možností přenosu virů mezi houbami interagujícími v přirozených stanovištích. Zatímco některé mykoviry ovlivňují patogenitu hostitelských hub, jejich účinek proti jiným mikrobům přítomným ve stejném růstovém substrátu není dosud popsán (Sutela et al., 2019).

2.7 Detekce mykovirů

V minulosti byly nejdůležitějším znakem pro charakterizaci viru symptomy vzniklé v důsledku interakce mezi virem a hostitelem, podle kterých bylo odvozeno jejich pojmenování. Protože příznaky způsobené virovou infekcí se mohou snadno zaměnit za příznaky vyvolané jinými patogeny, nedostatkem živin v prostředí, fyziologickými poruchami nebo působením toxických látek, nejedná se o spolehlivou metodu detekce. Symptomy způsobené konkrétním virem v hostiteli jsou vysoce variabilní a virus může zůstat v latentní fázi v závislosti na podmínkách prostředí a ročním období (Bhat a Rao, 2020).

Proto byly vyvinuty metody virové diagnostiky zahrnující metody množení virových částic jejich zavedením do vhodné hostitelské buněčné linie a pozorování cytopatických účinků, sérologické metody založené na reakci mezi antigenem a protilátkou a molekulárně genetické metody. U cytopatických metod se pozoruje infekce vyvolaná virem, která způsobuje poškození a následné morfologické změny buněk. Sérologické metody využívají protilátky jako primární prostředky k detekci virů. Tyto protilátky mohou být polyklonální, které váží více struktur na cílovou molekulu a jsou využívány k detekci kmenů virů ze vzorku. Naproti tomu monoklonální protilátky vykazují určitou specifitu a jsou vhodné pro cílenou detekci odlišných oblastí na cílové molekule využívané pro rozlišení mezi různými izoláty nebo genotypy jednoho viru, nebo mezi podobnými virovými druhy v rámci rodu. U molekulárních metod je prvním krokem pro charakterizaci virů založení čisté kultury virového izolátu ve vhodném hostiteli a izolace nukleové kyseliny pro další analýzu a charakterizaci (Cassedy et al., 2021).

Ke studiu virů na genomové úrovni je potřeba separace virového genomu, která by napomohla k identifikaci a molekulární charakterizaci virových částic a vývoji citlivé diagnostiky. Přítomnost mykovirů byla nejčastěji stanovena na základě

detekce dsRNA elementů u několika kmenů hub. Protože dsRNA elementy jsou stabilní a odolné vůči působení inhibitorů RNáz, lze je poměrně snadno izolovat. Existuje několik postupů pro izolaci nukleové kyseliny ze vzorku. Separovaná dsRNA je poté denaturována a použita jako templát pro syntézu komplementární DNA (cDNA) nebo pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR). Klíčovým prvkem detekce na bázi nukleových kyselin je PCR metoda využívající teplotních cyklů a enzym polymerázu k amplifikaci řetězců DNA. Standardní polymeráza používaná v PCR může syntetizovat pouze z templátu DNA, proto amplifikace RNA vyžaduje použití enzymu s reverzní transkripční aktivitou. PCR a reverzní transkripce jsou široce používané metody pro detekci jak DNA, tak RNA virů. Genom může být dále klonován, sekvenován, exprimován a použit k získání rezistentních transgenních rostlin (Bhat a Rao, 2020).

3 Cíl práce

Cílem práce bylo:

- Vypracování literární rešerše k dané problematice
- Izolace DNA ze vzorků hub
- Identifikace vzorků hub a tvorba fylogenetického stromu pomocí metod PCR a sekvenování
- Detekce přítomnosti mykovirů na základě izolace dsRNA

4 Metodika

4.1 Metodika kultivace hub na živném médiu

Houby byly odebrány ve formě mycelia nebo ve formě spor z rozkládajícího se dřeva nebo pařezů, hmyzích zástupců a z půdy z několika míst v České republice (Příloha A). Plodnice hub byly sbírány v intervalu jednoho roku od srpna roku 2020 do srpna roku 2021. Plodnice byly ponechány na vlhkém ubrousku v uzavřené nádobě po různě dlouhou dobu potřebnou k růstu, poté byly spory z plodnice přeneseny na agarové médium, kde byly kultivovány. Jako kultivační médium bylo zvolené médium potato dextrose agar (PDA). PDA je médium pro obecné použití k růstu několika druhů hub, kvasinek a plísní. Skládá se z dehydratovaného bramborového bujónu a dextrózy, jako tuhnoucí látka se využívá agar. Na přípravu 1 litru kultivačního média se přidá 39 g PDA, který se rozmíchá v 800 ml destilované vody a poté se doplní do jednoho litru. Směs se promíchá a následně sterilizuje po dobu 15 minut při teplotě 121 °C (Aryal, 2019). Po vychladnutí se médium rozlévá do sterilních Petriho misek. Pro kultivaci jednotlivých druhů hub byla přenesena část agaru s myceliem o velikosti 1x1 cm pomocí kličky na sterilizované Petriho misky s kultivačním médiem. Vzorby byly uchovávány a kultivovány v termostatu po dobu jednoho měsíce při pokojové teplotě, kde na Petriho misce po 2-3 týdnech vyrostlo mycelium (Příloha B, příloha C).

4.2 Metodika izolace DNA z hub

Pro extrakci nukleové kyseliny byl použit protokol pro izolaci DNA pomocí CTAB-PVP. Metoda izolace DNA pomocí CTAB-PVP slouží pro extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod jako je například metoda PCR. DNA byla izolována z čerstvého materiálu. Čerstvým materiálem se rozumí mycelium v množství 10-100 mg odebrané přímo z agaru, které bylo homogenizováno spolu s 500 μ l roztoku CTAB-PVP ve sterilních třecích miskách a následně převedeno pomocí pipety do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml.

CTAB (cetyltrimethylammoniumbromid) v roztoku slouží jako kationtová povrchově aktivní látka zásadní pro rozbití buněčné membrány a zahájení buněčné lýze. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon) do roztoku CTAB slouží k absorpci fenolických látek jako inhibitorů polymerázové reakce. Polyfenoly se váží na DNA a vysráží se společně s nukleovou kyselinou, ze které jsou odstraněny v dalších krocích. K přečištění roztoku od polyfenolických látek slouží také 2-merkaptoethanol,

známý též pod názvem β -merkaptoethanol (BME), který se přidává do vzorku v koncentraci jako 1%. BME slouží jako silné redukční činidlo, a kromě polyfenolyckých látek redukuje disulfidové vazby mezi proteiny a způsobuje jejich denaturaci (Heikrujam et al., 2020). Výsledný roztok se ponechal inkubovat po dobu 45 minut při teplotě 65 °C.

Po centrifugaci při otáčkách 12 000 rpm po dobu 10 minut v roztoku dojde k separaci DNA od proteinů a dalších příměsí. Pro oddělení fází byl do roztoku přidán chloroform s isoamylalkoholem (IAA) v poměru 24:1 v množství 500 μ l sloužící jako rozpouštědlo, ve kterém se rozpouští nepolární proteiny a lipidy od buněčného odpadu. Izolovaná DNA je zachována ve vodní fázi, která je od organické fáze oddělená na základě rozdílné hustoty. Isoamylalkohol stabilizuje interfázi mezi organickou vrstvou obsahující lipidy, proteiny a další nečistoty a vodnou vrstvou obsahující DNA. Vzorky byly promíchávány po dobu 10 min a poté centrifugovány při otáčkách 12 000 rpm po dobu 5 min. Pro srážení nukleové kyseliny byla přidána do vzorku 1/5 objemu 5% CTAB. Následně byl přidán chloroform s IAA v množství 500 μ l a směs se 10 minut promíchávala. Poté se roztok centrifugoval při rychlosti 14 000 rpm po dobu 5 min. K vysrážení DNA z extrakčního roztoku byl použit ledový isopropanol v množství 250 μ l, který navíc rozpouští nepolární rozpouštědla, mezi které patří chloroform použitý v krocích výše a dochází tak k odstranění nežádoucích nečistot v něm obsažených. Vzorky byly ponechány přes noc při teplotě -20 °C (Čurn, 2008).

Po centrifugaci při otáčkách 14 000 rpm při teplotě -4 °C po dobu 5 min byl odstraněn supernatant a do roztoku bylo přidáno 300 μ l TE (Tris-EDTA:10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) pufru s vysokým obsahem soli pro zvýšení rozpustnosti nežádoucích látek v ethanolu, který se do roztoku přidal po inkubaci při 37 °C po uplynutí doby 60 min v množství 600 μ l. Přidání 96% ethanolu umožňuje odstranění nečistot, jakmile je DNA vysrážena a peletována. Vzorky byly ponechány přes noc v mrazáku při teplotě -20 °C.

Následně byly vzorky centrifugovány při 14 000 rpm při -4 °C po dobu 10 min. Vysrážená DNA byla přečištěna pomocí ledového 70 % ethanolu, ve kterém DNA zůstává. Ethanol byl odstraněn centrifugací a pelet DNA se vysoušel v otevřené mikrocentrifugační zkumavce na vzduchu. Pro uchování DNA po delší dobu v neporušeném stavu byl pelet rozpouštěn v 20-200 μ l TE pufru podle jeho množství.

TE pufr chrání řetězce DNA před poškozením zářením a před volnými radikály, ionty Mg^{2+} obsažené v pufru EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) chrání DNA před působením enzymů štěpících nukleové kyseliny (Chauhan, 2018). Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 60 min a následně byly uchovávány v mrazáku při teplotě - 20 °C.

4.3 Spektrofotometrické vyhodnocení koncentrace extrahované DNA

Kvalita a množství celkové DNA ve vzorku byla stanovena spektrofotometricky. Metoda je založena na měření pomocí fyzikální veličiny absorbance A [nm], která slouží ke stanovení výtěžku a čistoty DNA. Roztok vzorku byl spektrofotometricky vyhodnocen při vlnových délkách od 260 nm do 280 nm. Poměr absorbance DNA (260 nm) / protein (280 nm) stanoví znečištění nukleové kyseliny přítomností proteinů, poměr absorbancí DNA (260 nm)/ kontaminující látky (230 nm) určuje přítomnost kontaminujících látek v nukleové kyselině, mezi které patří sacharidy, fenoly a látky použité při izolaci DNA (Barbas et al., 2010).

4.4 Metodika polymerázové řetězcové reakce (PCR)

PCR technologie se používá k rychlé amplifikaci vybraného úseku sekvencí DNA pro využití v molekulární diagnostice. Pro ohraničení vybraného úseku DNA se využívají krátké sekvence zvané primery. Jedná se o jednořetězcové oligonukleotidové sekvence dlouhé 20-25 nukleotidů, které pomocí své komplementarity bází přisedají k předem určené části genomu, která má být amplifikována. Od těchto míst následně probíhá syntéza nového vlákna DNA. Pro syntézu je nezbytný enzym DNA polymeráza, která je stabilní při vysokých teplotách. Při reakci se využívá cyklických změn teplot sestávajících ze tří základních kroků. Tyto kroky zahrnují denaturaci DNA, nasedání primerů a následnou syntézu DNA. Pomocí této techniky jsme schopni získat až miliardu kopií cílové sekvence DNA během několika hodin (Garibyan a Avashia, 2013).

Pro amplifikaci úseků DNA byly využity tři univerzální páry primerů pro houbové organismy se specifickými sekvencemi (Tab. I). K amplifikaci ITS oblastí genomové DNA byly použity primery ITS1 a ITS4, pro amplifikaci genu TEF 1- α byly použity primery EF595F a EF1160R (Kausrud a Schumacher, 2001). Pro namnožení úseku specifické oblasti genu pro β -tubulin kódující GTP-vazebné místo byly použity

primery TubF a TubR (Guo et al, 2016). Na přípravu PCR bylo použito 25 µl reakční směsi obsahující 12,5 µl Master Mixu (Go Taq), 8,5 µl H₂O, 0,75 µl každého primeru a 2,5 µl templátu DNA.

Tabulka I: Seznam použitých primerů

Název	Reverse/ forward	Sekvence	Teplota nasedání
ITS1	Forward	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'	55 °C
ITS4	Reverse	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	55 °C
EF595F	Forward	5' - CGTGACTTCATCAAGAACATG – 3'	45 °C
EF1160R	Reverse	5' - CCGATCTTG TAGACGTCCTG – 3'	45 °C
TubF	Forward	5' - GGTGCGGGTAACTGGGC – 3'	53 °C
TubR	Reverse	5' - GAGGCAGCCATCATGTTCTT – 3'	53 °C

Podmínky reakčního cyklu zahrnovaly počáteční denaturaci, která byla zahájena při teplotě 94 °C po dobu 3 minut pro amplifikaci TEF a TUB a po dobu 4 minut u ITS, po níž následovalo cyklické střídání reakčních teplot sestávajících z denaturace, nasedání primerů a syntézy DNA (Tab. II). ITS a TEF reakce zahrnovala 35 cyklů a TUB reakce zahrnovala 36 cyklů.

Tabulka II: Reakční teploty a časy u ITS, EF a TUB primerů

	denaturace DNA		nasedání primerů		syntéza DNA	
ITS	94 °C	30 s	55 °C	30 s	72 °C	1 min
EF	94 °C	30 s	45 °C	40 s	72 °C	40 s
TUB	94 °C	40 s	53 °C	40 s	72 °C	1 min

Konečná denaturace proběhla při teplotě 72 °C po dobu 10 minut u ITS a TEF a při teplotě 72 °C po dobu 6 minut u TUB.

4.5 Elektroforetické vyhodnocení vzorků

Elektroforéza je laboratorní technika používaná k identifikaci, kvantifikaci a čištění fragmentů nukleových kyselin. Vzorky se nanášejí do jamek agarózového gelu a vystaví se elektrickému napětí. Nukleové kyseliny jsou záporně nabitě díky fosfátům

obsažených ve své molekule, proto se v elektromagnetickém poli pohybují směrem ke katodě. Elektroforéza využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů danou jejich molekulovou velikostí. Kratší DNA fragmenty budou elektromagnetickým polem cestovat rychleji, zatímco delší fragmenty zůstanou nejbližší k jamkám, což vede k jejich separaci. Vizualizace fragmentů na gelu po elektroforetické separaci je umožněna přidáním fluorescenčních barviv. Fluorescenční barviva se naváží na nukleovou kyselinu a jsou vizualizovány pod fluorescenční lampou (Lee et al., 2012). Vzorky, které sloužily k identifikaci hub, byly vizualizovány elektroforeticky pomocí fluorescenčního barviva ethidia bromidu (EtBr) na 1,5% agarózovém gelu a byly vystaveny napětí 90 voltů po dobu 45 minut. Následně byly vyhodnoceny pod UV světlem na základě detekovaných fragmentů.

4.6 Identifikace vzorků hub pomocí sekvenování a fylogenetická analýza

Sekvenování je proces stanovení sekvence nukleotidových bází adeninu, thyminu, cytosinu a guaninu v části genomu DNA daného organismu. Jedná se o techniku cíleného sekvenování, která využívá krátké oligonukleotidové primery k vyhledávání specifických oblastí DNA (Gomes a Korf, 2018). Amplifikované produkty PCR byly přečištěny před sekvenováním ExoSAP-IT (ThermoFisher). ExoSAP-IT se používá k enzymatickému čištění amplifikovaného produktu PCR, kde hydrolyzuje přebytečné primery a nezačleněné nukleotidy ve dvou po sobě jdoucích inkubacích. V prvním kroku dochází ke štěpení přebytečných primerů a defosforylaci nukleotidů při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. V druhém kroku dochází k deaktivaci enzymů působením vysoké teploty a to 80 °C po dobu 7 minut (Dugan et al., 2002). Na 10 µl vzorku byl přidán 1 µl ExoSAP-IT. Po proběhlé inkubaci bylo do vzorků přidáno 5 µl specifického primeru.

Amplifikované fragmenty z oblastí ITS, TEF a TUB získané pomocí PCR ze vzorků hub byly sekvenovány pomocí Sangerovo sekvenování ve společnosti SEQme s.r.o. (Dobříš). Získané sekvence ve FASTA formátu byly porovnány s NCBI databází, ve které jsou uloženy již referenční či jinak známé sekvence. Na základě procentuální shody vyšší než 98 % byly ke vzorkům přiřazeny biologické druhy, pokud byla podobnost s již známou sekvencí nižší, byl určen vzorek pouze na úrovni rodu. Po určení houbového druhu či rodu u každé sekvence, byl z daných sekvencí vytvořen alignment v programu *Molecular Evolutionary Genetics Analysis 11*

(MEGA11) a následně byl z tohoto aligmentu vytvořen fylogenetický strom využívající statistický model *The maximum likelihood phylogeny*, který určuje příbuznost na základě podobnosti jednotlivých sekvencí (Koichiro et al., 2021).

4.7 Metodika izolace dsRNA elementů z hub

Pro extrakci nukleové kyseliny ve formě dsRNA byla použita modifikace protokolu, která využívá fenol-chloroform a celulózu (Morris a Dodds, 1979). Z každého vzorku bylo odebráno mycelium o hmotnosti 100-150 mg, které bylo převedeno do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 2 ml a následně bylo lyofilizováno za nízké teploty ve vakuu. Pro rozrušení buněčné membrány a zahájení buněčné lýze bylo ke každému vzorku přidáno 2xSTE pufr (chlorid sodný, tris-EDTA:100 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1M NaCl, pH 8) v celkovém množství 1000 μ l. 2xSTE pufr slouží k narušení buněčné membrány a přečištění nežádoucích polyfenolických látek (Heikrujam et al., 2020). Pro další lýzi buněk byl přidán 10% SDS pufr (dodecylsírán sodný). Dále byl získaný lyzát smíchán s 400 μ l chloroformu společně s 600 μ l fenolu. Přidáním těchto dvou látek dochází k postupnému přečištění roztoku nukleové kyseliny od proteinů. Po každém přidání chemikálie v požadovaném množství byly vzorky homogenizovány ve sterilních mikrocentrifugačních zkumavkách o objemu 2 ml a směs se následně promíchávala na rotátoru při teplotě 4 °C po dobu jedné hodiny.

Po centrifugaci při rychlosti 14000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 15 minut byl supernatant převeden do nových mikrocentrifugačních zkumavek o objemu 2 ml. Do každého vzorku byla přidána celulóza v množství 100 mg na 100-150 mg mycelia. Celulóza hraje v izolaci dsRNA zásadní roli, jelikož váže dvouvláknovou RNA v přítomnosti 16% ethanolu. Ten byl přidán do objemu v závislosti na množství převedeného supernatantu. Na 1000 μ l supernatantu se přidá 160 μ l 96% ledového ethanolu. Směs se následně promíchávala při teplotě 4 °C po dobu 30 minut na rotátoru. Po centrifugaci při teplotě 4 °C a rychlosti 14000 rpm po dobu 3 min byl odstraněn supernatant a pelet společně s celulózou na dně mikrocentrifugační zkumavky byl vymýván STE pufrem s 16% ethanolem v množství 1000 μ l. Vzorek byl promíchán a následně centrifugován při rychlosti 14000 rpm za teploty 4 °C po dobu 1 minuty. Tekutá fáze byla odstraněna a tento krok byl opakován pětkrát po sobě pro důkladné promytí nukleové kyseliny od nečistot.

Po poslední centrifugaci a odstranění tekuté fáze byla celulóza vysušena při 55 °C po dobu 10 minut. Celulóza s obsaženou nukleovou kyselinou byla resuspendována v 1xSTE pufru v 65 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly následně centrifugovány při 14000 rpm při teplotě 4 °C po dobu 3 minut. Tekutá fáze byla odebrána do nové mikrocentrifugační zkumavky o objemu 2 ml a bylo přidáno 1500 µl ledového 96% ethanolu k vysrážení nukleové kyseliny z extrakčního roztoku. Vzorky byly ponechány přes noc při teplotě -20 °C. DsRNA byla následně čištěna a peletována pomocí ledového ethanolu, který se odstranil po centrifugaci při teplotě 4 °C při otáčkách 14000 rpm po dobu 15 minut. Tekutá část byla odstraněna a vysrážený pelet se ponechal 5 minut vysoušet v otevřené zkumavce na filtračním papíře. Pro uchování nukleové kyseliny po delší dobu byl pelet rozpuštěn ve sterilní vodě o objemu 30 µl a uchován při teplotě -80 °C.

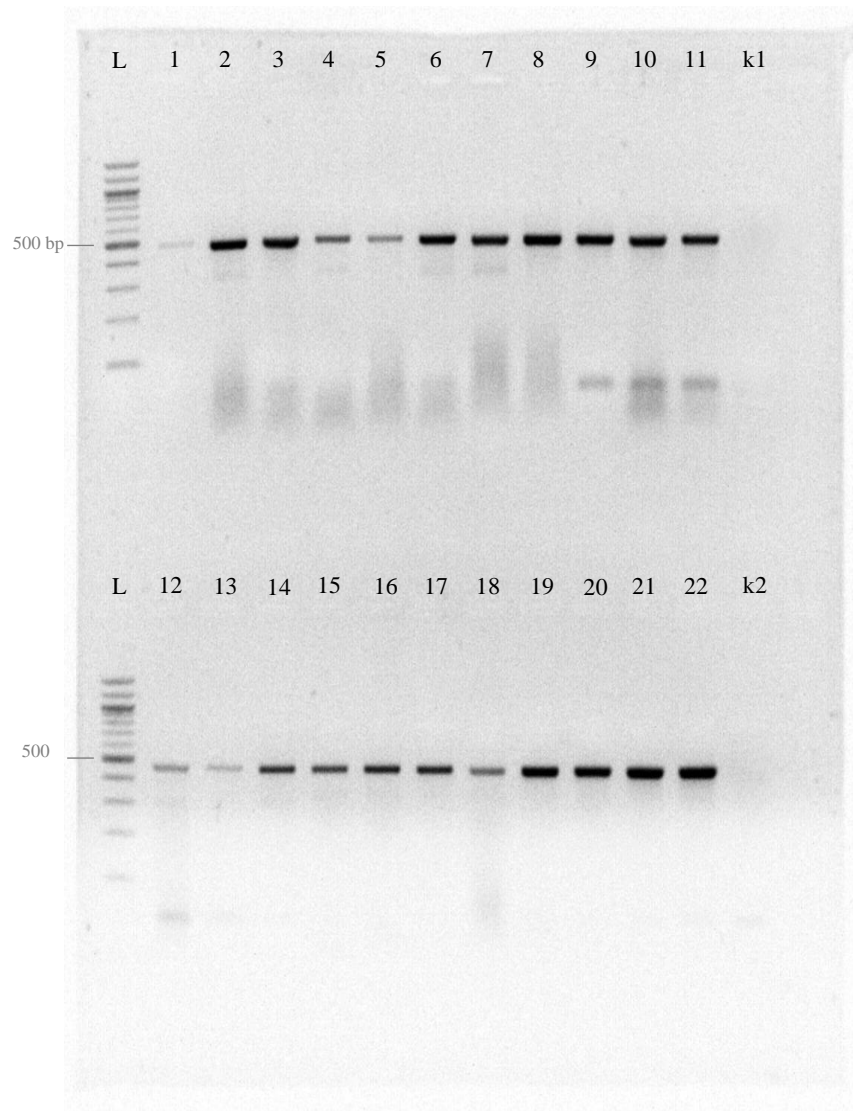
Pro vizualizaci vzorků, kde byly identifikovány dsRNA elementy, byl použit 1,5% agarózový gel s přidáním vizualizačního barviva EtBr. Vzorky byly smíchány s barvivem Gel Loading Dye, Purple 6X (New England BioLabs), na 15 µl vzorku bylo přidáno 15 µl barviva. Vzorky byly nanесeny na gel v množství 20 µl a vystaveny napětí 100 V po dobu 1 hodiny. Poté byly vyhodnoceny délky fragmentů v porovnání s pozitivní kontrolou. Jako pozitivní kontrola byl použit houbový rod *Fusarium*, u kterého byla přítomnost dsRNA elementu spolehlivě detekována.

5 Výsledky

5.1 Identifikace hub z neznámých vzorků

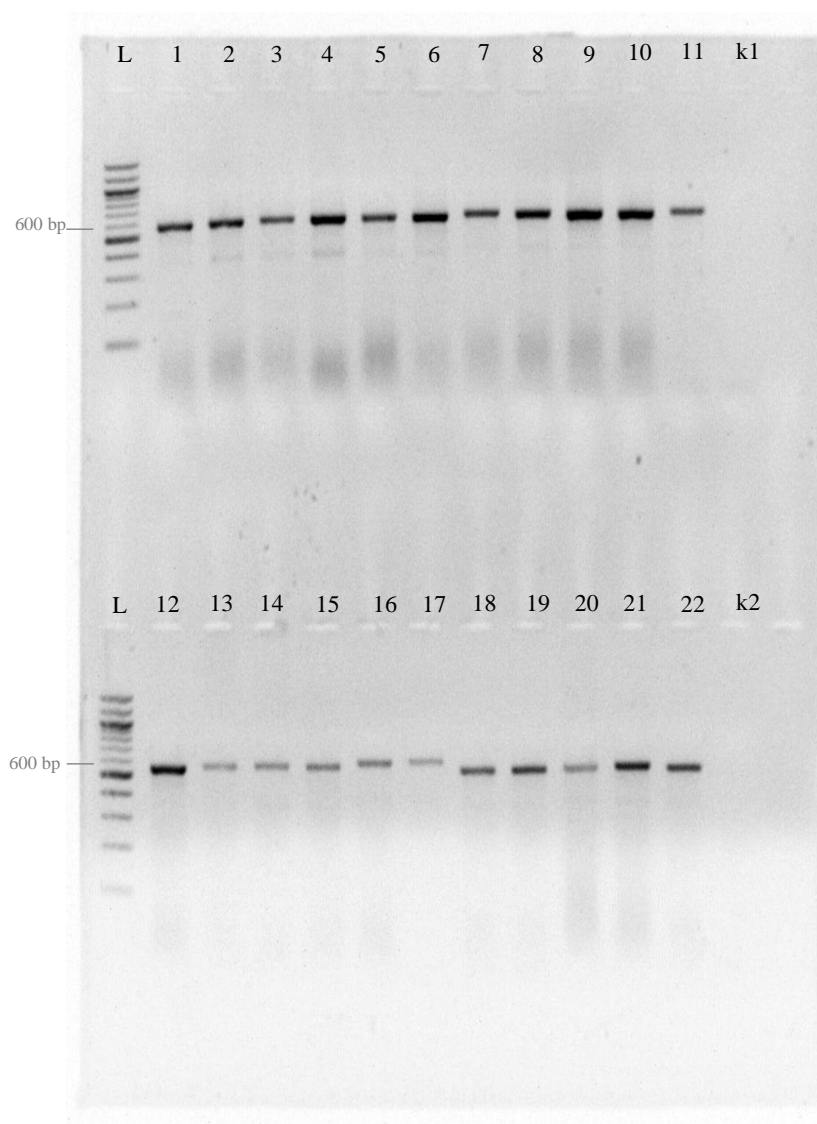
V bakalářské práci bylo testováno celkem 22 vzorků hub. Všechny vzorky byly úspěšně kultivovány na agarovém živném médiu, kde po dobu 2-3 týdnů vyrostla vzhledově odlišná mycelia. Z těchto mycelií byla následně extrahována nukleová kyselina ve formě DNA podle protokolu popsáného výše. Celkový výtěžek DNA byl vyhodnocen spektrofotometricky, který se v závislosti na jednotlivém izolátu pohyboval v rozmezí od 160 do 2000 ng/ μ L. Pro amplifikaci cíleného úseku DNA byla využita izolovaná DNA o koncentraci od 160 do 600 ng/ μ L, vzorky, u kterých byly naměřeny koncentrace vyšší než 600 ng/ μ L, byly naředěny destilovanou vodou. Pro stejné vzorky označené čísly 1-22 (Tab. III) byly sestaveny tři reakce, které se lišily použitými primery a to pro oblasti ITS, TEF 1- α gen a gen pro β -tubulin. Každá reakce zahrnovala dvě negativní kontroly označené jako k1 a k2 a jako marker byl použit Quick-Load[®] Purple 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs).

V první reakci za použití dvojice primerů EF595F a EF1160R z celkového počtu 22 testovaných vzorků vykazovalo všech 22 vzorků pozitivní výsledek v agarózovém gelu o velikosti fragmentu 550 bp (Obr. 2).



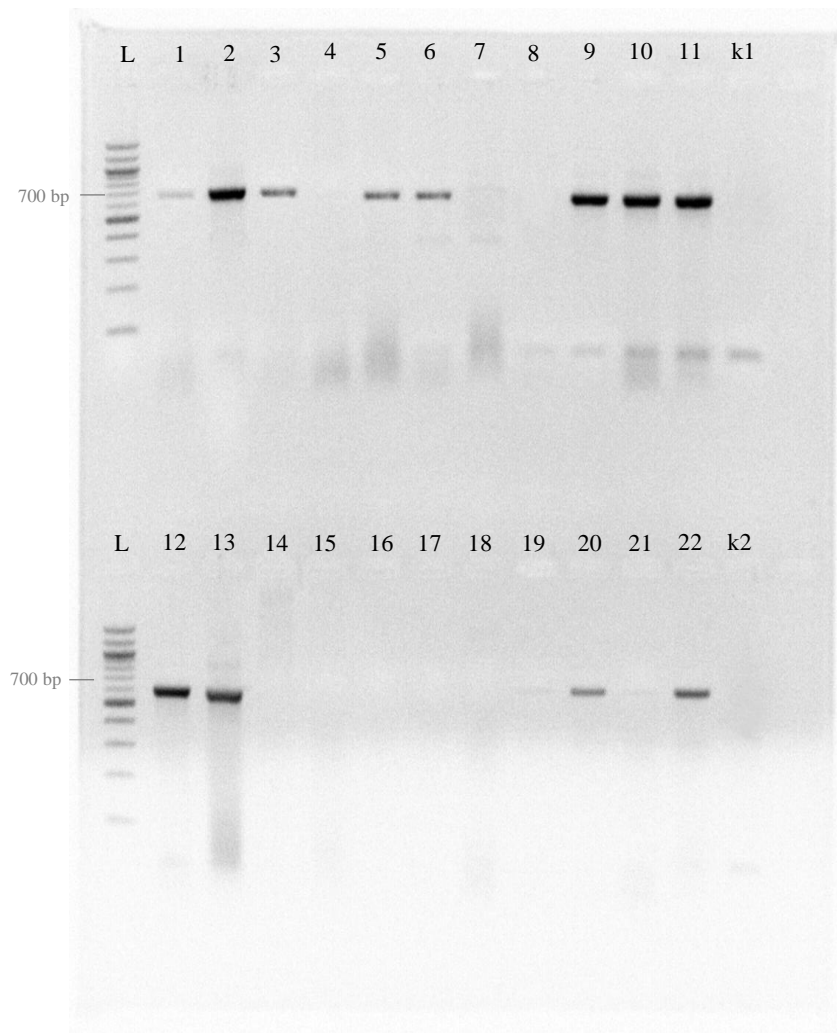
Obrázek 2: Amplifikace cíleného úseku DNA u vzorků hub pomocí TEF

Při analýze druhé reakce s páry primerů ITS1 a ITS4 byl detekován amplicon o velikosti 650 bp u všech 22 testovaných vzorků (Obr. 3).



Obrázek 3: Amplifikace cíleného úseku DNA u vzorků hub pomocí ITS

Při vizualizaci třetí reakce, kde byly použity primery TubF a TubR, 12 vzorků z celkového počtu 22 dosahovalo amplifikovaného fragmentu o velikosti 700 bp (Obr. 4).



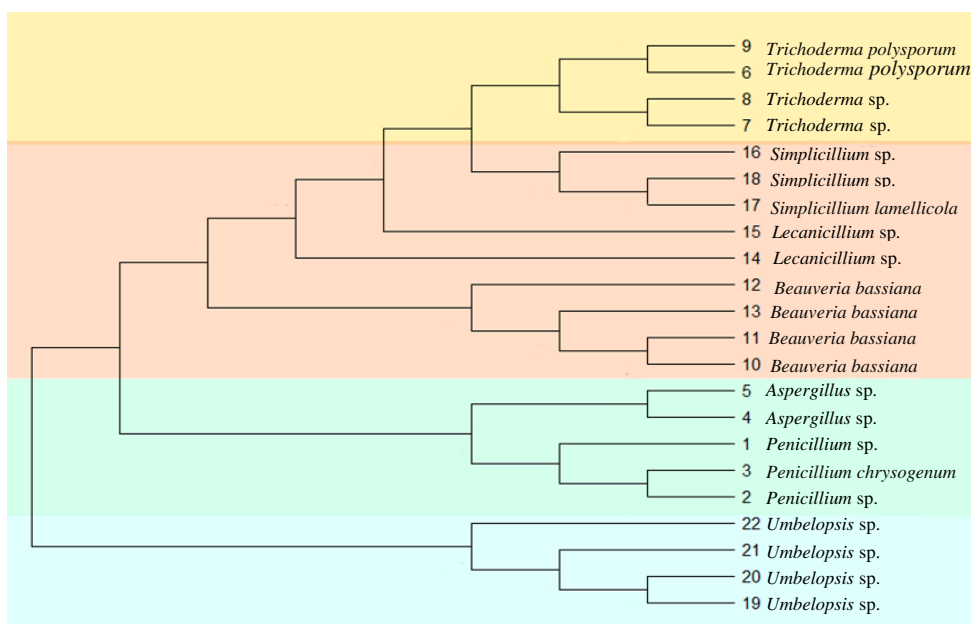
**Obrázek 4: Amplifikace vybraných úseků DNA u vzorků hub pomocí
TUB**

Pomocí PCR reakce bylo analyzováno ve třech reakcích celkem 22 vzorků označených čísly 1-22, kdy pouze 56 izolátů z celkových 66 bylo sekvenováno a použito pro fylogenetickou analýzu. Celkem bylo identifikováno sedm houbových rodů a jedenáct houbových druhů na základě ITS a TEF sekvencí (Tab. III). Vzorky 1-3 byly identifikovány jako významný rod *Penicillium*, konkrétní druhy byly přiřazeny ke vzorku 1 *Penicillium canescens* při použití ITS a vzorku 2 *P. chrysogenum* na základě ITS a TEF. Vzorky 4-5 byly identifikovány jako druh *Aspergillus oryzae* z rodu *Aspergillus* na základě ITS. Rod *Trichoderma* izolovaný z půdního prostředí byl přiřazen ke vzorkům 6-9, na úrovni druhu byl charakterizován vzorek 6 a vzorek 9 *Trichoderma polysporum* na základě ITS i TEF a vzorek 7 *Trichoderma harzianum* na základě ITS. U vzorků 10-13 byl jednoznačně určen entomopatogenní druh *B. bassiana* z rodu *Beauveria* na základě ITS i TEF. Další entomopatogenní rod *Lecanicillium* byl přiřazen ke vzorkům 14-15, kde na základě ITS byly identifikovány druhy *Lecanicillium lecanii* u vzorku 14 a *Lecanicillium muscarinum* u vzorku 15. U vzorků 16-18 byl identifikován rod *Simplicillium*, vzorek 16 a vzorek 17 byl určen jako *Simplicillium lamellicola* na základě ITS. Ve vzorcích 19-22 byl identifikován půdní druh *Umbelopsis*, vzorek 19 byl určen jako *Umbelopsis ramanniana*, vzorek 20 jako *Umbelopsis nana* a vzorek 22 jako *Umbelopsis isabellina* na základě ITS. U TUB nešlo spolehlivě rozeznat vzorky na úrovni druhů, jednotlivé rody byly přiřazeny ke vzorkům 1-3 a to rod *Penicillium*, ke vzorku 5 byl přiřazen rod *Aspergillus*, rod *Trichoderma* ke vzorku 6 a vzorku 9, rod *Beauveria* ke vzorkům 10-13 rod a ke vzorku 20 a vzorku 22 byl přiřazen rod *Umbelopsis*.

Tabulka III: Seznam identifikovaných druhů hub na základě srovnání sekvencí s veřejnou databází NCBI

vzorky	ITS	TEF	TUB
1	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>
2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium</i>
3	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>
4	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus</i>	-
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
6	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Trichoderma</i>
7	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma</i>	-
8	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>	-
9	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Trichoderma</i>
10	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria</i>
11	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria</i>
12	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria</i>
13	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Beauveria</i>
14	<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Lecanicillium</i>	-
15	<i>Lecanicillium muscarinum</i>	<i>Lecanicillium</i>	-
16	<i>Simplicillium lamellicola</i>	<i>Simplicillium</i>	-
17	<i>Simplicillium lamellicola</i>	<i>Simplicillium lamellicola</i>	-
18	<i>Simplicillium</i>	<i>Simplicillium</i>	-
19	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	<i>Umbelopsis</i>	-
20	<i>Umbelopsis nana</i>	<i>Umbelopsis</i>	<i>Umbelopsis</i>
21	<i>Umbelopsis</i>	<i>Umbelopsis</i>	-
22	<i>Umbelopsis isabellina</i>	<i>Umbelopsis</i>	<i>Umbelopsis</i>

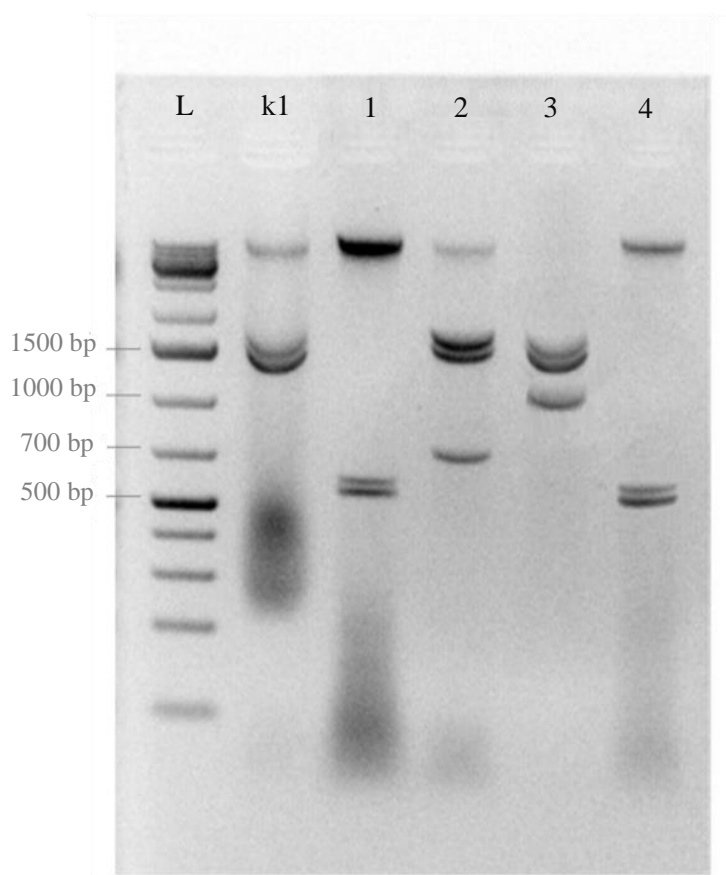
Pro vyhodnocení vztahů identifikovaných hub sloužily fylogenetické analýzy založené na ITS a TEF, které byly vytvořeny pomocí programu MEGA 11. Izoláty vykazovaly lepší rozlišení a přesnější zařazení sekvencí při použití primerů EF595F a EF1160R v porovnání s použitými primery ITS1 a ITS4. U vzorků 1-22 (Tab. III) byly vytvořeny linie na základě příbuznosti jednotlivých druhů hub (Obr. 5). Jako fylogeneticky příbuzné byly vyhodnoceny čtyři rody *Trichoderma*, *Simplicillium*, *Lecanicillium* a *Beauveria*, které patří do společného řádu *Hypocreales* z kmene *Ascomycota*. Rod *Trichoderma* byl zařazen do samostatné houbové čeledi *Hypocreaceae*, rody *Simplicillium*, *Lecanicillium* a *Beauveria* byly seskupeny do stejné houbové čeledi *Cordycipitaceae*. Do kmene *Ascomycota* byly zařazeny také rody *Aspergillus* a *Penicillium*, které byly fylogeneticky umístěny do jednoho houbového řádu *Eurotiales*, zatímco rod *Umbelopsis* z řádu *Mucorales* byl přiřazen do kmene *Chytridiomycota*.



Obrázek 5: Fylogenetický strom 22 identifikovaných hub na základě TEF

5.2 Detekce dsRNA mykovirů u identifikovaných hub

Na přítomnost mykovirů bylo analyzováno celkem 22 vzorků hub, které byly úspěšně identifikovány pomocí univerzálních houbových primerů jak bylo popsáno výše. Pouze 4 vzorky označené čísly 1-4 (Obr. 6). byly pozitivní na přítomnost dsRNA elementů v agarózovém gelu. V každé reakci byla použita pozitivní kontrola označená k1 a jako marker byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use (ThermoFisher). Pozorovaná velikost fragmentu ve vzorku 1 identifikovaného jako *S. lamellicola* dosahovala délky mezi 500 a 700 bp. Ve vzorku byl objeven jeden dsRNA element s dvěma fragmenty genomu stejně jako ve vzorku 4, který byl identifikován taktéž jako *S. lamellicola*. V druhu *L. lecanii* označeném jako vzorek 2 byly detekovány dva dsRNA elementy délky 700 bp a 1500 bp. V dsRNA o velikosti 1500 bp byly zaznamenány dva fragmenty genomu, zatímco dsRNA element délky 700 bp se skládá z jednoho fragmentu. DsRNA profil ve vzorku 4 *A. oryzae* obsahoval dva fragmenty délky okolo 1500 bp a jeden fragment délky okolo 1000 bp.



Obrázek 6: Detekce dsRNA elementů

6 Diskuse

6.1 Identifikace vzorků hub

Houby jsou vysoce rozmanitou skupinou organismů obývajících širokou škálu stanovišť. Předpokládá se, že se jedná o organismy s nejvyšší odhadovanou druhovou diverzitou, ačkoliv spousta druhů nebyla dosud objevena a plně charakterizována na molekulární úrovni. Molekulárně genetické metody založené na sekvenaci nukleové kyseliny využívají několik univerzálních houbových primerů k tvorbě fylogenetických analýz a stávají se tak hlavními technikami pro pochopení genetické diverzity hub. V této práci pro amplifikaci cílených oblastí DNA byly testovány oblasti pro ITS, TEF a TUB.

Oblasti ribozomální rDNA jsou vysoce konzervovaná místa, která se používají ve fylogenetických studiích hub. Uvádí se, že ITS se mohou lišit v různých oblastech rDNA mezi jednotlivými druhy v rámci rodu nebo v rámci populací, a proto slouží pro fylogenetické studie na taxonomické úrovni. V této práci byla oblast ITS z 22 izolátů amplifikována univerzálními primery ITS1 a ITS4, které produkovaly přibližně 650 bp amplikon. Fylogenetický strom odhalil, že se jedná o druhově variabilní skupinu hub a jednotlivé vzorky byly seskupeny do sedmi rodových linií. Mírné rozdíly v nukleotidových sekvencích zařadily některé vzorky jako fylogeneticky příbuzné druhy, přestože by měly být identické. Naopak k některým izolátům byl na základě sekvencí přiřazen stejný houbový druh, ačkoliv na agarovém médiu vykazovaly tyto izoláty morfologicky odlišné znaky.

Jak ve své práci uvádějí Manter a Vivanco (2007) tyto primery mají specifitu pro všechny vyšší houby z kmene *Ascomycota*, *Basidiomycota* a *Zygomycota*, ale vzhledem k podobnostem velikosti délky amplikonů některých druhů hub může být skutečná druhová rozmanitost mnohem vyšší. Navíc jak uvádějí Einax a Voigt (2003), velká pozornost při fylogenetických studiích hub je zaměřena na ribozomální genové sekvence, ačkoliv rDNA má vysoký obsah repetitivních sekvencí a v důsledku toho dochází k častým mutacím. Proto byly v této práci testovány primery pro geny kódujících proteiny. Tyto geny obsahují méně míst, kde může docházet k mutacím a jsou tak méně variabilní mezi několika kopiemi, které většina genomů obsahuje.

Gen pro translační elongační faktor 1- α kódující část proteinového translačního aparátu byl u 22 vzorků amplifikován pomocí EF595F a EF1160R a dosahoval délky 560 bp. Jedná se o gen, který vykazuje vysokou úroveň polymorfismu

mezi příbuznými druhy, takže byl považován za alternativu k rDNA pro fylogenetické studie. Fylogenetické analýzy na základě druhově specifických primerů TEF poskytly přesnější sekvence v porovnání s ITS a bylo získáno lepší rozlišení skupin stejně jako ve své práci uvádějí Guo et al. (2016).

Geny pro β -tubulin slouží k tvorbě evolučních vztahů na všech úrovních, především na úrovni druhů. Gen byl u 22 vzorků amplifikován pomocí TubF a TubR a dosahoval délky zhruba 700 bp. Na rozdíl od výsledků, které ve své práci uvádějí Einax a Voigt (2003) gen pro β -tubulin v této práci nebyl ideálním markerem pro odhad fylogenetických analýz a pouze 12 vzorků bylo rozpoznáno na rodové úrovni. Proto výsledky získané pomocí primerů TubF a TubR sloužily pouze pro doplnění údajů, které nám poskytly předešlé analýzy založené na oblasti ITS a genu TEF 1- α .

6.2 Detekce mykovirů u hub

Mykoviry jsou rozšířeny ve všech hlavních skupinách hub včetně rostlinných patogenních hub a entomopatogenních hub napadajících roztoče a hmyz. Identifikace dsRNA elementů se provádí extrakcí celkové nukleové kyseliny z izolátů a vizualizací pomocí agarózové elektroforézy. V této práci byly nalezeny dva elementy dsRNA u houbového druhu *A. oryzae* odebraného z Chelčic (Příloha A). Dva fragmenty dosahovaly velikosti zhruba 1500 bp a jeden velikosti okolo 1000 bp. Výzkumy u izolátů z rodu *Aspergillus* odhalily přítomnost dsRNA elementů u několika různých druhů jako je *A. niger*, *A. foetidus*, *A. ochraceus*, *A. flavus* a další, ale žádné dosud popsané mykoviry nebyly sekvenovány a charakterizovány u druhu *A. oryzae*. Proto byly hledány dsRNA elementy u jiných zástupců ze stejného rodu *Aspergillus*, které se nejvíce podobaly fragmentům detekovaných v této práci. Podle výsledků, které ve své studii uvádějí Kotta-Loizou a Coutts (2017) byl dsRNA profil nejvíce podobný u druhu *A. fumigatus*, ve kterém bylo objeveno tři až pět dsRNA elementů o velikosti od 870 bp do 3000 bp a u druhu *A. flavus* používaného při fermentaci potravin v biotechnologických aplikacích jako *Aspergillus oryzae*, který obsahoval jeden až devět elementů dsRNA o velikosti od 400 bp do 3000 bp.

U entomopatogenního druhu *B. bassiana* byly popsány dsRNA elementy různé délky. Kotta-Loizou et al. (2017) ve své studii uvádějí, že nalezený genom viru z izolátu *B. bassiana* se skládal z různého počtu dsRNA o velikosti od 800 bp

do 3000 bp. Ve studii, kterou uvádějí Filippou et al. (2018) byly zaznamenány odlišné elektroforetické profily pro izoláty *B. bassiana*, které obsahovaly jeden dsRNA element se dvěma fragmenty genomu o velikosti 1600 bp a 1700 bp podobné těm, které byly detekované v této práci v houbovém druhu *L. lecanii* odebraného z Bavorova (Příloha A). Přestože se jedná o odlišné druhy, rod *Lacanicillium* a rod *Beuaveria* patří do fylogeneticky příbuzného řádu *Hypocreales*, čeledi *Clavicipitaceae* z kmene *Ascomycota*, lze proto předpokládat, že mykoviry objevené v druhu *L. lecanii*, které obsahovaly dva fragmenty dsRNA délky 1500 bp a jeden fragment délky 500 bp by mohly patřit do stejné virové čeledi *Partitiviridae*. Žádné dsRNA elementy nebyly dosud popsány u rodu *Simplicillium* a u rodu *Lecanicillium*, proto získané výsledky nelze porovnat s jinými studiemi zabývajícími se mykoviry a byly by potřeba udělat rozsáhlejší studie u druhů *A. oryzae*, *S. lamellicola* a *L. lecanii*.

7 Závěr

Pomocí univerzálních genetických markerů pro houbové organismy oblasti ITS, TEF 1- α genu a genu pro β -tubulin, byly získány sekvence z testovaných vzorků hub. Na základě sekvencí získaných amplifikací DNA úseku použitím dvojice primerů ITS1 s ITS4 a EF595F s EF1160R bylo možné k jednotlivým izolátům přiřadit příslušný houbový rod nebo druh a pro určení fylogenetické příbuznosti identifikovaných izolátů byl vytvořen fylogenetický strom ze sekvencí genu pro TEF. Ačkoliv gen pro β -tubulin použitím primerů TubF s TubR měl sloužit pro lepší pochopení druhové diverzity u vzorků identifikovaných jako *Penicillium*, *Aspergillus* a *Trichoderma*, na základě získaných sekvencí nebylo možné k izolátům přiřadit konkrétní druh. Dále byla prokázána přítomnost dsRNA elementů u vzorků *A. oryzae* a entomopatogenních druhů *S. lamellicola* a *L. lecanii*. Jelikož tyto mykoviry nebyly dosud sekvenovány a charakterizovány na molekulární úrovni, nebylo možné určit, o jaký virus se jedná. Pro další charakterizaci a zařazení izolátu do virové čeledi budou vzorky dále zkoumány. Dalším krokem po elektroforetické separaci na agarózovém gelu je použití dsRNA jako templátu pro syntézu cDNA a PCR amplifikaci pomocí náhodných primerů a RNA ligázy k následnému klonování a sekvenování. Další studie by se měly zaměřit na objasnění molekulárních mechanismů interakce mezi hostitelem a mykovirem, zejména účinku mykovirové infekce na houbového hostitele.

Seznam použité literatury

Abbas, A. (2016). A review paper on mycoviruses. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7(12), s. 390-393.

Abid, M., Khan, M. A. U., Mushtaq, S., Afzaal, S. a Haider, M. S. (2018). A comprehensive review on mycoviruses as biological control agent. *World Journal of Biology and Biotechnology*, 3(2), s. 178-192.

Aryal, S. (2019). Potato dextrose agar (PDA)-principle, uses, composition, procedure and colony characteristics. <https://microbiologyinfo.com/> [online], [cit. 2021-8-23]. Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/potato-dextrose-agar-pda-principle-uses-composition-procedure-and-colony-characteristics/#>

Baldrian, P., Větrovský, T., Lepinay, C. a Kohout, P. (2021). High-through put sequencing view on the magnitude of global fungal diversity. *Fungal Diversity*, s. 13225.

Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. a Silverman, G. J. (2010). Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, (11), s. 1101.

Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N. a Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, (10), s. 3389-3404.

Bhat, A. I. a Rao, G. P. (2020). Characterization of plant viruses. New York, NY: Springer US, *Springer Protocols Handbooks*, s. 285-302.

Carris, L. M., Little, C. R. a Stiles, C. M. (2012). Introduction to *Fungi*. *The Plant Health Instructor*, s. 1094-1097.

Cassedy, A., Parle-McDermott, A. a O'Kennedy, R. (2021). Virus detection: a review of the current and emerging molecular and immunological methods. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 20(8):637559.

Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H., Lin, H. a Milgroom, M. G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 159(1), s. 107-118.

Čurn, V. (2008). Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum L.*). České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

Dauda, Z., Maina, U. M., Galadima, I. a Gambo, F. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of entomology and zoology studies*, 6(1), s. 27-32.

Dugan, K. A., Lawrence, H. S., Hares, D. R., Fisher, C. L. a Budowle, B. (2002). An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Sciences* 47, s. 811-818.

Einax, E. a Voight, K. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum *Fungi*. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(3), s. 185-194.

Fadiji, A. E. a Babalola, O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 15(8):467.

Fajarningsih, N. D. (2017). Internal transcribed spacer (ITS) as DNA barcoding to identify fungal species: a review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 11(2), s. 37-44.

Filippou, C., Garrido-Jurado, I., Meyling, N. V., Quesada-Moraga, E., Coutts, R. H. A., Kotta-Loizou, I. (2018). Mycoviral population dynamics in Spanish isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Viruses*, 10(12), s. 123-136.

Garibyan, L. a Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), s. 1-4.

Gomes, A. a Korf, B. (2018). Genetic testing techniques. *Pediatric Cancer Genetics, Elsevier*, s. 47-64.

Guo, T., Wang, H. C., Xue, W. Q., Zhao, J., Yang, Z. K. a Klopfenstein, N. B. (2016). Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China,

seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLOS ONE*, 11(5), s. 1371-1392.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. a Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), s. 43-56.

Hawksworth, D. L., Lücking, R., Heitman, J. a James, T. Y. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, 5(4), s. 79-95.

Heijden, M. G. A., Martin, F. M., Selosse, M.-A. a Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), s. 1406-1423.

Heikrujam, J., Kishor, R. a Behari Mazumder, P. (2020). The chemistry behind plant DNA isolation protocols. *Biochemical Analysis Tools-Methods for Bio-Molecules Studies, IntechOpen*.

Chandler, D. B. (2017). Basic and applied research on entomopathogenic fungi. *Microbial Control of Insect and Mite Pests, Elsevier*, s. 69-89.

Chauhan, T. (2018). Importance of tris-EDTA (TE) buffer in DNA extraction. *Genetic Education: Learn Genetics* [online], [cit. 2021-8-23]. Dostupné z: <https://geneticeducation.co.in/importance-of-tris-edta-te-buffer-in-dna-extraction/>

Jia, M., Chen, L., Xin, H.-L., Zheng, C.-J., Rahman, K., Han, T. a Qin, L.-P. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 9(7):906.

Kauserud, H. a Schumacher, T. (2001). Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (*Basidiomycota*). *Mycological Research*, 105(6), s. 676-683.

Koichiro, T., Glen, S. a Sudhir, K. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38 (7), s. 3022–3027.

Kotta-Loizou, I., a Coutts, R. H. A. (2017). Mycoviruses in *Aspergilli*: a comprehensive review. *Frontiers Microbiology*, (8):1699.

Kotta-Loiou, I., Coutts, R. H. A. a Dawe, A. L. (2017). Studies on the virome of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reveal. Novel dsRNA elements and mild hypervirulence. *PLOS Pathogens*, 13(1):1006183.

Koukol, O. a Haňáčková Z. (2017). Endofyty – všudypřítomní kolonizátoři rostlinných pletiv. *Živa*. Nakladatelství Academia, Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., za podpory Akademie věd ČR, 2017, (živa 5/2017), s. 227-231.

Kuhn, J. H. (2021). Virus taxonomy. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, s. 28-37.

Kyrychenko, A. N., Tsyganenko, K. S. a Olishevskaya, S. V. (2018). Hypovirulence of mycoviruses as a tool for biotechnological control of phytopathogenic fungi. *Cytology and Genetics*, 52(5), s. 374-384.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. a Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62): 3923.

Lee, S. H., Yun, S.-H., Chun, J. a Kim, D.-H. (2017). Characterization of a novel dsRNA mycovirus of *Trichoderma atroviride* NCF028. *Archives of Virology*, 162(4), s. 1073-1077.

Lemke, A. P. a Nash, C. H. (1974). Fungal viruses. *Bacteriological reviews*, 38 (1), s. 29-56.

Manter, D. K. a Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), s. 7-14.

Mascarin, G. M. a Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), s. 11274-11300.

-
- Mata, C. P., Rodríguez, J. M., Suzuki, N. a Castón, J. R. (2020). Structure and assembly of double-stranded RNA mycoviruses. *Virus Assembly and Exit Pathways, Elsevier*, s. 213-247.
- Mertens, P. (2004). The dsRNA viruses. *Virus Research*, 101(1), s. 3-13.
- Morris, T. J. a Dodds, J. A. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69(8), s. 854-858.
- Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), s. 632-642.
- Padhi, L., Mohanta, Y. K. a Panda, S. K. (2013). Endophytic fungi with great promises: a review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3(3), s. 152-170.
- Pearson, M. N., Beaver, R. E., Boine, B. a Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10(1), s. 115-128.
- Qin, D., Wang, L., Han, M., Wang, J., Song, H., Yan, X., Duan, X. a Dong, J. (2018). Effects of an endophytic fungus *Umbelopsis dimorpha* on the secondary metabolites of host-plant *Kadsura angustifolia*. *Frontiers in Microbiology*, 22(9):2845.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J. a Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80(3), s. 756-770.
- Ryu, W.-S. (2017). Discovery and classification. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, s. 3-20.
- Sasikumar, A. N., Perey, W. B. a Kinzy, T. G. (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(4), s. 543-555.
- Segers, G. C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q. a Nuss, D. L. (2007). Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31), s. 12902-12906.
-

Shahi, S., Eusebio-Cope, A., Kondo, H., Hillman, B. I., Suzuki, N. a Simon, A. E. (2019). Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. *Journal of Virology*, 93(6), s. 1503-1521.

Shin, T. S., Yu, N. H., Lee, J., Choi, G. J., Kim, J.-C. a Shin, C. S. (2017). Development of a biofungicide using a mycoparasitic fungus *Simplicillium lamellicola* BCP and its control efficacy against gray mold diseases of tomato and ginseng. *The Plant Pathology Journal*, 33(3), s. 337-344.

Sutela, S., Poimala, A. a Vainio, E. (2019). Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9), s. 119-150.

Thapa, S., Rai, N., Limbu, A. a Joshi, A. (2020). Impact of *Trichoderma* spp. in agriculture: a mini review. *Journal of Biology and Today's World* 2020, 9 (7), s. 227.

Togueo, R. M. K. a Boyom, F. F. (2020). *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *Biotech*, 10(3), s. 13205-13240.

Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., Sato, H. a Lespinet, O. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of *Ascomycetes* and *Basidiomycetes* in environmental samples. *PLOS ONE*, 7(7):40863.

Treseder, K. K. (2013). The extent of mycorrhizal colonization of roots and its influence on plant growth and phosphorus content. *Plant and Soil*, 371(1-2), s. 1-13.

Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., et al. (2021). Changes to virus taxonomy and to the international code of virus classification and nomenclature ratified by the *International Committee on Taxonomy of Viruses*. *Archives of Virology*, 166(9), s. 2633-2648.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Lokalizace primerů ITS	15
Obrázek 2: Amplifikace cíleného úseku DNA u vzorků hub pomocí TEF	33
Obrázek 3: Amplifikace cíleného úseku DNA u vzorků hub pomocí ITS	34
Obrázek 4: Amplifikace vybraných úseků DNA u vzorků hub pomocí TUB	35
Obrázek 5: Fylogenetický strom 22 identifikovaných hub na základě TEF	38
Obrázek 6: Detekce dsRNA elementů	39

Seznam tabulek

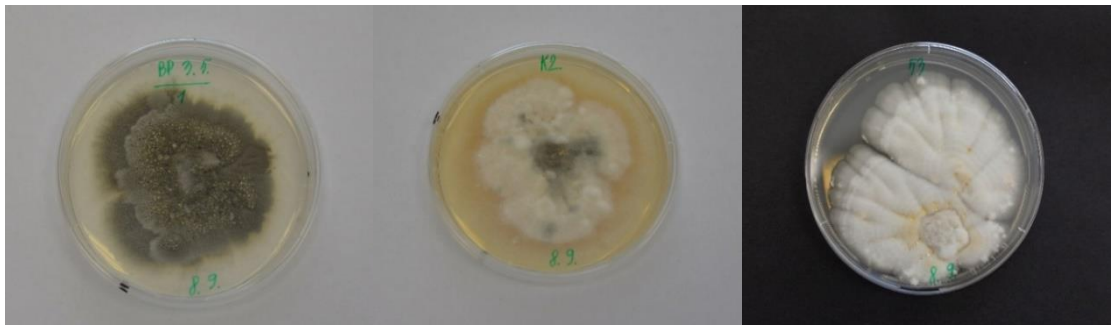
Tabulka I: Seznam použitých primerů	28
Tabulka II: Reakční teploty a časy u ITS, EF a TUB primerů.....	28
Tabulka III: Seznam identifikovaných druhů hub na základě srovnání sekvencí s veřejnou databází NCBI	37

Seznam příloh

Příloha A: Seznam míst odběru u vzorků hub	52
Příloha B: Růst hub na PDA I.....	53
Příloha C: Růst hub na PDA II.....	54

Příloha A: Seznam míst odběru u vzorků hub

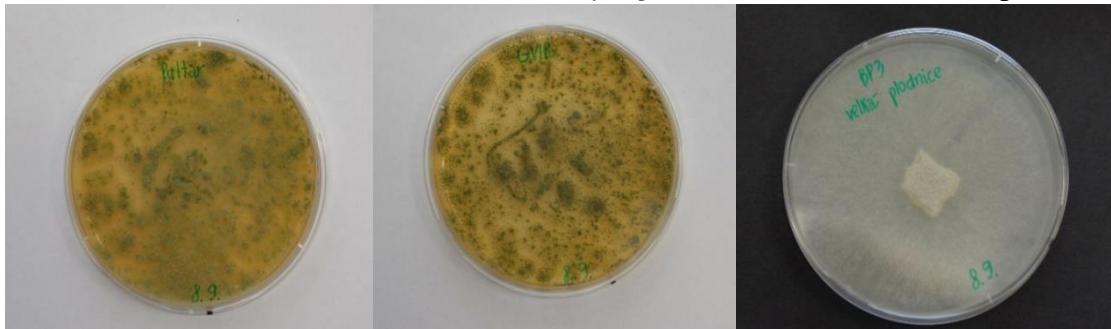
Název vzorku	Místo odběru
<i>Penicillium canescens</i>	Kvítkovice
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bavorov
<i>Penicillium spp.</i>	Blanský les
<i>Aspergillus oryzae I</i>	Chelčice
<i>Aspergillus oryzae II</i>	Bavorov
<i>Trichoderma polysporum I</i>	Kvítkovice
<i>Trichoderma harzianum</i>	České Budějovice
<i>Trichoderma spp.</i>	Boletice
<i>Trichoderma polysporum II</i>	Lišov
<i>Beauveria bassiana I</i>	Písecké hory (Všeteč)
<i>Beauveria bassiana II</i>	Písecké hory (Všeteč)
<i>Beauveria bassiana III</i>	Písecké hory (Všeteč)
<i>Beauveria bassiana IV</i>	Dlouhá Ves (u Chelčic)
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Bavorov
<i>Lecanicillium muscarinum</i>	Bavorov
<i>Simplicillium lamellicola I</i>	České Budějovice
<i>Simplicillium lamellicola II</i>	Helfenburg
<i>Simplicillium spp.</i>	České Budějovice
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	Lednice
<i>Umbelopsis nana</i>	Lišov
<i>Umbelopsis spp.</i>	Dlouhá Ves (u Chelčic)
<i>Umbelopsis isabellina</i>	Bavorov



Penicillium canescens

Penicillium chrysogenum

Penicillium sp.



Aspergillus oryzae I

Aspergillus oryzae II

Trichoderma polysporum I



Trichoderma harzianum

Trichoderma sp.

Trichoderma polysporum II



Beauveria bassiana I

Beauveria bassiana II

Beauveria bassiana III

Příloha B: Růst hub na PDA I



Beauveria bassiana IV

Lecanicillium lecanii

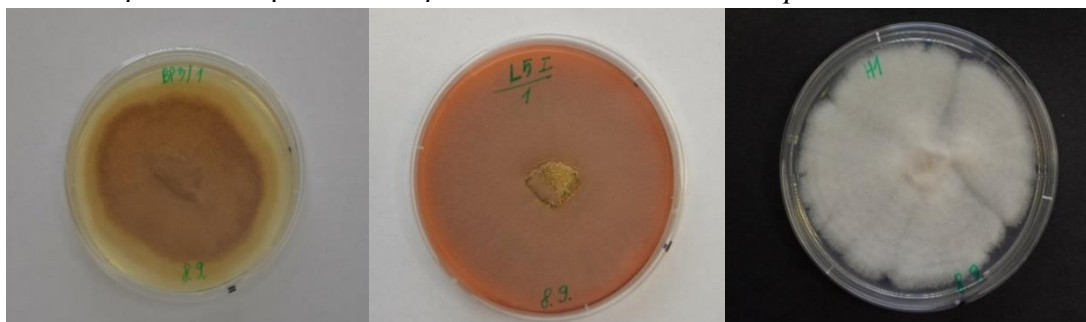
Lecanicillium muscarinum



Simplicillium sp.

Simplicillium lamellicola I

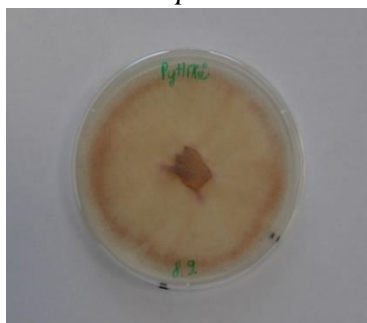
Simplicillium lamellicola II



Umbelopsis nana

Umbelopsis ramanniana

Umbelopsis isabellina



Umbelopsis sp.

Příloha C: Růst hub na PDA II

Seznam použitých zkratek

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová DNA
ssDNA	Jednovláknová DNA
dsRNA	Dvouvláknová RNA
ssRNA	Jednovláknová RNA
dsDNA	Dvouvláknová DNA
rDNA	Ribozomální DNA
cDNA	Komplementární DNA
PCR	Polymerázová řetězová reakce
ITS	Internal transcribed spacer
TEF	Translační elongační faktor
TUB	Tubulin
LHT systém	Systém Lwoff, Horne a Tournier
BC	<i>Baltimore classification</i>
IAMS	<i>International Association of Microbiological Societies</i>
ICTV	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
INSDC	<i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDA	Potato dextrose agar
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
BME	β -merkaptoethanol
IAA	Isoamylalkohol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
TE	Tris-EDTA
EtBr	Ethidium bromid
STE	Chlorid sodný, tris-EDTA
