

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2021**

**Adéla Kovalíková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



***Plasmopara halstedii* virus v České republice**

**Bakalářská práce**

**Adéla Kovalíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí práce: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.**

**Konzultantka: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Adéla KOVALÍKOVÁ**  
Osobní číslo: **R18648**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Plasmopara halstedii virus v ČR**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1/ Zpracování literárního přehledu k dané problematice:

interakce slunečnice – *Plasmopara halstedii* (Ph) – *Plasmopara halstedii virus* (PhV)

výskyt a patogenní variabilita Ph v ČR

viry peronospor, podrobná charakteristika PhV, rozšíření ve světě, hypovirulence Ph

2/ Vyhodnocení dat z fenotypového stanovení ras Ph na diferenčním souboru slunečnice

3/ Příprava vzorků z izolátů Ph z ČR, extrakce RNA, reverzní transkripce do cDNA, PCR amplifikace pomocí specifických PhV primerů, elektroforetická detekce fragmentů

4/ Zhodnocení výskytu a rozšíření PhV na území ČR, srovnání s dřívějšími daty

5/ Interpretace výsledků a souhrn

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Drábková Trojanová, Z., Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Lebeda, A. (2018): Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflower in the Czech Republic. *Plant Pathology* 67(1): 136-144.

Gulya, T.J., Freeman, T.P., Mayhew, D.E. (1990): Virus-like particles in *Plasmopara halstedii*, sunflower downy mildew. *Phytopathology* 80: 1032.

Gulya, T.J., Freeman, T.P., Mayhew, D.E. (1992): Ultrastructure of virus-like particles in *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* 70: 334-339.

Thines, M. (2014): Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes – a global overview. *European Journal of Plant Pathology* 138: 431-447.

Trojanová, Z., Sedlářová, M., Gulya, T.J., Lebeda, A. (2017): Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower – a review. *Plant Pathology* 66(2): 171-185.

Heller-Dohmen, M., Göpfert, J. C., Hammerschmidt, R., Spring, O. (2008): Different pathotypes of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* all contain isometric virions. *Molecular Plant Pathology* 9 (6): 777-786.

Heller-Dohmen, M., Göpfert, J. C., Pfannsteil, J., Spring, O. (2011): The nucleotide sequence and genome organization of *Plasmopara halstedii virus*. *Virology Journal* 8: 123.

Grasse, W., Zipper, R., Totska, M., Spring, O. (2013): *Plasmopara halstedii virus* causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genetics and Biology* 57: 42-47.

Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 49 (1): 1-10.

Grasse, W., Spring, O. (2015): Occurrence and genetic diversity of the *Plasmopara halstedii* virus in sunflower downy mildew populations of the world. *Fungal Biology* 119: 170-178.

Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Drábková Trojanová, Z., Bartůšek, T., Slobodianová, L., Lebeda, A. (2016): First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from Czech Republic – short communication. *Plant Protection Science* 52(3): 182-187.

Spring, O., Zipper, R. (2016): Asexual Recombinants of *Plasmopara halstedii* Pathotypes from Dual Infection of Sunflower. *PLOS ONE* 11 (12).

Grasse, W., Spring, O. (2017): ssRNA viruses from biotrophic Oomycetes form a new phylogenetic group between Nodaviridae and Tombusviridae. *Archives of Virology* 162(5): 1319-1324.

Spring, O. (2019): Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew – Review. *Plant Protection Science* 55: 149-158.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.**  
Katedra botaniky

Datum zadání bakalářské práce: **20. dubna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2021**

L.S.

---

**doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.**  
děkan

---

**prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.**  
vedoucí katedry

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Adéla Kovalíková

**Název práce:** *Plasmopara halstedii* virus v České republice

**Typ práce:** Bakalářská práce

**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (Katedra botaniky PřF UP v Olomouci)

**Rok obhajoby práce:** 2021

### **Abstrakt:**

*Plasmopara halstedii* je původcem plísňě slunečnice, která celosvětově významně snižuje výnos plodiny. V ČR jsou rozšíření a patogenní variabilita podrobně studovány od roku 2007. Infekce *Plasmopara halstedii* virus (PhV) může způsobovat hypovirulenci *P. halstedii*, čehož by mohlo být využito v biologické ochraně slunečnice.

V rámci bakalářské práce byl zjišťován výskyt PhV v izolátech *P. halstedii* pocházejících ze šesti lokalit České republiky (Brno-Chrlice, Hustopeče u Brna, Kroměříž, Lednice, Olomouc a Podivín) z let 2014–2020. K detekci viru byla použita metoda RT-PCR amplifikace se specifickými primery. Získaná data byla porovnávána s dříve získanými údaji. Z 33 studovaných izolátů *P. halstedii* byl výskyt PhV potvrzen u 24 z nich. Přítomnost viru byla prokázána na pěti studovaných lokalitách vyjma pozemků zkušební stanice ÚKZUZ v Brně-Chrlicích.

**Klíčová slova:** *Plasmopara halstedii*, *Plasmopara halstedii* virus, fyziologické rasy, slunečnice, RT-PCR, hypovirulence

**Počet stran:** 63

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** český

**Bibliographic identification**

**Author's first name and surname:** Adéla Kovalíková

**Title:** *Plasmopara halstedii virus* in the Czech Republic

**Type of thesis:** Bachelor thesis

**Workplace:** Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

**Supervisor:** doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. (Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc)

**The year of presentation:** 2021

**Abstract:**

*Plasmopara halstedii* is a causal agent of sunflower downy mildew with global distribution and negative economic impact on the crop yield, which has been monitored in the Czech Republic from 2007 (distribution as well as pathogenic variability). Infection by *Plasmopara halstedii virus* can cause hypovirulence in *P. halstedii* which is of importance in biological regulation of sunflower downy mildew.

Within this bachelor thesis presence of PhV was tested in *P. halstedii* isolates originating from six locations in the Czech Republic (Lednice, Olomouc, Kroměříž, Brno-Chrlice, Hustopeče u Brna and Podivín), collected between years 2014 and 2020. RT-PCR using PhV-specific primers revealed presence of PhV in 24 out of 33 *P. halstedii* isolates. The data was compared with those obtained in earlier studies. Presence of PhV was confirmed in five localities except Brno-Chrlice.

**Keywords:** *Plasmopara halstedii*, *Plasmopara halstedii virus*, physiological races, sunflower, PCR, hypovirulence

**Number of pages:** 63

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením doc. RNDr. Michaely Sedlářové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, dne

## **Poděkování**

Děkuji své vedoucí doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za odborné vedení při zpracovávání bakalářské práce, své konzultantce Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za předání praktických zkušeností při práci v laboratoři a v neposlední řadě svým blízkým za podporu během mého studia. Zpracování bakalářské práce bylo podpořeno projektem IGA UP PřF-2021-01.



## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce .....	2
3	Literární přehled .....	3
3.1	Charakteristika <i>Plasmopara halstedii</i> .....	3
3.1.1	Životní cyklus <i>Plasmopara halstedii</i> .....	3
3.1.2	Vliv <i>Plasmopara halstedii</i> na biologii hostitele .....	4
3.1.3	Morfologie <i>Plasmopara halstedii</i> .....	5
3.1.4	Původ a šíření <i>Plasmopara halstedii</i> .....	6
3.1.5	Patogenita <i>Plasmopara halstedii</i> .....	8
3.1.6	Genetická diverzita <i>Plasmopara halstedii</i> .....	10
3.1.7	Determinace ras <i>Plasmopara halstedii</i> .....	12
3.1.8	Alternativní způsoby determinace ras <i>Plasmopara halstedii</i> .....	15
3.1.9	Variabilita a výskyt <i>Plasmopara halstedii</i> v ČR .....	17
3.2	Viry hub a oomycet .....	20
3.2.1	Obecná charakteristika mykovirů .....	20
3.2.2	Taxonomie a původ mykovirů .....	21
3.2.3	Přenos mykovirů .....	22
3.2.4	Vliv mykovirů na biologii hostitele .....	22
3.2.5	Antivirová obrana houbových organismů .....	23
3.2.6	Viry oomycet .....	24
3.3	Charakteristika <i>Plasmopara halstedii virus</i> .....	26
3.3.1	Morfologie PhV .....	26
3.3.2	Interakce PhV s <i>Plasmopara halstedii</i> .....	27
3.3.3	Genom PhV.....	28
3.3.4	Rozšíření PhV .....	29
3.3.5	Taxonomické zařazení PhV .....	30
4	Materiál a metody .....	32
4.1	Biologický materiál .....	32

4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	34
4.3	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	36
4.3.1	Izolace RNA.....	36
4.3.2	Reverzní transkripce .....	36
4.3.3	Polymerázová řetězová reakce.....	37
4.3.4	Elektroforetická separace v agarózovém gelu .....	38
5	Výsledky .....	40
6	Diskuze.....	48
7	Závěr .....	52
8	Seznam použité literatury.....	53

## Seznam symbolů a zkratk

CC-NBS-LRR	coiled-coil nucleotide binding site leucin rich repeat
CP	plášťový protein (coat protein)
DMPH	downy mildews with pyriform haustoria
dsRNA	dvouvláknová RNA
EF	entomopatogenní houby (entomopathogenic fungi)
ESTs	expressed sequence tag
HR	hypersenzitivní reakce
ICTV	Mezinárodní výbor pro taxonomii virů (International Committee on Taxonomy of Viruses)
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
MLG	multilokusový genotyp
mtDNA	mitochondriální DNA
MU	Mendelova univerzita
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PCD	programovaná buněčná smrt (programmed cell death)
PhV	<i>Plasmopara halstedii virus</i>
PTI	PAMP-triggered immunity
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza
RISC	RNA-induced silencing complex
SDI	Soil drench inoculation
SmV-A	<i>Sclerophthora macrospora virus A</i>
SmV-B	<i>Sclerophthora macrospora virus B</i>
ssRNA	jednovláknová RNA (single-stranded RNA)
+ssRNA	jednovláknová RNA s pozitivní polaritou

-ssRNA	jednovláknová RNA s negativní polaritou
TIR-NBS-LRR	Toll/interleukin-1 receptor nucleotide binding site leucin rich repeat
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
<i>vic</i>	vegetativní inkompatibilita
VLP	viru podobná částice (virus-like particle)
VSR	virové supresory RNA silencingu
vsRNA	virus-derived small RNA

## Seznam obrázků

Obr. 1: Původ a rozšíření *Plasmopara halstedii*.

Obr. 2: Teoretické možnosti průběhu parasexuální genetické výměny u *Plasmopara halstedii*.

Obr. 3: Genetická variabilita ve francouzské populaci *Plasmopara halstedii*.

Obr. 4: Lokality s výskytem *Plasmopara halstedii* v České republice v letech 2007–2014.

Obr. 5: Isometrické viriony PhV s 4nm výběžky na jejich povrchu.

Obr. 6: Intenzita sporulace *Plasmopara halstedii*.

Obr. 7: Globální rozšíření PhV.

Obr. 8: Fylogenetická analýza aminokyselinové sekvence RdRp, plášťového proteinu a fylogenetická analýza kombinující aminokyselinové sekvence RNA-dependentní RNA polymerázy a plášťového proteinu.

Obr. 9: Detekce PhV za použití PCR primerů PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2.

Obr. 10: Detekce PhV za použití PCR s kombinacemi primerů PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2 a PhV\_GW\_F1 a PhV\_GW\_R2.

Obr. 11: Rozšíření PhV v České republice na základě výsledků screeningu přítomnosti PhV v roce 2020 vedeným v rámci této práce.

Obr. 12: Rozšíření PhV v České republice na základě výsledků screeningu přítomnosti PhV v roce 2012 a v roce 2014 provedeným v rámci práce R. Pospíchalové.

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Diferenciační soubor slunečnice pro určení rasy *Plasmopara halstedii*.

Tabulka 2: Rozšíření ras *Plasmopara halstedii* v České republice v letech 2007–2014.

Tabulka 3: Seznam izolátů *Plasmopara halstedii*.

Tabulka 4: Složení reakční směsi I pro reverzní transkripci.

Tabulka 5: Sekvence primerů použitých při detekci PhV.

Tabulka 6: Podmínky PCR reakcí při detekci PhV.

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci při detekci PhV.

Tabulka 8: Celkový stupeň napadení *P. halstedii* u náchylných diferenciačních linií slunečnice.

Tabulka 9: Výsledky screeningu přítomnosti PhV v izolátech *Plasmopara halstedii* pocházejících z České republiky, který byl proveden v roce 2020.

# 1 Úvod

Mykoviry byly poprvé popsány před více než 50 lety, jejich role však není dosud plně objasněná. Mykoviry byly pozorovány ve všech hlavních taxonech říše Fungi, ale také u houbám podobných organismů z říše Chromista, třídy Oomycota. Mykoviry se vyskytují většinou bezpříznakově, mohou však pozitivně či negativně ovlivňovat biologii hostitelského houbového organismu. *Plasmopara halstedii virus* (PhV) je jedním z těch mykovirů, které biologii svého hostitele ovlivňují negativně. Přítomnost PhV v *Plasmopara halstedii*, původci plísňě slunečnice, způsobuje hypovirulenci, což by mohlo být využito v biologické ochraně slunečnice.

Tato práce se zabývá charakteristikou *P. halstedii*, PhV a jejich vzájemnou interakcí, v experimentální části pak studiem rozšíření PhV v populaci *P. halstedii* na území České republiky.

## 2 Cíle práce

Cíli této bakalářské práce bylo:

1. Vypracovat literární přehled k dané problematice:
  - interakce slunečnice-*Plasmopara halstedii*-*Plasmopara halstedii virus* (PhV);
  - výskyt a patogenní variabilita *P.halstedii* v ČR;
  - viry oomycet, podrobná charakteristika PhV, rozšíření ve světě, vliv na fitness *P. halstedii*.
2. Vyhodnotit data z fenotypového stanovení ras *P. halstedii* na diferenčním souboru slunečnice.
3. Detekovat PhV ve vzorcích z izolátů *P. halstedii* z ČR, extrahovat RNA, provést reverzní transkripci do cDNA, amplifikovat cDNA metodou PCR pomocí specifických PhV primerů a detekovat fragmenty PhV elektroforetickou separací v agarózovém gelu.
4. Zhodnotit výskyt a rozšíření PhV na území ČR, srovnat s dřívějšími daty.



### 3 Literární přehled

#### 3.1 Charakteristika *Plasmopara halstedii*

*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni (1888), obligátně biotrofní patogen (Thines, 2014), byla jakožto původce plísně slunečnice popsána poprvé roku 1888 v USA (Šindelková et al., 2008).

*P. halstedii* je zařazena do říše Chromista, oddělení Oomycota Incertae sedis, třídy Peronosporae, podtřídy Peronosporidae, řádu Peronosporales a čeledi *Peronosporaceae* (Index Fungorum, 2021). Klasifikace podle Lifemap (<http://lifemap.univ-lyon1.fr/>) založená na datech portálu NCBI (National Center for Biotechnology Information) řadí *P. halstedii* do skupiny SAR (označované také jako superříše), skupiny Stramenopiles (označované také jako infraříše), třídy Oomycota, řádu Peronosporales a čeledi *Peronosporaceae* (LifeMap NCBI, 2021).

V rámci čeledi *Peronosporaceae* se řadí do druhově nejpočetnější skupiny tzv. "downy mildew" linií, tato skupina se dále člení a *P. halstedii* patří do skupiny, jejíž zástupci tvoří pyriformní haustoria (tzv. downy mildews with pyriform haustoria, DMPH). Dalšími zástupce této skupiny jsou např. rody *Bremia* či *Basidiophora* (Voglamayer et al., 2004). *P. halstedii* infikuje kromě slunečnice roční (*Helianthus annuus*) i další rostliny rodu *Helianthus*, jmenovitě *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. petiolaris*, *H. doronicoides* a *H. grosseserratus*. Hostitelský okruh *P. halstedii* zahrnuje přes 100 druhů v rámci čeledi *Asteraceae*, například *Ambrosia artemisiifolia*, *Artemisia vulgaris* a *Xanthium strumarium* (Virányi, 2002).

##### 3.1.1 Životní cyklus *Plasmopara halstedii*

Pohlavně vzniklé oospory *Plasmopara halstedii* jsou přenosné půdou a způsobují primární infekci klíčících rostlin. Oospory umožňují patogenu přežít v půdě a v nažkách po několik let (Spring, 2001). Za příznivých podmínek oospory klíčí hyfou, na které se vytváří zoosporangia produkující zoospory. Zoospory se v půdním roztoku pohybují pomocí dvou bičíků (jeden z nich je pěřitý) a do klíčících rostlin pronikají přes kořenové vlášení, na kterých po nasednutí vyklíčí v infekční hyfu. Rostlinou prorůstají hyfy systémově s růstem rostliny a indukují zakrslý růst. Za vlhka se na listech hostitelské rostliny objevuje sporulace v podobě povlaku sporangioforů a zoosporangií. Zoosporangia jsou přenášena větrem na listy dalších rostlin, na kterých se za vlhka uvolňují zoospory. Tímto způsobem dochází k sekundární infekci

okolních rostlin, díky čemuž se patogen relativně snadno rozšíří na velkém rozsahu. Zoospory na povrchu listů encystují, klíčí hyfou a následně penetrují hostitelská pletiva (Bouterige, 2003). Mycelium prorůstá mezibuněčnými prostory hostitele a tvoří haustoria, jejichž prostřednictvím čerpá *P. halstedii* živiny z okolních buněk (Diagnostic Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Za vlhkých podmínek produkuje patogen další zoosporangia (Bouterige, 2003). *P. halstedii* je homothalický druh patogenu, což znamená, že k pohlavnímu rozmnožování (gametangiogamii) není zapotřebí účasti dvou fyziologicky odlišných mycelií (Spring, 2000).

Slabě napadené a také sekundárně infikované rostliny produkují klíčivé nažky, které nesou mycelium patogenu. Z těchto nažek vyrůstají latentně infikované rostliny. V pletivech latentně infikované rostliny se vytvářejí oospory, které se větrem roznáší do okolní půdy (Šindelková *et al.*, 2008).

Na základě symptomů jsou rozlišovány tři formy infekce: systémová, lokální a latentní (Spring, 2001). To, jaké symptomy se projeví, závisí na stáří rostliny v čase infekce *P. halstedii* a na místě průniku patogenu do rostliny (Virányi, 1988).

### **3.1.2 Vliv *Plasmopara halstedii* na biologii hostitele**

Rostliny zasažené systémovou infekcí vykazují až o dvě třetiny menší vzrůst rostliny oproti neinfikovaným rostlinám a chlorózu podél hlavních žilek listu, nažky jsou často degenerované (Spring, 2001). Listy semenáčků bývají kompletně chlorotické a zkroucené směrem dolů. Ve vlhkých podmínkách se na spodní straně listu objevuje sporulace v podobě bílého povlaku tvořeného zoosporangiofory a zoosporangii *Plasmopara halstedii*. Rozsah sporulace na abaxiální ploše listu přesně odpovídá chlorotickým oblastem na adaxiální ploše listu (Diagnostic Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Květní úbor systémově infikované hostitelské rostliny dorůstá menší velikosti v porovnání se zdravou rostlinou a směřuje během dozrání nažek vzhůru oproti neinfikovaným rostlinám, jejichž květní úbor reaguje gravitropně a sklání se směrem k zemi (Spring, 2001). Kořeny rostliny postižené systémovou infekcí bývají menší a tmavší než kořeny zdravé rostliny (Virányi, 1988; Diagnostic Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Rostlina zasažená systémovou infekcí neprodukuje buď žádné nažky, nebo produkuje málo nažek s nízkou životností. Tato skutečnost působí nemalé ekonomické problémy (Diagnostic Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Mezi méně časté symptomy systémové infekce

*P. halstedii* patří padání klíčnicích rostlin, změna barvy dřevě stonku a poruchy v tvorbě květenství. (Sackston, 1981).

Lokální infekce *P. halstedii* se omezuje na menší část rostliny, nejčastěji na listy, kudy vnikají zoospory patogenu do rostliny. Vnější projevem lokální infekce jsou malé, hranaté, světle zelené skvrny na listech, které jsou ohraničené žilnatinou (Diagnostiscs Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Patogen se po průniku do listu šíří parenchymatickými buňkami do vyšších částí rostliny, jedná se tedy o sekundární způsob infekce. Listy jsou normální velikosti, rostlina dosahuje 60–80 % normální výšky (Spring, 2001). Lokální infekce se může ve vhodných podmínkách vyvinout v systémovou infekci. K tomu dochází tak, že patogen proroste přes řapík listu do stonku a odtud se dále šíří (Ratai-Vida, 1996).

Rostlina zasažená latentní formou infekce *P. halstedii* nevykazuje žádný z charakteristických symptomů, které se objevují u zbylých dvou typů infekce, přesto může patogen stále dokončit svůj životní cyklus produkcí pohlavně tvořených oospor (Heller *et al.*, 1997). Vzdělání infikované rostliny dosahuje stejné velikosti jako vzdělání zdravé rostliny, taktéž se nevyskytuje chloróza listů. Velikost květního lůžka rostlin zasažených latentní infekcí je stejná jako u nezasažených rostlin, dochází k produkci životných semen, jejichž velikost je jen mírně menší v porovnání se semeny neinfikovaných rostlin. Hmotnost semen je o 30–40 % menší v porovnání se semeny zdravé rostliny. Mycelium patogenu je přítomné v květním lůžku a zasažených nažkách, kdežto ve stonku a listech se mycelium nevyskytuje. Z toho je zřejmé, že se jedná o velmi pozdní sekundární infekci. Z epidemiologického hlediska působí latentní infekce značné problémy, protože ačkoliv je rostlina bez symptomů, patogen dokončí svůj životní cyklus a oospory v semenech se dostanou do půdy, kde přežívají několik let. Latentní forma infekce je také díky minimálnímu množství symptomů často obtížně rozpoznatelná, což usnadňuje šíření patogenu (Spring, 2001).

### **3.1.3 Morfologie *Plasmopara halstedii***

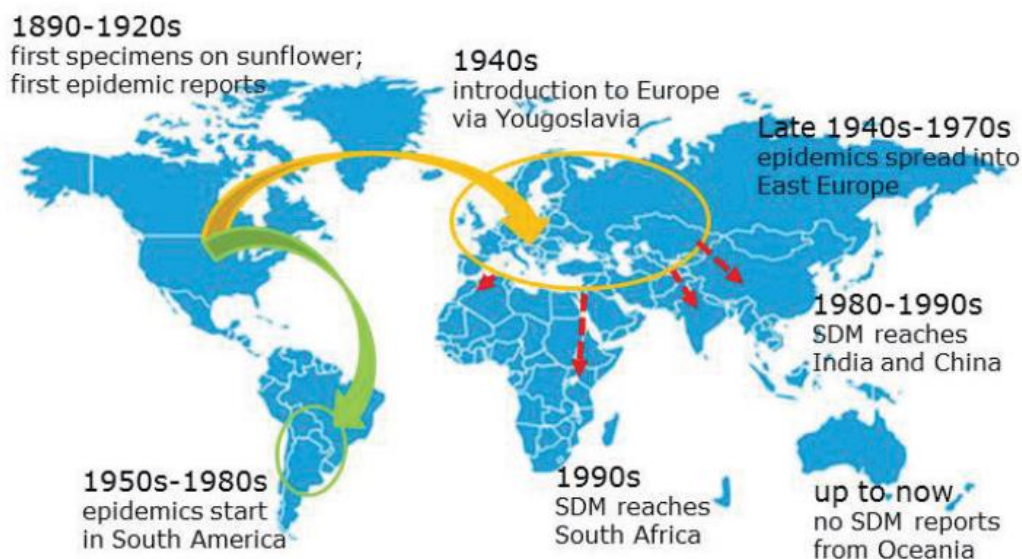
*Plasmopara halstedii* je obligátně biotrofní rostlinný patogen, proto jej nelze pěstovat na umělých médiích. Morfologická identifikace je možná za pomoci mikroskopu. Mycelium tvoří intercelulární nepigmentované nepřehrádkované mnohojaderné hyfy nepravidelného tvaru, které v průměru měří 6–20  $\mu\text{m}$ . Na myceliu se tvoří okrouhlá až pyrifonní haustoria

(5–10  $\mu\text{m}$  v průměru), která pronikají do mezofylových buněk hostitelské rostliny a umožňují tak čerpání živin.

Zoosporangiofory prorůstají ven z pletiva průduchy, ve své horní části se monopodiálně větví, přičemž vedlejší větve rostou v téměř pravém úhlu na hlavní osu sporangioforu a nesou papilární zoosporangia vejčitého až elipsoidního tvaru (Diagnostiscs Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Velikost zoosporangií je variabilní (Virányi, 1988). V každém zoosporangiu se mitoticky vytvoří až 20 dvoubičíkatých zoospor ledvinitého tvaru. Při pohlavním rozmnožování se po redukčním dělení na jedné stélce vytvářejí haploidní samčí antheridia cylindrického, na jednom konci se rozšiřujícího tvaru a bezbarvá oogonia sférického tvaru. Po jejich splnutí vzniká diploidní oosféra a následně tlustostěnná oospora. Pohlavně tvořené oospory vznikají ve všech vegetativních orgánech hostitelské rostliny, ale především v kořenech a v listech. Žlutohnědě pigmentované oospory mají lehce zvrásněnou stěnu, sférický tvar a vytvářejí se těsně pod epidermis hostitelské rostliny (Diagnostiscs Bulletin OEPP/EPPO, 2014). Oospory přežívají až dekádu a ve vhodných podmínkách klíčí v hyfu, na které se následně tvoří zoosporangium (Hall, 1989).

#### **3.1.4 Původ a šíření *Plasmopara halstedii***

*Plasmopara halstedii* má původ v Severní Americe (Sackston, 1981), poprvé byla popsána v Indianě, Iowě a Minnesotě na začátku 20. let 20. století (Yong *et* Morris, 1927). Na ostatní kontinenty vyjma Austrálie, Nového Zélandu, Antarktidy a Oceánie (Gilley *et al.*, 2020; Gulya *et al.*, 2007) byla pravděpodobně rozšířena ve formě mycelií pod osemení nažek hostitele (Virányi *et* Spring, 2011). V Evropě byl výskyt *P. halstedii* poprvé popsán na území tehdejší Jugoslávie ve 40. letech 20. století. Další šíření zmapoval ve svém článku prof. O. Spring, viz obr. 1 (Spring, 2019).



**Obr. 1: Původ a rozšíření *Plasmopara halstedii*.** Převzato z článku Spring (2019). Žlutá šipka značí zavlečení *P. halstedii* do tehdejší Jugoslávie, červené přerušované šipky ukazují další šíření z Jugoslávie do dalších zemí Evropy, do Afriky a Asie. Zelená šipka značí druhou vlnu šíření *P. halstedii*.

Na území tehdejšího Československa byl výskyt plísně slunečnice hlášen poprvé v padesátých letech 20. století, a to především na území jižní Moravy a jižního Slovenska (Bojňanský 1956, 1957). V České republice byla *P. halstedii* opětovně zaznamenána v roce 1999 na pozemku Mendelovy univerzity v Brně (Veverka *et* Křížková-Kudlíková, 2006). Plíseň slunečnice je v Evropě od roku 1992 zařazena mezi karanténní choroby (Delmotte *et al.*, 2008), v České republice byla *P. halstedii* zařazena mezi regulované nekaranténní škodlivé organismy v roce 2002 (Spurný, 2005) a její výskyt byl zaznamenáván Státní rostlinolékařskou správou, od roku 2014 Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ).

Plíseň slunečnice ve střední Evropě není hlavní příčinou ztrát na úrodě slunečnice, mezi závažnější choroby patří bílá plíseň, jejímž původcem je *Sclerotinia sclerotinium* (Lib.) de Bary, a plíseň šedá, kterou způsobuje *Botrytis cinerea* Pers. (Kudlíková *et* Veverka, 1999). Ačkoli se v České republice nepěstuje slunečnice ve velkém množství jako v jiných evropských zemích a plíseň slunečnice není hlavní hrozbou pro úrodu slunečnice, je nutné na našem území regulovat výskyt patogenu, protože může na dlouhou dobu zamořit pozemky a Česká republika zaujímá výhodnou polohu z hlediska šíření patogenu do okolních zemí

(Sedlářová *et al.*, 2013). Dalším důvodem pro nutnost regulace *Plasmopara halstedii* je fakt, že u mikromycet může docházet k přehlédnutí, dokud nezpůsobí ekonomické ztráty.

### 3.1.5 Patogenita *Plasmopara halstedii*

Patogenitou se označuje schopnost mikroorganismu vyvolat chorobu. Míra patogenity určitého patogenu je dána jeho virulencí, která tvoří kvalitativní složku patogenity, a agresivitou, která je jejím kvantitativním parametrem (Kúdela, 1989). V případě *Plasmopara halstedii* virulence znamená schopnost fyziologické rasy (některými autory označované jako patotyp) překonat obranu hostitele kódovanou určitým genem rezistence a napadnout tak určitý genotyp hostitelské rostliny. To je umožněno vnitrodruhovou variabilitou *P. halstedii* (Gulya, 2007). Jedná se tedy o vlastnost individuální, izoláty jedné rasy vykazují stejnou virulenci vůči stejnému kultivaru hostitelské rostliny. *P. halstedii* jedné rasy dokáže napadnout jeden genotyp slunečnice, ale izolát jiné rasy může napadat jiný genotyp.

Kvantitativní složku patogenity tvoří agresivita patogenu, která je v případě *P. halstedii* dána především mírou sporulace, listovou plochou zasaženou sporulací a délkou latence. Agresivita určuje míru schopnosti patogenu napadnout hostitele a způsobit jeho poškození. Každá rasa *P. halstedii* je vůči různým kultivarům hostitelské rostliny jinak agresivní (Kormány *et Virányi*, 1997). Fyziologická rasa (či patotyp) patogenu je tedy morfologicky podobná podskupina uvnitř druhu, která se od jiných ras liší svou virulencí a která není morfologicky (a v současné době ještě ani spolehlivě molekulárně) odlišitelná.

Interakce mezi rostlinou a patogenem je řízena geny virulence neboli efektorovými geny patogenu *avr* a odpovídajícími geny rezistence *R*. Pokud je v rámci dané interakce přítomný gen virulence a jemu odpovídající gen rezistence, výsledkem je úspěšná obrana hostitelské rostliny proti napadení patogenem. Pokud jeden z nich chybí nebo dojde k nekompatibilní reakci, výsledkem je rozeznání patogenu rostlinou, což vede k hypersenzitivní odpovědi (HR), která je programovanou buněčnou smrtí (PCD). Obětování napadené buňky má za následek zpomalení až zastavení patogenu (Radwan *et al.*, 2011). Efektorové geny patří mezi skupinu rychle se vyvíjejících genů, a zvyšují tím fitness daného patogenu v konkrétním hostiteli (Bahri *et al.*, 2009; Montarry *et al.*, 2010). Pro patogen nicméně není výhodné nést velké množství efektorových genů, protože tím by zvýšil energetické nároky na svou

existenci, což by následně mohlo snižovat agresivitu daného patogenu vůči formám hostitele, proti kterému gen virulence nenese (Leach *et al.*, 2001).

Slunečnice disponuje dvěma typy rezistence vůči *P. halstedii*. Rezistence typu I omezuje růst patogenu na oblast hypokotylu, indukovaná HR omezuje šíření patogenu do stonku. Rezistence typu II je slabší, patogen prorůstá do děložních listů hostitele. Interakce mezi geny virulence a geny rezistence vede k aktivaci HR na velké ploše napadených listů a je spuštěna systémová rezistence, což dohromady zastaví postup patogenu.

Rezistence typu I je regulována mj. genem rezistence RGC151, který patří do třídy genů TIR-NBS-LRR (Toll/interleukin-1 receptor nucleotide binding site leucin rich repeat). Rezistence typu II je regulována transkripty třídy genů CC-NBS-LRR (coiled-coil nucleotide binding site leucin rich repeat), mezi které patří mj. gen RGC203 (Radwan *et al.*, 2011).

Klíčovými elementy patogenity oomycet a hub jsou efekторы, které ovlivňují obranný systém hostitele a umožňují kolonizaci hostitelského pletiva. U zástupců oomycet jsou známé minimálně dvě třídy cytoplazmatických efektorů, RXLR a CRN. Tyto proteiny jsou produkovány haustorií a translokovány přes extrahaustoriální membránu do infikovaných buněk, kde potlačují působení produktů genů rezistence rostliny, a tím zajišťují patogenitu (Whisson *et al.*, 2007). *P. halstedii* produkuje také efektorové proteiny RXLR a CRN, přičemž protein RXLR má větší specifitu než CRN efektor. Prvně jmenovaný protein obsahuje motivy aminokyselinové sekvence RXLR a někdy i dEER, CRN efektor zase LXLFLAK motiv. Ty mají schopnost přenést tyto proteiny virulence přes plazmatickou membránu rostlinné buňky (As-sadi *et al.*, 2011).

RXLRs u zástupců řádu Peronosporales jsou nejčastěji tvořeny konzervativní  $\alpha$ -helikální doménou WY (Win *et al.*, 2012), v případě *P. halstedii* je to u 18–23 % RXLRs. V případě RXLRs u *P. halstedii* jsou zajímavé jejich cílové buněčné kompartmenty. PhRXLR-C10 je lokalizován v jádře a jadérku, podobně jako PhRXLR02. PhRXLR-C09 a PhRXLR-C11 jsou vázány na plazmatickou membránu a také jsou lokalizovány v jádře. Různé efekторы vyvolávající HR vykazují jinou míru suprese PTI (PAMPs-triggered immunity), což je jeden ze dvou druhů rostlinné imunity. Obecně efekторы aktivující HR mají míru suprese PTI vyšší než 45 %, ale například efektor PhRXLR-C01 vykazuje až 90% míru suprese PTI. Dva RXLR efekторы byly u *P. halstedii* lokalizovány v buňce poblíž chloroplastů, což vyzdvihuje roli plastidů v rané obraně rostliny. Tyto efekторы mohou zabránit produkci reaktivních forem

kyslíku chloroplasty, čímž blokuje HR, při které je jejich nadprodukce a tzv. oxidativní stres hlavním mechanismem narušení biomolekul (Pecrix *et al.*, 2018).

Analýza ESTs (expressed sequence tag) odhalila další geny, které by se mohly podílet na procesu infekce. Jeden EST je homologní s Kazal-like serin proteáza inhibítorem *Phytophthora infestans*, další EST vykazoval silnou homologii s Cystatin-like cystein proteáza inhibítorem taktéž *P. infestans* (hemibiotrofní zástupce čeledi *Peronosporaceae*). Většina ze zkoumaných ESTs byla příbuzná sekvencím odpovídajícím proteinům, které jsou zodpovědné za buněčný metabolismus, syntézu proteinů, transdukci signálů a buněčný stres (Bouzidi *et al.*, 2007).

### **3.1.6 Genetická diverzita *Plasmopara halstedii***

Velká genetická variabilita populací *Plasmopara halstedii* je překvapivá vzhledem k tomu, že tento organismus patří mezi homothalické druhy, u kterých převládá inbrední množení. V pohlavní fázi reprodukčního cyklu probíhá nejčastěji samooplození, v asexuální fázi potom mitotická reprodukce (Spring *et al.*, 2006). Mezi mechanismy vzniku nových ras v lokálních populacích *P. halstedii* patří především mutace v genech virulence v klonálních liniích (vzniklé mitoticky), křížení dvou ras a následná rekombinace (meioticky) nebo zavlečení ras schopných překonat geny rezistence slunečnic v jedné oblasti do oblasti jiné a jejich adaptace (Delmotte *et al.*, 2008).

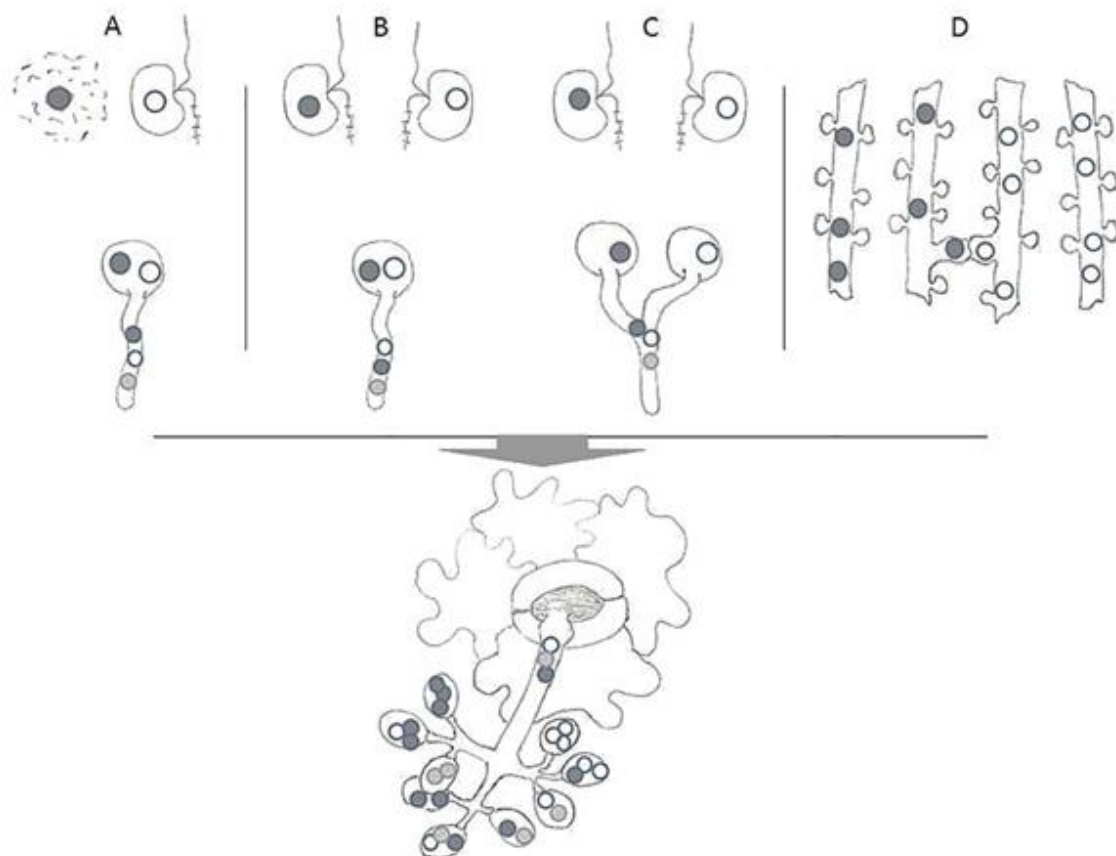
Asexuální alternativou k meiotické rekombinaci je parasexuální proces (u hub a houbových organismů nejčastěji fúzí vedle sebe rostoucích mycelií), vedoucí ke vzniku heterokaryotického mycelia. V případě *P. halstedii* bylo experimentálně potvrzeno, že ke genetické rekombinaci formou parasexuálního procesu dochází v případě tzv. duálních infekcí, kdy je jedna rostlina infikována dvěma rasami patogenu současně. Duální infekce vedla ke tvorbě nepohlavních zooosporangií, ze kterých vznikla forma patogenu kombinující fenotypové charakteristiky rodičovských izolátů – např. po jednom rodiči nový izolát převzal rezistenci vůči fungicidu metalaxylu, po druhém převzal virulenci vůči danému genotypu hostitelské rostliny. Výsledný patogen byl schopný infikovat specifickou, fungicidem ošetřenou linii slunečnice, kterou ani jeden z rodičovských izolátů nebyl schopen infikovat. Tato nová kombinace vlastností byla poté děděna po mnoho generací, přičemž u rodičovských



izolátů žádná podobná nová kombinace nevznikla, čímž se vyloučila možnost působení náhodných mutací (Spring *et* Zipper, 2006).

Zůstává ale pořád nejasné, v jaké fázi infekčního procesu k parasexuální genetické výměně jader dochází a také jak k ní dochází. Nabízí se čtyři možnosti průběhu parasexuální genetické výměny (viz obr. 2). První variantu představuje přijetí odhaleného jádra zoospory jednoho kmene zoosporou jiného kmene (obr. 2A), další možností je fúze zoospor (obr. 2B) – v obou těchto případech se jedná o proces genetické výměny, ke kterému může dojít před kontaktem patogenu s hostitelskou rostlinou. Třetí možností je fúze klíčnic vlákna vyrůstající z encystovaných zoospor před penetrací do hostitelské buňky (obr. 2C). Poslední možností je výměna jader a mitochondrií mezi hyfami dvou kmenů prostřednictvím anastomóz (obr. 2D) – tato varianta je ovlivněna interakcí s hostitelem, mohlo by k ní docházet v neselektivních podmínkách infekce nebo v rané fázi invaze do hostitele předtím, než by začaly působit proti patogenu produkty rostlinných genů rezistence nebo než by začal účinkovat fungicid.

Na hostiteli nezávislá stadia infekce jsou méně citlivá vůči účinkům fungicidu metalaxylu, proto je pravděpodobné, že ke genetické výměně dochází ještě před infekcí hostitele. Ke genetické rekombinaci dochází pravděpodobněji ve fázi zoospor, jejichž fúzi nebrání buněčná stěna a kterými se také nově vzniklé kombinace vlastností dále dědí (Spring *et* Zipper, 2016). Parasexuální proces může také hrát významnou roli ve speciaci peronospor a jejich vazbě na hostitelské rostliny (Voglmayr *et al.*, 2004; Thines, 2019).



**Obr. 2: Teoretické možnosti průběhu parasexuální genetické výměny u *Plasmopara halstedii*.** Převzato z článku Spring *et* Zipper (2016). A–C nezávisí na hostiteli, D závisí na hostiteli. A – absorpce odhaleného jádra zoospory jednoho kmene zoosporou jiného kmene, B – fúze zoospor, C – fúze klíčících vláken z encystovaných zoospor před penetrací do hostitelské buňky, D – výměna jader a mitochondrií mezi hyfami dvou kmenů procesem zvaným anastomóza.

### 3.1.7 Determinace ras *Plasmopara halstedii*

Rezistence slunečnice proti infekci *Plasmopara halstedii* byla poprvé popsána před více než 50 lety v Rumunsku (Vranceanu *et* Stoenescu, 1970). S objevem první rasy schopné překonat gen rezistence v 70. letech 20. století započal výzkum virulence *P. halstedii*. V 70. letech 20. století byly známy pouze dvě rasy *P. halstedii*, rasa 1 (současné označení 100) neboli 'European race' a rasa 2 (současné označení 300) neboli 'Red River Valley race', obě popsané v Kanadě a USA (Gulya, 2007). Rasy byly zpočátku pojmenovávány číslem podle toho, v jakém pořadí byly objevovány. S přibývajícím počtem ras v USA se však jejich

označování stalo nepřehledným (Gulya *et al.*, 1991a). Z praktických důvodů bylo proto žádoucí zvolit jiný způsob označení. Systém založený na tom, jaké geny rezistence daná rasa překonává, navrhli Gulya *et al.* (1991b) a Sackston *et al.* (1990). Nicméně ještě pár let pokračovalo pojmenování ras *P. halstedii* pořadovým číslem.

Od roku 2000 se začal používat pro pojmenování a určení rasy soubor 3x3 diferenciacních linií slunečnice, které nesou specifické kombinace genů rezistence vůči *P. halstedii*, označované *Pl*. V závislosti na reakci hostitele na inokulaci *P. halstedii*, následnou inkubaci cca 14 dní a vyhodnocení fenotypu (náchylnost vs. rezistence) je každé diferenciacní linii podle jejího pořadí přiřazeno číslo, součet čísel v rámci samostatných tří skupin poté udává jedinečnou číslici v rámci tripletového kódu (Gulya *et al.* 1998; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). S narůstající patogenní variabilitou bylo potřeba navýšit počet diferenciacních linií na 15 (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012), přičemž stávající značení ras zůstalo zachováno a pouze došlo k rozšíření označení rasy z trojčíselného na pětičíselný kód (Sedlářová *et al.*, 2016), nověji na 18 diferenciacních linií a označení rasy šestičíselným kódem (Gilley *et al.*, 2020). Smyslem a výhodou označování ras *P. halstedii* pomocí číselného kódu spočívá nejen v rozeznání jednotlivých ras, ale kód také nese informaci o virulenci dané rasy a interakci s každou diferenciacní linií. Další výhodou tohoto označování systémem tripletů diferenciacních linií je možnost kód kdykoliv rozšířit a současně zachovat možnost srovnávání se staršími výsledky (Trojanová *et al.*, 2017).

Patogenní variabilita *P. halstedii* díky intenzivnímu pěstování slunečnice v monokulturách a zavádění kultivarů s monogenní rezistencí roste. Postupně dochází k překonáváním dalších genů rezistence, např. *Pl<sub>6</sub>* (Bán *et al.*, 2014a, 2014b; Sedlářová *et al.*, 2016; García-Carneros *et al.* Molinero-Ruiz, 2017). Významným milníkem v populaci *P. halstedii* bylo v roce 2017 v Itálii pozorované překonání genu *Pl<sub>8</sub>* (Martín-Sanz *et al.*, 2019) v hybridech slunečnice odvozených od linie RHA 340 a výskyt těchto vysoce virulentních ras od roku 2018 i ve Francii (Miranda-Fuentes *et al.*, 2021). V populacích *P. halstedii* byla prokázána přítomnost ras virulentních vůči všem devíti liniím diferenciacního souboru, ačkoliv existence jednoho izolátu, který by byl sám o sobě virulentní vůči všem devíti liniím, dosud prokázána nebyla (Gascuel *et al.*, 2015; Spring *et al.*, 2018; Virányi *et al.*, 2015). Linie slunečnice RHA 340 byla dosud používána jako donor genů rezistence k produkci rezistentních hybridů. Nese mj. právě zmiňovaný gen rezistence *Pl<sub>8</sub>*, který je původem z druhu *Helianthus argophyllus* (Miller *et al.* Gulya, 1988), což jí doposud zajišťovalo rezistenci vůči všem rasám *P. halstedii*

vyskytující se v Evropě. V roce 2018 bylo v Evropě potvrzeno 5 izolátů rasy 714 infikujících druh slunečnice nesoucí gen *Pl<sub>8</sub>*, vůči kterým by hostitelská rostlina měla být rezistentní. Nový patotyp je dočasně pojmenovaný jako 714- *Pl<sub>8</sub>*. Z toho vyplynula potřeba aktualizace systému identifikace ras *P. halstedii*. Do aktualizovaného diferenciačního souboru by měla být zahrnuta linie RHA 340, která je veřejně dostupná a nese gen *Pl<sub>8</sub>* (Martín-Sanz *et al.*, 2019).

Během let docházelo také ke změnám ve složení diferenciačních souborů, taktéž v jednotlivých zemích jsou používány různé diferenciační linie (přehled viz Trojanová *et al.*, 2016). Proto byl v minulém roce podán návrh na zavedení tří dodatkových diferenciačních linií (viz tabulka 1). Součástí tohoto šestého tripletu je i výše zmíněná linie RHA 340 nesoucí gen rezistence *Pl<sub>8</sub>*. Na základě tohoto rozšířeného souboru byly pozorovatelné rozdíly v rámci několika izolátů, které byly původně pojmenovány stejným tripletovým kódem. Konkrétně např. izolát určený původně jako rasa 710 byl na základě rozšířeného souboru rozpoznán jako tři různé rasy, rasa 710600, 710602 a 710702. Navzdory tomu, že by případně došlo k rozšíření diferenciačního souboru o jeden triplet, bude potřeba soubor i nadále rozšiřovat a pozměňovat s tím, jak bude překonaných genů rezistence přibývat (Gilley *et al.*, 2020).

**Tabulka 1: Diferenciační soubor slunečnice pro určení rasy *Plasmopara halstedii*.** Převzato z článku Gilley *et al.* (2020), upraveno. Kromě již používaných pěti tripletů linií slunečnice (uvedeny s odpovídajícími geny rezistence) je zahrnut návrh na rozšíření diferenciačního souboru o šestý triplet podle Gilley *et al.* (2020; šedě podbarveno). Nejnověji překonaný gen rezistence *Pl<sub>8</sub>* je zvýrazněn tučně.

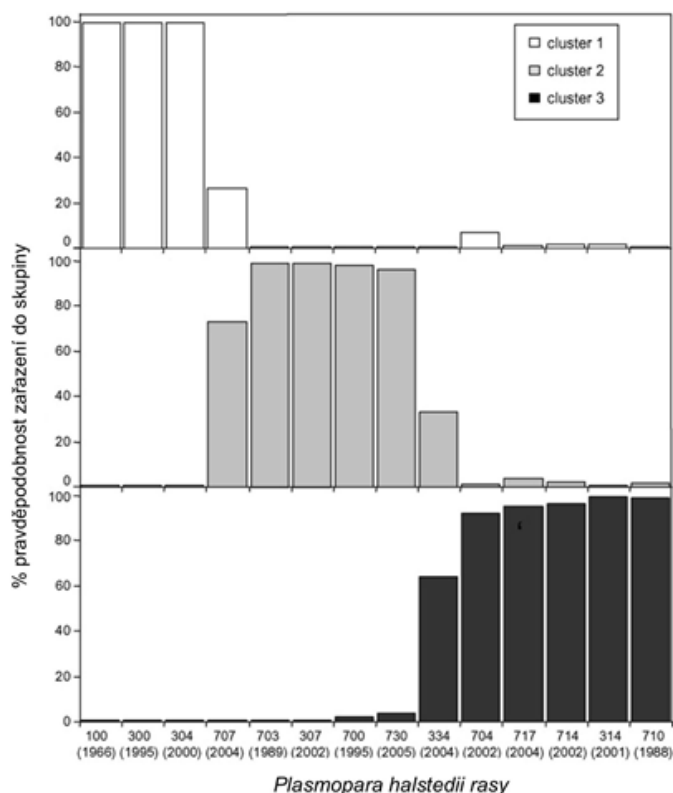
Tripletový kód		US Standardní diferenciační linie <sup>a</sup>		Gen rezistence
Set	Hodnota virulence			
1.	1	D-1	Mycogen 270	žádný
	2	D-2	RHA 265	<i>Pl<sub>1</sub></i>
	4	D-3	RHA 274	<i>Pl<sub>2</sub>/ Pl<sub>21</sub></i>
2.	1	D-4	DM-2	neznámý
	2	D-5	PM 17	<i>Pl<sub>5-</sub></i>
	4	D-6	803-1	<i>Pl<sub>5+</sub></i>
3.	1	D-7	HA-R4	<i>Pl<sub>16</sub></i>
	2	D-8	HA-R5	<i>Pl<sub>13</sub></i>
	4	D-9	HA 335	<i>Pl<sub>6</sub></i>
Diferenciační linie doplněné v roce 2012 (INRA <sup>b</sup> )				
4.	1	D-10	Y7Q	<i>Pl<sub>6-</sub></i>
	2	D-11	PSC8	<i>Pl<sub>2</sub></i>
	4	D-12	XA	<i>Pl<sub>4</sub></i>
5.	1	D-13	PSS2RM	<i>Pl<sub>6</sub>/ Pl<sub>21</sub></i>
	2	D-14	VAQ	<i>Pl<sub>5</sub></i>
	4	D-15	RHA 419	<i>Pl<sub>Arg</sub></i>
US Dodatkové linie <sup>c</sup>				
6.	1	D-16	RHA 491	<i>Pl<sub>15</sub></i>
	2	D-17	<b>RHA 340</b>	<b><i>Pl<sub>8</sub></i></b>
	4	D-18	HA 490	<i>Pl<sub>17</sub></i>

a – Tourvielle de Labrouhe *et al.*, 2000, upraveno; b – INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, France (Tourvielle de Labrouhe *et al.*, 2012); c – Gilley *et al.* (2020).

### 3.1.8 Alternativní způsoby determinace ras *Plasmopara halstedii*

Aktuální způsob determinace ras *Plasmopara halstedii* je založen na fenotypu interakce hostitele s patogenem, resp. vyhodnocení sporulace *P. halstedii*. Také není možné detekovat latentní formu infekce. Proto se hledají nové způsoby determinace ras, které by byly založeny na jiných principech.

Jednou z možností je využít polymorfismu nukleotidů (SNPs), které jsou rozmístěny po celém genomu a v populační genetice se využívají jako molekulární markery, protože mají vysokou rozlišovací schopnost. Při využití SNPs při testování izolátů *P. halstedii* ve Francii bylo potvrzeno několikrát zavlečení patogenu do země. Nejprve byla zavlečena rasa 100, poté 710 a nakonec 703. To mohlo přinést do této oblasti nový genový materiál pro vývoj nových ras, konkrétně pro rekombinaci mezi rasami nebo nahromadění mutací v klonálních liniích a tím vzniku nových ras. Postupně došlo ke genetickému odlišení tří skupin izolátů, které byly organizované okolo tří původních ras ve Francii (viz obr. 3). Příležitostní rekombinační události mezi geneticky odlišnými rasami mohly vést ke vzniku nových ras – rasa 334 je intermediátem mezi původními rasami 710 a 703, podobně rasa 707 vznikla rekombinací mezi rasami 703 a 304. Jedna klonální linie představovaná jedním multilokusovým genotypem (MLG) může také zahrnovat více ras, což je vysvětleno působením mutací v rámci klonální linie, které vedou ke vzniku nových ras na stejném genetickém základě (Delmotte *et al.*, 2008).



**Obr. 3: Genetická variabilita ve francouzské populaci *Plasmopara halstedii*.** Převzato z článku Delmotte *et al.* (2008). Zařazení ras *P. halstedii* do skupin bylo provedeno na základě studia SNPs; rok prvního popisu daných ras ve Francii je uveden v závorkách.

Později bylo objeveno 22 SNPs v sekvenci CRN efektorů, které byly použity pro určení genetických vzdáleností mezi 4 rasami (rasy 100, 304, 703 a 710). Genetická vzdálenost mezi rasami 100, 703 a 710 souhlasila se třemi dříve popsány skupinami (Delmotte *et al.*, 2008). Určité nově popsané SNPs také dokazují jasné odlišení ras 100 a 304, což nebylo dříve pozorováno (As-sadi *et al.*, 2011).

Existence tří jasně vyhraněných skupin byla opakovaně potvrzena i při zkoumání alelových a mtDNA haplotypů. Izoláty stejné rasy sdílely alelový nebo mtDNA haplotyp, ale také byly přítomné některé izoláty jiných ras, které sdílely identické MLG. To opět naznačuje, že nově vzniklé rasy mohou vznikat klonální reprodukcí s následnými mutacemi. Nejpravděpodobnější způsobem vzniku nových ras zůstává ale proces hybridizace, tedy křížení izolátů dvou ras s následnou meiotickou rekombinací. Populačně genetická analýza prokázala, že populace *P. halstedii* jsou velmi inbrední, což je v korelaci s faktem, že se jedná o homothalický druh (Ahmed *et al.*, 2012).

Za vznik sekundárních infekcí a šíření epidemie během vegetace hostitelské rostliny jsou v rámci životního cyklu *P. halstedii* zodpovědná zoosporangia. Byl proto zkoumán vztah mezi morfologií zoosporangií a složkami patogenity *P. halstedii*, tedy virulencí a agresivitou. Bylo by totiž velmi užitečné, pokud by k určení ras *P. halstedii* mohly být použitelné její morfologické charakteristiky. Nejčastěji se vyskytujícími zoosporangii jsou oválná a kulatá zoosporangia, přičemž oválná jsou vždy větší než kulatá. Tvar a velikost zoosporangií ovlivňuje zejména genotyp hostitelské rostliny, ale také její stáří. Co se týče agresivity *P. halstedii* a morfologií zoosporangií, jediným potvrzeným vztahem je nepřímá úměra mezi hustotou sporulace a velikostí zoosporangií, vysvětlením pro tento jev je pravděpodobně fyziologická rovnováha mezi kvantitou a rozměrem. Nebyl potvrzen žádný vztah mezi virulencí patogenu a morfologií jeho zoosporangií, proto není morfologie *P. halstedii* použitelná k rozlišení ras (Sakr *et al.*, 2008).

### **3.1.9 Variabilita a výskyt *Plasmopara halstedii* v ČR**

Do roku 2014 bylo celosvětově popsáno 42 fyziologických ras. V červnu roku 2014 byla ve vzorcích *Plasmopara halstedii* pocházejících ze slunečnice z lokality poblíž města Podivín v České republice opakovanými testy prokázána přítomnost rasy 705 a 715. S jejich objevem se zvýšil počet popsáných ras na 44 (Sedlářová *et al.*, 2016). K roku 2018 je známých

50 fyziologických ras *P. halstedii* (Spring, 2019). Celosvětově nejhojnější jsou rasy 100, 300, 330, 700, 703, 710, 730 a 770. V minulosti převažoval výskyt méně virulentních ras 100, 300 a 700, po roce 1988 začaly převládat virulentnější rasy 700 a 730. Od roku 2006 dominují především rasy 700, 710, 730 a 770 (Gulya, 2007; Virányi *et al.*, 2015).

Detailní monitoring výskytu *P. halstedii* na našem území byl zahájen v roce 2007 Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Do roku 2014 bylo identifikováno celkem 8 ras, ale pouze 6 z nich (700, 704, 705, 710, 714 a 715) bylo potvrzeno přesnější metodou SDI (Soil drench inoculation; Goosen *et Sackston*, 1968).



**Obr. 4: Lokality s výskytem *Plasmopara halstedii* (označené hvězdičkou) v České republice v letech 2007–2014. Převzato z článku Drábková-Trojanová *et al.* (2018).**

Přítomnost *P. halstedii* byla prokázána na osmi lokalitách – Kroměříž, Olomouc-Holice, Brno-Chrlice, Lednice, Lednice – Mendelova univerzita (MU), Podivín, Čáslav a Ledce (viz obr. 4). Opakovaný výskyt patogenu byl zaznamenán ve městech Podivín a Lednice, v městských čtvrtích Brno-Chrlice a Olomouc-Holice. Nejvyšší patogenní variabilita byla zjištěna ve městě Podivín, kde byly kromě rasy 730 popsány všechny výše zmíněné rasy. V České republice je nejhojněji zastoupena rasa 700, jejíž přítomnost byla zjištěna na všech lokalitách vyjma Lednice – MU. Druhá nejčastěji zastoupená rasa na našem území je rasa



710, která se u nás objevovala od roku 2010. Rasa 710 mohla být v ČR teoreticky přítomná už od roku 2008, protože metoda SDI, která je k identifikaci ras vhodnější, odhalila rasy původně určené jako 730 a 770 jako rasu 710 (Drábková-Trojanová *et al.*, 2018). Detailněji popsané geografické rozložení ras *P. halstedii* v České republice v letech 2007–2014 je uvedeno v tabulce 2. Od roku 2014 se fenotypové hodnocení v ČR provádí už na 15 diferenčních liniích, výsledkem je pětimístný kód virulence. První tři čísla tohoto kódu dovolují srovnání se staršími výsledky, ke kterým se došlo testováním izolátů na 9 diferenčních liniích. Od roku 2013 jsou v ČR nejčastější rasy 704 a 714 (Sedlářová *et al.*, 2020).

**Tabulka 2: Rozšíření ras *Plasmopara halstedii* v České republice v letech 2007–2014. Převzato z článku Drábková-Trojanová *et al.* (2018).**

Lokalita	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Počet ras
Brno – Chrlice		700		700, 730 <sup>a</sup> , 770 <sup>a</sup>	700, 704		710		5
Čáslav			700						1
Kroměříž		700, 770 <sup>a</sup>							2
Ledce			700						1
Lednice				700	700, 770 <sup>a</sup>	704	704, 700		3
Lednice – MU <sup>b</sup>							714		1
Olomouc – Holice	700	700			700, 710	710	710	700, 710	2
Podivín			700, 770 <sup>a</sup>	700, 710	704, 714			705, 710, 714, 715	7

a – nepotvrzeno metodou SDI; b – Lednice – Mendelova univerzita, leží asi 3 km od Lednice (pole ZS ÚKZÚZ).

## 3.2 Viry hub a oomycet

Viry jsou nebuněční intracelulární paraziti představující jednu z nejjednodušších organizací živé hmoty. Viry tvoří nukleová kyselina, která je obalená bílkovinným obalem. Jejich existence je zcela závislá na hostitelské buňce, jejíž metabolický a energetický aparát využívají viry ke své reprodukci, jsou tzv. biotrofní (Benda *et al.*, 2006). Viry parazitují jak v rostlinných a živočišných buňkách, tak i v buňkách bakterií a houbových organismů. Viry houbových organismů bývají pojmenovány více způsoby – mykofágy (Ellis *et Kleinschmidt*, 1967), viru-podobné částice (VLP) a mykoviry (Bozarth, 1972). Nazývat viry houbových organismů pojmem mykofágy se jeví jako nejméně vhodné, protože při infekci těmito viry nedochází k lyzi buněk a protože virus nedokáže procházet přes buněčnou stěnu buněk hostitele. Pojem VLP používají někteří autoři pouze pro dosud neizolované a blíže nepopsané částice, které byly pozorované pouze mikroskopicky a které vykazují jednu a více charakteristik virů. Mykoviry označují již izolované a popsané částice o známém nukleoproteinovém složení.

### 3.2.1 Obecná charakteristika mykovirů

Mykoviry byly poprvé popsány roku 1962 u druhu *Agaricus bisporus* (Hollings, 1962), jednalo se o *Mushroom bacilliform virus*. U vláknitých mikroskopických hub neboli mikromycet byly mykoviry pozorovány o pět let později u druhu *Penicillium stoloniferum* (Ellis *et Kleinschmidt*, 1967).

Mykoviry se vyznačují především absencí extracelulární fáze reprodukčního cyklu. S tím souvisí i fakt, že mykoviry nelyzují hostitelskou buňku, protože jsou na ní existenčně závislé. Mykoviry jsou tedy svým způsobem neinfekční (Buck, 1986), což dokládá fakt, že vystavením neinfekční hyfy buněčnému extraktu, který byl připraven z infekčního houbového organismu, není možné přenést infekci (Nuss, 2005).

Většina mykovirů má genom kódující pouze malé množství proteinů (Ghabrial *et al.*, 2015). Nejjednodušší známé mykoviry jsou zástupci čeledi *Narnaviridae*, jejichž genom kóduje jediný protein, RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp). Zástupci čeledí *Partitiviridae* a *Totiviridae* nesou většinou pouze geny kódující RdRp a kapsidový protein. Zralý virion může nést jeden nebo více genomových segmentů. Mykoviry řadící se do rodu *Mitovirus* čeledi *Narnaviridae* se replikují uvnitř hostitelské mitochondrie, kdežto ostatní známé

mykoviry se replikují v prostoru cytoplasmy hostitelské buňky. Tato jejich buněčná lokalizace může mít vliv na způsob replikace a přenosu mykovirů (Sutela *et al.*, 2019).

Viriony většiny popsaných mykovirů jsou izometrické a v průměru dosahují velikosti 25–48 nm (Bozarth, 1979). Genom většiny mykovirů je tvořen dsRNA, asi třetina popsaných virů je tvořena +ssRNA (King *et al.*, 2011). Většina mykovirů má proteinový plášť a je neobalená, velké množství dokonce nemá ani proteinový plášť. To souvisí s intracelulárním způsobem přenosu (Sutela *et al.*, 2019).

### 3.2.2 Taxonomie a původ mykovirů

Klasifikace virů upravená ICTV (Mezinárodní výbor pro taxonomii virů) z roku 2017 řadí mykoviry do 12 virových čeledí (Peyambari *et al.*, 2020). Nicméně stále dochází k úpravám klasifikace mykovirů, protože jsou objevovány a popisovány nové druhy a s nimi i čeledi a další nadřazené taxony. Podle nejnovějších zdrojů je taxonomie mykovirů následující. Sedm virových čeledí zahrnuje dsRNA mykoviry, konkrétně se jedná o čeledi *Chrysoviridae*, *Endornaviridae*, *Megabirnaviridae*, *Quadrviridae*, *Partiviridae*, *Reoviridae* a *Totiviridae*. Mykoviry s genomem tvořeným +ssRNA se řadí do 8 virových čeledí: *Alphaflexiviridae*, *Barnaviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Hypoviridae*, *Narnaviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Deltaflexiviridae* a *Botourmiaviridae* (Abbas, 2016; Sutela *et al.*, 2019). Mykoviry řadící se do čeledi *Mymonaviridae* mají genetickou informaci kódovanou v –ssRNA molekule. Jedinou skupinou mykovirů, jejíž zástupci mají genom tvořený kruhovou molekulou ssDNA, je čeleď *Genomoviridae*. (Sutela *et al.*, 2019).

Existují dvě hlavní hypotézy, které by mohly vysvětlit původ mykovirů (Pearson *et al.*, 2009). První hypotéza je založena na faktu, že přenos virů je možný pouze intercelulárně (Buck, 1998). Široký hostitelský okruh zástupců tří největších čeledí mykovirů (*Partiviridae*, *Totiviridae* a *Reoviridae*) naznačuje starobylý původ těchto virů (Peyambari *et al.*, 2020). Dlouhá doba koevoluce vedla k vývoji bezpříznakového fenotypu velkého množství mykovirových infekcí, což je výhodné jak pro hostitele, tak pro mykovirus (Pearson *et al.*, 2009). Absence extracelulární fáze reprodukčního cyklu mykovirů také podporuje tuto teorii, protože mykoviry jsou svou existencí zcela závislé na svém hostiteli, takže se s velkou pravděpodobností musely vyvíjet společně se svým hostitelem (Peyambari *et al.*, 2020).

Druhá hypotéza vychází z předpokladu, že se mykoviry vyvinuly relativně nedávno z rostlinných virů (Abbas, 2016). Podle této teorie byl mykovirus původně rostlinným virem, který se přemístil z hostitelské bunky do fytopatogena (Nibert *et al.*, 2014). Malé množství houbových organismů představuje vektory rostlinných virů, vzácná událost tak mohla vést k přijetí nového hostitele tímto virem (Varga *et al.*, 2003). Srovnání nukleotidových sekvencí mykovirů a rostlinných virů podporuje tuto teorii (Pearson *et al.*, 2009), nicméně obě tyto teorie nejsou dostatečně přesvědčivé, tudíž původ mykovirů zůstává nejasněn (Abbas, 2016).

### 3.2.3 Přenos mykovirů

Jak bylo zmíněno, mykoviry postrádají extracelulární fázi reprodukčního cyklu. Extracelulárnímu přenosu brání buněčná stěna hub, přes kterou se viriony mykovirů nedokážou dostat bez usmrcení hostitelské buňky (Ghabrial, 1994).

K přenosu mykovirů dochází intracelulárně během buněčného dělení, sporogenezi a fúzi buněk (Ghabrial, 1998). Je znám jak horizontální, tak vertikální způsob přenosu mykovirů mezi hostiteli. Horizontálnímu přenosu je zajištěn procesem anastomózy, při kterém dochází k fúzi infikované a neinfikované hyfy a tím ke genetické a cytoplasmatické výměně. Viriony mykovirů jsou součástí cytoplasmy hostitelských buněk, tudíž jsou v této výměně zahrnuty. K tomuto procesu je nezbytné, aby houbové hyfy byly tzv. vegetativně kompatibilní. Vegetativní inkompatibilita hyf tvoří přirozenou bariéru v horizontálním přenosu mykovirů (Pearson *et al.*, 2009). Více je o této problematice pojednáváno v podkapitole 3.2.4 (Vliv mykovirů na biologii hostitele). Primárním způsobem šíření mykovirů je vertikální přenos virionů sporulací. Při tvorbě asexuálních spor proudí viriony snadno přes cytoplasmu (Buck, 1998). Při tvorbě pohlavních spor dochází k přenosu méně často (Pearson *et al.*, 2009).

### 3.2.4 Vliv mykovirů na biologii hostitele

Přítomnost mykovirů byla zaznamenána ve všech hlavních taxonech říše Fungi včetně Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota a Chytridiomycota (Abbas, 2016). Kromě říše Fungi napadají mykoviry i houbám podobné organismy říše Chromista, konkrétně zástupce třídy Oomycota. Mykoviry se nejčastěji vyskytují v latentní formě, méně často mohou pozitivně či negativně ovlivňovat biologii hostitelského organismu. Symptomy se mohou v příhodných podmínkách projevit, proto je pro tyto bezpříznakové viry preferovaný pojem kryptické viry (Pearson *et al.*, 2009).

Příkladem mykoviru, který svou přítomností zvýhodňuje hostitelský organismu, je dsRNA mykovirus *Curvularia thermal tolerance virus (CThTV)*. Hostitelským organismem tohoto mykoviru je vřeckovýtrusá houba *Curvularia protuberata*, která infikuje travu *Dichanthelium lanuginosum*. Přítomnost viru zajišťuje tepelnou toleranci jak houbě, tak rostlině. Díky tomuto jevu dokáže celý systém růst v teplotách kolem 65 °C v okolí termálních pramenů v Yellowstone NP (Márquez *et al.*, 2007).

Hypovirulentní účinky některých virů představují teoretickou možnost kontroly houbových chorob. Regulace houbových chorob konvenčními chemickými fungicidy vede často ke vzniku rezistence vůči těmto fungicidům a často je neefektivní. Proto využití virů jako biokontrolních agens představuje zajímavou alternativu v této oblasti. Dobře prostudovaným příkladem viru způsobujícím hypovirulenci je *Cryphonectria parasitica virus 1*. Hostitelem tohoto viru je *Cryphonectria parasitica* způsobující korovou nekrózu kaštanovníku (Choi *et Nuss*, 1992).

### **3.2.5 Antivirová obrana houbových organismů**

Houbové organismy si vyvinuly způsoby, jakými se mohou infekci mykoviry bránit. Na úrovni populací figuruje jakožto antivirový obranný systém tzv. vegetativní inkompatibilita (*vic*). Mechanismem *vic* je bráněno přenosu virových částic mezi hyfami dvou nekompatibilních kmenů. Interakce těchto dvou nekompatibilních kmenů vede k rychle programované buněčné smrti (PCD), což zabrání výměně buněčných komponent (Leslie *et Zeller*, 1996). Tento systém genetického rozpoznávání se vyvinul jako obranný mechanismus bránící přenosu virů, mobilních genových elementů a plazmidů (Caten, 1972).

Na buněčné úrovni funguje jako antivirový obranný mechanismus proces zvaný RNA silencing neboli umlčování RNA. Klíčovými elementy v procesu umlčování RNA jsou konzervované ribonukleázy, které jsou součástí Dicer-like a Agronaute-like proteinových rodin (Hammond, 2005). Umlčování RNA probíhá následovně. Dicer endonukleáza rozpozná virové dsRNA a využije svoji aktivitu podobnou aktivitě RNázy III k rozštěpení dsRNA na malé vsRNA (virus-derived small RNA) o délce 21–24 nukleotidů. Tyto vsRNA jsou vloženy do efektorového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), jehož součástí je i protein z rodiny Agronaut, který má aktivitu podobnou aktivitě RNázy H. Následně dojde k oddělení vláken RNA, jedno z vláken je degradováno a druhé vlákno zůstává spojeno

s RISC komplexem. Tento komplex se komplementárně váže na cílovou virovou RNA, kterou následně rozštípe díky aktivitě proteinu Agronaut. Rozštěpená virová RNA je nakonec hostitelskou buňkou odbourána.

Poprvé byla RNA interference studována u modelové houby *Neurospora crassa*, u které však není znám mykovirus, což znemožňuje studium RNA umlčování jako antivirové obrany houbových organismů. Příbuznou houbou (ve stejné podtřídě Sordariomycetidae) je již výše zmíněná *Cryptonectria parasitica*, její interakci s *Cryptonectria parasitica hypovirus* lze využít jako alternativní experimentální systém pro studium RNA umlčování (Nuss, 2011).

Hypovirulentní mykoviry dokáží obejít tento systém umlčování RNA pomocí supresorů RNA umlčování (virové supresory RNA silencingu – VSR). Potenciál ve využití RNA umlčování jakožto mechanismu regulace houbových chorob spočívá ve vložení nebo vyjmutí těchto VSR tak, aby mykovirová infekce stále snižovala virulenci patogenní houby, ale aby nebyla negativně ovlivněna fitness mykovirů a schopnost hypovirulentních kmenů houbového fytopatogena šířit se a přetrvávat v ekosystému.

### 3.2.6 Viry oomycet

U zástupců třídy Oomycota byly v devadesátých letech dvacátého století poprvé pozorovány viru-podobné částice ve vzorcích rýže infikované patogenem *Sclerophthora macrospora* (Honkura *et al.*, 1983). Tyto VLP byly později identifikovány jako *Sclerophthora macrospora virus A* (SmV-A) a *Sclerophthora macrospora virus B* (SmV-B). SmV-A je tvořen třemi +ssRNA, RNA1 o délce 2 982 nukleotidů nese dva ORF. ORF1a kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp) a ORF1b kóduje protein o neznámé funkci. RNA2 o délce 1 981 nukleotidů nese ORF2, který kóduje plášťový protein (CP). RNA3 o délce 977 nukleotidů nenese žádný zjevný ORF, jedná se pravděpodobně o satelitní RNA (Yokoi *et al.*, 2003). Genom SmV-B je tvořen pouze jednou +ssRNA o délce 5 533 nukleotidů, která nese dva ORF. ORF1 kóduje chymotrypsinu-podobnou serin proteázu a RdRp a ORF2 kóduje CP (Yokoi *et al.*, 1999).

Dále byly VLP pozorovány v některých izolátech *Albugo candida* (Buck, 1986). V *Pythium butleri* byla pouze detekována přítomnost dsRNA, ale VLP zde potvrzeny nebyly. Naopak v *Pythium irregulare* byla potvrzena přítomnost jak dsRNA, tak i VLP (Gillings *et al.*, 1993).

V izolátech *Phytophthora infestans* byly popsány celkem čtyři různé mykoviry – *Phytophthora infestans* RNA virus 1–4 (PiRVs 1–4). Genom PiRV-1 tvoří RNA1 o délce 3 160 nukleotidů a RNA2 o délce 2 776 nukleotidů. ORF1 na RNA1 kóduje RdRp, ORF2 na RNA2 kóduje proteázu. Potenciální ORF3 na RNA2 kóduje protein neznámé funkce. Zvláštností PiRV-1 je skutečnost, že u něj existují dvě formy RNA2. Minoritně zastoupená forma RNA2B (u 4 ze 17 zkoumaných vzorků) má úsekem o délce 9 nukleotidů nahrazenou sekvencí, která je v majoritně zastoupené formě RNA2A dlouhá 19 nukleotidů. Toto specifické nahrazení rozbíjí ORF2 na ORF2B-1 a ORF2B-2. V případě minoritně zastoupené formy RNA2B je proteáza kódovaná ORF2B-2 (Cai *et al.*, 2013). PiRV-1 je příbuzný zástupcům třídy *Astroviridae* (Cai *et al.*, 2013).

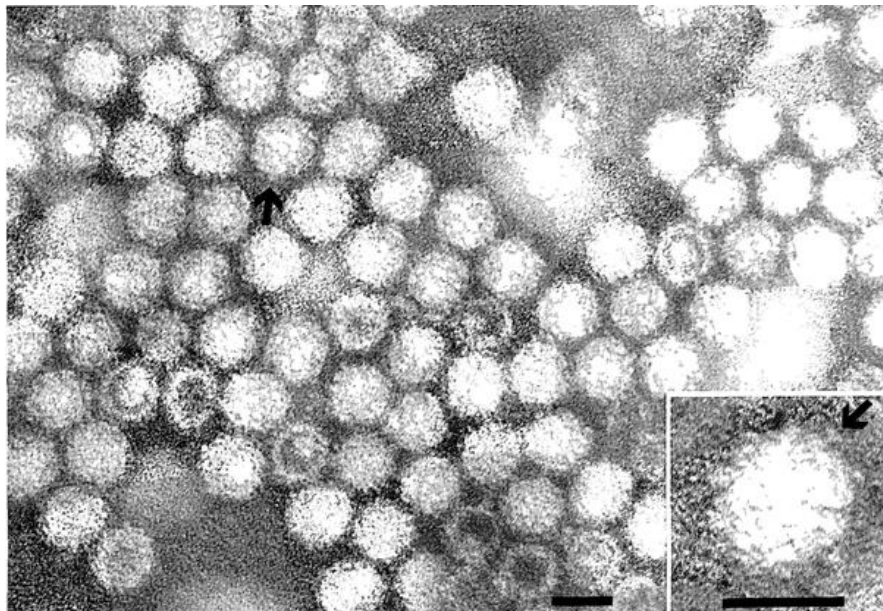
PiRV-2 nese dlouhou RNA o délce 11 170 nukleotidů kódující jediný polyprotein dlouhý 3 710 aminokyselin. PiRV-3 má genom tvořený jednou ssRNA dlouhou 8 112 nukleotidů, která nese dva ORF. ORF1 kóduje protein neznámé funkce a ORF2 kóduje virovou RdRp (Cai *et al.*, 2013). Spolu s dalšími nezařazenými viry – *Phlebiopsis gigantea* virus 2 (PgV2), *Fusarium virguliforme* RNA virus 1 (FvV1), *Fusarium virguliforme* RNA virus 2 (FvF2), *Fusarium graminearum* virus 3 (FgV3) a *Grapevine-associated totivirus-2* (GaTV-2) tvoří PiRV-3 nově navrhovanou skupinu s provizorním názvem New genus 2 (Cai *et al.*, 2013). PiRV-4 je zařazen do čeledi *Narnaviridae* a jeho genom je tvořen dsRNA o délce 3 kb.

### 3.3 Charakteristika *Plasmopara halstedii* virus

Viru podobné částice (VLP) v *Plasmopara halstedii* byly poprvé pozorovány T. Gulyou v roce 1990 (Gulya *et al.*, 1990). Přítomnost těchto virových částic byla potvrzena v dalších pěti izolátech *P. halstedii* rasy 300 (syn. rasa 2, 'Red River Valley' rasa) pocházejících ze severní Dakoty v USA (Gulya *et al.*, 1992).

#### 3.3.1 Morfologie PhV

Viriony *Plasmopara halstedii* virus (PhV) jsou izometrické o průměru 37 nm a na svém granulárním povrchu (Heller-Dohmen, 2008) nesou 4 nm velké výběžky (Mayhew *et al.*, 1992; obr. 5). Později byla mikroskopicky potvrzena přítomnost VLP v cytoplazmě intercelulárního mycelia *P. halstedii*, haustorií, sporangioforů, zoosporangií a oospor. Viriony se vyskytují v patogenu nezávisle na jeho fyziologické rase, geografickém původu a citlivosti vůči fungicidu metalaxylu (Heller-Dohmen, 2008), nejčastěji volně v cytoplazmě, ale také jako součásti vezikulů. Často tvoří krystalické struktury (Gulya *et al.*, 1992). Buňky hostitelské rostliny – slunečnice – zůstávají nezasazené (Mayhew *et al.*, 1992). Tvar virionů nebyl ovlivněn účinkem chloroformu při purifikaci, což indikuje neobalené viriony (Heller-Dohmen, 2008).



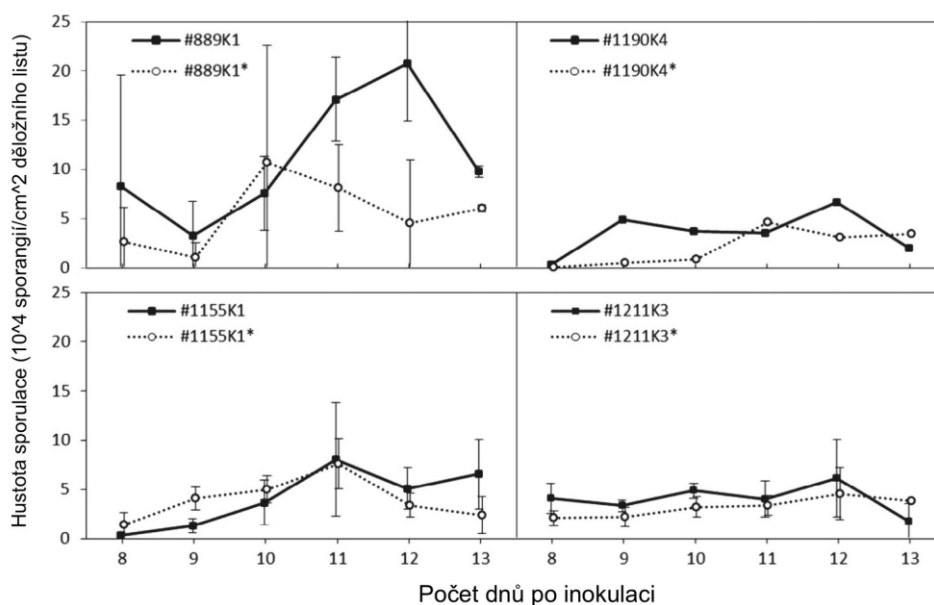
**Obr. 5: Isometrické viriony PhV.** Převzato z článku Mayhew *et al.* (1992). Šipkami jsou označeny 4nm výběžky na povrchu PhV. Měřítko 30 nm.



### 3.3.2 Interakce PhV s *Plasmopara halstedii*

Překážkou pro práci s PhV je především biotrofní povaha jeho hostitele, kultivace *Plasmopara halstedii* je kompletně závislá na živé hostitelské rostlině (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Vliv PhV na patogenitu *P. halstedii* prokázán nebyl (Grasse *et al.*, 2013). Patogenitou se rozumí schopnost vyvolat chorobu a patogenita byla testována metodou kultivačního patotestu na diferenciačním souboru (Tourvieille *et al.*, 2000).

Jak bylo popsáno výše, kvantitativní složku patogenity tvoří agresivita patogenu (viz podkapitola 3.1.5 Patogenita *Plasmopara halstedii*). Agresivita zahrnuje více faktorů, v případě *P. halstedii* se jedná především o intenzitu infekce, délku latence a hustotu sporulace.



**Obr. 6: Intenzita sporulace *Plasmopara halstedii*.** Převzato z článku Grasse *et al.* (2013). Počet sporangií na  $\text{cm}^2$  plochy děložního listu byl hodnocen mezi 8. a 13. dnem po inokulaci. Spojitá čára značí bezvirózní kmeny, přerušovaná čára kmeny obsahující PhV.

Vlivem přítomnosti PhV došlo k redukci míry systémové infekce o 25 % a míra celkové infekce (počet infikovaných rostlin) klesla o 10 %. Latentní perioda (doba od inokulace po objevení sporulace u 70 % infikovaných rostlin) trvala u bezvirózních kmenů průměrně 8–9 dní, u kmenů nesoucích PhV se tato doba prodloužila v průměru o jeden den. Intenzita sporulace se snížila u kmenů obsahujících PhV v průměru o 30 % v porovnání s kmeny bez viru. Tento faktor virulence vykazoval oproti zbývajícím faktorům největší rozdíly mezi

kmeny *P. halstedii* (viz obr. 6), u některých kmenů došlo k poklesu hustoty sporulace až o 50 %, u jiných jen o 5 %. Ve více než 90 % izolátů *P. halstedii* byla potvrzena přítomnost PhV a také bylo prokázáno, že PhV není vázán na konkrétní fyziologickou rasu (Grasse *et al.*, 2015). Bylo prokázáno, že přítomnost PhV způsobuje hypovirulenci *P. halstedii* (Grasse *et al.*, 2013).

### 3.3.3 Genom PhV

Už při výzkumu v roce 1992 se zjistilo, že nukleová kyselina izolovaná z PhV je citlivá vůči účinkům RNázy, ale vůči DNáze I je odolná. Tím bylo prokázáno, že genom PhV tvoří ssRNA (Mayhew *et al.*, 1992). Později bylo zjištěno, že se jedná o dvě samostatné molekuly ssRNA, RNA 1 a RNA 2 (Heller-Dohmen *et al.*, 2008).

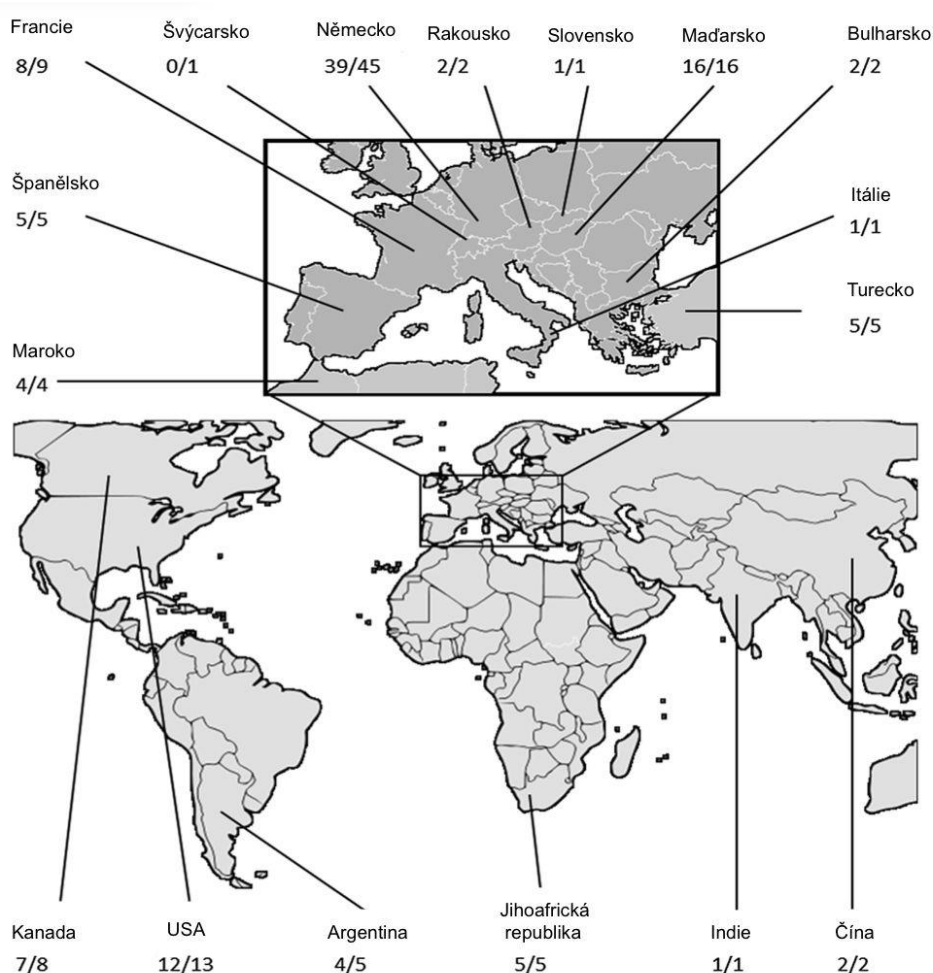
RNA 1 o délce 2 793 nukleotidů nese jeden otevřený čtecí rámec (ORF 1) o délce 2 745 nukleotidů, který kóduje RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp). Oblast ORF 1 je ohraničená nepřekládanou oblastí na 5' konci (5'UTR) o délce 18 nukleotidů a 3'UTR o délce 30 nukleotidů. RdRp vykazuje podobnost s RdRp viru *Sclerophthora macrospora virus A* (SmV-A) a s viry čeledi *Nodaviridae*. Odhadovaná velikost RdRp je 104 kDa.

RNA 2 je dlouhá 1 526 nukleotidů a nese ORF 2 o velikosti 1 128 nukleotidů. Oblast ORF 2 je ohraničená 164 nukleotidů dlouhou 5'UTR oblastí a 3'UTR oblastí o délce 234 nukleotidů. ORF 2 kóduje plášťový protein (CP), jehož velikost byla na základě nukleotidové sekvence odhadnuta na 40 kDa (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Experimentálně stanovená velikost CP je ale menší, 36–37,5 kDa (Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Mayhew *et al.*, 1992). Tento rozdíl je způsoben posttranslačními úpravami a proteolytickým štěpením translačního produktu na N'konci polypeptidu. CP je před působením dosud neznámé proteázy tvořen 375 aminokyselinami, úpravami dojde ke zmenšení polypeptidu na délku 352 aminokyselin. CP vykazuje podobnost s CP virů čeledi *Tombusviridae* a s virem SmV-A (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

Variabilita virové sekvence obou molekul RNA PhV z různých izolátů byla o 0,3 % nižší nezávisle na rase hostitele, geografickém původu a citlivosti vůči fungicidu metalaxyly. Nízká variabilita ukazuje, že změny v těchto vysoce konzervovaných molekulách RNA jsou škodlivé pro proces skládání a uvolnění virové částice z hostitelské buňky a proto k nim nedochází, resp. dochází k nim ve velmi malé míře (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

### 3.3.4 Rozšíření PhV

Screening 128 izolátů *Plasmopara halstedii* ze 17 zemí 5 kontinentů proběhl roku 2015 a zahrnoval až 40 let staré vzorky. PhV byl přítomen v hostiteli nezávisle na stáří vzorků, jejich geografickém původu (globální rozšíření viz obr. 7), rase i materiálu (čerstvě odebraná sporangia, zmražená sporangia a celé listy slunečnice se sporulací), ze kterého byla nukleová kyselina izolována. Bylo překvapivé, že i v dlouhodobě uchovávaných vzorcích byla detekovatelná RNA viru (Grasse *et al.*, 2015). Tato skutečnost podporuje teorii, že RNA PhV je velmi stabilní a dobře chráněná proti degradaci a to pravděpodobně díky proofreading aktivitě RdRp nebo přítomnosti čepičky na 5' konci (Dickson *et Wilusz*, 2011; Barr *et Faerns*, 2010).



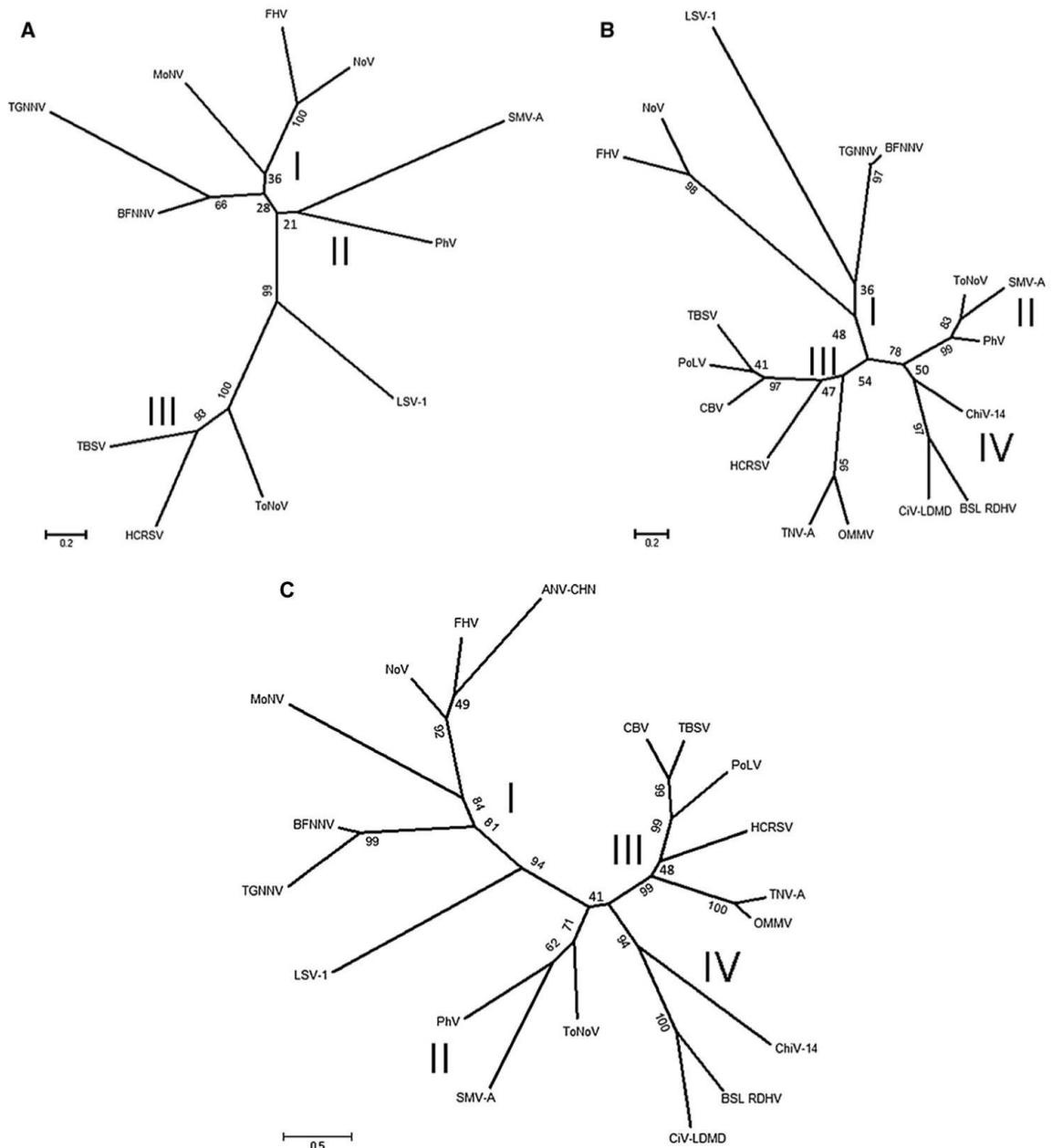
**Obr. 7: Globální rozšíření PhV.** Převzato z článku Grasse *et al.* (2015). Čísla značí poměr mezi počtem izolátů se záchytem PhV a celkovým počtem analyzovaných *Plasmopara halstedii*.

Velmi častý výskyt PhV pozitivních izolátů byl potvrzen vícekrát v přechozích letech (Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Grasse *et al.*, 2015). Důvodem pro vysoké procento infekcí PhV v *P. halstedii* může být fakt, že PhV není kryptický virus jako většina mykovirů (Buck, 1998), jež se šíří pouze intercelulárně a jež nevyvolávají příznaky. PhV naopak dokáže infikovat hostitele z vnějšího prostředí, jak bylo prokázáno ve studii zkoumající interakci PhV s hostitelem (Grasse *et al.*, 2013), kdy zoospory bezvirózních kmenů *P. halstedii* byly během inokulace infikovány pouze kontaktem s izolovanými viriony PhV.

### 3.3.5 Taxonomické zařazení PhV

Jediný známý virus, jehož CP i RdRp vykazují podobnost s odpovídajícími proteiny PhV, je virus SmV-A. Jedná se o neobvyklé viry, jejich RdRp se podobá RdRp virů z čeledi *Nodaviridae*, kdežto CP je nejpodobnější CP virů ze zcela odlišných skupin, z čeledi *Tombusviridae*, *Circoviridae* a nové skupiny tzv. chimérických virů (DNA-RNA viry). Proto je velmi náročné tento virus klasifikovat, protože na základě každého z proteinů PhV se tento virus fylogeneticky řadí do jiné skupiny virů.

Výsledkem fylogenetické analýzy založené na aminokyselinové sekvenci RdRp je fylogenetický strom, ve kterém čeledi *Tombusviridae* a *Nodaviridae* tvoří samostatné větve. Viry oomycet (PhV a SmV-A) tvoří další samostatnou větev poblíž čeledi *Nodaviridae*, ke kterým má aminokyselinová sekvence RdRp virů PhV i SmV-A nejblíže (viz obr. 8A). Fylogenetická analýza aminokyselinové sekvence CP demonstruje odlišnost virů oomycet od virů čeledi *Nodaviridae* i *Tombusviridae*, protože viry oomycet opět tvořily samostatnou větev na fylogenetickém stromě na pomezí mezi těmito dvěma čeleděmi (viz obr. 8B). Proto byla na základě společné analýzy obou proteinů jak na aminokyselinové, tak na genomové úrovni navržena samostatná taxonomická skupina virů oomycet, umístěná na pomezí mezi čeleděmi *Tombusviridae* a *Nodaviridae* (viz obr. 8C; Grasse *et al.*, 2017).



**Obr. 8:** Fylogenetická analýza aminokyselinové sekvence RdRp (A), pláštěvého proteinu (B) a spojených aminokyselinových sekvencí RNA-dependentní RNA polymerázy a pláštěvého proteinu (C). Převzato z článku Grasse *et al.* (2017). I – *Nodaviridae*, II – viry oomycet, III – *Tombusviridae*, IV – chimerické viry.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

V rámci bakalářské práce byla testována přítomnost PhV u 33 izolátů *Plasmopara halstedii*, jejíž vzorky byly získány sběrem ze symptomatických rostlin na lokalitách v České republice v letech 2014–2020 (viz tabulka 3). Napadené rostliny z lokalit Lednice, Olomouc, Brno-Chrlice a Kroměříž byly pěstovány pro experimentální účely na provokačních pozemcích ÚKZÚZ (Lednice, Brno-Chrlice), UPOL (Olomouc-Holice) a ZVÚ (Kroměříž). Z lokality Kroměříž pochází také jeden izolát ze soukromé zahrady. Izoláty z lokalit Hustopeče u Brna a Podivín pocházejí z infikovaných rostlin z výdrolu slunečnice na polích s následnou plodinou, kukuřicí.

Vzorky pro izolaci RNA byly odebírány ze zamraženého materiálu listů slunečnice se sporulací *P. halstedii*, dlouhodobě uchovávaného v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a to z děložních listů infikovaných rostlin po přemnožení daného izolátu na náchylné linii slunečnice (Perodovik nebo Giganteus), u izolátů 1902 a 1903 navíc i z pravých listů rostliny (původní vzorek odebraný v terénu při sběru *P. halstedii*). Vzorky představovaly část pletiva s viditelnou sporulací *P. halstedii* o ploše zhruba  $1\text{ cm}^2$ .

**Tabulka 3: Seznam izolátů *Plasmopara halstedii*.**

<b>Kód izolátu</b>	<b>Lokalita původu</b>	<b>Rok sběru</b>	<b>Kód izolátu</b>	<b>Lokalita původu</b>	<b>Rok sběru</b>
1405	Podivín	2014	1713	Hustopeče u Brna	2017
1416	Olomouc-Holice	2014	1714	Hustopeče u Brna	2017
1605	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2016	1715	Hustopeče u Brna	2017
1608	Olomouc-Holice	2016	1716	Olomouc-Holice	2017
1610	Olomouc-Holice	2016	1718	Kroměříž, ZVÚ <sup>a</sup>	2017
1611	Olomouc-Holice	2016	1720	Hustopeče u Brna	2017
1612	Olomouc-Holice	2016	1721	Kroměříž, ZVÚ <sup>a</sup>	2017
1613	Olomouc-Holice	2016	1801	Kroměříž, soukromá zahrada	2018
1614	Olomouc-Holice	2016	1802	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2018
1704	Hustopeče u Brna	2017	1901	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2019
1705	Hustopeče u Brna	2017	1902	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2019
1706	Hustopeče u Brna	2017	1903	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2019
1708	Hustopeče u Brna	2017	1904	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2019
1709	Hustopeče u Brna	2017	1905	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2019
1710	Hustopeče u Brna	2017	1906	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2019
1711	Hustopeče u Brna	2017	2001	Brno-Chrlice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	2020
1712	Hustopeče u Brna	2017			

a – ZVÚ – Zemědělský výzkumný ústav; b – ÚKZÚZ – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

## 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

### Použité chemikálie

- 96–100% ethanol (Lach-Ner; 20025-A96)
- 2-merkptoethanol (Serva; kat. č. 28625)
- Agarose for DNA elektrophoresis (Serva; kat. č. 11404.05)
- BioScript Reverse Transcriptase (Bioline; BIO-27036)
- (Fermentas; kat. č. SM0243)
- dNTP Mix (10 mM each) (Fermentas; kat. č. R0192)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium; kat. č. 41002-0,5ml)
- MyTaq DNA Polymerase (Bioline; BIO-21105)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega; kat. č. N211B)
- Random Hexamer Primers (Bioline; kat. č. BIO-38028)
- Oligonukleotidy (primery) (Generi-Biotech)

### Použité soupravy

- Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation; kat. č. 25 800)

### Použité roztoky a jejich příprava

50x TAE (Tris-Acetate-EDTA): 242 g Tris base rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH<sub>2</sub>O, přidat 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplnit do 1000 ml.

0,1% bromfenolová modř v 30% glycerolu.

### Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)
- Dokumentační systém G:BOX (Syngene)
- Elektroforetická komora HU10 MINI (Scie-Plas)
- Fluorimetr DyNa Quant 200 (Hoefer)
- Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals)
- Laminární box PV-100 (Telstar)
- Minicentrifuga PRISMTM mini (Labnet International, Inc.)
- Power Station 300 (Labnet)



- Spektrofotometr Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)
- Thermocycler T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD)
- Thermocycler T personal (Biometra)
- Váhy EK 200G (A&D Engineering)
- Výrobek šupinkového ledu Ice Flaker (BREMA)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)
- Zařízení pro inkubaci a třepání Mixing Block MB-102 (Bioer)
- Zdroj stejnosměrného proudu MS major science, MP-250V (Major Science)

## 4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.3.1 Izolace RNA

K izolaci celkové RNA ze vzorku byl použit kit Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation). Celková RNA byla extrahována ze sporangií a hyf *Plasmopara halstedii*, anebo z listu slunečnice infikované *P. halstedii*. Izolace probíhala při pokojové teplotě.

Ve sterilní zkumavce bylo připraveno požadované množství lyzačního pufru (Lysis Buffer C), ke kterému byl přidán v poměru 1:100 (Serva). Do 2ml homogenizační zkumavky bylo přidáno 50 mg vzorku listu s houbovými sporangii, ke kterému bylo následně přidáno 600  $\mu$ l lyzačního pufru s 2-merkptoethanolem. Vzorek byl zhomogenizován pomocí Lysis Matrix A za použití homogenizátoru (FastPrep 24, MP Biomedicals) při rychlosti  $5,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  po dobu 45 s. Homogenát byl inkubován po dobu 5 min při teplotě  $55^\circ\text{C}$  a poté byl veškerý lyzát přemístěn do filtrační kolony umístěné ve sběrné zkumavce a centrifugován 2 min při 14 000 RPM. Supernatant bez sraženiny byl převeden do čisté mikrocentrifugační zkumavky a byl k němu přidán 96–100% ethanol (Lach-Ner; 20025-A96) v poměru 1:1 k objemu supernatantu. Vzorek byl promíchán ve vortexu (MS1 Minishaker, IKA).

Až 600  $\mu$ l vzorku bylo přemístěno do spin kolony umístěné ve sběrné zkumavce a centrifugováno při 6 000 RPM po dobu 60 s a poté při 14 000 RPM po dobu 60 s. Filtrát byl vylit a do spin kolony v téže sběrné zkumavce bylo přidáno 400  $\mu$ l promývacího pufru (Wash Solution A). Vzorek byl centrifugován při 14 000 RPM 60 s. Promytí promývací pufrem bylo provedeno celkem 3x. Vzorek byl poté centrifugován nasucho při 14 000 RPM 2 min. Spin kolona byla umístěna do čisté 1,7ml eluční zkumavky. Na fritu spin kolony bylo přidáno 50 $\mu$ l elučního roztoku (Elution Solution A), vzorek byl centrifugován 2 min při 2 000 RPM a poté 1 min při 14 000 RPM. Izolovaná RNA byla uchovávána při teplotě  $-70^\circ\text{C}$ . Spektrofotometricky (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) byla stanovena koncentrace a kvalita izolované RNA.

### 4.3.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena ve dvou po sobě následujících krocích. Byla připravena reakční směs I (složení je uvedeno v tabulce 4). K 8  $\mu$ l reakční směsi byly přidány 2  $\mu$ l izolované RNA (300–500 ng), celkový objem reakce byl 1  $\mu$ l. Reakční směs I byla inkubována při  $70^\circ\text{C}$  po dobu 5 min a následně umístěna na led. Ke každému vzorku bylo přidáno 20  $\mu$ l reakční směsi II, složení viz tabulka 4. Vzorky byly vloženy do termocycleru

(Thermocycler T100TM Thermal Cycler, BIO-RAD) a reverzní transkripce proběhla za podmínek 25 °C/10 min, 42 °C/30 min, 85 °C/5 min.

**Tabulka 4: Složení reakční směsi I pro reverzní transkripci**

<b>Položka</b>	<b>Koncentrace pracovního roztoku</b>	<b>Konečná koncentrace</b>	<b>Pipetovaný objem [μl] (jeden test)</b>
<b>Reakční směs I</b>			
Voda	-	-	5
dNTP	10 mmol·l <sup>-1</sup>	500 μmol·l <sup>-1</sup>	1,5
Random primer	20 μmol·l <sup>-1</sup>	1 μmol·l <sup>-1</sup>	1,5
Celkem	-	-	-
<b>Reakční směs II</b>			
Voda	-	-	12
RT-PCR pufr	5x	1x	6
Inhibitor ribonukleáz	40 U·μl <sup>-1</sup>	40 U·reakce <sup>-1</sup>	1
BioScript RT	200 U·μl <sup>-1</sup>	10 U·reakce <sup>-1</sup>	1
<b>Celkový objem reakce</b>	-	-	<b>30</b>

### 4.3.3 Polymerázová řetězová reakce

Detekce viru byla provedena metodou PCR amplifikace za použití primerů specifických pro virovou RdRp (PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R1) a primerů specifických pro virový plášťový protein (PhV\_GW\_F2 a PhV\_GW\_R2). Sekvence specifických primerů jsou uvedeny v tabulce 5. Jako templát byla využita cDNA získaná reverzní transkripcí. Byla připravena reakční směs, složení viz tabulka 7. Reakční směs byla rozpipetována po 23 μl do 200μl mikrozkušavek a do každé zkumavky byly přidány 2 μl vzorku cDNA. Reakční směs byla promíchána a zkumavky byly umístěny do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 6. Výsledné PCR produkty byly uchovávány při -20 °C.

**Tabulka 5: Sekvence primerů použitých při detekci PhV.**

Název primeru	Sekvence 5'-3'	Velikost PCR produktu [bp]	Reference
PhV_pol_F1	CATATGGCCTCCGGAAGACAATC	300 bp	Grasse <i>et al.</i> , 2013
PhV_pol_R1	TAACACTGATTTTTCCCGCTTTGA		
PhV_WG_F2	TCAAGGGATCGATCGTATTCACA	500 bp	
PhV_WG_R2	GGTTCTCTTTGGGATCACATTC		

**Tabulka 6: Podmínky PCR reakcí při detekci PhV.**

Proces	Teplota	Doba trvání	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	1
Denaturace	95 °C	30 s	35
Nasedání primerů	58 °C	30 s	
Syntéza	72 °C	30 s	
Terminace	72 °C	5 min	1

**Tabulka 7: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci při detekci PhV.**

Položka	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem [μl] (jeden test)
Pufr	5x	1x	5
Voda			17,3
f primer <sup>a</sup>	20 μmol·l <sup>-1</sup>	0,2 μmol·l <sup>-1</sup>	0,25
r primer <sup>b</sup>	20 μmol·l <sup>-1</sup>	0,2 μmol·l <sup>-1</sup>	0,25
Taq polymeráza	5 U·μl <sup>-1</sup>	1 U·reakce <sup>-1</sup>	0,2
<b>Celkový objem reakce</b>			<b>23</b>

a – PhV\_pol\_F1 nebo PhV\_WG\_F2; b – PhV\_pol\_R1 nebo PhV\_WG\_R2

#### 4.3.4 Elektroforetická separace v agarózovém gelu

Do předem připraveného 1,5% agarózového gelu (Agarose for DNA electrophoresis, Serva) v 50 ml 1x TAE pufru bylo přidáno 2,5 μl interkalačního barviva GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium) a vše bylo nalito do elektroforetické vany (HU10 MINI, Scie-Plas). Do první jamky bylo napipetováno 1,5 μl markeru molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder,

Fermentas) a do ostatních jamek po 3  $\mu$ l PCR produktu. Elektroforetická separace probíhala při napětí 80 V (zdroj stejnosměrného proudu MP-250V, Major Science) po dobu 45 min. PCR produkty byly vizualizovány pomocí dokumentačního systému G:BOX (Syngene).

## 5 Výsledky

Během screeningu bylo otestováno 35 vzorků, reprezentujících 33 izolátů *Plasmopara halstedii* původem z České republiky odebraných v letech 2014–2020.

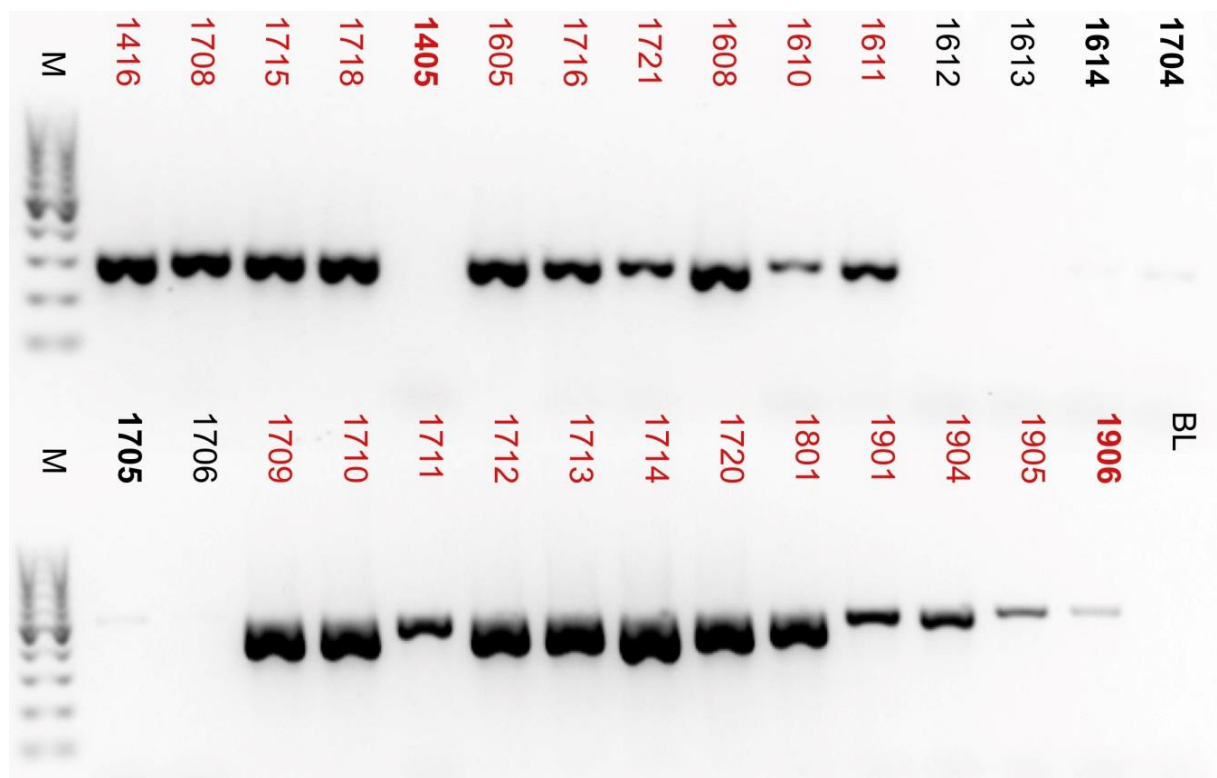
Virus byl detekován u 23 vzorků *P. halstedii*, při amplifikaci s použitím specifických PhV primerů jak pro polymerázu, tak pro kapsidový protein viru byly získány produkty o očekávané velikosti (viz obr. 9 a 10). Přítomnost viru tak byla prokázána u vzorků pocházejících z lokalit Hustopeče u Brna, Olomouc-Holice, Lednice, Kroměříž a Podivín (mapa lokalit viz obr. 9, souhrn viz tabulka 9 a obr. 11).

PhV pozitivních bylo 75 % vzorků původem z Hustopečí u Brna, a to vzorky z izolátů 1708, 1709, 1710, 1711, 1712, 1713, 1714, 1715 a 1720; 62,5 % vzorků pocházejících z Olomouce, a to vzorky z izolátů 1608, 1610, 1611 a 1716; 62,5 % vzorků pocházejících z Lednice, a to vzorky z izolátů 1605, 1901, 1904, 1905 a 1906, všechny vzorky původem z Kroměříže, a sice vzorky z izolátů 1718, 1721 a 1801 a vzorek z izolátu 1405 z Podivína (vzorky odebrány ze zmraženého materiálu po přemnožení izolátu).

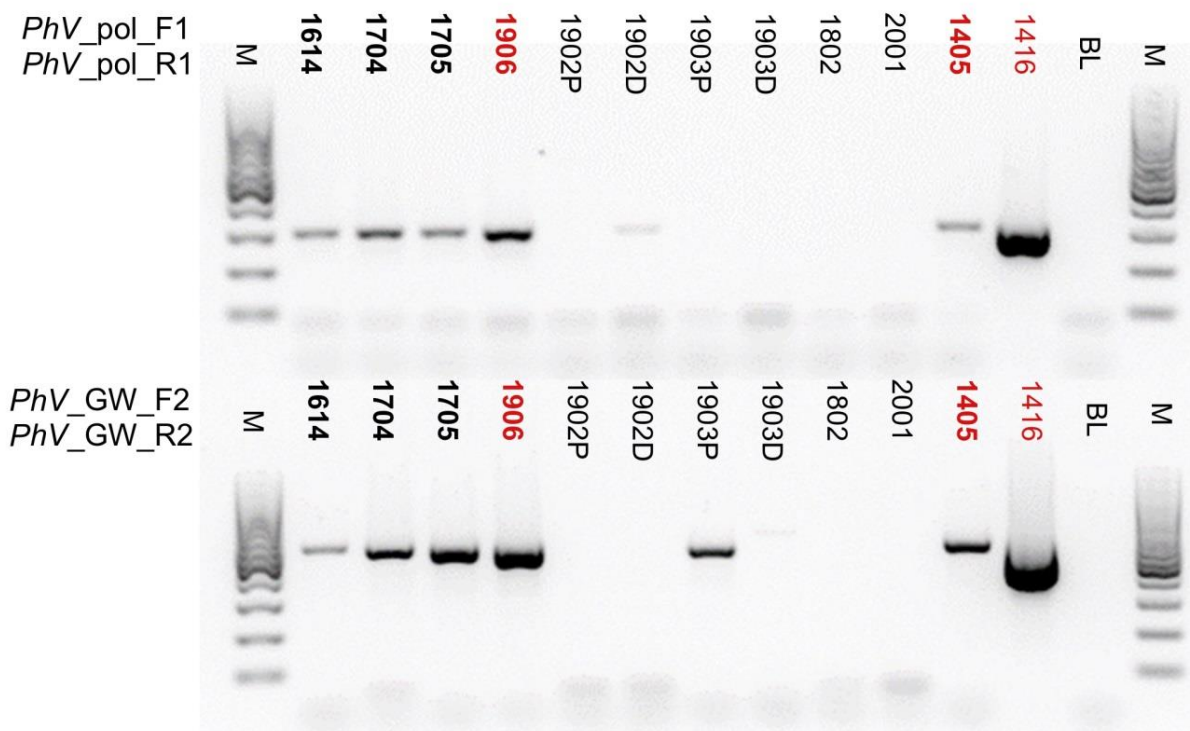
U několika vzorků byl zaznamenán neprůkazný výsledek, u vzorků 1405 a 1906 byly získány při detekci viru slabé PCR produkty (viz obr. 9). Z tohoto důvodu byla provedena i druhá PCR amplifikace, která potvrdila přítomnost viru v těchto vzorcích. Opakovaná PCR amplifikace byla provedena i v případě vzorků pocházejících z izolátů 1614, 1704 a 1705, přítomnost viru se nepotvrdila a tyto vzorky byly vyhodnoceny negativně.

Výsledky detekce PhV vzorků z izolátů 1902 a 1903 vyšly rozporuplně. V obou případech byly testovány vzorky pocházející ze zmražených děložních listů slunečnice i z původních pravých listů. Co se týče vzorku izolátu 1902 pocházejícího ze zmražených děložních listů, slabě pozitivní výsledek byl detekován po amplifikaci primery PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2, kdežto při použití primerů PhV\_GW\_F1 a PhV\_GW\_R2 byl výsledek negativní. U původního vzorku izolátu 1902 nebyl virus detekován. Pozitivní výsledky vykazoval vzorek izolátu 1903 pocházejícího z pravých listů pouze po amplifikaci primery PhV\_GW\_F1 a PhV\_GW\_R2. Při použití primerů PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2 i v případě vzorku z přemnoženého materiálu nebyl virus detekován. Orientačním sekvenováním těchto produktů byla prokázána nespecificity produktů (Šafářová, osobní sdělení), virus nebyl ve vzorku přítomen.

Vzorek 1416 z Olomouce byl použit v celém experimentu jako pozitivní kontrola, detekce PhV v tomto vzorku proběhla poprvé roku 2014 R. Pospíchalovou (Pospíchalová, 2014). U vzorků z Kroměříže byl potvrzen virus v izolátech z provokačního pozemku ÚKZÚZ i z jednoho izolátu ze soukromé zahrady. PhV nebyl detekován v jediném izolátu *P. halstedii* z lokality Brno-Chrlice.



**Obr. 9: Detekce PhV za použití PCR primerů PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2.** M – marker molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder), BL – negativní kontrola (voda). PhV pozitivní vzorky jsou označeny červeně, tučně psané vzorky vykazovaly nejasné výsledky, a byly proto testovány opakovaně.



**Obr. 10: Detekce PhV za použití PCR s kombinacemi primerů PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2 (nahore) a PhV\_GW\_F1 a PhV\_GW\_R2 (dole). M – marker molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder), BL – negativní kontrola (voda), vzorky označeny izolačními čísly, D – zmražené děložní listy rostlin po přemnožení izolátu na náchylné linii slunečnice, P – pravé listy původních vzorků. PhV pozitivní vzorky jsou označeny červeně, tučně psané vzorky vykazovaly nejasné výsledky, a byly proto testovány opakovaně.**

Z důvodu restriktivních epidemiologických opatření v souvislosti s výskytem onemocnění covid-19 nebylo možné provést inokulační testy, proto byla vyhodnocena data z patotestů *P. halstedii* na diferenciačních liniích slunečnice (data poskytnuta vedoucí práce) s cílem vyhledat potenciální souvislost mezi přítomností / nepřítomností PhV a intenzitou sporulace *P. halstedii* na náchylných diferenciačních liniích (GB a Giganteus), která vyjadřuje stupeň napadení rostliny (viz tabulka 8).



**Tabulka 8: Celkový stupeň napadení *P. halstedii* u náchylných diferenciačních linií slunečnice.**

Kód izolátu	Přítomnost PhV	Datum hodnocení	Diferenciační linie <i>Helianthus annuus</i> bez genů rezistence	Celkový stupeň napadení <i>P. halstedii</i> *
1405	+	8. 7. 2014	GB	100 %
			Giganteus	90 %
		10. 8. 2015	GB	81 %
			Giganteus	93 %
		23. 8. 2015	GB	100 %
			Giganteus	67 %
10. 12. 2015	GB	100 %		
	Giganteus	90 %		
1416	+	26. 11. 2015	GB	100 %
			Giganteus	67 %
1612	–	27. 7. 2016	GB	88 %
			Giganteus	87 %
		21. 9. 2016	GB	44 %
			Giganteus	75 %
1613	–	10. 8. 2016	GB	100 %
			Giganteus	67 %
		24. 8. 2016	GB	78 %
			Giganteus	100 %

+ PhV přítomen, – PhV nepřítomen

$$P = \frac{\sum(n.v).100}{x.N}$$

\* procento maximální možné sporulace , kde: P = celkový stupeň napadení; n = počet rostlin v každé kategorii; v = stupeň napadení; x = rozsah stupnice napadení; N = celkový počet hodnocených rostlin.

Celkový stupeň napadení (= % maximální možné sporulace) PhV pozitivního izolátu *P. halstedii* 1405 na náchylné linii GB se pohyboval mezi 81 % a 100 %. Celkový stupeň napadení téhož izolátu na náchylné linii Giganteus byl v rozmezí 67–93 %. Sporulace PhV pozitivního izolátu 1416 na diferenciační linii GB dosáhla 100 %, kdežto na linii Giganteus jen 67 %. Bezvirózní izolát 1612 vykazoval při napadení linie GB sporulaci 44 % a 88 %, při

napadení linie *Giganteus* dosáhla sporulace 75 % a 87 %. Izolát 1613 je taktéž bezvirózní a při napadení náchylné linie GB dosáhl sporulace 100 % a 78 %, kdežto při napadení linie *Giganteus* celkový stupeň napadení odpovídal 67 % a 100 %.

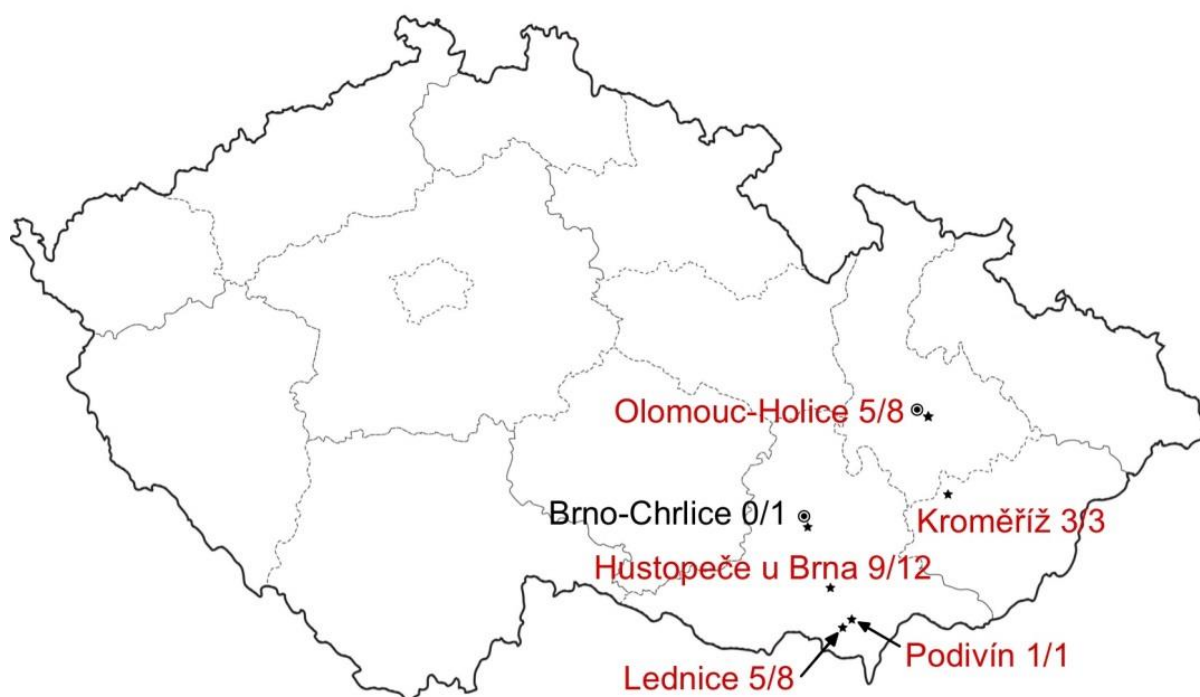
Srovnání celkového stupně napadení odráží biologickou variabilitu PhV. Při přemnožování *P. halstedii* v listopadu (výsledky nezveřejněny) se sporulace vyskytla pouze na zlomku děložních rostlin. Fakt, že se tyto výsledky neshodují, potvrzuje, že je potřeba optimalizovat podmínky experimentu.

**Tabulka 9: Výsledky screeningu přítomnosti PhV v izolátech *Plasmopara halstedii* pocházejících z České republiky, který byl proveden v roce 2020.**

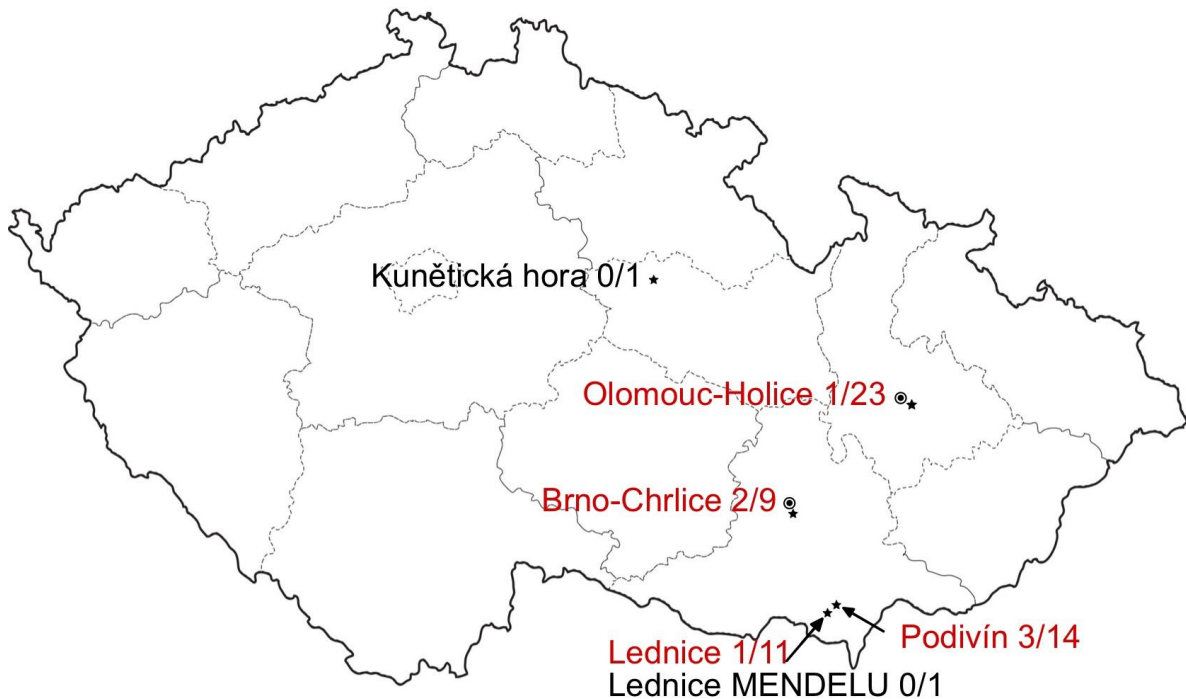
Kód izolátu	Lokalita původu	Přítomnost PhV	Kód izolátu	Lokalita původu	Přítomnost PhV	Poznámka
1405	Podivín	+	1714	Hustopeče u Brna	+	
1416	Olomouc-Holice	+	1715	Hustopeče u Brna	+	
1605	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	+	1716	Olomouc-Holice	+	
1608	Olomouc-Holice	+	1718	Kroměříž, ZVÚ <sup>a</sup>	+	
1610	Olomouc-Holice	+	1720	Hustopeče u Brna	+	
1611	Olomouc-Holice	+	1721	Kroměříž, ZVÚ <sup>a</sup>	+	
1612	Olomouc-Holice	–	1801	Kroměříž, soukromá zahrada	+	
1613	Olomouc-Holice	–	1802	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	–	
1614	Olomouc-Holice	–	1901	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	+	
1704	Hustopeče u Brna	–	1902	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	–	rostlinný materiál – původní pravé listy
1705	Hustopeče u Brna	–	1902	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	–	rostlinný materiál – děložní listy, materiál přemnožený v laboratoři; slabý produkt polF1/R1
1706	Hustopeče u Brna	–	1903	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	–	rostlinný materiál – původní pravé listy; polF1/R1 – vs. WGF2/R2+
1708	Hustopeče u Brna	+	1903	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	–	rostlinný materiál – děložní listy, materiál přemnožený v laboratoři
1709	Hustopeče u Brna	+	1904	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	+	
1710	Hustopeče u Brna	+	1905	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	+	
1711	Hustopeče u Brna	+	1906	Lednice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	+	
1712	Hustopeče u Brna	+	2001	Brno-Chrlice, ÚKZÚZ <sup>b</sup>	–	
1713	Hustopeče u Brna	+				

a – ZVÚ – Zemědělský výzkumný ústav; b – ÚKZÚZ – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský; + PhV přítomen, – PhV nepřítomen

Na základě výsledků screeningu přítomnosti PhV v roce 2020 byla vytvořena mapa rozšíření PhV v České republice (obr. 11). S využitím dat ze screeningu přítomnosti PhV v letech 2012 a 2014 provedeným v rámci práce R. Pospíchalové byla vytvořena mapa rozšíření PhV v těchto letech (obr. 12). V obou studiích byly testovány dva shodné izoláty *P. halstedii* (1405 z Podivína a 1416 z Olomouce-Holice), ostatní izoláty se lišily rokem sběru a lokalitami. Do studie v rámci této bakalářské práce byly zařazeny izoláty z Kroměříže a Hustopečí u Brna, naopak chyběly izoláty z Kunětické hory a Lednice MU.



**Obr. 11: Rozšíření PhV v České republice na základě výsledků screeningu přítomnosti PhV v roce 2020 provedeným v rámci této práce. Čísla značí poměr mezi počtem vzorků obsahujících PhV a celkovým počtem vzorků *Plasmopara halstedii*. Červeně psané názvy lokalit značí lokality s pozitivním nálezem PhV.**



**Obr. 12: Rozšíření PhV v České republice na základě výsledků screeningu přítomnosti PhV v roce 2012 a v roce 2014 provedeným v rámci práce R. Pospíchalové (data převzata z Pospíchalová, 2014). Číslo značí poměr mezi počtem vzorků obsahujících PhV a celkovým počtem vzorků *Plasmopara halstedii*. Červeně psané názvy lokalit značí lokality s pozitivním nálezem PhV.**

## 6 Diskuze

Během screeningu přítomnosti PhV byly otestovány vzorky z 33 izolátů *Plasmopara halstedii* pocházejících ze šesti lokalit na území České republiky z let 2014–2020: provokační pozemky ÚKZÚZ v Lednici a Brně-Chrlicích, ZVÚ v Kroměříži a Biocentra PřF UPOL v Olomouci-Holici; soukromá zahrada v Kroměříži; pole s výdroly slunečnice v Hustopečích u Brna a v Podivíně. Přítomnost viru byla prokázána u celkem 26 vzorků odpovídajících 24 izolátům *P. halstedii*.

Vzorky izolátů 1405, 1614, 1704, 1705 a 1906 vykazovaly po první provedené PCR amplifikaci nejednoznačné výsledky, proto bylo potřeba analýzu opakovat. Ačkoliv po druhé amplifikaci vykazovaly tři z těchto vzorků (1614, 1704 a 1705) přítomnost slabého produktu, nejednalo se o PhV, neboť tyto produkty byly v porovnání s pozitivní kontrolou, kterou představuje vzorek 1416, velmi slabé. Slabý produkt byl dán pravděpodobně nízkou koncentrací viru, nicméně nedá se vyloučit, že se mohlo jednat o kontaminaci.

Vzorek izolátu 1902 pocházející ze zmražených děložních listů slunečnice vykazoval po amplifikaci primery PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2 slabě pozitivní výsledek, kdežto po amplifikaci primery PhV\_GW\_F1 a PhV\_GW\_R2 byl výsledek negativní. Také u původního vzorku izolátu 1902 nebyla přítomnost viru prokázána. Vzorek izolátu 1903 pocházejícího z pravých listů původních vzorků po amplifikaci primery PhV\_GW\_F1 a PhV\_GW\_R2 vykazoval pozitivní výsledky, kdežto po amplifikaci primery PhV\_pol\_F1 a PhV\_pol\_R2 vyšel výsledek negativně. U přemnoženého materiálu izolátu 1903 nebyl PhV detekován. V obou případech se jednalo o nespecifický bakteriální produkt, proto lze u obou těchto izolátů přítomnost PhV vyloučit.

Poprvé byl PhV pozorován v izolátu *P. halstedii* v roce 1990 elektronmikroskopicky (Gulya *et al.*, 1990). K biochemické, morfologické a genomové charakteristice těchto virionů, a tím pádem i potvrzení, že se jedná o virus, došlo o dva roky později (Gulya *et al.*, 1992; Mayhew *et al.*, 1992). Až v roce 2008 proběhla první studie zahrnující mj. rozšíření PhV ve světě. PhV byl detekován v izolátech pocházejících z osmi různých zemí v Evropě, Severní a Jižní Americe, konkrétně se jednalo o Francii, Maďarsko, Německo, Rakousko, Slovensko, Argentinu, Kanadu a USA (Heller Dohmen *et al.*, 2008). Až v roce 2015 proběhl výzkum zabývající se rozšířením PhV v globální měřítku (Grasse *et Spring*, 2015). V rámci tohoto výzkumu byly testovány izoláty ze 17 zemí pěti kontinentů (viz obr. 7). Přítomnost PhV byla

hlášena ve více než 90 % izolátů, což se shodovalo s výsledky z roku 2008 (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). S tímto tvrzením se rozcházejí výsledky z diplomové práce R. Pospíchalové, která potvrdila přítomnost PhV pouze u 12 % izolátů *P. halstedii* (7 z 59), které pocházely ze čtyř lokalit na území ČR (ÚKZÚZ Brno-Chrlice a Lednice, Olomouc-Holice a Podivín) (Pospíchalová, 2014). Screening rozšíření PhV provedený v rámci této bakalářské práce potvrzuje přítomnost PhV v 73 % izolátů pocházejících z pěti lokalit v rámci České republiky v letech 2014–2020. Tento údaj koreluje s údaji z let 2008 a 2015 (Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Grasse *et Spring*, 2015), ale je v rozporu s údajem o rozšíření PhV v České republice z roku 2014 (Pospíchalová, 2014).

Přítomnost PhV byla detekována ve více izolátech pocházejících z lokalit Olomouc-Holice a Lednice (ÚKZÚZ), než tomu bylo v roce 2014, kdy byl PhV detekován pouze v jednom izolátu *P. halstedii* z obou zmíněných lokalit. To odpovídá v obou případech podílu méně než 10 % z celkového počtu izolátů z daných lokalit. Aktuální screening vykazuje přítomnost PhV v 62,5 % izolátů *P. halstedii* z obou těchto lokalit. Na druhou stranu bylo detekováno méně izolátů s PhV v lokalitách Brno-Chrlice a Podivín, než tomu bylo v roce 2014. Nicméně bylo testováno pouze po jednom izolátu z každé z těchto dvou lokalit, takže virus nemusel být detekován kvůli nedostatečnému počtu testovaných izolátů. Izolát původem z Brna neobsahoval PhV, kdežto v izolátu z Podivína byla přítomnost PhV potvrzena. Nově byly testovány izoláty pocházející z Kroměříže a Hustopečí u Brna, kde bylo v obou případech zastoupení izolátů s PhV poměrně vysoké. V Hustopečích u Brna byla potvrzena přítomnost PhV u 75 % izolátů *P. halstedii*, což představuje nejvyšší podíl ze všech testovaných izolátů (shrnutí viz obr. 11 a 12).

Izoláty 1405 a 1416 byly testovány na přítomnost PhV jak v roce 2014, tak v roce 2020. Vzorek pocházející z izolátu 1416 byl použit v rámci testování v roce 2020 jako pozitivní kontrola, při opakované analýze vykazoval tento vzorek vždy vysokou koncentraci viru. V roce 2014 zastupoval tento vzorek jediný virus-pozitivní izolát ze všech testovaných izolátů pocházejících z lokality Olomouc-Holice. Naproti tomu v izolátu 1405 nebyl PhV v roce 2014 detekován, kdežto při testování v roce 2020 byla přítomnost viru potvrzena. Důvodem pro tuto neshodu ve výsledcích může být velmi nízká koncentrace viru ve vzorku. Tuto domněnku potvrzuje fakt, že při pozdějším testování byl výsledek analýzy vzorku izolátu 1405 nejasný a bylo potřeba analýzu opakovat. Při opakované analýze byl při nanášení vzorků na elektroforetický gel zvýšen objem nanášených vzorků, čímž se zvýšilo množství analyzované

virové nukleové kyseliny v gelu. Díky tomu bylo možné detekovat PhV i při jeho nízké koncentraci ve vzorku.

Vzhledem k aktuálně probíhající pandemii onemocnění covid-19 byla zavedena celostátní restriční omezení, kvůli kterým nebylo možné v rámci této bakalářské práce provést časově náročné inokulační laboratorní experimenty v původně plánovaném rozsahu. Kdyby to bylo možné, proběhl by experiment, který by se zaměřoval na vlastnost hypovirulence PhV. V rámci tohoto experimentu by proběhlo porovnání vlivu inokulace náchylné rostliny izolátem *P. halstedii* s PhV a izolátem bez PhV. Také by se pro inokulaci použily izoláty různých ras, aby se zjistilo, jestli má rasa *P. halstedii* vliv na případnou hypovirulenci.

Alternativně byly proto použity starší výsledky sporulace na náchylných diferenciačních liniích z minulých let a hodnocena existence souvislosti mezi přítomností PhV a stupněm napadení (viz tabulka 8).

Interakce PhV s hostitelským organismem je jeho velmi zajímavou a potenciálně užitečnou vlastností. Mykoviry se většinou jeví jako bezpříznakové, nicméně u PhV byl pozorován hypovirulentní účinek (Grasse *et al.*, 2013). Pokud by byla tato vlastnost potvrzena, bylo by výhodné využít PhV pro kontrolu *P. halstedii* v biologické ochraně slunečnice. Při prvním zkoumání vlastností PhV byla přítomnost jeho virionů detekována u izolátů, které vyvolávaly mírnější projevy choroby, ale také u agresivních fyziologických ras *P. halstedii*. To vedlo k závěru, že není žádná souvislost mezi rasou patogenu a přítomností PhV (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Následně byl proveden další výzkum, jehož výsledkem bylo potvrzení hypovirulentního účinku PhV. Přítomnost PhV snížila intenzitu sporulace, rozsah systémových infekcí a dobu latence (Grasse *et al.*, 2013).

Data hodnocená v této práci neprokázala žádnou souvislost mezi přítomností nebo absencí PhV v těchto izolátech a nepotvrdila očekávání, že PhV pozitivní izoláty budou vykazovat nižší stupeň napadení rostliny. Pěstování náchylných rostlin (kultivary Peredovik, GB a Giganteus) a inokulace probíhaly v minulosti jako součást patotestů různých studentů a pracovníků a za různých podmínek (skleník, kultivační komory, fytotrony), což mohlo ovlivnit výsledky. Také nebylo provedeno dostatečné množství testování a nebylo použito dostatek vzorků, tudíž jsou údaje nesrovnatelné.



Jako další možnost biologické ochrany slunečnice proti *P. halstedii* byla navržena aplikace entomopatogenních hub, které mohou kolonizovat i rostlinná pletiva a jako endofyty bránit infekci *P. halstedii*; tento alternativní způsob ochrany proti *P. halstedii* je však nutné optimalizovat (Miranda-Fuentes *et al.*, 2021).

Tato bakalářská práce rozšiřuje údaje z roku 2014 (Pospíchalová, 2014) o rozšíření PhV na území České republiky. Výskyt PhV byl potvrzen na všech studovaných lokalit vyjma ÚKZÚZ Brno-Chrlice. Vzhledem k tomu, že tato lokalita byla zastoupena pouze jedním vzorkem, virus nemusel být detekován vinou nízkého počtu testovaných vzorků. Zajímavé je, že mezi izoláty získanými ve stejném roce na stejné lokalitě byly izoláty jak bez viru, tak i s virem. Toto zjištění se shoduje se závěry R. Pospíchalové. Kromě informací o rozšíření PhV na našem území vyvstává z této práce několik otázek, které by bylo zajímavé objasnit. Především by bylo vhodné podniknout zmiňovaný experiment, jehož podstatou je zjistit vliv PhV na agresivitu patogenu. V rámci experimentu by bylo zajímavé zjistit, jestli existuje nějaká souvislost mezi fyziologickými rasami *P. halstedii* a hypovirulencí PhV. S tím souvisí i otázka, jestli v interakci s patogenem hraje roli i variabilita genomu PhV. Všechny do roku 2015 sekvencované vzorky PhV vykazují velmi nízkou variabilitu jak v kódujících, tak i nekódujících oblastech genomu (Grasse *et Spring*, 2015). Bylo by vhodné tuto informaci aktualizovat a sekvencovat vzorky PhV z různých izolátů *P. halstedii* a z různých lokalit nejen našeho území.

## 7 Závěr

Výskyt *Plasmopara halstedii virus* v české populaci *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, byl molekulárními metodami potvrzen u 24 z 33 testovaných izolátů pocházejících z pěti lokalit na území České republiky. Lokalitami, kde byla potvrzena přítomnost PhV, jsou města Kroměříž, Hustopeče u Brna, Podivín, Lednice a městské části Olomouc-Holice a Brno-Chrlice.

Vzhledem k aktuálně probíhající pandemii onemocnění covid-19 a celostátním restriktivním omezením v letech 2020–2021 nebylo možné v rámci této bakalářské práce provést biologické kultivační experimenty, které by zhodnotily hypovirulenci PhV. Pokud by se potvrdilo, že přítomnost PhV v izolátu *P. halstedii* způsobuje hypovirulenci izolátů patogenu, dalo by se této skutečnosti využít k regulaci *P. halstedii* v biologické ochraně slunečnice. Z tohoto důvodu by bylo vhodné tento experiment v budoucnu uskutečnit.

## 8 Seznam použité literatury

Abbas A. (2016): A Review Paper on Mycoviruses. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 7(12).

Ahmed S., Tourvieille de Labrouhe D., Delmotte F. (2012): Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genetics and Biology* 49(10).

As-sadi F., Carrere S., Gascuel Q., Hourlier T., Rengel D., Le Paslier M.-C., Bordat A., Boniface M.-C., Brunel D., Gouzy J., Godiard, Vincourt P. (2011): Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* show single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BMC Genomics* 12:498.

Bahri B., Kaltz O., Leconte M., de Vallavieille-Pope C., Enjalbert J. (2009): Tracking costs of virulence in natural populations of the wheat pathogen, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *BMC Evolutionary Biology* 9:26.

Ban R., Kovacs A., Körösi K., Perczel M., Turoczy G. (2014a): First report on the occurrence of a new pathotype, 714, of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) in Hungary. *Plant Disease* 98, 1580.

Ban R., Kovacs A., Perczel M., Körösi K., Turoczy G. (2014b): First report on the increased distribution of pathotype 704 of *Plasmopara halstedii* in Hungary. *Plant Disease* 98, 844.

Barr J. N., Fearn R. (2010): How RNA viruses maintain their genome integrity. *Journal of General Virology*. 91(6), 1373–1387.

Benda V., Babůrek I., Kotrba P. (2006): *Základy biologie*, 1. Vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha pp. 39.

Bojňanský V. (1956): Peronospora slnečnicová (*Plasmopara halstedii*) Farlow (Berl. & de Toni) v ČSR. *Pol'nohospodárstvo*, 3: 397–401.

Bojňanský V. (1957): Bude peronospora slnečnicová i u nás vážnou chorobou? *Za vysokou úrodu*, 6: 19.

- Bouterige S., Tronchin G., Lesourd M., Marot-Leblond A., Molinéro V., Bouchara J. P., Robert R. (2003): Ultrastructural and immunochemical changes during the in vitro development of *Plasmopara halstedii*. *Phytopathology* 93: 1023–1030.
- Bouzidi M., Parlange F., Nicolas P., Mouzeyar S. (2007): Expressed Sequence Tags from the oomycete *Plasmopara halstedii*, an obligate parasite of the sunflower. *BMC Microbiology* 7(1).
- Bozarth R. F. (1972): Mycoviruses: a new dimension in microbiology. *Environmental health perspectives*, 2, 23–39.
- Bozarth R. F. (1979): Physicochemical Properties of Mycoviruses: An Overview. In: Molitoris H. P., Hollings M., Wood H. A. (eds) *Fungal Viruses. Proceedings in Life Sciences*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Buck K. W. (1986): Fungal virology – an overview. In: Buck K. W. (ed.): *Fungal Viruses*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida 2–84.
- Buck K. (1998): Molecular variability of viruses of fungi. In: Bridge P. D., Couteaudier Y., CLackson J. M. (eds.): *Molecular variability of fungal pathogens*, CAB International, Wallingford, UK, 53–72.
- Cai G., Hillman B. (2013): *Phytophthora* Viruses. Mycoviruses. *Advances in Virus Research*. 327–350.
- Cai G., Krychiw J. F., Myers K., Fry W. E., Hillman B. I. (2013): A new virus from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans* with an 8 kb dsRNA genome: The sixth member of a proposed new virus genus. *Virology*. 435(2), 341–349.
- Caten C. E. (1972): Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of General Microbiology* 72:221–229.
- Choi G, Nuss D. (1992): Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science*. 257(5071), 800–803.

- Delmotte F., Giresse X., Richard-Cervera S., M'Baya J., Vear F., Tourvieille J., Walser P., Tourvieille de Labrouhe D. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 534–540
- Dickson A. M., Wilusz J (2011): Strategies for viral RNA stability: live long and prosper. *Trends in Genetics*. 27(7), 286–293.
- Drábková-Trojanová Z., Sedlářová M., Pospíchalová R., Lebeda A. (2018): Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflower in the Czech Republic. *Plant Pathology* 67(1): 136–144.
- Ellis L. F., Kleinschmidt W. L. (1967): Virus-like Particles of a Fraction of Statolon, a Mould Product. *Nature*. 215(5101), 649–650.
- García-Carneros A. B., Molinero-Ruiz. (2017): First Report of the Highly Virulent Race 705 of *Plasmopara halstedii* (Downy Mildew of Sunflower) in Portugal and in Spain. *Plant Disease* 101:8, 1555–1555.
- Gascuel Q., Martinez Y., Boniface M. C., Vear F., Pichon M., Godiard L. (2015): The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology*. 16(2), 109–122.
- Ghabrial S. A. (1994): New development in fungal virology. *Advances in Virus Research*. 43, pp. 303–388.
- Ghabrial S. A. (1998): Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*. 16(1): 119–31.
- Ghabrial S. A., Castón J. R., Jiang D., Nibert M. L. Suzuki N. (2015): 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479–480, 356–368.
- Gilley M. A., Gulya T. J., Seiler G. J., Underwood W., Hulke B. S., Misar C. G., Markell S. G. (2020): Determination of Virulence Phenotypes of *Plasmopara halstedii* in the United States. *Plant Disease* 104:11, 2823–2831.

- Gillings M. R., Tesoriero L. A., Gunn L. V. (1993): Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. *Plant Pathology*, 42, 6–15.
- Gresse X., Tourvieille de Labrouhe D., Richard-Cervera S., Delmotte F. (2007): Twelve polymorphic expressed sequence tags-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. *Molecular Ecology Notes* 7(6), 1363–1365.
- Goossen P. G., Sackston W. E. (1968): Transmission and biology of sunflower downy mildew. *Canadian Journal of Botany*, 46: 5–10.
- Grasse, W., Spring, O. (2015): Occurrence and genetic diversity of the *Plasmopara halstedii virus* in sunflower downy mildew populations of the world. *Fungal Biology* 119: 170–178.
- Grasse, W., Spring, O. (2017): ssRNA viruses from biotrophic Oomycetes form a new phylogenetic group between Nodaviridae and Tombusviridae. *Archives of Virology* 162(5): 1319–1324.
- Grasse, W., Zipper, R., Totska, M., Spring, O. (2013): *Plasmopara halstedii virus* causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genetics and Biology* 57: 42–47.
- Gulya, T. J., Freeman, T. P., Mayhew, D. E. (1990): Virus-like particles in *Plasmopara halstedii*, sunflower downy mildew. *Phytopathology* 80: 1032.
- Gulya, T. J., Freeman, T. P., Mayhew, D. E. (1992): Ultrastructure of virus-like particles in *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* 70: 334–339.
- Gulya T. J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda A., Spencer-Phillips P. T. N. (eds.): *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 3. Proceedings of The 2nd International Downy Mildews Symposium. UP in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hane, Czech Republic, 121–134.
- Gulya T. J., Miller J. F., Virányi F., Sackston W. E. (1991b): Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11–20.

- Gulya T., Tourvieille de Labrouhe D., Maširevic S., Penaud A., Rashid K., Viranyi F. (1998): Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). ISA Symposium III: Sunflower Downy Mildew, Fargo (ND, USA) 13–14 January, 130–136.
- Gulya T. J., Sackston W. E., Virányi F., Maširevic S., Rashid K. (1991a): New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *Journal of Phytopathology* 132, 303–11.
- Hall G. (1989): *Plasmopara halstedii*. *Cmi Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* No. 979. CAB International, Wallingford, UK.
- Hammond S. M. (2005): Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters* 579: 5822–5829.
- Heller A., Rozynek B., Spring O. (1997): Cytological and Physiological Reasons for the Latent Type of Infection in Sunflower Caused by *Plasmopara halstedii*. *Journal of Phytopathology*. 145(10): 441–445.
- Heller-Dohmen, M., Göpfert, J. C., Hammerschmidt, R., Spring, O. (2008): Different pathotypes of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* all contain isometric virions. *Molecular Plant Pathology* 9 (6): 777–786.
- Heller-Dohmen, M., Göpfert, J. C., Pfannsteil, J., Spring, O. (2011): The nucleotide sequence and genome organization of *Plasmopara halstedii virus*. *Virology Journal* 8: 123.
- Hollings M. (1962): Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196: 962–65.
- Honkura R., Shirako Y., Ehara Y., Yamanaka S. (1983): Two types of virus-like particles isolated from downy mildew diseased rice plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 49, 653–658.
- Ioos R., Laugustin R. R., Tourvieille J., Tourvieille de Labrouhe D. (2006): Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology* 56(2), 209–218.

Kormány A., Virányi F. (1997): Studies on the virulence and aggressiveness of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) in Hungary. Proc. 49th International Symposium on Crop Protection, Ghent 6. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige Universiteit Gent 62/3b: 911–915.

Kůdela V. (1989): Obecná fytopatologie. Praha: Academia.

Kudlíková I., Veverka K. (1999): Výsledky šlechtění slunečnice na odolnost vůči chorobám. In: Nové poznatky o vztahu hostitel-pathogen (Book of Abstracts). Czech Phytopathological Society, Prague: 37–41. Kudlíková I., Veverka K. (1999): Výsledky šlechtění slunečnice na odolnost vůči chorobám. In: Nové poznatky o vztahu hostitel-pathogen (Book of Abstracts). Czech Phytopathological Society, Prague: 37–41.

Leach J. E., Vera Cruz C. M., Bai J., Leung H. (2001): Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. Annual Review of Phytopathology. 39: 187–224

Leslie J. F., Zeller K. A. (1996): Heterokaryon incompatibility in fungi: More than just another way to die. Journal of Genetics 75: 415–424.

Márquez L. M., Redman R. S., Rodriguez R. J., Roossinck M. J. (2007): A virus in fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315, 513–515.

Martín-Sanz A., Rueda S., García-Carneros A. B., Molinero-Ruiz L. (2019): First Report of a New Highly Virulent Pathotype of Sunflower Downy Mildew (*Plasmopara halstedii*) Overcoming the *Pl8* Resistance Gene in Europe. Plant Disease 104(2).

Mayhew D. E., Cook A. L., Gulya T. J. (1992): Isolation and characterization of a mycovirus from *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany 70: 1734–1737.

Miller J. F., T. J. Gulya (1988): Registration of six downy mildew resistant sunflower germplasm lines. Crop Sci. 28: 1040–1041.

Montarry J., Hamelin F. M., Glais I., Corbi R., Andrivon D. (2010): Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. BMC Evolutionary Biology 10: 283.



Nibert M. L., Ghabrial S. A., Maiss E., Lesker T., Vainio E. J., Jiang D., Suzuki N. (2014): Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. *Virus Res* 188: 128–141.

Novotelnova N. S. 1966: Downy mildews of sunflower. Moscow, Leningrad, Nauka.

Nuss D. L. (2005): Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*. 3(8): 632–42.

Nuss D. L. (2011): Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. *Advances in Virus Research*. 80: 25–48.

Pearson M. N., Beever R. E., Boine B., Arthur K. (2009): Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 10(1): 115–28.

Pecrix Y., Buendia L., Penouilh-Suzette C., Maréchaux M., Legrand L., Bouchez O., Rengel D., Gouzy J., Cottret L., Vear F., Godiard L. (2018): Sunflower resistance to multiple downy mildew pathotypes revealed by recognition of conserved effectors of the oomycete *Plasmopara halstedii*. *The Plant Journal* 97(4), 730–748.

Peyambari M., Thapa V., Roossinck M. J. (2020): Evolution of Mycoviruses. *Encyclopedia of Virology* 457–460.

Pospíchalová R. (2014): Výskyt *Plasmopara halstedii viru* v české populaci plísně slunečnicové. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Radwan O., Bouzidi M. F., Mouzeyar S. (2011): Molecular Characterization of Two Types of Resistance in Sunflower to *Plasmopara halstedii*, the Causal Agent of Downy Mildew. *The American Phytopathology Society* 101(8), 970–979.

Ratai-Vida R. (1996): New infections of downy mildew of sunflower. *Novövényvédelem* 32, 533–535, (in Hungarian).

Sackston, W. E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: Spencer, D.M. (ed.): *The downy mildews*. Academic Press, London, UK, 545–575.

- Sackston W. E., Vimard B. (1988): Leaf Disk Immersion (LDI) inoculation of sunflower with *Plasmopara halstedii* for in vitro determination of host-pathogen relationships. *Plant Disease* 72, 227–9.
- Sakr N., Ducher M., Tourvieille J., Walser P., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D. (2008): Variation in form and size of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) zoosporangia. *Mycological Progress* 7(4), 257–265.
- Sedlářová M., Dobešová K., Lebeda A. (2020): Plíseň slunečnicová v České republice. In: *Agromanuál 2020/05*, 32–34
- Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Drábková Trojanová, Z., Bartůšek, T., Slobodianová, L., Lebeda, A. (2016): First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from Czech Republic – short communication. *Plant Protection Science* 52(3): 182–187.
- Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 49 (1): 1–10.
- Spring O. (2000): Homothallic sexual reproduction in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. *Helia*. 23: 19–26.
- Spring O. (2001): Nonsystemic infections of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 108(4), 329–336.
- Spring, O. (2019): Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew – Review. *Plant Protection Science* 55: 149–158.
- Spring O., Zipper R. (2006): Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* 110(6), 657–663.
- Spring O., Zipper R. (2016): Asexual Recombinants of *Plasmopara halstedii* Pathotypes from Dual Infection of Sunflower. *PLoS ONE* 11(12).

Spring O., Gomez-Zeledon J., Hadziabdic D., Trigiano R. N., Thines M., Lebeda A. (2018): Biological Characteristics and Assessment of Virulence Diversity in Pathosystems of Economically Important Biotrophic Oomycetes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 37(6), 439–495

Spurný M. (2005): Hybridy slunečnice *Rustica* úspěšné v boji proti plazmopaře. In: Řepka, mák, slunečnice a hořčice (sborník referátů). Česká zemědělská společnost na ČZU v Praze a Katedra rostlinné výroby, Praha, 146–166.

Sutela S., Poimala A., Vainio E. J. (2019): Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiology Ecology* 95(9).

Thines, M. (2014): Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes – a global overview. *European Journal of Plant Pathology* 138: 431–447.

Thines M. (2019): An evolutionary framework for host shifts – jumping ships for survival. *New Phytologist*, 224 (2): 605–617.

Tourvieille de Labrouhe D., Gulya T., Maširevic S., Penaud A., Rashid K., Viranyi F. (2000): New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference*. Toulouse, France: International Sunflower Association, 161–166.

Tourvieille de Labrouhe D., Walser P., Jolivot D. *et al.* (2012): Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference*. Mar del Plata, Argentina.

Trojanová Z., Sedlářová M., Gulya T. J., Lebeda A. (2017): Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower – a review. *Plant Pathology* 66(2): 171–185.

Veverka K., Křížková-Kudlíková I. (2006): Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: XVIIth Czech and Slovak Conference on Plant Protection (Book of Abstracts). Czech Agricultural University, Prague: 287–288

Virányi F. (1988): *Plasmopara halstedii*. In: Smith I. M., Dunez J., Phillips D. H., Lelliott R. A., Archer S. A. (Eds.). (1988): European handbook of plant diseases, pp. 228–230, Blackwell Scientific Publications.

Virányi F. (2002): The sunflower-*Plasmopara halstedii* pathosystem: natural and artificially induced coevolution. In: Spencer-Philips P. T. N, Gisi U., Lebeda A. (eds): Advances in Downy Mildew Research. Vol. 1. Kluwer Academic Publisher, London: 167–172.

Virányi F., Spring O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. European Journal of Plant Pathology 129: 207–220.

Virányi F., Gulya T. J., Tourvielle D. L. (2015): Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations in different countries. Helia, 38: 149–162.

Voglmayr H., Riethmülle R. A., Göker M., Weiß M., Oberwinkler F. (2004): Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildews with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. Mycological Research, 108: 1011–1024.

Whisson S. C., Boevik P. C., Moleleki L., Avrova A. O., Morales J. G., Gilroy E. M., Armstrong M. R., Grouffaud S., van West P., Chapman S., Hein I., Toth I. K., Protchard L., Birch P. R. J. (2007): A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. Nature 450: 115–8.

Win J., Krasileva K. V., Kamoun S., Shirasu K., Staskawicz B. J., Banfield M. J. (2012): Sequence divergent RXLR effectors share a structural fold conserved across plant pathogenic oomycete species. PLoS Pathogens 8, e1002400.

Varga J., Vágvölgyi C., Tóth B. (2003): Recent advances in mycovirus research. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 50(1), 77–94.

Vranceanu V., Stoenescu F. (1970): Immunity to sunflower downy mildew due to a single dominant gene. *Probleme Agriculture* 22, 34–40.

Yokoi T., Takemoto Y., Suzuki M., Yamashita S., Hibi T. (1999): The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* virus B. *Virology*. 264(2):344–9.

Yokoi T., Yamashita S., Hibi T. (2003): The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* Virus A. *Virology* 311: 394–399.

Yong P. A., Morris H. E. (1927): *Plasmopara* downy mildew of cultivated sunflower. *American Journal of Botany* 14, 551–552.

Zimmer D. E., Hoes, J. A., 1978: Diseases. In: J. F. Carter (ed.): *Sunflower Science and Technology*. Agronomy 19, American Society of Agronomy, Madison, WI pp. 225–262.

### **Internetové zdroje**

Diagnostics (2014). *Plasmopara halstedii*. *Bulletin OEPP/EPPO* 44(3), 350–359. [online] [navštíveno 10. 2. 2021] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12160>

Index Fungorum. [online] [navštíveno 11. 3. 2021]. Dostupné z: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=203446>

Lifemap NCBI. [online] [navštíveno 11. 3. 2021] Dostupné z <https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/>

Šindelková M., Brnický P., Svobodová I., Šamánek J. (2008): Plíseň slunečnice *Plasmopara halstedii*. Ministerstvo zemědělství České republiky ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, Praha. [online] [navštíveno 2. 3. 2021] Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/59919/Plasmopara\\_halstedii.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/59919/Plasmopara_halstedii.pdf)