

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2014

Bc. Romana Pospíchalová

UNIVERZITA PALACKÉHO v OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Výskyt *Plasmopara halstedii* viru
v české populaci plísně slunečnicové**

Diplomová práce

Bc. Romana Pospíchalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

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

KOPIE

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

V Olomouci, dne

Práce byla podpořena interními granty UP PřF-2012-001, PřF-2013-003, IGA_PřF_2014001 a Českou vědeckou mykologickou společností.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, Mgr. Zuzaně Trojanové za ochotnou pomoc a cenné rady při práci v laboratoři a zpracování práce, dále RNDr. Milanu Kitnerovi, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP v jehož laboratoři byla provedena experimentální část práce a v neposlední řadě svým blízkým, kteří mě podporovali během celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Romana Pospíchalová
Název práce: Výskyt *Plasmopara halstedii* viru v české populaci plísně slunečnicové
Typ práce: Diplomová práce
Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice, <http://botany.upol.cz/>
Vedoucí práce: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2014

Souhrn:

Literární rešerše této diplomové práce je zaměřena na obecnou charakteristiku mykovirů a jejich vztah k fytopatogenním mikroorganismům. Podrobněji se práce věnuje charakteristice *Plasmopara halstedii* viru (*PhV*) a jeho hostitele *Plasmopara halstedii*, karanténního původce plísnovitosti slunečnice roční. Součástí DP je také porovnání patosystému *Plasmopara halstedii* - *PhV* s podobným patosystémem *Sclerophthora macrospora* - *Sclerophthora macrospora virus A*.

V experimentální části DP byla optimalizována metoda detekce *PhV* v izolátech *P. halstedii* pomocí PCR amplifikace s použitím *PhV* specifických primerů, která byla později využita při studiu výskytu tohoto viru v populaci *P. halstedii* z území ČR. Data z vlastního screeningu rozšíření *PhV* byly srovnány s již dříve získanými výsledky.

[REDACTED]

Klíčová slova: *Plasmopara halstedii*, oomycety, mykoviry, hypovirulence, PCR
Počet stran: 57
Jazyk: český

Bibliographic identification:

Author's first name and surname: Bc. Romana Pospíchalová
Title: Occurrence of *Plasmopara halstedii virus* in the Czech population of sunflower downy mildew
Type of thesis: Diplomma thesis
Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice, Czech Republic
Supervisor: Dr. Michaela Sedlářová
The year of presentation: 2014

Summary:

This diplomma work reviews biology of mycoviruses with focus on relationships between mycoviruses and plant pathogenic fungi. *Plasmopara halstedii virus*, a parasite of *Plasmopara halstedii* which is a quarantine causal agent of sunflower downy mildew, is described in details. This pathosystem is compared with the most similar pathosystem of *Sclerophthora macrospora* - *Sclerophthora macrospora virus A*.

Optimization of *Plasmopara halstedii virus* detection method and screening of *PhV* presence in *Plasmopara halstedii* isolates originating from the Czech Republic were the main experimental tasks in this thesis. PCR using *PhV*-specific primers revealed

[REDACTED]

Key words: : *Plasmopara halstedii*, downy mildews, mycoviruses, hypovirulence, PCR

Number of pages: 57

Language: Czech

SOUHRN

Literární rešerše této diplomové práce je zaměřena na obecnou charakteristiku mykovirů a jejich vztah k fytopatogenním mikroorganismům. Podrobněji se práce věnuje charakteristice *Plasmopara halstedii* viru (*PhV*) a jeho hostitele *Plasmopara halstedii*, karanténního původce plísnovitosti slunečnice roční. Součástí DP je také porovnání patosystému *Plasmopara halstedii* - *PhV* s podobným patosystémem *Sclerophthora macrospora* - *Sclerophthora macrospora virus A*.

V experimentální části DP byla optimalizována metoda detekce *PhV* v izolátech *P. halstedii* pomocí PCR amplifikace s použitím *PhV* specifických primerů, která byla později využita při studiu výskytu tohoto viru v populaci *P. halstedii* z území ČR. Data z vlastního screeningu rozšíření *PhV* byly srovnány s již dříve získanými výsledky.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

SUMMARY

This diploma work reviews biology of mycoviruses with focus on relationships between mycoviruses and plant pathogenic fungi. *Plasmopara halstedii virus*, a parasite of *Plasmopara halstedii* which is a quarantine causal agent of sunflower downy mildew, is described in details. This pathosystem is compared with the most similar pathosystem of *Sclerophthora macrospora* - *Sclerophthora macrospora virus A*.

Optimization of *Plasmopara halstedii virus* detection method and screening of *PhV* presence in *Plasmopara halstedii* isolates originating from the Czech Republic were the main experimental tasks in this thesis. PCR using *PhV*-specific primers revealed [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

OBSAH

1. CÍLE PRÁCE.....	1
2. ÚVOD.....	2
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
3.1 Mykoviry.....	3
3.1.1 Obecná charakteristika.....	3
3.1.2 Taxonomie a původ.....	4
3.1.3 Přenos.....	7
3.1.4 Vliv na biologii hostitelů a symptomy.....	8
3.1.5 Významné mykoviry a jejich hostitelé.....	10
3.1.6 Mykoviry oomycet.....	12
3.2 Patosystém <i>Helianthus annuus</i> - <i>Plasmopara halstedii</i> - <i>Plasmopara halstedii virus</i>	14
3.2.1 <i>Helianthus annuus</i>	14
3.2.2 <i>Plasmopara halstedii</i>	14
3.2.2.1 Biologie a morfologie <i>P.halstedii</i>	16
3.2.2.2 Výskyt a variabilita <i>P.halstedii</i>	18
3.2.3 <i>Plasmopara halstedii virus (PhV)</i>	19
3.2.3.1 Morfologie <i>PhV</i>	20
3.2.3.2 Interakce <i>PhV</i> s <i>Plasmopara halstedii</i>	20
3.2.3.3 Genom <i>PhV</i>	21
3.2.3.4 Srovnání <i>PhV</i> a <i>SmV A</i>	22
3.3 Patosystém <i>Sclerophthora macrospora</i> - <i>S. macrospora virus</i>	23
4. MATERIÁL A METODY.....	25
4.1 Rostlinný materiál a izoláty <i>P. halstedii</i>	25
4.2 Metodika detekce <i>PhV</i> v roce 2012.....	28
4.3 Metodika detekce <i>PhV</i> v roce 2014.....	29
4.3.1 Izolace RNA.....	29
4.3.2 Syntéza virové cDNA z izolované RNA.....	30
4.3.3 Detekce viru pomocí PCR.....	31
5. VÝSLEDKY.....	33
6. DISKUSE.....	39
7. ZÁVĚR.....	43
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	44
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45

1. CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce byla zaměřena na:

1/ vypracování literární rešerše o mykovirech, se zaměřením na *Plasmopara halstedii* virus (*PhV*), jeho charakteristiku, interakce s *Plasmopara halstedii*.

2/ experimentální detekci *PhV* v populaci *P. halstedii* na území ČR. Tato část práce zahrnovala kultivaci *P. halstedii* v laboratorních podmínkách (příprava rostlinného materiálu, inokulace semenáčků, přemnožování a uchovávání patogenu, odebrání vzorků pro extrakci RNA), zavedení a optimalizaci metody detekce *PhV* v izolátech *P. halstedii*, včetně zhodnocení výskytu a rozšíření *PhV* na území ČR na základě vlastního screeningu v kombinaci s již dříve získanými výsledky.

2. ÚVOD

První zmínky o mykovirech (virech napadajících výhradně houby a houbové organismy) byly publikovány před více než 40 lety, přesto je však množství informací o těchto obligátních parazitech omezené a jejich role v biosystémech není doposud zcela objasněná. Mykoviry byly detekovány u všech skupin houbových organismů z říše Fungi, ale také u fytopatogenních peronospor („downy mildews“) z říše Chromista, odd. Oomycota, tř. Peronosporomycetes, ř. Peronosporales. Vztahy mykovirů s houbovými hostiteli v rámci komplexních patosystémů (hostitel - parazit - hyperparazit) jsou bezesporu fascinujícím a doposud poměrně málo probádaným polem, hlavním zájmem mykovirologů však zůstává využití mykovirů jako prostředků biologické ochrany rostlin proti fytopatogenním houbám. Kontrola houbových chorob rostlin pomocí chemických fungicidů a doporučené agronomické praxe je často neúčinná a je komplikována rezistencí k fungicidům a požadavky na ochranu životního prostředí (Nuss, 2005). Potenciál využití mykovirů jako prostředků biologické ochrany proti rostlinným patogenům je proto jedním z hlavních důvodů jejich výzkumu (Pearson *et al.*, 2009).

Jedním z poměrně dobře charakterizovaných mykovirů je *Plasmopara halstedii virus (PhV)* parazitující na *Plasmopara halstedii*, jednom z nejvýznamnějších patogenů pěstované slunečnice roční. V různých částech stélky *Plasmopara halstedii* byly transmisí elektronovou mikroskopií lokalizovány viriony, které byly morfologicky shodné v izolátech plísně slunečnicové různého geografického původu i patotypů. Následné molekulární studie potvrdily, že tyto virové částice byly i sekvenčně identické a dobře odlišitelné od jiných mykovirů, což dokládá, že se jedná o jeden samostatný druh. Morfologické změny u izolátů *P. halstedii* obsahujících viriony nebyly zaznamenány. *PhV* však může způsobit hypovirulenci (oslabení agresivity patogena, tj. schopnosti produkovat infekční částice a napadat další hostitele).

Předložená diplomová práce se zabývá obecnou charakteristikou mykovirů, podrobněji pak *Plasmopara halstedii* virem jako součástí komplexního patosystému *Helianthus annuus* - *Plasmopara halstedii* - *Plasmopara halstedii virus* a rozšířením *PhV* v populaci *P. halstedii* na území České republiky.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Mykoviry

Viry jsou nebuněční intracelulární paraziti, kteří nejsou schopni samostatné existence a množení bez živého hostitele, tj. jsou biotrofní. Viry jsou tvořeny nukleovou kyselinou (DNA nebo RNA), která je chráněna plášťovým proteinem. Pro svou existenci a replikaci využívají proteosyntetický aparát hostitele (Benda *et al.*, 2006). Podle hostitelských organismů viry můžeme rozdělit na viry rostlinné, živočišné, houbové a bakteriofágy (viry bakterií).

Pro pojmenování virů hub byly dříve používány tři termíny - mykoviry (Bozarth, 1972), mykofágy (Nash *et al.*, 1973) a virům podobné částice („virus-like particles“, VLP). Různorodá terminologie je výsledkem spíše různého výzkumného zaměření vědeckých pracovníků než rozdílů ve struktuře a funkcích virů hub (Bozarth, 1979). Nejvhodnější se zdá být použití termínu mykoviry nebo VLP. Někteří autoři používají pojem VLP pro částice podobné virům, detekované u hub pomocí elektronové mikroskopie, které doposud nebyly izolovány a charakterizovány, a označení mykoviry pro částice, které již byly z hub izolovány a je známá jejich morfologie a nukleoproteinové složení (Ghabrial, 1980). Poslední zmiňovaná terminologie bude používána i v rámci této diplomové práce.

Mykoviry nepředstavují parazity výhradně makro nebo mikromycet z říše Fungi, ale vyskytují se i u houbám podobných organismů zařazených do říše Chromista. Použití termínu „mykoviry“ pro označení virů napadajících např. zástupce tř. Peronosporomycetes (syn. Oomycetes), mezi které náleží i *P. halstedii*, je poněkud nepřesné a do jisté míry zavádějící, protože se nejedná o houby v pravém slova smyslu (Kalina *et Váňa*, 2005). Nicméně v literatuře a ve vědecké komunitě je termín „mykoviry“ běžně užíván i pro viry infikující houbové organismy mimo říši Fungi, podobně jako jsou choroby rostlin způsobené těmito organismy běžně označovány jako mykózy.

3.1.1 Obecná charakteristika

Většina známých mykovirů se vyznačuje izometrickými viriony o průměrné velikosti 25-50 nm (Buck, 1986) a jejich genomy jsou tvořeny dsRNA nebo ssRNA. Podle 7. Zprávy ICTV (van Regenmortel *et al.*, 2000) měla většina charakterizovaných

mykovirů dsRNA genomy; byly popsány pouze dva ssRNA viry a to *Mushroom bacilliform virus* z plodnic *Agaricus bisporus* nakažených chorobou „La France“ způsobující jejich deformace (Revill *et al.*, 1999) a *Sclerophthora macrospora virus B* z mycelia *Sclerophthora macrospora* (Yokoi *et al.*, 1999). O pět let později 8. Zpráva ICTV (Fauquet *et al.*, 2005) uvádí již 28 ssRNA virů, což je téměř 1/3 dosud charakterizovaných mykovirů.

Na rozdíl od virů rostlin a živočichů mykovirům chybí extracelulární fáze reprodukčního cyklu, a proto nejsou infekční v klasickém slova smyslu. Infekce totiž obvykle nemůže být zahájena expozicí neinfikovaných částí stélky výtažkem připraveným z infikovaného houbového kmene (Nuss, 2011). Omezení či absence styku s extracelulárním prostředím snižuje potřebu tvorby částic, které chrání virovou genetickou informaci a značný počet mykovirů, např. členové taxonomické rodiny Narnaviridae a Hypoviridae, nekódují ani kapsidový protein (Nuss, 2005).

První zpráva o mykovirech byla publikována již před více než 50 lety (Hollings, 1962) přesto jsou znalosti o těchto nebuněčných organismech stále značně omezené. Většina studií se zabývá viry ekonomicky významných hub, jako jsou pěstované houby (př. *Agaricus bisporus* - pečárka dvouvýtrusá), kvasinky (př. *Saccharomyces cerevisiae* - kvasinka pивní), původci mykóz rostlin (př. *Cryphonectria parasitica* - původce korové nekrózy kaštanovníku), a dalších polyfágních mikromycet (*Aspergillus* sp. - kropidlák) (Pearson *et al.*, 2009). Vůbec prvním detekovaným mykovirem byl v roce 1962 *Mushroom bacilliform virus* (MBV), který popsal M. Hollings jako viriony v deformovaných plodnicích *A. bisporus* při studiu „La France disease“ a položil tak základy mykovirologie (Ghabrial *et Suzuki*, 2009).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

3.1.5 Významné mykoviry a jejich hostitelé

V roce 1948 byla popsána choroba způsobující poškození pěstovaných plodnic žampionů *Agaricus bisporus*, tzv. „La France disease“ (Ghabrial *et* Suzuki, 2009), která se projevuje zpomalením vývoje plodnic hub, které se mohou předčasně otevírat, hnědnout nebo stejně jako mycelium projevovat další známky deformace (na obrázku č. 1A. a 1B.), které je činí neprodejnými (Mikula, 2002). *Mushroom bacilliform virus* (MBV), který byl detekován v napadených plodnicích a popsán v roce 1962 stál při zrodu mykovirologie (Ghabrial *et* Suzuki, 2009). Následný intenzivní výzkum ukázal, že La France disease je mimo přítomnosti MBV spojena s přítomností druhého samostatně se replikujícího viru s názvem *La France isomeric virus* (LIV) (Romaine *et* Schlaghauer, 1995). Mezi další ekonomicky významné mykoviry pěstovaných hub patří také *Oyster mushroom spherical virus* (OMSV) (Yu *et al.*, 2003) a *Oyster mushroom isometric virus* způsobující odumírání plodnic *Pleurotus ostreatus* (hlívy ústříčné) (Ro *et al.*, 2006).



Obrázek č. 1: **A** - Deformované plodnice *Agaricus bisporus* vykazující typické symptomy La France disease. **B** - Mycelium *Agaricus bisporus* abnormální barvy a růstu se symptomy La France disease (převzato z Elibuyuk *et* Bostan, 2010).

Významnými mykoviry jsou také viry kvasinek, z nichž některé se podílejí na tzv. killer fenoménu. U *Saccharomyces cerevisiae* byly detekovány dva dsDNA viry (*L-A* a *L-BC*), dva ssRNA samostatné replikony (20S a 23S RNA) a několik retrovirů (*Ty1*, *Ty2*, *Ty3*, *Ty4*) (Wickner, 1976). Výzkum virů kvasinek začal s objevem killer fenoménu a jeho spojením s dsRNA. Jedná se o jev, kdy některé kmeny kvasinek vylučují toxický protein, který je letální pro jiné kmeny a zároveň kmeny, které jej produkují, jsou vůči němu imunní nebo rezistentní. (Wickner, 1996). Toxin a imunitní protein jsou kódovány satelitem M1 hlavního kvasinkového dsRNA viru s názvem *L-A* (Bostian *et al.*, 1980). Bylo popsáno ještě několik dalších satelitů kódující toxin-imunitní systém kvasinek a byly označeny jako M2, M3, M28 atd. (Young, 1993). *L-A* představuje rodinu blízce příbuzných virů odlišitelných na základě sekvence nebo funkce. Dalším dsRNA virem je *L-BC*, který má stejně velký jednosegmentový genom jako *L-A* ale jeho sekvence je odlišná (Sommer *et Wickner*, 1982).

V rámci rostlinné patologie dominuje výzkum *Cryphonectria hypovirus 1* (*CHVI*), který byl úspěšně použit jako prostředek biologické ochrany proti *Cryphonectria parasitica* (Nuss, 2005), mikromycety zavlečené do Severní Ameriky a Evropy z Dálného východu, způsobující korovou nekrózu kaštanovníku. Fenotypové změny plísňě spojené s infekcí *CHVI* zahrnují snížení asexuální sporulace, změnu morfologie kolonií a často také sníženou produkci pigmentu a akumulaci specifických metabolitů, jako je například kyselina šťavelová (Anagnostakis, 1979). Testování různých izolátů *C. parasitica* prokázalo značnou variabilitu v úrovni hypovirulence a v rozsahu souvisejících příznaků, což koreluje se sekvenční rozmanitostí *CHVI* (Chen *et al.*, 1994). Jako příklad můžeme uvést virové izoláty označené *CHVI-EP713* a *CHVI-Euro7*, které jsou homologní, ale mají odlišnou expresi symptomů (Nuss, 2005). Oba tyto kmeny snižují tvorbu oranžového pigmentu produkovaného virus-free kmeny *C. parasitica*. Biologický význam této fenotypové změny je nejasný, poskytuje však marker *CHVI* infekce (Nuss, 2005). Oba kmeny snižují sporulaci, *CHVI-EP713* výrazně zpomaluje růst kolonií *C. parasitica* na pevném médiu, zatímco kmeny infikované *CHVI-Euro7* rostou na médiu rychleji než izogenní „virus-free“ kmeny (Chen *et Nuss*, 1999). Tyto odlišné fenotypy jsou viditelné na obrázku č. 2 a jsou výrazné i přímo na rostlinném pletivu. Na větvičkách kaštanovníku infikovaných kmeny *C. parasitica* s izolátem viru *CHVI-EP13* se tvoří malé povrchové vředy s malým počtem stromatických puchýřků, ve kterých vznikají nepohlavní výtrusy. Oproti tomu

kmeny *C. parasitica* infikované izolátem *CHVI*-Euro7 tvoří rychle se šířící vředy, které jsou hustě pokryty stromaty (Chen *et Nuss*, 1999).



Obrázek č. 2: Vliv infekce virem *CHVI* na morfologii kolonií *Cryphonectria parasitica* (převzato z Nuss, 2005). **A** - kmen EP155 bez virové infekce, **B** - izogenní kmen infikovaný izolátem viru *CHVI* - EP713, **C** - izogenní kmen infikovaný méně infekčním izolátem *CHVI* - Euro7.

Rod *Aspergillus* je jednou z nejlépe prostudovaných skupin mikromycet, což je způsobeno také tím, že jej lze jako saprotrofní organismus poměrně snadno a úspěšně pěstovat *in vitro* podmínkách. Zástupci tohoto rodu jsou pro člověka zajímaví v mnoha směrech - *A. nidulans* posloužil jako experimentální model pro studium parasexuálního procesu a řada druhů je využívána v biotechnologiích (produkce amyláz, kyseliny citronové, sójové omáčky). Naopak toxiny produkující zástupci kontaminují obilniny a další potraviny a některé druhy mohou infikovat živočichy včetně člověka. (Bennett, 2010). Přestože bylo díky rozsáhlému průzkumu detekováno množství VLP a nukleových kyselin virového původu (van Diepeningen *et al.*, 2008), zejména u nepohlavně se rozmnožujících aspergilů, pouze malé množství z nich bylo studováno podrobněji. Mezi ně patří např. částečně charakterizované *Aspergillus viry* 1816, 178 a 341 vyskytující se u *A. nidulans*, u kterých byl studován mechanismus RNA silencingu při interakci virového patogenu a houbového hostitele (Hammond *et al.*, 2008).

████████████████████

████████████████████████████████████████████████████████████████████████████████

████████████████████████████████████████████████████████████████████████████████

████████████████████████████████████████████████████████████████████████████████

3.2 Patosystém *Helianthus annuus*-*Plasmopara halstedii*-*Plasmopara halstedii* virus

3.2.1 *Helianthus annuus*

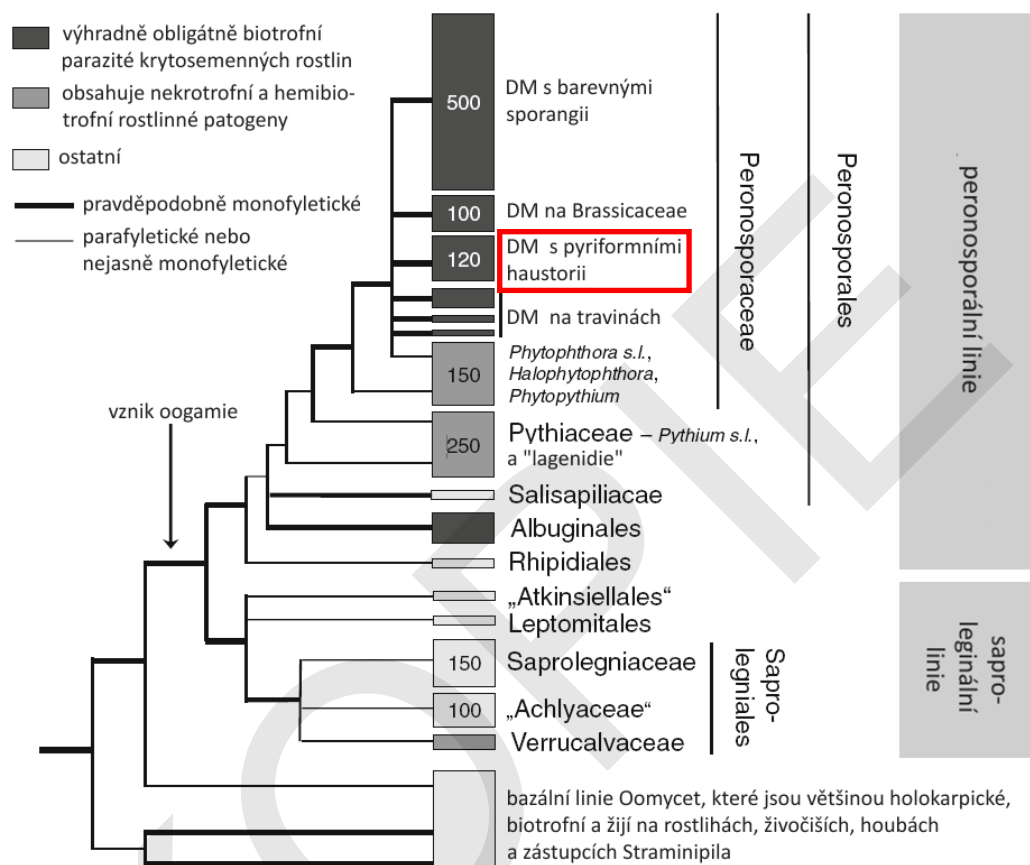
Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) je teplomilná jednoletá bylina z čeledi Asteraceae, původem ze Severní Ameriky (Kirschner *et* Šída, 2004). Dnes je tato plodina pěstována po celém světě, hlavně pro své olejnaté nažky, které jsou zdrojem lehce stravitelného oleje vhodného především na přípravu a konzervaci pokrmů (Kirschner *et* Šída, 2004). Semena obsahují 20-40 % bílkovin a 30-65 % oleje, který až z 80 % obsahuje kyselinu linolovou (www.eppo.int, 2000). Mezi další druhy rodu slunečnice vyskytující se hojně v ČR patří *H. tuberosus* (s. topinambur) a *H. × laetiflorus* (s. pozdní) (Kirschner *et* Šída, 2004).

Slunečnice je plodina s mírnými požadavky na půdu a vlhkost, ale je velmi riziková z hlediska potenciálních ztrát způsobených chorobami, hmyzem, plevelem nebo ptáky. Mezi hlavní patogeny slunečnice ve světovém měřítku patří například *Sclerotinia sclerotiorum* (sklerotiniová hniloba), *Diaporthe helianthi* (šedá skvrnitost slunečnice) a *Plasmopara halstedii* (plíseň slunečnicová), která je hrozbou především kvůli nově vznikajícím patogenním rasám a odolnosti vůči fungicidům, které se používají k chemické kontrole (www.eppo.int, 2000). Nejvýznamnějšími patogeny slunečnice v České republice jsou *Sclerotinia sclerotiorum* způsobující bílou hnilobu slunečnice, *Phoma macdonaldii* způsobující fomové černání lodyh a *Botrytis cinerea* znehodnocující nažky a květenství těsně před sklizní (Kudlíková *et* Veverka, 1999; www.eagri.cz, 2013).

3.2.2 *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. *et* De Toni (1888), původním názvem *Peronospora halstedii* (Farlow, 1883), je obligátně biotrofní patogen z říše Chromista, oddělení Oomycota, třídy Peronosporomycetes, řádu Peronosporales (Lebeda *et al.*, 2006). *Plasmopara* patří do kategorie tzv. „downy mildew“ linií, která je druhově nejpočetnější skupinou v rámci čel. Peronosporaceae (Thines, 2014). v rámci této linie patří spolu s rody *Basidiophora*, *Benua*, *Bremia*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*,

Plasmoverna a *Protobremia* do skupiny tvořící hruškovitá (pyriformní) haustoria (Voglmayer *et al.*, 2004), jejíž postavení mezi ostatními „downy mildews“ je ukázáno na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Postavení *Plasmopara halstedii* v rámci skupiny „downy mildews“ (DM) s pyriformními haustorii (označeno červeným rámečkem) v systému Oomycet (upraveno podle Thines, 2014).

P. halstedii způsobuje plíšňovitost slunečnice, která je považována za jednu z celosvětově nejzávažnějších hrozeb slunečnice, a to kvůli vzniku a šíření nových ras či izolátů rezistentních k fungicidům (Roeckel-Drevet *et al.*, 2003) a především kvůli oosporám, které jsou schopné přetrvávat v půdě několik let (Spring, 2001). Plíšňovitost slunečnice byla proto zařazena mezi karanténní choroby, v Evropě od roku 1992 (Delmotte *et al.* 2008), v České republice pak o deset let později (Spurný, 2005).

Plíšňovitost slunečnice postihuje především mladé rostliny slunečnice roční při dostatečné vlhkosti půdy a maximální teplotě mezi 15-18 °C (Sakr *et al.*, 2008).

U napadených rostlin vyvolává typické symptomy, které jsou výsledkem systémové nebo lokální infekce (www.eppo.int, 2014). Systémově napadené rostliny prakticky neprodukují použitelné nažky (Čača *et al.*, 1981) a spolu s lokálně infikovanými rostlinami hrají významnou roli jako zdroj inokula při šíření choroby (Spring, 2001).

Kromě slunečnice roční *Helianthus annuus* L. patří mezi hostitelské rostliny *P. halstedii* i další plané a pěstované druhy rodu *Helianthus*. Například *H. tuberosus* (s. topinambur), *H. lenticularis* (s. roční - původní planá populace) nebo *H. x laetiflorus* (s. pozdní) (Virányi *et Spring*, 2011). Stejně tak *P. halstedii* napadá i několik zástupců z jiných rodů čeledi *Asteraceae*, např. *Ambrosia artemisiifolia* (ambrózie trojklaná) (Virányi *et Spring*, 2011), *Xanthium strumarium* (řepeň durkoman) (Virányi, 2002) nebo *Rudbeckia fulgida* (třapatka lesklá) (Dankers *et al.*, 2004).

3.2.2.1 Biologie a morfologie *P. halstedii*

Stélka *P. halstedii* je tvořena nepřehrádkovanými hyfami často nepravidelného tvaru, které produkují hruškovitá haustoria (5-10 μm v průměru) pronikající do hostitelských buněk a zabezpečující patogenu příjem živin. Sporangiofory jsou v horní polovině monopodiálně větvené a nesou vejčitá až elipsoidní sporangia o velikosti 18-30 μm x 14-20 μm . Ve sporangíích se vytváří variabilní počet ledvinitých dvoubičíkatých zoospor (Diagnostiscs Bulletin OEPP/EPPO, 2008). Pohlavním procesem zvaným oogamie (splynutí oogonia s antheridiem) vznikají na konci vegetační sezóny tlustostěnné oospory (Spring, 2001). Nalézáme je ve všech vegetativních orgánech hostitelské rostliny, zejména v kořenech a listech, těsně pod epidermis. Oospory jsou kulovité, mají 15-30 μm v průměru a mají lehce zvrásněnou vnější stěnu (Diagnostiscs Bulletin OEPP/EPPO, 2008).

Oospory představují primární inokulum, v první řadě slouží k přežití patogenu do další vegetační sezóny a umožňují dlouhodobé přetrvávání patogena v půdě (Spring, 2001). Z přezimující pohlavně vzniklé oospory roste zoosporangium, které uvolňuje variabilní počet primárních zoospor způsobujících primární infekci (Bouterige *et al.*, 2003). Zoospory pronikají do semenáček kořeny, infekce postupuje vzhůru a rostlinná pletiva jsou prorůstána mezibuněčnými hyfami a haustorii (Wehtje *et Zimmer*, 1978). Podle intenzity napadení může dojít k odumření semenáček (padání klíčnicích rostlin) nebo rozvoji systémové infekce. Podle symptomů rozlišujeme 3 typy infekce: systémovou, lokální a latentní. Systémová infekce zasahuje všechny části rostliny, mezi

hlavní symptomy patří celková zakrslost rostlin (obrázek č. 4 A, B), chlorotické skvrny na listech (obrázek č. 4 C, D) s nárosty sporangioforů na spodní straně lézí (obrázek 4D) a v případě velmi silné infekce i padání klíčnicích rostlin. Lokální infekce je omezená na určitou část pletiva nadzemní části rostliny a vede většinou ke vzniku lokalizovaných chlorotických lézí. Latentní infekce je zpravidla bezpříznaková, umožňuje však plísni dokončit životní cyklus a zamořit půdu dalšími oosporami (Spring, 2001).



Obrázek č. 4: Typické symptomy vyvolané u slunečnice systémovou infekcí *P. halstedii*. **A.** – zakrslost, srovnání se zdravou rostlinou (na fotografii vpravo), **B.** - zakrslost, deformace listové čepelí a chlorotické léze na listech, **C.** - chlorotické skvrny na bazální části listových čepelí, **D.** - bíle zbarvené shluky sporangioforů na spodní straně napadených listů. Foto: R. Pospíchalová.

V průběhu vegetační sezóny dochází k tvorbě nepohlavních zoosporangií na spodní straně infikovaných listů a jejich šíření větrem na okolní rostliny (Bouterige *et al.*, 2003). Tento způsob přenosu způsobuje sekundární infekce nadzemních částí rostlin, které se projevují jako lokální infekce a jen zřídka vedou k rozvoji systémové infekce (Bouterige *et al.*, 2003). Infikované rostliny mohou ale produkovat semena obsahující mycelium patogenní houby. Rostliny pěstované z infikovaného osiva jsou obvykle bezpříznakové, patogen ale může dokončit životní cyklus a takovéto rostliny mohou zamořit půdu houbovými oosporami. Tímto způsobem může a pravděpodobně i docházelo k přenosu patogena i na velké vzdálenosti (Sackston, 1981).

3.2.2.2 Výskyt a variabilita *P. halstedii*

P. halstedii byla popsána v roce 1882 v severovýchodní části USA a dnes už je rozšířena ve všech zemích světa pěstujících slunečnici (Sackston, 1981) mimo Austrálii a Nový Zéland (Constantinescu *et Thines*, 2010). Seznam zemí s výskytem *P. halstedii* je uveden v tabulce č. 4.

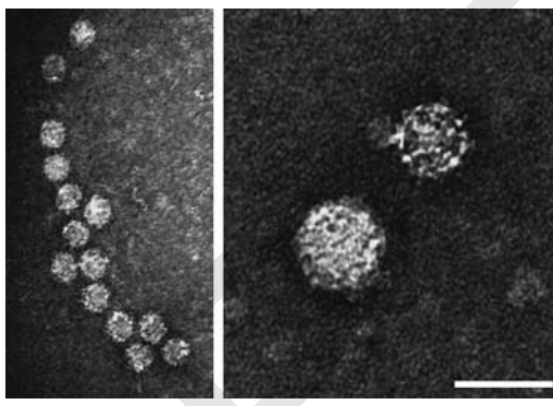
Tabulka č. 4: Přehled výskytu *P. halstedii* v jednotlivých zemích světa (převzato z EPPO, 2014).

Světadíl	Státy
Evropa	Albánie, Bulharsko, Česká republika, Estonsko, Francie, Itálie, Maďarsko, Moldavsko, Německo, Polsko (nepotvrzeno), Rakousko, Rumunsko, Rusko, Slovensko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko, Ukrajina
Asie	Ázerbajdžán, Čína, Gruzie, Indie, Irán, Irák, Izrael, Japonsko, Kazachstán, Pakistán, Rusko, Turecko
Afrika	Egypt, Etiopie, Keňa, Maroko, Zimbabwe, Uganda
Severní Amerika	Kanada, USA - Kalifornie, Kansas, Minnesota, Severní a Jižní Dakota
Střední Amerika a Karibik	Dominikánská republika
Jižní Amerika	Argentina, Brazílie, Chile, Paraguay, Uruguay

První výskyt u nás byl hlášen na území bývalého Československa v roce 1950 v oblastech jižní Moravy a jižního Slovenska (Bojňanský, 1956). Výskyt *P. halstedii* je monitorován Státní rostlinolékařskou správou, která je od 1.1.2014 součástí ÚKZUZ. Od roku 2007 probíhá každoroční monitoring výskytu *P. halstedii* na vybraných lokalitách v ČR pracovníky KB PřF UP v Olomouci (Sedlářová *et al.*, 2012). Přestože

3.2.3.1 Morfologie *PhV*

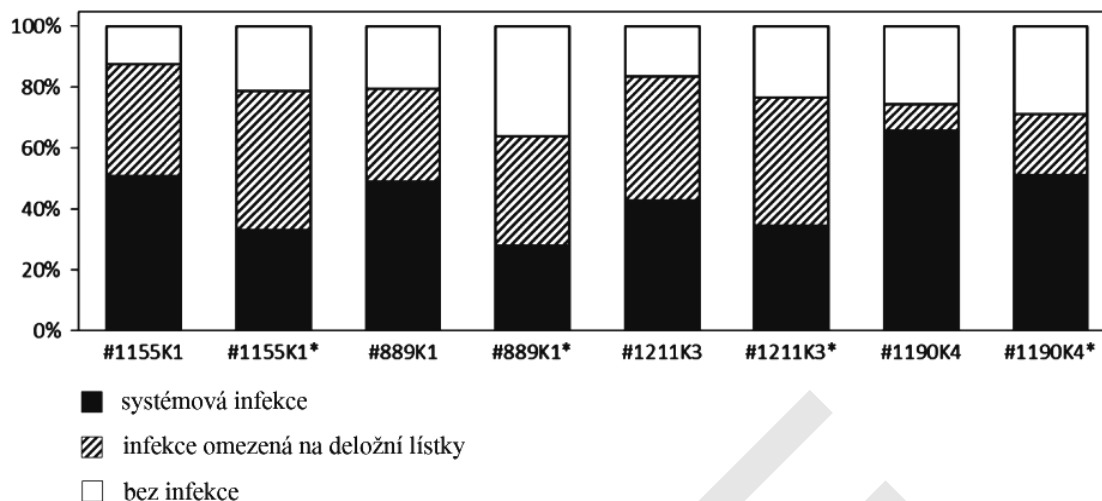
Viriony *PhV* jsou izometrické částice o velikosti cca 37 nm, mají zrnitý povrch s výběžky o velikosti cca 4 nm (Mayhew *et al.*, 1992) a jsou neobalené (Heller-Dohmen *et al.*, 2008), jak je patrné z obrázku č. 5. Nebyl pozorován žádný zásadní rozdíl v morfologii ani biochemických vlastnostech u virionů vyskytujících se u různých izolátů *P. halstedii* (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Viriony jsou většinou volně rozptýlené v cytoplazmě, často také tvoří krystalické struktury (Gulya *et al.*, 1992).



Obrázek č. 5: Negativně barvené viriony *PhV* (měřítko 40 nm) (převzato z Heller-Dohmen *et al.*, 2008).

3.2.3.2 Interakce *PhV* s *P. halstedii*

Studii zabývajících se účinkem *PhV* a obecně mykovirů na houbové hostitele je prozatím velmi málo. Jedním z důvodů může být biotrofní povaha *P. halstedii*, která experimenty spojené se studiem těchto interakcí značně komplikuje. Bylo však potvrzeno, že přítomnost *PhV* vede k hypovirulenci izolátů *P. halstedii*, tedy snížení schopnosti *P. halstedii* vyvolat chorobu. Intenzita sporulace (vyjádřená počtem sporangíí na cm² děložního lístku) byla u kmenů obsahujících *PhV* nižší v průměru o 30 % v porovnání s „virus-free“ kmeny. Nižší infekčnost byla pozorována také v testech latentního období. U kmenů bez viru došlo ke sporulaci mezi 8. a 9. dnem po inokulaci, u kmenů obsahujících virus byla tato doba prodloužena o cca 1 den. Došlo též ke snížení intenzity výskytu systémových infekcí asi o jednu třetinu (Grasse *et al.*, 2013). Na převzatém grafu je vidět, že u všech testovaných izolátů došlo ke snížení intenzity infekce v přítomnosti *PhV* (obrázek č. 6).



Obrázek č. 6: Poměr infikovaných a neinfikovaných semenáčků 14 dní po inokulaci izoláty *P. halstedii* s *PhV* a bez *PhV* (upraveno podle Grasse *et al.*, 2013)

3.2.3.3 Genom *PhV*

Kapilární elektroforézou byly u *PhV* detekovány dva typy virové nukleové kyseliny, které byly citlivé na RNázy a naopak necitlivé vůči DNáze což vedlo k závěru, že nukleové kyseliny jsou jednovláknové (Mayhew *et al.*, 1992). Genom *PhV* je tedy tvořen dvěma molekulami ssRNA (označeny RNA1 a RNA2) (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Analýza sekvence RNA1 o délce 2783 nukleotidů prokázala existenci jednoho ORF (ORF1), který kóduje polypeptid o odhadované velikosti 104 kDa. Analýza odvozené sekvence aminokyselin naznačila přítomnost předpokládané RdRp domény. Tato doména vykazuje cca 40% podobnost s RdRp virů rodiny Nodaviridae. RNA2 má celkovou délku 1526 nukleotidů a obsahuje ORF2 o délce 1128 nt (375 aminokyselinových zbytků), který kóduje plášťový protein (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

Molekulová hmotnost plášťového proteinu byla dříve na základě SDS - PAGE analýzy odhadována na 37,5 kDa (Mayhew *et al.*, 1992) a 36 kDa (Heller-Dohmen *et al.*, 2008), což se neshodovalo s vypočítanou velikostí 40 kDa pro 375 aminokyselin odvozených z nukleotidové sekvence ORF2. Polypeptid byl proto analyzován hmotnostní spektrometrií, která ukázala, že N - konec plášťového proteinu je *in vivo* proteolyticky zkracován na konečnou velikost 352 aminokyselin o molekulové hmotnosti 38.0 kDa. Plášťový protein vykazuje 37% podobnost s plášťovým proteinem virů z rodiny Tombusviridae (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

Pro kompletní sekvenování *PhV* byl vybrán izolát pH8-99 (Heller-Dohmen *et al.*, 2011), další izoláty byly sekvenovány částečně a jejich vzájemné srovnání ukázalo velmi nízkou sekvenční variabilitu. Odvozená aminokyselinová sekvence jak z ORF1 tak ORF2 vykazuje podobnost s aminokyselinovými sekvencemi *Sclerophthora macrospora virus A (SmV A)* (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Porovnání obou mykovirů je věnována následující podkapitola.

3.2.3.4 Srovnání *PhV* a *SmV A*

Dosavadní studie ukázaly, že *PhV* sdílí několik morfologických, biochemických a molekulárních vlastností s mykovirem typu A detekovaným v *S. macrospora*. Srovnání je shrnuto v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Srovnání *Plasmopara halstedii virus (PhV)* a *Sclerophthora macrospora viru a (SmV A)* (upraveno podle Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

	<i>PhV</i>	<i>SmVA</i>
Morfologie		
Velikost virionů	37 nm	40 nm
Tvar virionů	izometrický	izometrický
Genom		
Typ nukleové kyseliny	ssRNA	ssRNA
Velikost genomu	4,3 kb	5,9 kb
Počet segmentů	2	3
Velikost segmentů a přítomnost ORF	RNA1 : 2793 nt (ORF1) RNA2: 1526 nt (ORF2)	RNA1 : 2928 (ORF1a, ORF1b) RNA2: 1981 nt (ORF2) RNA3: 977 nt
Velikost a funkce ORF	ORF1 2745 nt (RdRp) ORF2 1128 (CP)	ORF1a 2697 nt (RdRp) ORF1b 870 nt (neznámá funkce) ORF2 1269 nt (CP)
Velikost 5' netranslatované oblasti (5'UTR)	RNA1 18 nt RNA2 164 nt	RNA1 66 nt RNA2 11
Velikost 3' netranslatované oblasti (3'UTR)	RNA1 30 nt RNA2 234 nt	RNA1 165 nt RNA2 701 nt
3' poly(A) konec	přítomen u RNA1 i RNA2	chybí u všech 3 RNA
Proteiny		
Počet strukturálních proteinů	1	2
Velikost strukturálních proteinů	SDS-PAGE : 36 kDa ORF2: 40 kDa (375 amk) MS: 38 kDa	SDS-PAGE: 43 a 39 kDa ORF2: 45 kDa (433 amk) MS: 38 kDa
CP vykazuje podobnost s CP	<i>SmVA</i> , Tombusviry	<i>PhV</i> , Tombusviry
Počet nestrukturních proteinů	1	1 - 2
Velikost nestrukturních proteinů	ORF1: 104 kDa (914 amk)	ORF1a: 100 kDa (898 amk) ORF1b: 33 kDa (289 amk)
RdRp vykazuje podobnost s	<i>SmVA</i> , Nodaviry	<i>PhV</i> , Nodaviry

Oba viry jsou izometrické a mají granulární povrch (Mayhew *et al.*, 1992). *PhV* měří 37 nm v průměru, *SmV A* je o něco větší (asi 40 nm v průměru). Oba virové genomy jsou segmentované a jsou tvořeny ssRNA. V *SmV A* byly detekovány tři segmenty RNA na rozdíl od *PhV*, který obsahuje pouze dva segmenty. Částečné srovnání aminokyselinových sekvencí *PhV* a *SmV a* ukázalo 58% podobnost (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Oba viry vykazují podobnost sekvence RNA-dependentní RNA polymerázy se členy rodiny Nodaviridae (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Jsou to živočišné ssRNA viry infikující ryby (ICTVdB Management, 2006) např. *Striped Jack nervous virus (SJNNV)* způsobující virovou encefalitidu larev tropické ryby *Pseudocaranx dentex* (Arimoto *et al.*, 1993) nebo *Barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV)*, který je původcem nervové virové nekrózy u platýzovité ryby *Verasper moseri* (Watanabe *et al.*, 1998). Plášťový protein obou virů vykazuje podobnost s rostlinnými viry z rodiny Tombusviridae (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Opět se jedná o ssRNA viry a jako příklad můžeme uvést *Pelargonium leaf curl virus* způsobující virovou kadeřavost pelargonii nebo *Carnation mottle virus* způsobující virovou strakatost hvozdíku (ICTV, 2002).

3.3 Patosystém *Sclerophthora macrospora* - *Sclerophthora macrospora virus*

Sclerophthora macrospora (Sacc.) Thirumalachar, CG Shaw & Narasimhan je obligátní parazit patřící mezi tzv. „graminicolous downy mildews“ (GDM) (Thines 2014), infikující zástupce čeledi Poaceae (lipnicovité). *Sclerophthora* byla nejdříve řazena do rodu *Sclerospora* podle tlusté stěny oospor (Saccardo, 1890), sporangiální fáze však byla více podobná zástupcům rodu *Phytophthora* (Tanaka, 1940). Později byla proto zařazena k novému rodu *Sclerophthora* (Thiumalachar *et al.*, 1953). Tato patogenní plíseň byla nalezena u více než 140 druhů trav čeledi Poaceae, zahrnující ekonomicky významné rody obilovin, píceň a okrasných travin jako je např. *Zea* (kukuřice), *Triticum* (pšenice), *Sorghum* (čirok), *Secale* (žito), *Hordeum* (ječmen), *Avena* (oves), *Oryza* (rýže), *Digitaria* (rosička), *Agrostis* (psineček), *Lolium* (jílek), *Panicum* (proso), *Poa* (lipnice), *Festuca* (kostřava) atp. (Gjærum *et al.*, 1986; Farr *et al.*, 1989). Choroba způsobená *S. macrospora* není příliš ekonomicky významná a vyskytuje se především v nedostatečně odvodněných oblastech nebo v oblastech zasažených povodněmi. *S. macrospora* způsobuje systémové infekce. Rostliny vykazují

nadměrné odnožování a úzké chlorotické listy. Nejtypičtější symptomem je tzv. crazy top, kdy dochází k nadměrné proliferaci květenství a přeměně na listové struktury (EPPO, 2014).

V Japonsku byly u rostlin rýže napadených *S. macrospora* detekovány 2 typy virových částic, které se vyskytovaly buď jednotlivě, nebo oba současně (Honkura *et al.*, 1983). Kromě *SmV A*, popsaného v předchozí podkapitole, byl u patogenní houby popsán *S. macrospora virus B* (*SmV B*). Viriony o velikosti 32 nm v průměru mají izometrický tvar a hladký povrch. Genom je tvořen (+)ssRNA (velikost 5,5 kb) a kóduje plášťový protein o velikosti 41 kDa. Organizace genomu je charakteristická a odlišná od jiných známých RNA mykovirů a nelze jej tedy, podobně jako *SmV A*, taxonomicky zařadit do žádné virové rodiny (Yokoi *et al.*, 1999). Oba viry se hojně vyskytují v cytoplazmě oospor a myceliu. Fenotypové změny plísňě následkem virové infekce nebo jejich role při vyvolání choroby jsou zatím stále nejasné (Yokoi *et al.*, 1999).

4. MATERIÁL A METODY

Detekce *PhV* proběhla ve dvou fázích podle dvou odlišných metodik. Pilotní testování první sady izolátů *P. halstedii* převážně v herbarizovaném stavu bylo provedeno Mgr. Zuzanou Trojanovou na pracovišti prof. Otmara Springa na Univerzitě v Hohenheimu (Stuttgart, Německo) na jaře roku 2012 podle metodiky, která je uvedena v kapitole 4.2. Druhá fáze testování proběhla v roce 2014 podle metodiky uvedené v kapitole 4.3. a příslušných podkapitolách.

[REDACTED]



4.2 Metodika detekce *PhV* v roce 2012

Extrakce RNA byla provedena dle metodiky jak ji uvádí Grasse *et al.* (2013) s použitím Aurum Total RNA Mini Kitu (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) dle pokynů výrobce. Syntéza cDNA byla provedena pomocí RevertAid™ reverse transcriptase kit (Fermentas, Glen Burnie, USA) podle pokynů výrobce.

Tabulka č. 8: Primery použité při detekci PhV při pilotním screeningu.

Označení	Sekvence 5'→3'	Autoři	Produkt
PHV_pol_F1	CATATGGCCTCCGGAAGACAATC	Grasse et al., 2013	300 bp
PHV_pol_R1	TAACACTGATTTTTCCCGCTTTGA	Grasse et al., 2013	

Tabulka č. 9: Podmínky PCR reakce pro detekci PhV při pilotním screeningu. **A.** reakce s primery PhV_pol_F1 a PhV_pol_R1. **B.** reakce s primery HexaUbiQ_F2 a HexaUbiQ_R2.

A. PhV_pol_F1 a PhV_pol_R1				B. HexaUbiQ_F2 a HexaUbiQ_R2			
Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů	Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	94°C	3 min	1	Denaturace	94°C	3 min	1
	94°C	30 s			94°C	30 s	
Amplifikace	57°C	45 s	35	Amplifikace	59°C	45 s	35
	72°C	60 s			72°C	60 s	
Terminace	72°C	10 min	1	Terminace	72°C	10 min	1

cDNA byla amplifikována pomocí PCR na přístroji peqStar thermocycler (Peqlab, Erlangen, Německo) za použití primerů PhV_pol_F1 a PhV_pol_R1, které byly navrženy podle sekvence *PhV* uložené do GenBank autory Heller-Dohmen *et al.* (2008) a jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 8. Jako kontrola byly použity primery

HexaUbiQ_F2 a HexaUbiQ_R2 navržené W. Grassem (nepublikováno), jejichž sekvece jsou rovněž uvedeny v tabulce č. 8. Podmínky PCR reakce pro oba páry primerů jsou uvedeny v tabulce č. 9 a složení reakční směsi v tabulce č. 10. PCR produkty byly vizualizovány pomocí mikročipové kapilární elektroforézy (MultiNa, Shimadzu, Duisburg, Německo) s použitím Shimadzu DNA 2500 Kitu.

Tabulka č. 10: Složení reakční směsi pro PCR při pilotním testování.

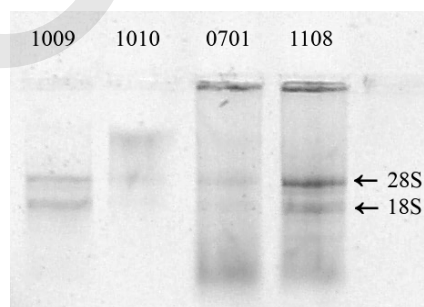
Složka směsi	Reagencie	Koncentrace prac. roztoku	Objem vzorku
Reakční pufr	10x Taq Buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄ (Thermo Scientific)	10x	1,25 µl
Směs nukleotidů	10 mM dNTP mix (Fermentas)	2mM	1,25 µl
MgCl ₂	25 mM MgCl ₂ (Thermo Scientific)	25mM	0,5 µl
Pár primerů	PHV_pol_F1 nebo HexaUbiQ_F2	25µM	0,25 µl
	PHV_pol_R1 nebo HexaUbiQ_R2	25µM	0,25 µl
DNA polymeráza	Taq DNA Polymerase (recombinant) 1U/µl (Fermentas)	5 U/µl	0,5 µl
destilovaná voda	d H ₂ O		7 µl
Celkový objem premixu			11,5 µl
vzorek cDNA			1 µl
Celkový objem reakční směsi			12,5 µl

4.3 Metodika detekce *PhV* v roce 2014

4.3.1 Izolace RNA

K izolaci celkové RNA byl použit kit InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (Invitec, ČR). Virová RNA byla extrahována ze sporangií a hyf plísně slunečnicové, které se nacházely v a na rostlinném pletivu. Společně s virovou RNA byla izolována také celková rostlinná RNA. Izolace probíhala v pokojové teplotě podle manuálu výrobce, pokud nebylo uvedeno jinak. Ve sterilní zkumavce bylo připraveno požadované množství čerstvého lyzačního pufru (RP Lysis Solution), ke kterému byla přidána 1/100 požadovaného objemu 1M β-merkptoethanolu (Sigma). Pro jeden vzorek bylo k 1000 µl lyzačního pufru přidáno 0,7 µl zásobního 14,3M β-merkptoethanolu. Zmražený vzorek byl pomocí sterilního plastového tloučku a tekutého dusíku homogenizován přímo v mikrozukavce. Po důkladném rozdrcení stále ještě zmraženého vzorku bylo do zkumavky přidáno 900 µl připraveného lyzačního pufru a vzorky byly v pufru inkubovány v termomixu (Thermocell Cooling

and Heating block CHB-202, Bioer, Čína) 30 minut za stálého míchání při 400 rpm. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 11 000 g (Centrifuge 5415R – Eppendorf, Německo). Celý objem supernatantu byl přepipetován do připraveného prefiltrování a centrifugován 1 minutu při 11 000 g. K filtrátu bylo přidáno 500 μ l 96% ethanolu (Sigma). Směs byla důkladně promíchána pipetou a 750 μ l lyzátu bylo naneseno na kolonku (RTA spin filter) umístěnou ve sběrné zkumavce. Po minutové inkubaci byla kolonka centrifugována 1 minutu při 11 000 g. V případě většího množství lyzátu byl tento krok opakován. Na kolonku bylo naneseno 500 μ l promývacího pufru 1 (Wash Buffer 1) a byla provedena centrifugace 1 minutu při 11 000 g. Poté bylo na kolonku naneseno 700 μ l promývacího pufru 2 (Wash Buffer 2) a kolonka byla opět centrifugována 1 minutu při 11 000 g. Po promývacích krocích byla membrána RTA spin filtru vysušena čtyřminutovou centrifugací při 11 000 g. Kolonka byla přemístěna do řádně popsání sterilní eluční zkumavky (Rnase- free Elution Tube) a bylo na ni naneseno 45 μ l elučního pufru (Elution Buffer R). Po čtyřminutové inkubaci byla kolonka centrifugována 1 minutu při 11 000 g a zkumavka se získanou RNA byla ihned umístěna na led. Část izolované RNA byla pro kontrolu kvality nanesena na 1% agarózový gel a elektroforeticky rozdělena (0,5x TBE pufr, 150 V, 30 min). Vyhovující nedegradované vzorky RNA (jako např. izoláty 1009 a 1108 na obrázku č. 7) byly přepsány reverzní transkripcí na cDNA, zbývající RNA byla uskladněna v -80 °C.



Obrázek č. 7: Kontrola kvality izolované RNA pomocí elektroforézy. U vzorků 1009 a 1108 jsou přítomny jasné 18S a 28S ribozomální RNA bandy, což značí že RNA není degradovaná a je využitelná pro syntézu cDNA. Foto R. Pospíchalová.

4.3.2 Syntéza virové cDNA z izolované RNA

Reverzní transkripce probíhala následujícím postupem. Do sterilní nukleáse-free mikrozkušavky byl k 11,5 μ l RNA přidán 1 μ l oligo(dT)₁₈ primeru (Thermo

Scientific). Směs byla v termocycleru (XP Cyler TXCP, Bioer, Čína) preinkubována 5 minut při 65 °C a poté zchlazena na ledu. Ke každému vzorku bylo přidáno 7,5 µl reakční směsi připravené podle tabulky č. 11. Vzorky byly inkubovány v cyleru 60 minut při 42 °C. Reakce byla ukončena zahřátím směsi na 70 °C po dobu 10 minut.

Tabulka č. 11: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Složka směsi	Reagencie	Objem vzorku
Reakční pufr	M-MLV 5x Reaction Buffer (Promega)	4 µl
Inhibitor RNáz	RNasin Plus RNase Inhibitor 40 U/µl (Promega)	0,5 µl (20 U)
Směs nukleotidů	10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific)	2 µl (1 mM)
Reverzní transkriptáza	M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/µl (Promega)	1 µl (200 U)
Objem reakční směsi bez RNA a primeru		7,5 µl
Celkový objem reakční směsi		20 µl

4.3.3 Detekce viru pomocí PCR

Pro identifikaci virové cDNA byla u všech vzorků použita PCR amplifikace pomocí specifických *PhV* primerů pro virovou polymerázu (PHV_pol_UTR3_F1 a PHV_pol_R7), u vzorků s pozitivním výsledkem bylo provedeno potvrzení přítomnosti viru další PCR amplifikací pomocí *PhV* specifických primerů pro plášťový protein (PHV_WG_F2 a PHV_WG_R2). Dále byla provedena kontrolní amplifikace pomocí univerzálního RAPD dekameru OPX 13 pro potvrzení přítomnosti cDNA. Sekvence primerů použitých pro detekci *PhV* v roce 2014 jsou uvedeny v tabulce č. 12. Podmínky PCR reakcí prováděných v termocycleru (XP Cyler TXCP, Bioer, Čína) se lišily pouze teplotou anelingu primerů a jsou uvedeny v tabulce č. 13. Složení reakční směsi pro PCR bylo obdobné pro všechny reakce a je uvedeno v tabulce č. 14, pouze v případě OPX 13 bylo použito 0,2 µl primeru a 8,95 µl destilované vody.

Získané PCR produkty byly spolu se standartními fragmenty DNA HyperLadder 50bp (Bioline) rozděleny elektroforetickou separací (komůrka Easycast B1, OWL separation systems, USA) v 1,5% agarózovém gelu (SeaKem LE Agarose, Lonza) s barvivem GelRed Nucleic acid stain 10 000x in water (Biotium) v 0,5x TBE pufru (Bio Basic Inc., Kanada) při 150 V po dobu 30 minut (zdroj Minis-300 VP, Major Science, Taiwan) a vizualizovány v UV transluminátoru (UVT-20 SML, Helolab,

Německo). Dokumentační fotografie byly zhotoveny pomocí fotoaparátu (DC 290, Kodak, USA) a softwaru KODAK 1D 3.6.

Tabulka č. 12: Primery použité při detekci *PhV* v roce 2014.

Označení	Sekvence 5'→3'	Autoři	Produkt
██████	████████████████████	██████	██████
██████	████████████████████	██████	██████
██████	████████████████████	██████	██████
██████	████████████████████	██████	██████
██████	████████████████████	██████	-

Tabulka č. 13: Podmínky PCR reakcí při detekci *PhV* v roce 2014.

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	2 min	1
	95°C	45 s	
Amplifikace	55 ^{a)} /54 ^{b)} /45 ^{c)} °C	45 s	35
	72°C	45 s	
	72°C	5 min	1

^{a)} PHV_pol_UTR3_F1 + PHV_pol_R7

^{b)} PHV_WG_F2 + PHV_WG_R2

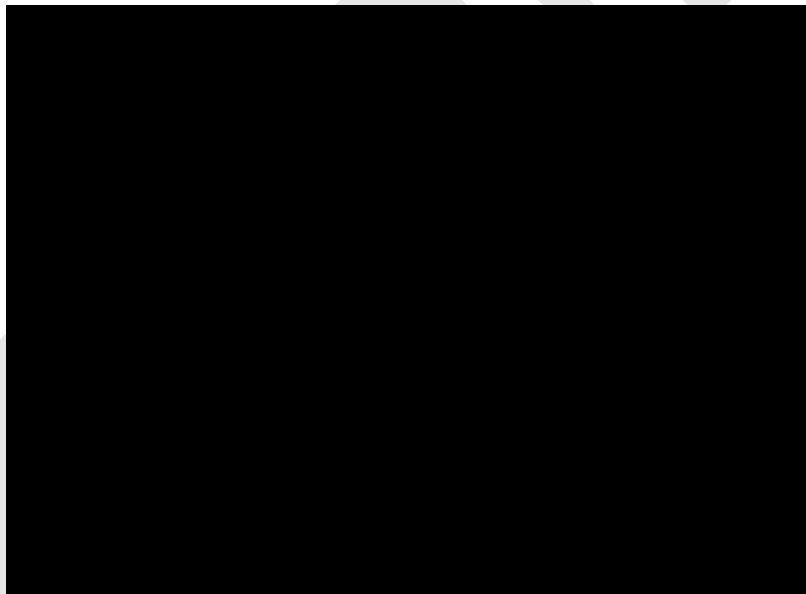
^{c)} OPX 13

Tabulka č. 14: Složení reakční směsi pro PCR při detekci *PhV* v roce 2014.

Složka směsi	Reagencie	Koncentrace prac. roztoku	Objem vzorku
Reakční pufr	5x Green GoTaq Reaction Buffer with 1,5 mM MgCl ₂ (Promega)	5x	2,50 μl
Směs nukleotidů	10 mM dNTP mix (Fermentas)	10mM	0,25 μl
Pár primerů	PHV_pol_UTR3_F1 nebo PHV_WG_F2	25μM	0,20 μl
	PHV_pol_R7 nebo PHV_WG_R2	25μM	0,20 μl
	OPX 13	25μM	0,20 μl
DNA polymeráza	GoTaq DNA Polymerase 15/μl (Promega)	5 U/μl	0,1 μl
destilovaná voda	d H ₂ O		8,75 μl
	Celkový objem premixu		11,5 μl
	vzorek cDNA		1 μl
	Celkový objem reakční směsi		12,5 μl

5. VÝSLEDKY

[REDACTED]



[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

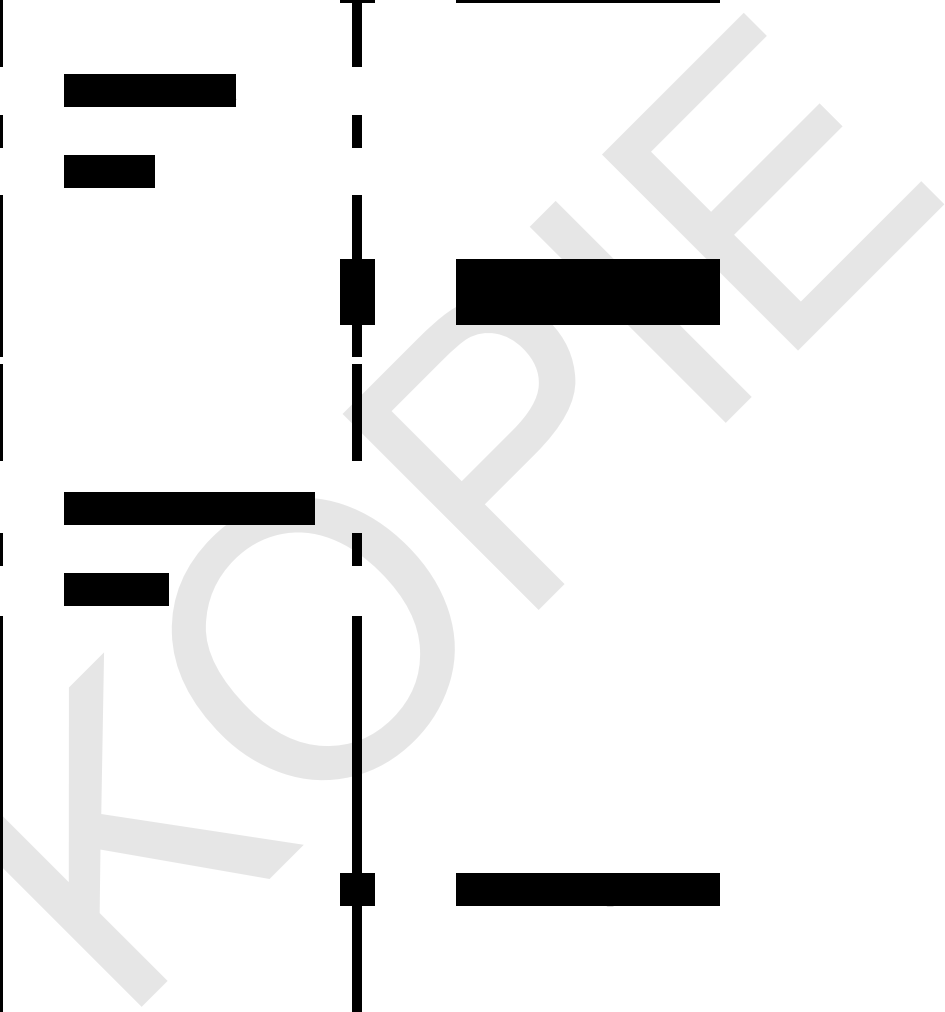
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

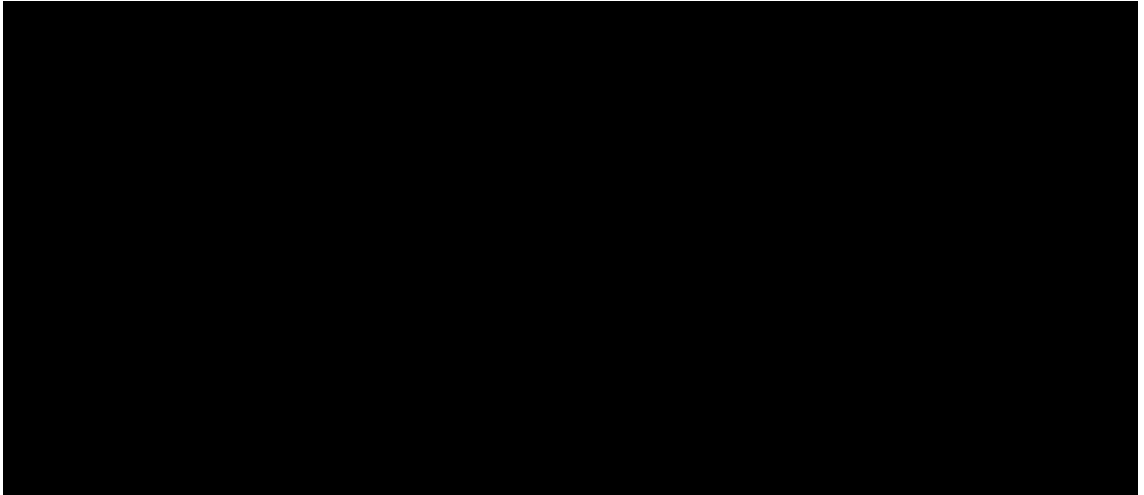
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



KOPILAH

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7. ZÁVĚR

Mykoviry jsou nebuněční paraziti hub a houbových organismů, které byly detekovány u desítek hostitelů včetně fytopatogenních druhů, avšak jejich původ a role v ekosystémech je stále dosti nejasná. Zajímavý je jejich potenciál v biologické ochraně mykóz, které každoročně způsobují zemědělcům rozsáhlé škody. Předložená práce se zabývá obecnou charakteristikou mykovirů, teoriemi o jejich původu, přenosu, dále pak vztahy mykovirů s hostiteli a významnými zástupci z této skupiny nebuněčných organismů. Podrobněji se pak věnuje *Plasmopara halstedii* viru, který byl detekován u původce plísnovitosti slunečnice *P. halstedii*. V práci je popsán celý komplexní patosystém *Helianthus annuus* - *Plasmopara halstedii* - *Plasmopara halstedii* virus. Přestože genom *PhV*, tvořený dvěma jednovláknovými RNA, byl již plně osekvenován, nelze tento virus zařadit do žádné z již popsaných rodin mykovirů. Nejvyšší podobnost vykazuje *PhV* s virem *Sclerophthora macrospora* virus A izolovaným z oomycety *Sclerophthora macrospora*, se kterým má společné také některé morfologické a biochemické vlastnosti. Mykovirové infekce se často projevují jako bezpříznakové, u *PhV* byl však prokázán hypovirulentní účinek, snižující schopnost *P. halstedii* vyvolat chorobu u slunečnice roční, která je jejím hlavním hostitelem.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Anglicky (český výraz)
amk	aminokyselina
bp	base pairs (páry bází)
CP	coat protein (plášťový protein)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
DM	downy mildew (zástupce Peronosporaceae)
dpi	days per inoculation (dnů po inokulaci)
dsRNA	double-strand ribonukleotid acid (dvouvláknová ribonukleová kyselina)
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Mezinárodní výbor pro taxonomii virů)
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
nt	nucleotides (nukleotidy)
ORF	open reading frame (otevřený čtecí rámeček)
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase (RNA-dependentní RNA polymeráza)
RAPD	random amplified polymorphic DNA (polymorfismus náhodně amplifikované DNA)
SDS-PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis with SDS (polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného)
ssRNA	single-strand ribonukleotid acid (jednovláknová ribonukleová kyselina)
ÚKZUZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
VIC	vegetative incompatibility (vegetativní neslučitelnost)
VLP	virus-like particles (virům podobné částice)

Zkratka	Anglický název viru
<i>BFNNV</i>	<i>Barfin flounder nervous necrosis virus</i>
<i>CarMV</i>	<i>Carnation mottle virus</i>
<i>CThTV</i>	<i>Curvularia thermal tolerance virus</i>
<i>CHVI</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i>
<i>LIV</i>	<i>La France isometric virus</i>
<i>MBV</i>	<i>Mushroom bacilliform virus</i>
<i>OMSV</i>	<i>Oyster mushroom spherical virus</i>
<i>PhV</i>	<i>Plasmopara halstedii virus</i>
<i>PiRV 1-4</i>	<i>Phytophthora infestans RNA virus 1-4</i>
<i>PLRV</i>	<i>Potato leafroll virus</i>
<i>SBMV</i>	<i>Southern bean mosaic virus</i>
<i>SJNNV</i>	<i>Striped Jack nervous virus</i>
<i>SmV A,B</i>	<i>Sclerophthora macrospora Virus A,B</i>

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANAGNOSTAKIS, S.L., DAY, P.R. (1979): Hypovirulence conversion in *Endothea parasitica*. *Phytopathology* 69: 1226-29.

ARIMONO, M., MORI, K., NAKAI, T., MUROGA, K., FURUSAWA, I. (1993): Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Journal of Fish Diseases* 16: 461-469.

BÁN, R., KOVÁCS, A., PERCZEL, M., KÖRÖSI, K., TURÓCZI, G. (2014): First report on the increased distribution of pathotype 704, of *Plasmopara halstedii* in Hungary. *Plant Disease* 9:, 844.

BÁN, R., KOVÁCS, A., KÖRÖSI, K., PERCZEL, M., TURÓCZI, G. (2014): First report on the occurrence of a new pathotype 714 of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) in Hungary. *Plant Disease*, online, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0142-PDN>

BARTŮŠEK, T. (2013): Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii* a rezistence vůči metalaxylu v České republice. Bakalářská práce, 44 p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.

BENNETT, J.W. (2010): An Overview of the Genus *Aspergillus*. In: MICHIDA, M., GOMI, K. (eds.): *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, 1-18.

BENDA, V., BABŮREK, I., KOTRBA, P. (2006): Základy biologie, 1. Vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 196 p.

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

BOSTIAN, K.A., HOPPER, J.E., ROGERS, D.T., TIPPER, D.J. (1980): Translational analysis of the killer-associated viruslike particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell* 19: 403-14.

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.

BOZARTH, R.F. (1972): Mycoviruses: A new dimension in microbiology. In: Environmental Health Perspectives. Washington D.C.: United States Department of Health, Education and Welfare, 23-39 p.

BOZARTH, R.F. (1979): The physicochemical properties of mycoviruses. In: LEMKE, P.A. (ed.): Viruses and Plasmids in Fungi. Decker, New York, 43-91.

BRANTS, D.H. (1971): Infection of *Pythium sylvaticum* in vitro with tobacco mosaic virus. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 77: 175-176.

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.

BUCK, K.W. (1986): Fungal virology - an overview. In: BUCK, K.W. (Ed.): Fungal Viruses. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 2-84.

CATEN, C.E. (1972): Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of General Microbiology* 72: 221-229.

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: 341-349.

CAI, G., MYERS, K., FRY, W.E., HILLMAN, B.I. (2012): A member of the virus family Narnaviridae from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Archives of Virology* 157: 165-169.

CAI, G., MYERS, K., HILLMAN, B. I., FRY, W. E. (2009): A novel virus of the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, with two RNA segments and a supergroup 1 RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 392: 52-61.

CONSTANTINESCU, O., THINES, M. (2010): *Plasmopara halstedii* is absent from Australia and New Zealand. *Polish Botanical Journal* 55: 293-298.

CORTESI, P., MILGROOM, M.G. (1998): Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2988-2994.

ČAČA, Z., KOLÁR, V., NOVÁK, J.B., ZÁVRA, J. (1981): Zemědělská fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 344 p.

DANKERS, H., KIMBROUGH, J.W., MOMOL, M.T. (2004): First report of *Plasmopara halstedii* on perennial black-eyed susan in North Florida. *Plant Health Progress, January*: 1-2.

DELMOTTE, F., GIRESE, 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.

VAN DIEPENINGEN, A.D., VARGA, J., HOEKSTRA, R.F., DEBETS, A.J.M. (2008): Mycoviruses in the Aspergilli. In: VARGA, J., SAMSON, R.A. (eds.): *Aspergillus* in the Genomic Era. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 133-174.

DIJKSTRA, J. (1983): *Tobacco streak virus* in sunflower (*Helianthus annuus*). *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89: 153-169.

ELIBUYUK, I.O., BOSTAN, H. (2010): Detection of a virus disease on *Agaricus bisporus* (white button mushroom) in Ankara, Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology* 12: 597–600.

FARLOW, W.G. (1883): Note on some species in the third and eleventh centuries of Ellis's North American Fungi. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 18: 71-73.

FARR, D.F., BILLS, G.F., CHAMURIS, G.P., ROSSMAN, A.Y. (1989): Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press, Minnesota, United States of America, 941 p.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANIHOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. (eds.) (2005): Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, California, USA, 1257 p.

GHABRIAL, S.A. (1998): Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16: 119-131.

GHABRIAL, S.A. (1980): Effects of fungal viruses on their hosts. *Annual Review of Phytopathology* 18: 441-461.

GHABRIAL, S.A., SUZUKI, N. (2009): Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 47: 353–84.

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.

GJÆRUM, H.B., TJAMOS, E.C., VIRÁNYI, F. (1986): European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 233 p.

- GLASS, N.L., DEMENTON, K. (2006): Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* 9: 553–558.
- GOODWIN, S.B. (1997): The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462-473.
- 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.
- GRIFFIN, G.J. (1986): Chestnut blight and its control. *Horticultural Reviews* 8: 291-336.
- GULYA, T.J. (1996): Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask. In: Proc. 18th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, U.S.A., 1996, pp. 39–48.
- 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., 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., MILLER, J.F., VIRÁNYI, F., SACKSTON, W.S. (1991): Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11–20.

HAMMOND, T.M., ANDREWSKI, M.D., ROOSSINCK, M.J., KELLER, N.P. (2008): *Aspergillus* mycoviruses are targets of suppressors of RNA silencing. *Eucaryotic Cell* 7: 350 - 357.

HEINIGER, U., RIGLING, D. (1994): Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581-599.

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: 777-786.

HELLER-DOHMEN, M., GÖPFERT, J.C., PFANNENSTIEL, J., SPRING, O. (2011): The nucleotide sequence and genome organization of *Plasmopara halstedii* virus. *Virology Journal* 8: 123-131.

HOLLINGS, M (1978): Mycoviruses: viruses that infect fungi. *Advances in Virus Research* 22: 1-53.

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.

CHEN, B., NUSS, D. L. (1999): Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1/Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology* 73: 985-992.

CHEN, B., CHOI, G.H., NUSS, D.L.(1994): Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. *Science* 264: 1762-1764.

KALINA, T., VÁŇA, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova, Praha, 606 p.

KIRSCHNER, J., ŠÍDA, O. (2004): *Helianthus* L. - slunečnice. In: SLAVÍK, B., ŠTĚPÁNKOVÁ, J. (eds.): Květena České republiky 6. Academia, Praha, 322-331.

KLASSEN, G.R. (1991): Presence of double-stranded RNA in isolates of *Pythium irregulare*. *Mycologia* 83: 657-661.

KŮDELA, V., KOCOUREK, F., BÁRNET, M. (2012): České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin. Česká akademie zemědělských věd, Praha, 59 p.

KUDLÍKOVÁ, I., VEVERKA, K. (1999): Výsledky šlechtění slunečnice na odolnost vůči chorobám. In: Nové poznatky o vztahu hostitel – patogen (Sborník referátů), Česká fytopatologická společnost, Praha, 37-41.

LEBEDA, A., MAZÁKOVÁ, J., TÁBORSKÝ, V. (2006): Protozoa a Chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Česká fytopatologická společnost, Praha, 92 p.

LESLIE, J.F., ZELLER, K.A. (1996): Heterokaryon incompatibility in fungi: More than just another way to die. *Journal of Genetics* 75: 415-424.

LIU, Y.-C., MILGROOM, M.G. (1996): Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from natural populations of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86: 79-86.

MÁRQUEZ, L.M., REDMAN, R.S., RODRIGUEZ, R.J., ROOSSINCK M.J. (2007): A virus in a fungus in a plant: Three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515.

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.

MICHELIM, L., MULLER, G., ZACARIA, J., LONGARAY DELAMARE, A.P., PINTO DA COSTA, S.O., ECHEVERRIGARAY, S. (2008): Comparison of PCR-based molecular markers of the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 12: 423-429.

NASH, C.H., DOUTHART, R.J., ELLIS, L.F., VAN FRANK, R.M., BURNETT, J.P., LEMKE, P.A. (1973): On the mycophage of *Penicillium chrysogenum*. *Canadian Journal of Microbiology* 19: 97-103.

NUSS, D.L. (2005): Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3: 632-642.

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: 115-128.

RAI, M. (2009): Advances in Fungal Biotechnology. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 514 p.

REVILL, P.A., DAVIDSON, A.D., WRIGHT, P.J. (1999): Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of *mushroom bacilliform virus*, a single-stranded RNA mycovirus. *Virology* 260: 273-276.

RO, H.S., LEE, N.J., LEE, C.W., LEE, H.S. (2006): Isolation of a novel mycovirus *OMIV* in *Pleurotus ostreatus* and its detection using a triple antibody sandwich-ELISA. *Journal of Virological Methods* 138: 24-29.

- ROECKEL-DREVET, P., TOURVIELLE, J., GULYA, T.J., CHARMET, G., NICOLAS, P., TOURVIELLE LABROUHE, D. (2003): Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 492-502.
- ROMAINE, C.P., SCHLAGNHAUFFER, B. (1995): PCR analysis of the viral complex associated with La France disease of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2322-2325.
- ROOS, U. P., SHAW, D. S. (1985): Intranuclear virus-like particles in a laboratory strain of *Phytophthora drechsleri*. *Transactions of the British Mycological Society* 84: 340-344.
- ROOSSINCK, M.J. (2011): The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature reviews, Microbiology* 9: 99-108.
- SACCARDO, P.A. (1890): Fungi aliquot australiensis. *Hedwigia* 29: 154-156.
- SACKSTON, W.E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: SPENCER, D.M. (ed.): The downy mildews. Academic Press, London, UK, 545-575.
- SAKR, N., DUCHER, M., TOURVIELLE, J., WALSER, P., VEAR, F., TOURVIELLE DE LABROUHE, D. (2008): Variation in form and size of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) zoosporangia. *Mycological Progress* 7: 257-265.
- SAUPE, S.J. (2000): Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 489-502.
- SEDLÁŘOVÁ, M., TROJANOVÁ, Z., LEBEDA, A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 49: 1-10.

SOMMER, S.S., WICKNER, R.B. (1982): Yeast L dsRNA consists of at least three distinct RNAs; evidence that the nonMendelian genes [HOK], [NEX1 and [EXL1 are on one of these dsRNAs. *Cell* 31: 429-41.

SPRING, O. (2001): Non-systemic infections of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108: 329-336.

SPRING, O., ROZYNEK, B., ZIPPER, R. (1998): Single spore infections with sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology* 146: 577-579.

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.

STOJASPAL, K. (2009): Studium interakcí slunečnice - *Plasmopara halstedii*. Diplomová práce, 58p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.

SUZAKI, K., IKEDA, K.-I., SASAKI, A., KANEMATSU, S., MATSUMOTO, N. AND YOSHIDA, K. (2005): Horizontal transmission and host-virulence attenuation of totivirus in violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. *Journal of General Plant Pathology* 71:161-168.

TANAKA, I. (1940): *Phytophthora macrospora* S. Ito & I. Tanaka on wheat plant. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 10:127-138.

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

THIRUMALACHAR, M.J., SHAW, C.G., NARASIMHAN, M.J. (1953): The sporangial phase of the downy mildew on *Eleusine coracana* with a discussion of the identity of *Sclerospora macrospora* Sacc. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 80: 299-307.

TOOLEY, P.W., HEWINGS, A.D., FAEKENSTEIN, K.F. (1989): Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 79: 470-474.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E.B., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R., WICKNER, R.B. (2000): Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press.

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. Volume 1. Kluwer Academic Publisher, London, UK, 167–172.

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

VOGLMAYR, H., RIETHMÜLLE R. A., GÖKER, M., WEIB, 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.

WATANABE, K., SUZUKI, S., NISHIZAWA, T., SUZUKI, K., YOSHIMIZU, M., EZURA, Y. (1998): Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathology* 33: 445-446.

WEHTJE G., ZIMMER, D.E. (1978): Downy mildew of sunflower: Biology of systemic infection and the nature of resistance. *Phytopathology* 68: 1568-1571.

WICKNER, R.B. (1996): Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Reviews* 60: 250–265.

WICKNER, R.B. (1976): Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleid acid plasmid. *Bacteriological Reviews* 40: 757-773.

XIE, J., WEI, D., JIANG, D., FU, Y., LI, G., GHABRIAL, S. AND PENG, Y. (2006): Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology* 87: 241-249.

YOKOI, T., TAKEMOTO, Y., SUZUKI, M., YAMASHITA, S., HIBI, T. (1999): The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora Virus B*. *Virology* 264: 344-349.

YOKOI, T., YAMASHITA, S., HIBI, T. (2003): The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora Virus A*. *Virology* 311: 394-399.

YOUNG, T.W. (1993): Killer yeasts. In: ROSE, H., HARRISON, J. (eds.): The yeasts: Yeast Technology. Elsevier, New York, 131-161.

YU, H.J., LIM, D., LEE, H.S. (2003): Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. *Virology* 314: 9-15.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

Diagnostics (2008). *Plasmopara halstedii*. Bulletin OEPP/EPPO 38, 343-348
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2008.01245.x/pdf>
přístup 29.7.2014

CABI and EPPO. *Plasmopara halstedii*. Data Sheets on Quarantine Pests, 5 p.
https://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Plasmopara_halstedii/PLASHA_ds.pdf
přístup 27.7.2014

EPPO (2014) PQR - EPPO database on quarantine pests (available online).
<http://www.eppo.int>
přístup 14.5.2014

EPPO standards (2000): Guidelines on good plant protection practice: sunflower, 9 p.
http://www.archives.eppo.int/EPPOStandards/PP2_GPP/pp2-21-e.doc
přístup 29.7.2014

MIKULA, P. (2002): Choroba ničící pěstované houby Virus X v Británii. 1 p.
<http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=6277>
přístup 27.7.2014

Slunečnice (2013): Přehled odrůd slunečnice. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad Brno, 40 p.
http://eagri.cz/public/web/file/258550/PO_slunecnice_2013.pdf
přístup 27.7.2014

ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4
<http://ictvdb.bio-mirror.cn/ICTVdB/00.045.htm>
přístup 27.7.2014