

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

Bc. Adéla Kovalíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárně biologická charakteristika 'plasmopara
halstedii virus'**

Diplomová práce

Adéla Kovalíková

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Konzultantka: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla KOVALÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R21016**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Molekulárně biologická charakteristika 'plasmopara halstedii virus'**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Zásady pro vypracování:

Diplomová práce se soustředí na charakteristiku izolátů ssRNA mykoviru 'plasmopara halstedii virus', který infikuje *Plasmopara halstedii*, houbu vyvolávající onemocnění plíseň slunečnice.

1. skríníng aktuálních poznatků o 'plasmopara halstedii virus' (PhV) a dalších sekvenčně podobných mykovirech;
2. molekulárně genetická charakteristika vybraného souboru virových izolátů za použití RT-PCR, sekvenování a bioinformatické analýzy získaných genomických sekvencí; zjištění jejich podobnosti se známými izoláty;
3. zhodnocení mikroevolučních vztahů studovaných a doposud popsanych izolátů PhV.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- 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.
- 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.
- Wang, Z., Neupane, A., Feng, J., Pedersen, C., Lee Marzano, S. Y. (2021): Direct Metatranscriptomic Survey of the Sunflower Microbiome and Virome. *Viruses* 13 (9): 1867.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: **24. listopadu 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2023**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 17. března 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Adéla Kovalíková

Název práce: Molekulárně biologická charakteristika 'plasmopara halstedii virus'

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt:

Literární rešerše diplomové práce se zabývá popisem nového mykoviru 'plasmopara halstedii virus', obecnou charakteristikou mykovirů a v neposlední řadě popisem hostitele viru, *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice. V rámci experimentální části práce bylo charakterizováno 23 českých a 12 maďarských izolátů 'plasmopara halstedii virus'. U 25 z nich byly pomocí RT-PCR a Sangerova sekvenování získány téměř kompletní sekvence genomických RNA1 a RNA2 molekul o délce 2636–2743 nt, respektive 1344–1441 nt. U 3 izolátů byly získány téměř kompletní sekvence RNA2 molekuly o délce 1274–1396. U 6 izolátů byla získána parciální RNA2 sekvence o délce 544–588 nt, u jednoho izolátu pak parciální RNA1 sekvence o délce 1886 nt. Sekvence vykazovaly 99,64–100% identitu se známými izoláty PhV. V obou molekulách bylo 19 variabilních míst, z toho 6 zcela nových, na jejichž základě byly PhV izoláty rozděleny do 6 RNA1 a 6 RNA2 genotypů, jeden z nich byl vždy prevalentní a zbývajících pět bylo nově detekovaných. Fylogenetickou a distanční analýzou genomických a aminokyselinových sekvencí byla potvrzena vysoká homogenita české i maďarské populace 'plasmopara halstedii virus', která je v souladu se známou varibilitou ve světě doposud popsáných izolátů PhV. Nebyl zjištěn žádný vztah mezi genotypem a původem anebo datem sběru virového izolátu. Byly určeny rasy čtyř kmenů *Plasmopara halstedii*, byly zaznamenány v ČR běžné rasy 700 60 a 710 60, a také nová, dosud nepopsaná, rasa 712 60.

Klíčová slova: *Plasmopara halstedii*, slunečnice, RT-PCR, Sangerovo sekvenování, SNPs, fylogenetická analýza

Počet stran: 68

Počet příloh:

Jazyk: český

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Adéla Kovalíková

Title: Molecular characterisation of 'plasmopara halstedii virus'

Type of thesis: Master thesis

Workplace: Department of Cell Biology and Genetics, Fac. Sci., Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Dana Šafářová, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract:

The literary research of the diploma thesis deals with the description of a new mycovirus, 'plasmopara halstedii virus', a general characteristic of mycoviruses, and a description of the virus host, *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. In the experimental part of the thesis, 23 Czech and 12 Hungarian isolates of 'plasmopara halstedii virus' were characterized. Nearly complete sequences of genomic RNA1 and RNA2 molecules of length 2636–2743 nt and 1344–1441 nt, respectively, were obtained for 25 of them using RT-PCR and Sanger sequencing. Nearly complete sequences of the RNA2 molecule of length 1274–1396 were obtained for 3 isolates. Partial RNA2 sequences of 544–588 nt were obtained for 6 isolates and partial RNA1 sequence of 1886 nt was obtained for one isolate. The sequences showed 99,64–100% identity with known PhV isolates. The 19 variable sites were detected in both molecules, including 6 completely new ones, based on which PhV isolates were divided into 6 RNA1 and 6 RNA2 genotypes, one of which was always prevalent, and the remaining five were newly detected. Phylogenetic and distance analysis of genomic and amino acid sequences confirmed the high homogeneity of the Czech and Hungarian populations of 'plasmopara halstedii virus', consistent with the known variability of PhV isolates worldwide. No relationship was found between genotype and origin or date of collection of the virus isolate. Races of four *Plasmopara halstedii* strains were determined, including the common races 700 60 and 710 60, and a new, previously undescribed race 712 60 recorded in the Czech Republic.

Keywords: *Plasmopara halstedii*, sunflower, RT-PCR, Sanger sequencing, SNPs, phylogeny

Number of pages: 68

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterkého studia pod vedením Mgr. Dana Šafářová, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, dne

Poděkování

Děkuji své vedoucí Mgr. Daně Šafářové, Ph.D. za odborné vedení při zpracovávání diplomové práce a za předání praktických zkušeností při práci v laboratoři, dále děkuji své konzultantce doc. RNDr. Michaelae Sedlářové, Ph.D. za trpělivé vedení při provádění experimentů na Katedře botaniky a v neposlední řadě svým nejbližším za podporu během celého mého studia.

Experimentální část práce byla podpořena projektem IGA_PrF_2022_009 Univerzity Palackého v Olomouci.

Obsah

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Cíle práce..... | 2 |
| 3 | Literární přehled | 3 |
| 3.1 | Mykoviry | 3 |
| 3.1.1 | Původ mykovirů | 3 |
| 3.1.2 | Vliv mykovirů na hostitele | 3 |
| 3.1.3 | Genom a taxonomie mykovirů | 4 |
| 3.1.4 | Viry oomycetů..... | 6 |
| 3.2 | Charakteristika 'plasmopara halstedii virus' (PhV) | 9 |
| 3.2.1 | Morfologie virionu PhV | 9 |
| 3.2.2 | Organizace genomu a genetická diverzita PhV | 9 |
| 3.2.3 | Taxonomické zařazení PhV | 10 |
| 3.2.4 | Rozšíření PhV | 13 |
| 3.2.5 | Interakce PhV s <i>Plasmopara halstedii</i> | 13 |
| 3.3 | Charakteristika <i>Plasmopara halstedii</i> | 14 |
| 3.3.1 | Životní cyklus <i>Plasmopara halstedii</i> a vliv infekce na hostitele..... | 14 |
| 3.3.2 | Morfologie <i>Plasmopara halstedii</i> | 16 |
| 3.3.3 | Determinace ras <i>Plasmopara halstedii</i> a variabilita v ČR..... | 17 |
| 4 | Materiál a metody..... | 19 |
| 4.1 | Biologický materiál | 19 |
| 4.2 | Použité chemikálie, soupravy a roztoky | 21 |
| 4.3 | Použité experimentální a vyhodnocovací postupy pro molekulárně genetickou charakteristiku PhV | 23 |
| 4.3.1 | Izolace RNA | 23 |
| 4.3.2 | Reverzní transkripce..... | 23 |
| 4.3.3 | Polymerázová řetězová reakce | 24 |
| 4.3.3.1 | Detekce PhV | 24 |
| 4.3.3.2 | Amplifikace genomických úseků | 26 |
| 4.3.4 | Elektroforetická separace PCR produktů | 30 |
| 4.3.5 | Izolace PCR produktu pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up | 31 |
| 4.3.6 | Izolace PCR produktu z gelu pomocí kitu FastGene Gel/PCR Extraction Kit..... | 31 |
| 4.3.7 | Sekvenční značení | 32 |
| 4.3.8 | Bioinformatická analýza..... | 33 |
| 4.4 | Metodika stanovení ras <i>Plasmopara halstedii</i> a test přenosu PhV..... | 35 |
| 4.4.1 | Množení <i>P. halstedii</i> | 35 |
| 4.4.2 | Testování ras <i>P. halstedii</i> na diferenačním souboru slunečnic metodou SDI..... | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4.3 | Přenos PhV | 38 |
| 5 | Výsledky..... | 39 |
| 5.1 | Genetická variabilita PhV..... | 41 |
| 5.2 | Fylogenetická analýza | 53 |
| 5.3 | Určení ras <i>P. halstedii</i> a přenos PhV..... | 56 |
| 6 | Diskuze..... | 58 |
| 7 | Závěr..... | 61 |
| 8 | Seznam použité literatury..... | 62 |

Seznam symbolů a zkratek

| | |
|----------|--|
| Acc. No. | přístupové číslo v databázi GenBank (accession number) |
| BgaV | bat associated nodavirus |
| CBV | cucumber bulgarian virus |
| ChiV-14 | chimeric virus 14 |
| CThTV | curvularia thermal tolerance virus |
| CP | plášťový protein (coat protein) |
| FHV | flock house virus |
| HCRSV | hibiscus chlorotic ringspot virus |
| LSV-1 | lake sinai virus 1 |
| MoNV | mosinivirus |
| NoV | nodamura virus |
| NRV | neekar river virus |
| OMMV | olive mild mosaic virus |
| ORF | otevřený čtecí rámec (open reading frame) |
| PaV | pariacoto virus |
| PeLV | pear latent virus |
| PcoNSRV | phytophthora condilina negative stranded RNA virus |
| PcRV1 | phytophthora cactorum RNA virus 1 |
| PhV | plasmopara halstedii virus |
| PiRV | phytophthora infestans virus |
| PLCV | pelargonium leaf curl virus |
| PoLV | pothos latent virus |
| PuRV | pythium ultimum RNA virus |
| RdRp | RNA-dependentní RNA polymeráza |
| SmV-A | sclerophthora macrospora virus A |

| | |
|-------|---|
| SmV-B | sclerophthora macrospora virus B |
| SNP | jednonukletidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism) |
| TBSV | tomato bushy stunt virus |
| TNV-A | tobacco necrosis virus A |
| ToNoV | tombunodavirus UC1 |
| UTR | nepřekládaná oblast (untranslated region) |
| VLP | viru podobná částice (virus-like particle) |
| WSI | whole seedling inoculation |

Seznam obrázků

Obr. 1: Fylogenetický strom spojených aminokyselinových sekvencí RdRp a CP.

Obr. 2: Srovnání genomu PhV s viry čeledí *Tombusviridae* a *Nodaviridae* a dalšími viry.

Obr. 3: Životní cyklus *Plasmopara halstedii*.

Obr. 4: Sporangiofor *Plasmopara halstedii*.

Obr. 5: Sporangia *Plasmopara halstedii*.

Obr. 6: Mapa nasedání primerů na molekulu RNA1 (kódující RdRp) PhV izolátu Ph8-99.

Obr. 7: Mapa nasedání primerů na molekulu RNA2 (kódující CP) PhV izolátu Ph8-99.

Obr. 8: Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *Plasmopara halstedii*.

Obr. 9: Haplotypová síť PhV studovaných izolátů konstruovaná na základě RNA1 a RNA2.

Obr. 10: Procentuální identita genomických sekvencí RNA1 a aminokyselinových RdRp sekvencí PhV izolátů a dalších virů.

Obr. 11: Procentuální identita genomických sekvencí RNA2 a aminokyselinových CP sekvencí PhV izolátů a dalších virů.

Obr. 12: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě genomických sekvencí RNA1 pomocí algoritmu maximální parsimonie.

Obr. 13: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí RdRp pomocí neighbor-joining analýzy.

Obr. 14: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě genomických sekvencí RNA2 pomocí algoritmu maximální parsimonie.

Obr. 15: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí CP pomocí neighbor-joining analýzy.

Obr. 16: Detekce PhV po přenosu viru za použití primerů PHV_WG_F2/PHV_WG_R2 a PHV_RdRp_polR1/ PHV_RdRp_polF1.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled aktuálně uznaných čeledí a rodů virů hub a oomycetů.

Tabulka 2: Seznam izolátů *Plasmopara halstedii* pro určování rasy a přenos PhV.

Tabulka 3: Seznam izolátů *Plasmopara halstedii*.

Tabulka 4: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci.

Tabulka 5: Sekvence primerů použitých při detekci PhV.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci za použití MyTaq DNA Polymerase.

Tabulka 7: Podmínky PCR reakce při detekci PhV a při amplifikaci genomických úseků PhV.

Tabulka 8: Seznam použitých primerů.

Tabulka 9: Kombinace primerů použitých při amplifikaci genomických fragmentů.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genomických úseků PhV za použití MyFiTM Mix.

Tabulka 11: Podmínky PCR reakce při amplifikaci genomických úseků PhV.

Tabulka 12: Podmínky sekvenačního značení.

Tabulka 13: Seznam sekvencí virových izolátů použitých v bioinformatických analýzách a jejich GenBank Accession Numbers.

Tabulka 14: Seznam získaných sekvencí českých a maďarských izolátů PhV.

Tabulka 15: Detekovaná variabilní místa v RNA1 molekule PhV.

Tabulka 16: Detekovaná variabilní místa v RNA2 molekule PhV.

Tabulka 17: Identifikované rasy *P. halstedii*.

1 Úvod

První zmínky o mykovirech, virech hub a oomycetů, byly publikovány před více než 60 lety a mykoviry jsou v současnosti intenzivně studovány, i přesto jsou ale znalosti o těchto intracelulárních biotrofních parazitech poměrně omezené. Mykoviry mohou mít na své hostitele jak pozitivní, tak negativní účinky, význam mykovirů vzrůstá zejména v souvislosti se studiem účinku virové infekce v ochraně rostlin proti infekci houbovými patogeny.

Jedním z takto studovaných, ale relativně nových a zároveň málo popsáných virových druhů je 'plasmopara halstedii virus', jehož hostitelem je původce plísně slunečnice, *Plasmopara halstedii*. Tento virus byl poprvé pozorován v 90. letech 20. století, ale genom tohoto viru byl popsán až v roce 2008. V České republice byl výskyt 'plasmopara halstedii virus' poprvé zaznamenán v roce 2014, ale o genetické variabilitě 'plasmopara halstedii virus' na našem území nejsou dostupné žádné informace. Diplomová práce se proto primárně zaměřuje na molekulárně genetickou charakteristiku českých izolátů 'plasmopara halstedii virus' a také izolátů tohoto viru původem z Maďarska.

2 Cíle práce

Cíli této diplomové práce bylo:

1. Vypracovat literární přehled aktuálních poznatků o 'plasmopara halstedii virus' (PhV) a dalších sekvenčně podobných mykovirech.
2. Provést molekulárně genetickou charakteristiku vybraného souboru virových izolátů za použití technik izolace RNA, RT-PCR, konvenčního Sangerova sekvenování a bioinformatické analýzy získaných sekvenčních dat.
3. Zhodnotit mikroevoluční vztahy studovaných a dosud popsanych izolátů PhV.

3 Literární přehled

3.1 Mykoviry

Viry jsou intracelulární biotrofní parazité, kteří nejsou schopni samostatné existence a jejichž replikace je závislá na živé hostitelské buňce. Mykoviry, zahrnující *sensu lato* viry hub a oomycetů, jsou typické perzistentním intracelulárním nelytickým způsobem života. Mykoviry se šíří dvěma způsoby, horizontálně anastomózami mycelií a vertikálně sporulací (Pearson *et al.*, 2009; Sutela *et al.*, 2019). Diskutován, ale nepotvrzen zůstává environmentální přenos včetně zapojení hmyzích faktorů (Myers *et James*, 2022). Při anastomóze dochází k fúzi dvou vegetativně kompatibilních hyf různých houbových organismů, kdy spolu s cytoplasmou dojde i k přesunu mykovirů. Primárně se mykoviry přenáší pohlavně i nepohlavně tvořenými sporami (Pearson *et al.*, 2009; Sutela *et al.*, 2019).

3.1.1 Původ mykovirů

O dosud nejasném původu mykovirů existují dvě hypotézy (Ghabrial, 1998). Podle první hypotézy existuje nějaký společný předek všech mykovirů a mykoviry se vyvíjeli spolu se svými hostiteli (Pearson *et al.*, 2009). Tato hypotéza je založena na faktu, že přenos mykovirů je možný pouze intracelulárně (Buck, 1998). Podle druhé hypotézy, založené na sekvenční podobnosti mykovirů a rostlinných virů, byly mykoviry původně rostlinnými viry a relativně nedávno došlo k jejich přesunu z buněk rostlinného hostitele do buněk jejich houbových patogenů (Pearson *et al.*, 2009). V souladu s druhou hypotézou je i fakt, že mnoho ssRNA mykovirů způsobujících hypovirulenci hostitele je fylogeneticky příbuznější rostlinným ssRNA virům než typicky avirulentním dsRNA mykovirům (Xie *et al.*, 2006).

3.1.2 Vliv mykovirů na hostitele

Virové infekce hub a oomycetů bývají většinou asymptomatické. Některé mykoviry způsobují oslabení hostitele, jiné mykoviry zvyšují fitness hostitele. Například *Cryphonectria parasitica virus 1* způsobuje hypovirulenci svého hostitele, kterým je *Cryphonectria parasitica*, původce korové nekrózy kaštanovníku (Choi *et Nuss*, 1992). Příkladem mykoviru, který poskytuje svému hostiteli značnou ekologickou výhodu, je *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV). Hostitelem CThTV je fytopatogenní askomyceta *Curvularia protuberata*, která infikuje kořeny trávy *Dichanthelium lanuginosum*. Přítomnost CThTV zajišťuje v tomto

mutualistickém systému toleranci teplot až do 65 °C a nízkého pH na extrémních stanovištích v Yellowstonském národním parku (Márquez *et al.*, 2007).

3.1.3 Genom a taxonomie mykovirů

Genom převážné většiny mykovirů je tvořen ssRNA nebo dsRNA, dle Baltimorovy klasifikace se řadí do skupiny III, IV a V (Baltimore, 1971). Většina mykovirů má malé genomy, které obsahují geny kódující pouze několik proteinů (Ghabriel *et al.*, 2015). Nejjednodušší z dosud známých mykovirů (rod *Mitovirus*, čeleď *Mitoviridae*) kódují pouze jediný protein, RNA-dependentní RNA polymerázu (RdRp). Tyto mykoviry se replikují uvnitř mitochondrií hostitele, kdežto všechny ostatní známé mykoviry jsou cytosolické a replikují se tedy v cytoplasmě hostitele. Zástupci čeledí *Partiviridae* a *Totiviridae* kódují většinou pouze RdRp a plášťový protein (CP; Sutela *et al.*, 2019).

Velikost genomu mykovirů se pohybuje mezi 2,5 a 23 kb a genom obsahuje 1–12 genů. Viry s dsRNA genomem jsou typicky obalené, ssRNA viry většinou postrádají pravé viriony a tvoří tedy proteinovou kapsidu. Výjimkou jsou viry čeledi *Barnaviridae*, které tvoří kapsidu vždy, a viry čeledi *Polymyoviridae*, které tvoří kapsidu občas.

Taxonomie mykovirů je založená na fylogenetické analýze genu pro RdRp a CP, organizaci genomu a biologických vlastnostech. Mykoviry s (+)ssRNA genomem jsou rozděleny do devíti čeledí (viz tabulka 1). Některé mykoviry mohou mít (–)ssRNA genom (viry čeledí *Mymonaviridae* a *Phenuiviridae*). Mykoviry s genomem tvořeným dsRNA se dělí do devíti čeledí (viz tabulka 1). Mykoviry s ssDNA genomem se řadí do čeledi *Genomoviridae* (Myers *et James*, 2022). Kromě mykovirů, jejichž zařazení je zřejmé, existuje velké množství mykovirů bez jasné klasifikace. Neustále jsou objevovány a popisovány nové mykoviry a stále jich velká část zůstává neznámá, jejich klasifikace se tedy neustále mění a upravuje.

Tabulka 1: Přehled aktuálně uznaných čeledí a rodů virů hub a oomycetů (Převzato z Sutela *et al.*, 2019, upraveno).

| Čeďed' | Rod | Druh (přříklad) | Druh nukleové kyseliny, počet molekul nukleové kyseliny (velikost genomu) | Morfologie |
|--------------------------|--------------------------|--|---|---|
| nezařazeno | <i>Rhizidiovirus</i> | <i>Rhizidiomyces virus</i> | dsDNA, 1 | 60nm izometrické viriony s proteinovou kapsidou |
| <i>Genomoviridae</i> | <i>Gemycircularvirus</i> | <i>Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence associated DNA virus</i> | kruhová ssDNA, 1 (2,2 kb) | 20–22nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu |
| <i>Chrysoviridae</i> | <i>Alphachrysovirus</i> | <i>Penicillium chrysogenum virus</i> | dsRNA, 4 (2,4–3,6 kb) | 35–40nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu |
| | <i>Betachrysovirus</i> | <i>Botryosphaeria dothidea chrysovirus 1</i> | | |
| <i>Megabirnaviridae</i> | <i>Megabirnavirus</i> | <i>Rosellinia necatrix megabirnavirus 1</i> | dsRNA, 2 (7,2–8,9 kb) | 52nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu |
| <i>Partitiviridae</i> | <i>Alphapartitivirus</i> | <i>Helicobasidium momba partitivirus V70</i> | dsRNA, 2 (3–4,8 kb) | 25–50nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu |
| | <i>Betapartitivirus</i> | <i>Atkinsonella hypoxylon virus</i> | | |
| | <i>Gammapartitivirus</i> | <i>Penicillium stoloniferum virus S</i> | | |
| <i>Reoviridae</i> | <i>Mycoreoviruse</i> | <i>Mycoreovirus 1</i> | dsRNA, 9–12 (0,7–4,1 kb) | 60–80nm obalené viriony tvořící ikosaedrální proteinovou kapsidu |
| <i>Totiviridae</i> | <i>Totivirus</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A</i> | dsRNA, 1 (4,6–7 kb) | 30–40nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu, neobalené |
| | <i>Victorivirus</i> | <i>Helminthosporium victoriae virus 190S</i> | | |
| <i>Quadriviridae</i> | <i>Quadrivirus</i> | <i>Rosellinia necatrix quadrivirus 1</i> | dsRNA, 4 (3,5–5 kb) | 45nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu |
| <i>Polymycoviridae</i> | <i>Polymycovirus</i> | <i>Aspergillus fumigatus tetramycovirus 1</i> | dsRNA, 4–8 (7,5–12,5 kb) | občas tvoří kapsidu, obalené; většinou netvoří pravé viriony |
| <i>Curvulaviridae</i> | <i>Orthocurvulavirus</i> | <i>Curvularia thermal tolerance virus</i> | dsRNA, 2 (1,8–2,2 kb) | 25–30nm izometrické viriony tvořící proteinovou kapsidu |
| <i>Amalgaviridae</i> | <i>Zybavirus</i> | <i>Zygosaccharomyces bailii virus Z</i> | dsRNA, 1 (3,1 kb) | tvoří proteinovou kapsidu |
| | <i>Botrexvirus</i> | <i>Botrytis virus X</i> | | |
| <i>Alphaflexiviridae</i> | <i>Sclerodarnavirus</i> | <i>Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus</i> | (+)ssRNA, 1 (5,4–9 kb) | 720nm ohebné viriony tyčkovitého tvaru |
| <i>Barnaviridae</i> | <i>Barnavirus</i> | <i>Mushroom bacilliform virus</i> | (+)ssRNA, 1 (4,0 kb) | 18–20 × 48–53nm baciliformní viriony tvořící proteinovou kapsidu, neobalené |
| <i>Gammaflexiviridae</i> | <i>Mycoflexivirus</i> | <i>Botrytis virus F</i> | (+)ssRNA, 1 (6,8 kb) | 720nm ohebné viriony tyčkovitého tvaru |
| <i>Deltaflexiviridae</i> | <i>Deltaflexivirus</i> | <i>Sclerotinia sclerotiorum deltaflexivirus 1</i> | (+)ssRNA, 1 (8,2 kb) | pravděpodobně neobalený |

Tabulka 1, pokračování: Přehled aktuálně uznaných čeledí a rodů virů hub a oomycetů
(Převzato z Sutela *et al.*, 2019, upraveno).

| Čeď | Rod | Druh (příklad) | Druh nukleové kyseliny, počet molekul nukleové kyseliny (velikost genomu) | Morfologie |
|-------------------------|--------------------------|---|---|---|
| <i>Endornaviridae</i> | <i>Alphaendornavirus</i> | <i>Helicobasidium mompa alphaendornavirus 1</i> | (+)ssRNA, 1 (9,7–17,6 kb) | netvoří pravé viriony |
| | <i>Betaendornavirus</i> | <i>Sclerotinia sclerotiorum betaendornavirus 1</i> | | |
| <i>Hypoviridae</i> | <i>Hypovirus</i> | <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> | (+)ssRNA, 1 (9,1–12,7 kb) | 50–80nm pleomorfní vezikuly, netvoří pravé viriony |
| <i>Narnaviridae</i> | <i>Narnavirus</i> | <i>Saccharomyces 20S RNA narnavirus</i> | (+)ssRNA, 1 (2,3–2,9 kb) | neobalený ribonukleoproteinový komplex, netvoří pravé viriony |
| <i>Mitoviridae</i> | <i>Mitovirus</i> | <i>Cryphonectria parasitica mitovirus 1</i> | (+)ssRNA, 1 (2,3–2,9 kb) | neobalený ribonukleoproteinový komplex, netvoří pravé viriony |
| <i>Botourmiaviridae</i> | <i>Botoulivirus</i> | <i>Botrytis botoulivirus</i> | | |
| | <i>Magoulivirus</i> | <i>Magnaporthe magoulivirus 1</i> | (+)ssRNA, 1 (2,4–3,2 kb) | netvoří pravé viriony |
| | <i>Scleroulivirus</i> | <i>Sclerotinia scleroulivirus 1</i> | | |
| <i>Mymonaviridae</i> | <i>Sclerotimonavirus</i> | <i>Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 1</i> | (-)ssRNA, 1 (10 kb) | vláknité obalené viriony, 50×1000 nm |
| <i>Phenuviridae</i> | <i>Coguvirus</i> | <i>Fusarium sibiricum coguvirus 1</i> | (-)ssRNA, 3 (1,2–7 kb) | netvoří pravé viriony |

3.1.4 Viry oomycetů

Viru podobné částice (virus-like particles, VLP) u zástupců oomycetů, oddělení Peronosporomycota byly poprvé pozorovány u plísně velkovýtrusé (*Sclerophthora macrospora*) infikující rýži (Honkura *et al.*, 1983). Později byly tyto VLP blíže identifikovány a popsány jako dva různé (+)ssRNA viry (Shikaro *et al.*, 1985). Prvním z těchto virů je *Sclerophthora macrospora virus A* (SmV-A). Izometrické viriony SmV-A mají 30 nm v průměru a na svém povrchu nesou 4nm výběžky. Genom SmV-A je tvořen třemi RNA. RNA1 je dlouhá 2 928 nt a nese dva ORF, ORF1a kóduje RdRp a ORF1b kóduje protein neznámé funkce. RNA2 o délce 1 981 nt nese ORF2, která kóduje CP. RNA 3 o délce 977 nt nenese žádný ORF a je považována za satelitní RNA. Kapsida SmV-A je tvořena dvěma plášťovými proteiny, p43 a p39, oba jsou kódované ORF2. Protein p39 je odvozen proteolytickým štěpením z p43 (Yokoi *et al.*, 2003). Druhým zástupcem je *Sclerophthora*

macrospora virus B (SmV-B). Viriony SmV-B jsou izometrické a v průměru 32 nm velké. Genom je tvořen jedinou RNA o délce 5 533 nt, která nese dva ORF. ORF1 kóduje protein s motivy chymotrypsin-podobné serinové proteázy a RdRp, ORF2 kóduje CP (Yokoi *et al.*, 1999).

Původce plísně bramborové, *Phytophthora infestans*, je hostitelem čtyř dalších dobře popsaných virů oomycetů – phytophthora infestans virus 1–4 (PiRV-1–4; Cai *et Hillman*, 2013; Cai *et al.*, 2013; 2018). Všechny čtyři viry napadající *P. infestans* mají genom tvořený dsRNA. Genom PiRV1 sestává ze dvou RNA. RNA1 o délce 3 160 nt nese ORF1 kódující polyprotein o velikosti 977 aa, který nese motivy charakteristické pro RdRp. RNA2 o délce 2 776 nt nese ORF2, který kóduje polyprotein o velikosti 847 aa, pravděpodobně se jedná o trypsinu-podobnou serinovou proteázu. RNA2 nese i druhý ORF (ORF3) kódující protein neznámé funkce. Existuje alternativní forma RNA2, ve které je 19nt úsek nahrazen jinou 9nt sekvencí. Poměr výskytu těchto dvou forem je 3:1 ve prospěch delší RNA2A. Alternativní sekvence RNA2B vede k rozdělení ORF2 do dvou pojmenovaných jako ORF2B-1 a ORF2B-2. V případě alternativní RNA2B kóduje proteázu ORF2B-2. PiRV1 nemá jasné taxonomické zařazení, ale na základě sekvence RdRp je nejpříbuznější virům čeledi *Astroviridae* (Cai *et al.*, 2009).

Genom PiRV2 je tvořen RNA o délce 11 170 nt, která nese jeden ORF kódující polyprotein o velikosti 3 710 aa s motivy cysteinové proteázy poblíž N-konce a RdRp poblíž C-konce. PiRV2 není příbuzný žádnému známému viru (Cai *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že PiRV2 stimuluje produkci sporangií hostitele, tudíž zvyšuje jeho virulenci (Cai *et Hillman* 2013).

PiRV3 má genom tvořený RNA o délce 8 112 nt, která nese dva ORF. ORF1 kóduje protein neznámé funkce a ORF2 kóduje RdRp, která je podobná RdRp dalších 5 neklasifikovaných dsRNA (Phlebiopsis gigantea virus 2, Fusarium virguliforme RNA virus 1 a 2, Fusarium graminearum virus 3 a Grapevine-associated totivirus-2). Společně s těmito 5 viry tvoří PiRV3 nově navrženou taxonomickou skupinu 'Fusagraviridae' (Cai *et al.*, 2013; Sutela *et al.*, 2019). ORF2 má 31 nt dlouhý přesah s ORF1. Těsně před terminačním kodonem v ORF1 se nachází sekvence G TTA AAC, na které dochází k –1 sklouznutí ribozomu při translaci a tím zmizí terminační kodon ORF1. Po translaci tedy vznikají buď dva proteiny, nebo jeden fúzní, pokud dojde ke sklouznutí (Cai *et al.*, 2013).

Genom PiRV4 je tvořen 2 984 nt dlouhou RNA, která nese jeden ORF kódující RdRp. Tato RdRp je příbuzná s RdRp *Saccharomyces cerevisiae* narnavirus 20S a 23S, který se řadí do rodu *Narnavirus*, čeledi *Narnaviridae*. Na základě této podobnosti bylo navrženo zařazení PiRV4 do čeledi *Narnaviridae* (Cai *et al.*, 2012).

Nedávno byly v mořském zástupci oddělení Peronosporomycota *Phytophthora condilina* objeveny viry řadící se do řádu *Bunyvirales* (Botella *et Jung*, 2021). *P. condilina* je nově popsáný druh rodu *Phytophthora*, který byl izolován ze vzorku brakických vod v jižním Portugalsku (Burgess *et al.*, 2018). Tyto nově objevené dsRNA viry byly pojmenovány jako phytophthora condilina negative stranded RNA virus 1–13 (PcoNSRV; Botella *et Jung*, 2021).

Phytophthora cactorum RNA virus 1 (PcRV1) je dsRNA virus nedávno objevený v izolátu *P. cactorum* pocházející z břízy bělokoré. Genom PcRV1 velký 5 699 nt nese dva překrývající se ORF, které kódují CP o velikosti 705 aa a RdRp o velikosti 779 aa (Poimala *et Vainio*, 2020). VLP nebo virové dsRNA byly dále pozorovány v *Plasmopara viticola*, původci plísňé révy vinné (Chiapello *et al.*, 2020) a v *Pythium irregular* (Gillings *et al.*, 1993). Nový druh rodu *Gammapartivirus*, čeledi *Partiviridae* byl objeven v *Pythium nuun* a byl pojmenován pythium nuun virus 1 (Shiba *et al.*, 2018). Ve dvou izolátech *Globisporangium splendens* (dříve *Pythium*) byl objeven dsRNA virus, který byl pojmenován pythium splendens RNA virus 1 (Shiba *et al.*, 2019). V *Pythium polare*, který napadá mechy na Arktidě, byly pozorovány tři VLP s dsRNA genomem, později pojmenovány pythium polare RNA virus 1 a 2 a pythium polare bunya-like RNA virus 1 (Sasai *et al.*, 2018). V Japonsku byly nově objeveny v *Globisporangium ultimum* (dříve *Pythium*) dva dsRNA viry, pythium ultimum RNA virus 1 a 2 (PuRV1 a PuRV2), PuRV1 je podobný virům navrhované čeledi *Fusariviridae* a PuRV2 je podobný virům čeledi *Totiviridae* (Fukunishi *et al.*, 2021).

3.2 Charakteristika 'plasmopara halstedii virus' (PhV)

Viru podobné částice (VLP) byly v *Plasmopara halstedii* poprvé pozorovány v 90. letech 20. století (Gulya *et al.*, 1990; 1992). VLP byly pozorovány v myceliu pěti izolátů *P. halstedii* rasy 300 původem ze severní Dakoty, kdežto buňky hostitelské rostliny VLP neobsahovaly (Gulya *et al.*, 1992). Později byla přítomnost virionů 'plasmopara halstedii virus' (PhV) prokázána v haustoriích, hyfách, sporangioforech, zoosporangiích i oosporách *P. halstedii*. Viriony PhV byly pozorovány nezávisle na fyziologické rase hostitelského patogenu, geografickém původu a citlivosti vůči fungicidu methalaxylu (Heller-Dohmen *et al.*, 2008).

3.2.1 Morfologie virionu PhV

Viriony PhV mají izometrický tvar a měří 37 nm v průměru. Povrch virionů PhV je granulární s epitopy o délce 4 nm (Gulya *et al.*, 1992; Mayhew *et al.*, 1992; Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Viriony jsou intaktní vůči působení chloroformu, jsou tedy neobalené (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Viriony se vyskytují v hostiteli jak volně v cytoplasmě, tak jako součást vezikul. Viriony často formují krystalické struktury, obzvláště pokud jsou v kontaktu s buněčnou membránou (Gulya *et al.*, 1992; Heller-Dohmen *et al.*, 2008).

3.2.2 Organizace genomu a genetická diverzita PhV

Genom PhV tvořen je dvěma molekulami ssRNA s pozitivní orientací (Gulya *et al.*, 1992; Mayhew *et al.*, 1992). Jejich existence byla prokázána na základě zjištěných štěpících účinků RNázy A, a to jak v prostředí o nízké, tak i vysoké koncentraci solí, vůči působení DNázy I byla nukleová kyselina rezistentní (Heller-Dohmen *et al.*, 2008).

RNA1 je dlouhá 2 793 nt, o molekulové hmotnosti $1,05 \cdot 10^6$ (Mayhew *et al.*, 1992). RNA1 nese jeden otevřený čtecí rámec ORF1 o délce 2 745 nt, který kóduje 914 aa dlouhý peptid se specifickou doménou pro RNA-dependentní RNA polymerázu s GDD motivem. Odhadovaná molekulová hmotnost RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp) je 104 kDa. ORF1 je ohraničen 5' nepřekládanou oblastí (UTR) o délce 18 nt a 3'-UTR oblastí o délce 30 nt (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

RNA2 je dlouhá 1 526 nt, o molekulové hmotnosti $0,53 \cdot 10^6$ (Mayhew *et al.*, 1992). RNA2 nese ORF2 o délce 1 128 nt kodující 375 aminokyselin dlouhý plášťový protein (CP). ORF2

je ohraničen 5'-UTR o délce 164 nt a 3'-UTR o délce 234 nt. Experimentálně byla jeho velikost stanovena na 36–37,5 kDa (Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Mayhew *et al.*, 1992).

Na základě aminokyselinových sekvencí byla velikost CP teoreticky odhadnutá na 40 kDa. Hmotnostní spektrofotometrií byla prokázána přítomnost specifického místa v pozicích 24–35 na N-terminálním konci CP, které je rozeznáváno neznámou proteázou jinou než trypsin. CP je tedy *in vivo* proteolyticky zpracováván dosud neznámou proteázou a zkrácen na velikost 352 aminokyselin a molekulovou hmotnost 38 kDa (Heller-Dohmen *et al.*, 2011).

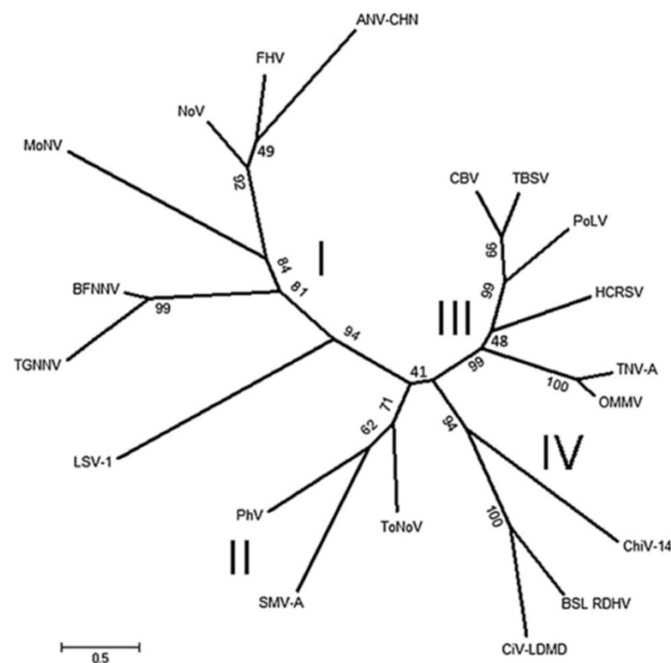
Sekvenční analýzou 22 vzorků PhV z různých zemí světa byla zjištěna vysoká podobnost jednotlivých izolátů, kdy bylo ve čtecích rámcích obou RNA identifikováno pouze variabilních 18 míst (SNP). Na pěti pozicích se objevují SNP opakovaně, 13 SNP se vyskytuje vzácně u jednoho nebo dvou vzorků a výskyt SNP nemá vliv na strukturu proteinů kódované těmito ORF. Byla zjištěna velmi malá genetická diverzita ORF, v případě RNA1 kódující RdRp 0,003 % a v případě RNA2 kódující CP 0,008 %. Analýza nepřekládaných oblastí (UTR) u RNA2 prokázala výskyt dalších 8 nukleotidových záměn a jedné krátké delece, přičemž *in silico* analýzou bylo zjištěno, že tyto záměny nevedly ke změně sekundární struktury RNA. Variabilita v UTR oblastech je asi třikrát vyšší než v ORF (0,025 %), nicméně nebylo prokázáno, že by tato variabilita měla vliv na regulační procesy replikace PhV (Grasse *et Spring*, 2015).

3.2.3 Taxonomické zařazení PhV

Přesná klasifikace a fylogenetické vztahy PhV jsou stále nejasné. Jediný známý virus, jehož charakteristiky jsou podobné PhV, je 'sclerophthora macrospora virus A' (SmV-A). Hostitelem SmV-A je stejně jako v případě PhV obligátně biotrofní patogen patřící do oddělení Peronosporomycota. Při fylogenetické analýze DNA-RNA hybridních virů (Diemer *et Stedman*, 2012) a chimerických virů (Roux *et al.*, 2013; Krupovic *et al.*, 2015) založené na aminokyselinových sekvencích CP tvořil PhV spolu se SmV-A větve poblíž virů čeledi *Tombusviridae*. CP PhV a SmV-A tedy vykazují aminokyselinovou podobnost s CP virů čeledi *Tombusviridae*, dále také s viry čeledi *Circoviridae* a hybridními DNA-RNA viry (Grasse *et Spring*, 2017). Na druhou stranu při fylogenetické analýze založené na aminokyselinových sekvencích RdRp virů čeledi *Nodaviridae* tvořily PhV a SmV-A spolu s několika viry čeledi *Nodaviridae* novou skupinu zvanou „noda” (Aholá *et Karlin*, 2015).

RdRp PhV a SmV-A je tedy homologní s odpovídajícími enzymy čeledi *Nodaviridae* (Grasse *et* Spring, 2017).

Při fylogenetické analýze aminokyselinových sekvencí RdRp tvořily viry čeledi *Nodaviridae* i *Tombusviridae* samostatné skupiny. Viry oomycetů (PhV a SmV-A) tvořily samostatnou skupinu poblíž čeledi *Nodaviridae*. Fylogenetická analýza založená na aminokyselinových sekvencích CP ukázala velkou odlišnost PhV a SmV-A od virů jak čeledi *Nodaviridae*, tak i *Tombusviridae*. Fylogenetická analýza umístila viry oomycetů do samostatné skupiny poblíž virů čeledi *Tombusviridae* a hybridních DNA-RNA virů, které tvořily čtvrtou samostatnou skupinu.

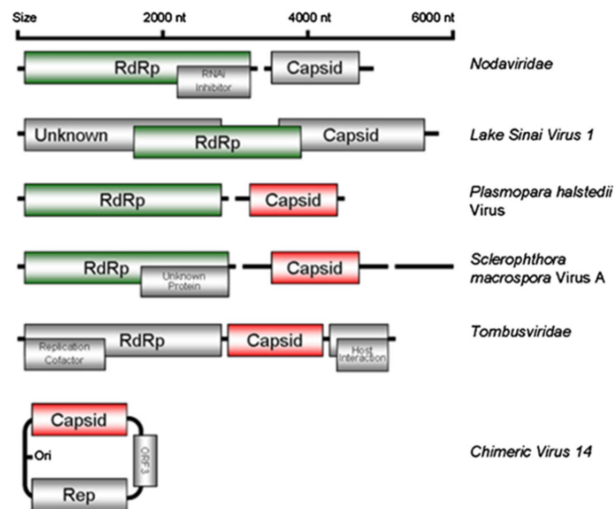


Obr. 1: Fylogenetický strom spojených aminokyselinových sekvencí RdRp a CP. Převzato z Grasse *et* Spring (2017). I – *Nodaviridae*, II – viry oomycet, III – *Tombusviridae*, IV – hybridní DNA-RNA viry.

Protože analýza založená na samostatných aminokyselinových sekvencích jednotlivých proteinů umístila PhV a SmV-A poblíž různých virových skupin, byl pro fylogenetickou analýzu zvolen odlišný přístup kombinující aminokyselinové sekvence obou proteinů. Na základě společné analýzy obou proteinů vznikl fylogenetický strom odlišující čtyři samostatné skupiny (viz obr. 1). PhV, SmV-A a další doposud neklasifikovaný virus 'tombunodavirus UC1' (ToNoV) tvořily skupinu označenou jako viry oomycet, která se v rámci topologie stromu nacházela v blízkosti skupiny virů čeledi *Nodaviridae*. Na základě fylogenetické

analýzy vykazovaly viry oomycetů také podobnost se skupinou tvořenou hybridními DNA-RNA viry. Obě dvě tyto větve byly na pomezí mezi čeleděmi *Tombusviridae* a *Nodaviridae*.

Mezní pozici virů oomycetů mezi čeleděmi *Tombusviridae* a *Nodaviridae* podporuje i jejich organizace genomu. Podobně jako u virů čeledi *Nodaviridae* se genom PhV skládá ze dvou ssRNA s pozitivní orientací. V tomto ohledu se SmV-A od PhV liší, má oproti PhV i třetí RNA s dosud neznámou funkcí. RdRp PhV a SmV-A odpovídá RdRp virů čeledi *Nodaviridae*, oproti tomu jejich CP se od CP virů oomycetů se zcela liší. Z pohledu organizace genomu jsou viry oomycetů virům čeledi *Tombusviridae* méně podobní. Tyto viry jsou stejně jako viry oomycetů tvořeny ssRNA, ta ale není segmentovaná a kóduje až 5 proteinů (viz obr. 2).



Obr. 2: Srovnání genomu PhV s viry čeledi *Tombusviridae* a *Nodaviridae* a dalšími viry. Zelené rámečky značí podobnost mezi RdRp, červené rámečky značí podobnost mezi CP. Převzato z Grasse *et* Spring (2017).

Spolu s PhV a SmV-A je součástí této nové skupiny i ToNoV. Tento virus je poměrně neprozkoumaný, jeho viriony nebyly doposud izolovány a také není známý jeho hostitel. Pokud by se zjistilo, že je hostitelem ToNoV také patogen oddělení Peronosporomycota, tvořily by PhV, SmV-A a ToNoV samostatnou homogenní skupinu virů, která by byla charakteristická hostitelskou specifitou. Možným vysvětlením pro existenci takovéto skupiny by mohl být horizontální přenos genů (Grasse *et* Spring, 2017).

3.2.4 Rozšíření PhV

V roce 2015 proběhl rozsáhlý screening izolátů *P. halstedii* pocházejících ze 17 zemí. PhV byl přítomen u izolátů z Francie, Německa, Rakouska, Slovenska, Maďarska, Bulharska, Itálie, Turecka, Španělska, Maroka, Indie, Číny, Jihoafrické republiky, Argentiny, USA a Kanady. Výskyt PhV byl prokázán u 117 ze 128 testovaných izolátů, což odpovídá více než 90 % izolátů, ve vzorcích o stáří od 3 do 40 let, bez ohledu na jejich geografický původ, rasu *P. halstedii* a materiál, který sloužil jako zdroj pro izolaci RNA (zamražená sporangia, čerstvě sklizená sporangia, slunečnicové listy z herbářových sbírek s viditelnou sporulací; Grasse *et Spring*, 2015). Podobně vysoké procento izolátů *P. halstedii* infikovaných PhV bylo zaznamenáno již v roce 2008 (Heller-Dohmen *et al.*, 2008).

Na území České republiky byl poprvé výskyt PhV zjišťován v roce 2014, kdy byl PhV detekován pouze u 12 % testovaných izolátů *Plasmopara halstedii* pocházejících z Brna, Podivína, Olomouce a Lednice (Pospíchalová, 2014). V práci, která předcházela aktuálnímu výzkumu, byl PhV detekován u 73 % izolátů pocházejících obdobných lokalit, z Olomouce, Hustopeče u Brna, Lednice, Podivína a Kroměříže (Kovalíková, 2020), což koreluje s údaji z jiných zemí z let 2008 a 2015 (Heller-Dohmen *et al.*, 2008; Grasse *et Spring*, 2015).

3.2.5 Interakce PhV s *Plasmopara halstedii*

Vliv PhV na svého hostitele byl dosud zkoumán jen málo, pravděpodobně z důvodu obligátně biotrofní povahy *P. halstedii*. Grasse *et al.* (2013) studovali vliv přítomnosti PhV na virulenci *P. halstedii* (kvalitativní složka patogenity, schopnost fyziologické rasy patogenu vyvolat u daného genotypu hostitele chorobu) a agresivitu (kvantitativní složka patogenity, míra napadení hostitele a jeho poškození). Vliv PhV na virulenci hostitele pozorován nebyl, ale přítomnost PhV snižovala agresivitu hostitele.

Vlivem přítomnosti PhV byla doba latence (čas od inokulace do první sporulace) prodloužena o asi 1 den, pravděpodobně došlo ke zpomalení vývoje mycelia. Hustota sporulace na děložních listech byla nižší v průměru o 30 % u izolátů s PhV. Míra celkové infekce rostlin klesla o 10 % a míra systémové infekce klesla z 51,5 % u bezvirózních izolátů na 36,5 % u izolátů s PhV, tedy více rostlin zvládlo omezit růst patogenu na oblast hypokotylu a zabránit jeho rozšíření do stonku rostliny. Bylo tedy prokázáno, že přítomnost PhV způsobuje hypovirulenci *P. halstedii* tím, že snižuje její agresivitu (Grasse *et al.*, 2013).

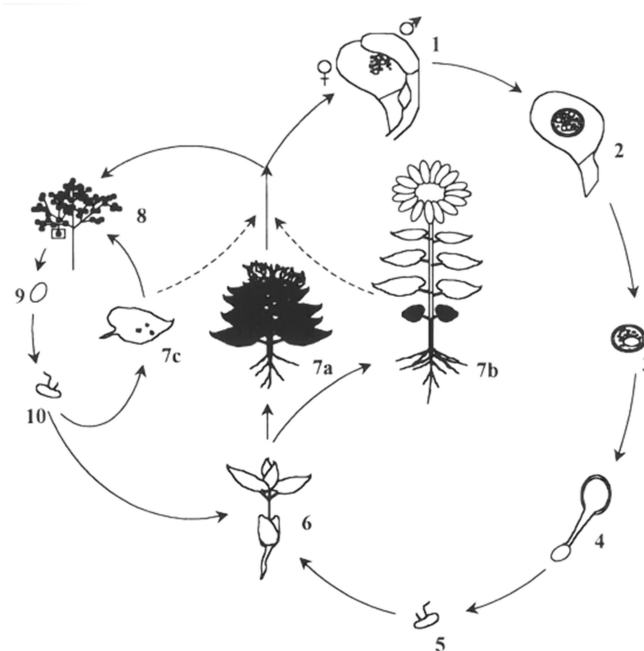
3.3 Charakteristika *Plasmopara halstedii*

Obligátně biotrofní patogen *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni (1888) je původcem plísně slunečnice. Svým zařazením spadá do čeledi *Peronosporaceae*, řádu *Peronosporales*, podtřídy *Peronosporidae*, třídy *Peronosporae*, oddělení *Peronosporomycota* a říše *Chromista* (Index Fungorum, 2023).

P. halstedii pochází ze Severní Ameriky, kde má původ i její hostitel – slunečnice roční (*Helianthus annuus*). První záznam výskytu plísně slunečnice je datován do roku 1888 (Farlow *et* Seymour, 1888). Od 20. let 20. století začala plíseň slunečnice působit závažné škody na úrodě slunečnice ve Spojených státech amerických (Henry *et* Gilbert, 1924), odkud byla zaznamenána první vlna šíření ve 40. letech 20. století. *P. halstedii* se rozšířila nejprve do Evropy, konkrétně do Jugoslávie, odkud se šířila do okolních východoevropských zemí a do Ruska (Novotelnova, 1966). Mezi lety 1970 a 1990 došlo k rozšíření do střední a jižní Evropy, Asie a severní Afriky. Druhá vlna šíření vedla ze Severní do Jižní Ameriky v 50. letech 20. století (Spring, 2019). Dnes je výskyt *P. halstedii* sledován na všech kontinentech vyjma Austrálie, Nového Zélandu a Oceánie (Constantinescu *et* Thines, 2010). Populace *P. halstedii* jsou variabilní z hlediska své patogenity a pokusy o ochranu slunečnice jsou tak znesnadněny vývojem nových patotypů *P. halstedii*, překonávajících geny rezistence u nových hybridů či vznikem kmenů odolných vůči fungicidům (Bán *et al.*, 2021; Molinero Ruiz, 2022).

3.3.1 Životní cyklus *Plasmopara halstedii* a vliv infekce na hostitele

Plasmopara halstedii je během celého životního cyklu úzce spjata s pletivý hostitelské rostliny, slunečnice, a příbuzných rostlin čeledi *Asteraceae* (Diagnostiscs, 2014, viz obr. 3). Jedná se o homothalický druh, k pohlavnímu rozmnožování, oogametangiogamii, dochází splynutím haploidního antheridia s haploidním oogoniem v rámci jednoho mycelia. Po oplození dojde k vytvoření diploidní tlustostěnné oospory, umožňující patogenu přečkat v nažkách hostitele nebo v půdě po dobu mnoha let (Spring, 2000).



Obr. 3: Životní cyklus *Plasmopara halstedii*. Převzato z Spring (2001). 1 – pohlavní rozmnožování (gametangiogamie), 2 – oogonium s nezralou oosporou, 3 – zralá oospora, 4 – oospora s primárním sporangiem, 5 – zoospora (primární infekce), 6 – semenáček hostitelské rostliny, 7a – systémově infikovaná rostlina, 7b – latentní infekce omezená na děložní listy, 7c – lokální infekce omezená na listy (sekundární infekce), 8 – sporangiofor, 9 – sporangium, 10 – zoospora.

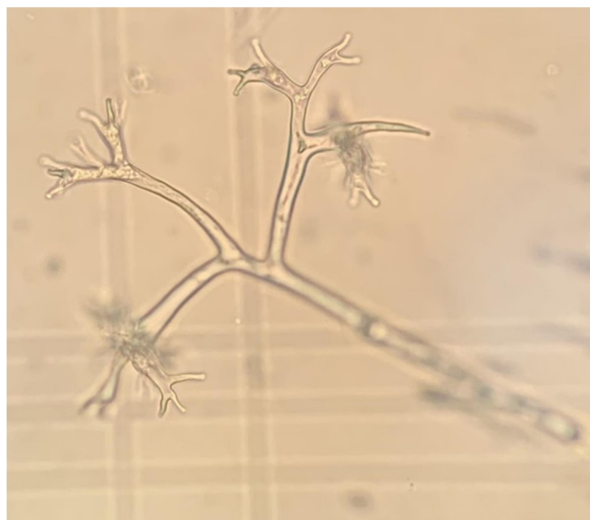
Za vhodných podmínek klíčí oospora hyfou se sporangiem, které produkuje biflagelátní zoospory infikující hostitele přes kořenové vlášení. Pokud je infekce patogenem silná, dochází až k padání klíčících rostlin a tedy odumření hostitele. Při slabší infekci prorůstá mycelium *P. halstedii* rostlinou a způsobuje mnoho symptomů, jedná se pak o systémovou infekci. Za vlhkých podmínek začne patogen vytvářet na listech bílý povlak sporangií. Větrm se sporangia uvolňují z povrchu listů a přenášejí se na další rostliny, čímž dochází k sekundární infekci těchto rostlin (Spring, 2001).

Na abaxiální straně listu dojde k uvolnění zoospor ze sporangií, které zde klíčí hyfami. Mycelium je hemiedofytické, hyfy tedy prorůstají průduchy a následně se rozrůstají v pletivu. Mycelium vytváří haustoria, pomocí kterých může čerpat živiny z hostitelských buněk. U sekundárně infikovaných rostlin se může vyvinout jak lokální, tak i systémová infekce (Spring *et* Zipper, 2006). Ve vlhkém prostředí může patogen produkovat další sporangia a tím infikovat další okolní rostliny (Bouterige, 2003).

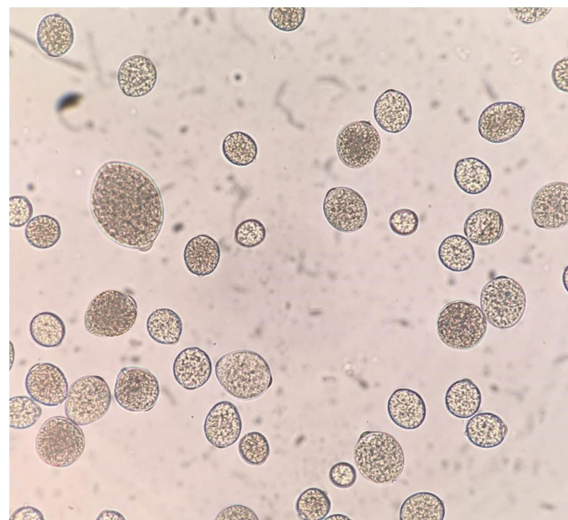
V závislosti na symptomech se rozlišují tři formy infekce. Systémová infekce postihuje všechny části hostitele, způsobuje především zakrslost rostliny, dále také chlorózu a deformaci listů. Při silné infekci může dojít až k padání klíčnicích rostlin. V květním úboru systémově napadené rostliny se vyvíjí hluché nebo latentně infikované nažky (Spring, 2001). Z těchto latentně infikovaných nažek se vyvíjí rostlina bez viditelných symptomů, nicméně patogen je pořád schopen dokončit svůj životní cyklus, dojde k pohlavnímu rozmnožení a vytvoření odolných oospor (Heller, 1997). Ty přetrvávají v půdě roky a z epidemiologického hlediska působí vážný problém (Spring, 2001). Lokální infekce je omezená na menší plochu, zpravidla se jedná o listy, kudy pronikl patogen do hostitelské rostliny. Lokální infekce se projevuje vznikem chloróz v oblasti, kde došlo k průniku patogenu do rostliny (Diagnostics, 2014).

3.3.2 Morfologie *Plasmopara halstedii*

Diploidní mycelium *P. halstedii* se skládá z intercelulárních bezbarvých nepřehrádkovaných hyf o průměru 6–20 μm . Na myceliu se vytváří malá haustoria kulovitě až hruškovitého tvaru o průměru 5–10 μm . Sporangiofory (viz obr. 4) prorostou za vhodných podmínek průduchy ven, zejména na abaxiální straně listu. V horní části se monopodiálně větví, vzniká 7–8 větví v pravých úhlech od hlavní osy sporangioforu.



Obr. 4: Sporangiofor *Plasmopara halstedii*. Fotografie pořízena v srpnu roku 2022.



Obr. 5: Sporangia *Plasmopara halstedii*. Fotografie pořízena v srpnu roku 2022.

Sporangiofory nesou sporangia ovoidního až elipsoidního tvaru (viz obr. 5), v nichž se mitoticky tvoří do 20 zoospor ledvinovitého tvaru. Po meiotickém dělení na jedné stélce vznikají haploidní oogonia a antheridia. Samičí oogonia mají sférický tvar a jsou bezbarvá. Samčí antheridia mají na jedné straně rozšiřující se tvar. Jejich splynutím vzniká diploidní žlutohnědá oospora sférického tvaru o velikosti 15–30 µm v průměru, jejíž stěny jsou lehce vrásčité. Oospora ve vhodných podmínkách klíčí v hyfu (Diagnostics, 2014).

3.3.3 Determinace ras *Plasmopara halstedii* a variabilita v ČR

Patogenita vyjadřuje schopnost mikroorganismu vyvolat chorobu (NZIP, 2023). Virulence vyjadřuje schopnost určité fyziologické rasy *P. halstedii* překonat obranu hostitelské rostliny kódovanou geny rezistence a vyvolat u daného genotypu hostitelské rostliny chorobu (Gulya, 2007). První fyziologické rasy byly objeveny v 70. letech 20. století a od té doby započal výzkum virulence *P. halstedii*. Zpočátku byly odlišovány pouze dvě rasy, rasa 1 neboli 'European race' a rasa 2 neboli 'Red River Valley race' (Zimmer, 1974). Určování rasy bylo založeno na schopnosti *P. halstedii* vyvolat chorobu u linií slunečnice, které nesou gen rezistence označovaný jako *Pl*. V té době neexistoval žádný standardizovaný set diferenciačních linií slunečnice ani mezinárodní názvosloví pro pojmenovávání ras *P. halstedii*, proto se stávalo, že byly dvě rozdílné rasy současně pojmenovány stejným číslem (Gulya, 2007).

Roku 2000 se začal pro identifikování ras *P. halstedii* používat standardizovaný soubor devíti veřejně dostupných linií slunečnice. Tyto tzv. diferenciační linie nesou specifické kombinace genů rezistence vůči *P. halstedii*. V závislosti na fenotypové reakci určité diferenciační linie slunečnice na přítomnost patogenu je určeno, zda je daná linie vůči patogenu náchylná, nebo rezistentní. Podle toho je dané linii přiřazeno číslo. Součet čísel v rámci tripletu diferenciačních linií udává číslici tripletového kódu. Velká výhoda v pojmenování ras pomocí tripletového kódu spočívá v tom, že tento kód nese informaci o virulenci dané rasy (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Roku 2015 došlo z důvodu rostoucí patogenní variability k navýšení z 9 na 15 diferenciačních linií slunečnic, stávající pojmenování ras zůstalo, pouze přibýly dvě číslice v rámci tripletového kódu a z trojčíselného se tedy stal pětičíselný kód, nicméně používání tohoto rozšířeného systému ještě není zavedeno všude (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2015).

Počet popsáných fyziologických ras *P. halstedii* neustále roste. V roce 2006 bylo celosvětově známo 36 fyziologických ras (Gulya, 2007), v roce 2014 jich bylo popsáných už 42 (Virányi *et al.*, 2015). V červnu roku 2014 byla u dvou vzorků pocházejících z oblasti poblíž města Podivín v České republice prokázána přítomnost dosud nepopsáných ras 705 a 715, čímž došlo k navýšení známých fyziologických ras na 44 (Sedlářová *et al.*, 2016). Roku 2018 bylo celosvětově popsáno 50 ras *P. halstedii* (Spring, 2019). Kromě rychlého navyšování počtu popsáných ras je pozorovatelný i výrazný posun směrem k více virulentním rasám (Drábková-Trojanová *et al.*, 2018; Spring, 2019; Bán *et al.*, 2021; Miranda-Fuentes *et al.*, 2021). Méně virulentní a dříve velmi hojné rasy 100, 300 a 700 byly v 90. letech 20. století postupně nahrazeny virulentnějšími rasami 310, 330, 710 a 730 (Spring, 2019). Od roku 2006 jsou nejhojněji zastoupeny rasy 700, 710, 730 a 770 (Gulya, 2007).

V České republice byly v letech 2007–2014 identifikovány rasy 700, 704, 705, 710, 714, 715. V letech 2013–2014 bylo provedeno testování pomocí rozšířeného diferenciacního souboru o 15 liniích a byly popsány rasy 700 60, 704 71, 705 71, 710 60, 714 61 a 715 71 (Drábková-Trojanová *et al.*, 2018), od roku 2014 se v ČR provádí určování rasy *P. halstedii* na tomto rozšířeném diferenciacním souboru standardně. V České republice převládala v letech 2007–2011 rasa 700, od roku 2010 rasa 710 a od roku 2013 jsou nejhojněji zastoupené rasy 704 a 714 (Sedlářová *et al.*, 2020).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Bylo testováno 35 vzorků 'plasmopara halstedii virus' pocházejících z izolátů *Plasmopara halstedii* (viz tabulka 3). Vzorky byly získány sběrem ze symptomatických rostlin v České republice v letech 2012–2021 a v Maďarsku v letech 2012–2022. Vzorky pro izolaci RNA byly odebrány ze zmražených děložních listů slunečnice (*Helianthus annuus* cv. Giganteus, cv. Peredovik a cv. Iregi szürke csíkos) se sporulací *Plasmopara halstedii*. U čtyř bezvirózních izolátů *P. halstedii* byla určována rasa, jeden z těchto bezvirózních izolátů a virózní izolát H5-22 sloužily pro přenos PhV (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Seznam izolátů *Plasmopara halstedii* pro určování rasy a přenos PhV.

| Název izolátu | Země, lokalita původu | Rok sběru |
|-------------------------|------------------------|-----------|
| 2104 ^{a, c} | ČR, Přelíc | 2021 |
| 2107 ^{a, c} | ČR, Nová Ves u Mělníka | 2021 |
| 2109 ^{a, b, c} | ČR, Nová Ves u Mělníka | 2021 |
| 2110 ^{a, c} | ČR, Přelíc | 2021 |
| H5-22 ^{b, c} | Maďarsko | 2014 |

^a – izoláty pro určení rasy; ^b – izoláty pro přenos PhV, ^c – v rámci této práce byla testována přítomnost PhV

Tabulka 3: Seznam izolátů PhV.

| Název izolátu | Země, lokalita původu | Rok sběru |
|----------------------|---------------------------------|------------------|
| 1405 | ČR, Podivín | 2014 |
| 1416 | ČR, Olomouc-Holice | 2014 |
| 1605 | ČR, Lednice, ÚKZÚZ ^b | 2016 |
| 1608 | ČR, Olomouc-Holice | 2016 |
| 1610 | ČR, Olomouc-Holice | 2016 |
| 1611 | ČR, Olomouc-Holice | 2016 |
| 1708 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1709 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1710 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1711 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1712 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1713 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1714 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1715 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1716 | ČR, Olomouc-Holice | 2017 |
| 1718 | ČR, Kroměříž, ZVÚ ^a | 2017 |
| 1720 | ČR, Hustopeče u Brna | 2017 |
| 1721 | ČR, Kroměříž, ZVÚ ^a | 2017 |
| 1801 | ČR, Kroměříž, soukromá zahrada | 2018 |
| 1901 | ČR, Lednice, ÚKZÚZ ^b | 2019 |
| 1904 | ČR, Lednice, ÚKZÚZ ^b | 2019 |
| 1905 | ČR, Lednice, ÚKZÚZ ^b | 2019 |
| 1906 | ČR, Lednice, ÚKZÚZ ^b | 2019 |
| H1 | Maďarsko | 2014 |
| H2 | Maďarsko | 2014 |
| H3 | Maďarsko | 2014 |
| H4 | Maďarsko | 2016 |
| H5 | Maďarsko | 2016 |
| H7 | Maďarsko | 2014 |
| H9 | Maďarsko | 2014 |
| H10 | Maďarsko | 2014 |
| H11 | Maďarsko | 2012 |
| H12 | Maďarsko | 2014 |
| H13 | Maďarsko | 2012 |
| H14 | Maďarsko | 2014 |

^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)
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas; kat. č. SM0243)
- GeneRuler™ 100 bp+ DNA Ladder (Fermentas, kat. č. SM0323)
- dNTP Mix (10 mmol·l⁻¹ each) (Fermentas; kat. č. R0192)
- Ethidium bromide (EB), (10 µg·ml⁻¹ in H₂O) (Biotium; kat. č. 40042)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium; kat. č. 41002)
- MyFi™ Mix (Bioline; kat. č. BIO-25049)
- 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)
- 6× DNA Loading Dye (Fermentas; kat. č. R0611)
- Deionizovaná voda

Použité soupravy

- Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corporation; kat. č. 25 800)
- Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems; kat. č. 4337458)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel; kat. č. 740609.50)
- FastGene Gel/PCR Extraction Kit (kat. č. FG-91302)

Použité roztoky a jejich příprava

- 50x TAE (Tris-Acetate-EDTA): 242 g Tris base rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, 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.
- 1% KOH.

Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Biofuge pico (Heraeus)
- Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)
- Chromafil CA-45/25 (S) (Macherey-Nagel; kat. č. 729025)
- 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 T100TM Thermal Cyclcer (BIO-RAD)
- Thermocycler T personal (Biometra)
- Uhelon 130 T extra (Silk Progress)
- UV-transluminátor UVT-14 L (Herolab)
- Váhy EK 200G (A&D Engineering)
- Výrobník 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)
- Techne DB-2D Dri-Block Heater
- ultrazvuková lázeň

4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy pro molekulárně genetickou charakteristiku PhV

4.3.1 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována z listů slunečnice infikovaných *Plasmopara halstedii* pomocí kitu Plant/Fungi Total RNA Purification (Norgen Biotek Corp.), podle pokynů výrobce.

Před izolací byl připraven čerstvý lyzační pufr (Lysis Buffer C) přidáním 2-merkaptoethanolu (Serva) v poměru 1:100. 50 mg listu bylo homogenizováno v 600 μ l připraveného pufru za použití FastPrep24 homogenizátoru (MP Biomedicals) pomocí Lysis Matrix A při rychlosti $5,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 45 s. Homogenát byl poté inkubován po dobu 5 min při teplotě $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Lyzát byl přemístěn do filtrační kolonky, která byla vložena do sběrné zkumavky, a centrifugován 5 min při 14 000 rpm. Supernatant byl přesunut do čisté zkumavky a bylo k němu přidáno stejné množství 98% ethanolu a vzorek byl promíchán na vortexu.

Roztok byl následně přemístěn na spin kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 min při 6 000 rpm. Po odstranění filtrátu bylo na kolonku přidáno 400 μ l promývacího roztoku (Wash Solution A), vzorek byl centrifugován 1 min při 14 000 rpm a filtrát byl následně odstraněn. Toto promytí bylo opakováno dvakrát, poté byla kolonka centrifugována 2 min při 14 000 rpm.

Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5ml eluční zkumavky, bylo přidáno 50 μ l elučního roztoku (Elution Solution A) a vzorek byl centrifugován 2 min při 2 000 rpm a následně 1 min při 14 000 rpm. Izolovaná RNA byla dlouhodobě uchovávána při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

4.3.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do komplementární DNA reverzní transkripcí pomocí BioScript Reverse Transcriptase (Bioline) a Random Hexamer Primers (Bioline). Byly připraveny dvě reakční směsi (viz tabulka 4). K 8 μ l reakční směsi I byly přidány 2 μ l (300–500 ng) RNA. Reakční směs I s RNA byla inkubována při $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min a následně přesunuta na led. Ke každému vzorku bylo přidáno 20 μ l reakční směsi II (složení viz tabulka 4). Vzorky byly vloženy do termocycleru (Thermocycler T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD))

a reverzní transkripce proběhla za následujících podmínek: 25 °C/10 min, 42 °C/30 min a 85 °C/5 min.

Tabulka 4: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci.

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

4.3.3 Polymerázová řetězová reakce

4.3.3.1 Detekce PhV

Virová cDNA byla detekována metodou PCR amplifikace za použití MyTaq DNA Polymerase a primerů specifických pro obě virové molekuly; pro detekci RNA1, virové RdRp byly použity primery PHV_RdRp_polF1 a PHV_RdRp_polR1 a pro detekci RNA2, genu pro plášťový protein primery PHV_WG_F2 a PHV_WG_R2 (sekvence primerů viz tabulka 5). Reakční směs (rozpis viz tabulka 6) byla rozpipetována po 23 μl do 200μl mikrozkušavek a do každé mikrozkušavky byly přidány 2 μl templátové cDNA. Po promíchání reakční směsi se vzorkem byly zkušavky umístěny do termocykleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek uvedených v tabulce 7. PCR produkty byly uchovávány při -20 °C.

Získané PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací v 1,5% agarózovém gelu (Agarose for DNA Electrophoresis; Serva) v 1× TAE pufru. Do 50 ml předem připraveného rozehřátého agarózového gelu byly přidány 2 μl interkalačního barviva (GelRed Nucleic Acid Stain; Biotium) a gel byl následně přelit do elektroforetické vany (HU10 MINI; Scie-Plas). Po ztuhnutí byl gel převrstven studeným 1× TAE puforem. Do první jamky byl napipetován 1 μl markeru molekulové hmotnosti (GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder; Fermentas), do ostatních

jamek pak byly napipetovány 3 μl PCR produktu. Elektroforetická separace probíhala při napětí 80 V (zdroj stejnosměrného proudu MS Major Science, MP-250V) po dobu 30–45 min. Po proběhnutí elektroforetické separace byly PCR produkty vizualizovány pomocí dokumentačního systému G:BOX (Syngene).

Tabulka 5: Sekvence primerů použitých při detekci PhV.

| Název primeru | Sekvence 5'–3' | Orientace primeru | Velikost PCR produktu [bp] |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------|
| PHV_RdRp_polR1 ^{a, b} | TAACACTGATTTTTCCCGCTTTGA | forward | 300 bp |
| PHV_RdRp_polF1 ^{a, b} | CATATGGCCTCCGGAAGACAATC | reverse | |
| PHV_WG_F2 ^c | GCGGGCTCTGCTTATGGA | forward | 500 bp |
| PHV_WG_R2 ^{a, b} | GGGTTCTCTTTGGGATCACATTC | reverse | |

Reference: ^a – Grasse *et al.*, 2013, ^b – Grasse *et al.*, 2015, ^c – nepublikováno

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci za použití MyTaq DNA Polymerase.

| Položka | Koncentrace pracovního roztoku | Konečná koncentrace | Pipetovaný objem [μl] (jeden test) |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Pufř | 5 \times | 1 \times | 5 |
| Voda | | | 17,3 |
| Forward primer | 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,25 |
| Reverse primer | 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,25 |
| Taq polymeráza | 5 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ | 1 U $\cdot\text{reakce}^{-1}$ | 0,2 |
| Celkový objem reakce | | | 23 |

Tabulka 7: Podmínky PCR reakce při detekci PhV a při amplifikaci genomických úseků PhV.

| Proces | Teplota | Doba trvání | Počet cyklů |
|----------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Počáteční denaturace | 95 °C | 120 s | 1 |
| Denaturace | 95 °C | 30 s | 35 |
| Nasedání primerů | 58 °C | 30 s | |
| Syntéza | 72 °C | 30 s | |
| Terminace | 72 °C | 300 s | 1 |

4.3.3.2 Amplifikace genomických úseků

Vlastní PCR amplifikace probíhala obdobně jako při detekci viru za využití specifických primerů (sekvence primerů viz tabulka 8). Použité kombinace primerů jsou uvedeny v tabulce 9 (mapa nasedání primerů viz obr. 6 a 7). V závislosti na velikosti očekávaných produktů byla připravena reakční směs, pro amplikony ≤ 1500 bp byla použita MyTaq DNA Polymerase (složení viz tabulka 6), pro amplikony > 1500 bp byla amplifikace provedena pomocí MyFiTM Mix (Bioline; složení viz tabulka 10). Jako templát byly v obou případech použity 2 μ l cDNA. Podmínky amplifikační reakce se lišily v závislosti na zvolených primerech a délce amplikonu (viz tabulka 11). Teplota nasedání primerů se lišila podle zvolených primerů (viz tabulka 9) a doba trvání syntézy závisela na délce amplikonu, přičemž délka amplifikačního kroku byla prodloužena o 30 s na každých 500 bp délky PCR produktu. PCR produkty byly dlouhodobě uchovávány při -20 °C.

Tabulka 8: Seznam použitých primerů.

| Název primeru | Sekvence 5'–3' | Pozice* | T _m primerů [°C] |
|-------------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------|
| RNA1 (RdRp) | | | |
| PhV_RdRp_UTR5_F2 ^b | ATCACGCAGAGTACACTATG | 2–21 | 54,72 |
| PhV-RdRp_73F | GTGGTTGGCCTTGCGAC | 73–89 | 58,96 |
| PhV-RdRp_570F | TTACCGTGTTGCTGGAGGTG | 570–589 | 60,25 |
| PHV_pol_F5 ^b | TTCCCGGTTTAAAATCGTGAG | 822–842 | 54,55 |
| PhV-RdRp_1072R | CTGGTAGTTTCTGCGAATGGT | 1072–1052 | 58,30 |
| PhV-RdRp_1264R | CATCTACTATGCGCCAGCAA | 1264–1244 | 60,54 |
| PHV_pol_R1 ^{a, b} | TAACACTGATTTTTCCCGCTTTGA | 1674–1697 | 59,42 |
| PHV_pol_R5 ^b | TCAGGTCGGAAAGCCAATAA | 1763–1744 | 56,84 |
| PHV_pol_F2 ^b | TCCGACCTGAATACACGAATGA | 1754–1775 | 59,24 |
| PHV_pol_F1 ^{a, b} | CATATGGCCTCCGGAAGACAATC | 1968–1946 | 61,11 |
| PHV_pol_R2 ^b | GGTCCATAAAGCCGTTCAAA | 2144–2124 | 58,84 |
| PhV-RdRp_2230F | CGGACCACAAATATCCAGAA | 2230–2249 | 55,15 |
| PhV-RdRp_2349R | ATATCTTGCCGGGAGGTGTG | 2349–2330 | 59,53 |
| PHV_pol_R7 ^b | GGGCTTCCTGCGGTTTG | 2754–2738 | 58,62 |
| PhV_RdRp_UTR3_R2 ^b | TGGATACTTAGGACATTGGC | 2792–2773 | 54,51 |
| RNA2 (CP) | | | |
| PhV_Coat_UTR5_F1 ^b | TAAACAGCCCCGACGCAG | 32–49 | 60,05 |
| PHV_WG_F2 ^c | GCGGGCTCTGCTTATGGA | 174–191 | 59,49 |
| PHV_WG_F1 ^{a, b} | TCAAGGGATCGATCGTATTCACA | 355–377 | 59,37 |
| PHV_WG_R2 ^{a, b} | GGGTTCTCTTTGGGATCACATTC | 679–657 | 59,3 |
| PhV-CP_1019F | CAGATGGACAGAAACGGGAG | 1019–1038 | 58,00 |
| PhV_Coat_UTR3_R4 ^b | TCGCCTATGCGGGTCTCC | 1526–1509 | 61,22 |

Reference: ^a – Grasse *et al.* (2013); ^b – Grasse *et Spring* (2015); ^c – nepublikováno; neoznačené primery byly navrženy v této práci.

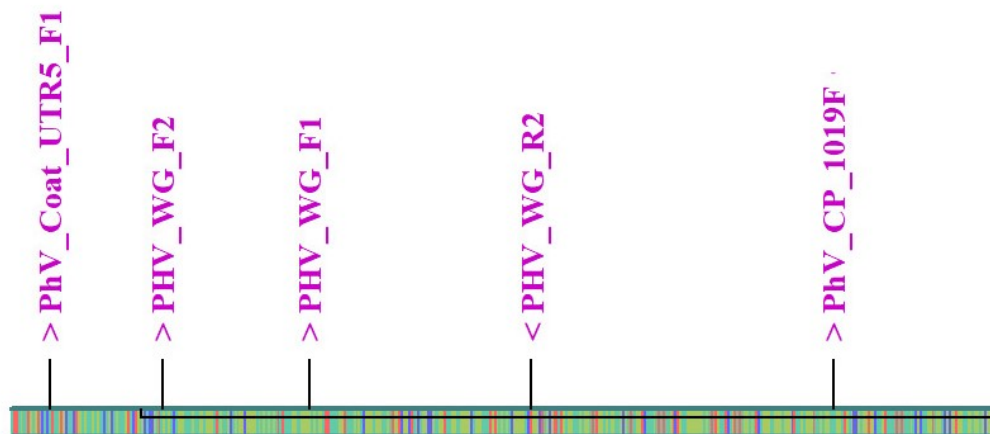
* – pozice vůči referenční sekvenci (GenBank Acc. No. HM453713.1 a HM453718.1)

Tabulka 9: Kombinace primerů použitých při amplifikaci genomických fragmentů.

| Název primerů | Velikost PCR produktu [bp] | T _m primerů [°C] |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| RNA1 (RdRp) | | |
| PhV_RdRp_UTR5_F2/PhV-RdRp_1264R | 1262 | 54 |
| PhV_RdRp_UTR5_F2/PHV_pol_R5 | 1761 | 55 |
| PhV_RdRp_UTR5_F2/ PHV_pol_F1 | 1966 | 54 |
| PhV_RdRp_UTR5_F2/ PhV_RdRp_UTR3_R2 | 2790 | 54 |
| PhV-RdRp_73F/ PhV-RdRp_1072R | 999 | 58 |
| PhV-RdRp_570F/ PhV-RdRp_1072R | 502 | 58 |
| PhV-RdRp_570F/PHV_pol_F1 | 1398 | 60 |
| PHV_pol_F5/PhV_RdRp_UTR3_R2 | 1970 | 54 |
| PHV_pol_R1/ PHV_pol_F1 | 294 | 59 |
| PHV_pol_R1/ PHV_pol_R2 | 470 | 58 |
| PHV_pol_R1/PHV_pol_R7 | 1080 | 58 |
| PHV_pol_R1/PhV_RdRp_UTR3_R2 | 1118 | 54 |
| PHV_pol_F2/ PhV-RdRp_2349R | 595 | 59 |
| PHV_pol_F2/ PHV_pol_R7 | 1000 | 58 |
| PHV_pol_F2/PhV_RdRp_UTR3_R2 | 1038 | 54 |
| PhV-RdRp_2230F/ PHV_pol_R7 | 524 | 55 |
| RNA2 (CP) | | |
| PhV_Coat_UTR5_F1/ PHV_WG_R2 | 647 | 58 |
| PhV_Coat_UTR5_F1/PhV_Coat_UTR3_R4 | 1492 | 58 |
| PHV_WG_F2/ PHV_WG_R2 | 505 | 59 |
| PHV_WG_F2/ PhV_Coat_UTR3_R4 | 1352 | 58 |
| PHV_WG_F1/ PhV_Coat_UTR3_R4 | 1171 | 58 |
| PhV-CP_1019F/ PhV_Coat_UTR3_R4 | 507 | 58 |



Obr. 6: Mapa nasedání primerů na molekulu RNA1 (kódující RdRp) PhV izolátu Ph8-99 (Acc. No. HM453713.1). Jednotlivé primery označeny názvem a orientací (> forward, < reverse).



Obr. 7: Mapa nasedání primerů na molekulu RNA2 (kódující CP) PhV izolátu Ph8-99 (Acc. No. HM453718.1). Jednotlivé primery označeny názvem a orientací (> forward, < reverse).

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genomických úseků PhV za použití MyFiTM Mix.

| Položka | Koncentrace pracovního roztoku | Konečná koncentrace | Pipetovaný objem [μl] (jeden test) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Pufr | 2× | 1× | 12,5 |
| Voda | | | 10 |
| Forward primer | 20 μmol·l ⁻¹ | 0,2 μmol·l ⁻¹ | 0,25 |
| Reverse primer | 20 μmol·l ⁻¹ | 0,2 μmol·l ⁻¹ | 0,25 |
| Celkový objem reakce | | | 23 |

Tabulka 11: Podmínky PCR reakce při amplifikaci genomických úseků PhV.

| Proces | Teplota | Doba trvání | Počet cyklů |
|----------------------|---------|-------------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 °C | 120 s | 1 |
| Denaturace | 95 °C | 30 s | |
| Nasedání primerů | * | 30 s | 35 |
| Syntéza | 72 °C | 30 s** | |
| Terminace | 72 °C | 300 s | 1 |

*Teplota nasedání primerů se lišila podle zvolených primerů (viz tabulka); **Délka amplifikačního kroku byla prodloužena o 30 s na každých 500 bp délky PCR produktu.

4.3.4 Elektroforetická separace PCR produktů

Získané PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací, PCR produkty ≤ 1000 bp byly rozděleny v 1,5% agarózovém gelu (Agarose for DNA Electrophoresis; Serva) v 1× TAE pufru a PCR produkty > 1000 bp byly rozděleny v 1% agarózovém gelu (Agarose for DNA Electrophoresis; Serva) v 1× TAE pufru. PCR produkty byly vizualizovány pomocí interkalačního barviva GelRed (GelRed Nucleic Acid Stain; Biotium).

Do 50 ml předem připraveného rozeřátého agarózového gelu byly přidány 2 μl interkalačního barviva (GelRed Nucleic Acid Stain; Biotium) a gel byl následně přelit do elektroforetické vany (HU10 MINI; Scie-Plas). Po ztuhnutí byl gel převrstven studeným 1× TAE puforem. Do první jamky byl napipetován 1 μl markeru molekulové hmotnosti (pro PCR produkty ≤ 1000 bp GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder, Fermentas; pro PCR produkty > 1000 bp GeneRulerTM 100+ bp DNA Ladder, Fermentas), do ostatních jamek pak byly napipetovány 3 μl PCR produktu. Elektroforetická separace probíhala při napětí 80 V (zdroj

stejnoseměrného proudu MS Major Science, MP-250V) po dobu 30–45 min. Po proběhnutí elektroforetické separace byly PCR produkty vizualizovány pomocí dokumentačního systému G:BOX (Syngene).

4.3.5 Izolace PCR produktu pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up

Pokud byla koncentrace PCR produktu vizuálně vyhodnocena jako vysoká, byl PCR produkt izolován pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) kitu podle doporučení výrobce.

Byl připraven pracovní roztok pufru NTI v poměru 1:5 s deionizovanou vodou, v množství odpovídajícím počtu izolovaných vzorků. PCR vzorek byl doplněn do celkového objemu 100 μ l, následně bylo přidáno 200 μ l NTI pufru. Směs byla promíchána pipetováním a celý objem mikrozkušavky byl přepipetován do NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kolonky umístěné ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 min při 11 000 rpm.

Po odstranění filtrátu bylo na kolonku přidáno 700 μ l NT3 pufru a vzorek byl centrifugován 1 min při 11 000 rpm. Promývací krok byl zopakován. Po odstranění filtrátu po druhém promývání byla membrána kolonky vysušena centrifugací nasucho při 11 000 rpm po dobu 2 min. Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5ml eluční zkumavky, na membránu bylo napipetováno 20 μ l deionizované vody a kolonka byla centrifugována 1 min při 11 000 rpm. Koncentrace DNA byla stanovena fluorimetricky (Fluorimetr DyNa Quant 200; Hoefer) a izolovaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

4.3.6 Izolace PCR produktu z gelu pomocí kitu FastGene Gel/PCR Extraction Kit

Pokud byla koncentrace PCR produktu vizuálně hodnocena jako nízká, byl PCR produkt izolován z gelu pomocí FastGene Gel/PCR Extraction kitu podle doporučení výrobce.

Do 75 ml rozehřátého 1% agarózového gelu bylo přidáno 5 μ l ethidium bromidu ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a gel byl přelit do elektroforetické vany (HU10 MINI; Scie-Plas). Po ztuhnutí byl gel převrstven studeným $1\times$ TAE puftrem. Do první jamky byl nanesen 1 μ l markeru molekulové hmotnosti (GeneRulerTM 100+ bp DNA Ladder; Fermentas) a do dalších jamek byl napipetován veškerý PCR produkt, jeden PCR produkt rozdělen do dvou jamek. Elektroforetická separace probíhala při 80 V minimálně 45 min

Po proběhnutí elektroforetické separace byl gel přemístěn na UV-transiluminátor (UVT-14 L; Herolab) a každý PCR produkt byl sterilním skalpelem vyříznut a umístěn do 1,5ml mikrozkušavky. Do každé zkumavky bylo přidáno 500 μ l GP1 pufru a mikrozkušavky byly inkubovány 10 min při 55 °C. Po inkubaci byl celý obsah zkumavky nanesen na kolonku umístěné ve sběrné zkumavce a kolonka byla centrifugována 1 min při 13 000 rpm. Filtrát byl odstraněn, do kolonky bylo přidáno 600 μ l promývacího pufru GP2 a kolonka byla centrifugována 1 min při 13 000 rpm. Po odstranění filtrátu byl promývací krok zopakován. Po odstranění filtrátu po druhém promývání byla membrána kolonky vysušena centrifugací nasucho při 13 000 rpm po dobu 2 min. Kolonka byla přemístěna do čisté 1,5ml eluční zkumavky, na membránu bylo napipetováno 20 μ l elučního pufru GP3 a kolonka byla centrifugována 2 min při 13 000 rpm. Koncentrace DNA byla stanovena fluorimetricky (Fluorimetr DyNa Quant 200; Hofer) a izolovaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

4.3.7 Sekvenační značení

Sekvenační značení bylo provedeno pomocí Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems).

Byla připravena reakční směs tak, že byla smíchána Big Dye Terminator v. 3.1 polymeráza s pufrem v poměru 1:1 μ l. Do reakční směsi byly přidány 2 μ l sekvenačního primeru o koncentraci 1,6 pmol μ g \cdot ml⁻¹. Do reakce bylo přidáno 20–50 ng DNA v závislosti na velikosti amplikonu v celkovém objemu 6 μ l. Pro sekvenování byly použity koncové primery, které byly použity pro amplifikaci fragmentů (viz kapitola 4.3.3.2, tabulka 8), v případě delších fragmentů byly pro sekvenování použity i další primery nasedající do jejich vnitřní oblasti (viz obr. 6 a 7).

Mikrozkušavky byly vloženy do termocycleru, ve kterém proběhla reakce za podmínek, viz tabulka 12. Vzorke byly následně sekvenovány pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 3730 na pracovišti ÚEB AV ČR v Olomouci.

Tabulka 12: Podmínky sekvenačního značení.

| Proces | Teplota | Doba trvání | Počet cyklů |
|----------------------|---------|-------------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 °C | 60 s | 1 |
| Denaturace | 95 °C | 10 s | |
| Nasedání primerů | 50 °C | 5 s | 40 |
| Syntéza | 60 °C | 240 s | |
| Terminace | 60 °C | 300 s | 1 |

4.3.8 Bioinformatická analýza

Primery pro amplifikaci a sekvenační značení byly navrženy pomocí programu Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). V programu pDraw ver. 1.1.149 (AcaClone) byla vytvořena genomická mapa s místy nasedání primerů (viz obr. 6 a 7). Teploty nasedání primerů (viz tabulka 8) byly zjištěny pomocí programu Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

Výstupní sekvenční data byla sestavena do kontigů pomocí programů SeqMan Lasergene (DNAStar, Inc.) a Geneious Prime 2023.0.4. Identita získaných kontigů byla ověřena pomocí programu BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) vůči nr databázi NCBI. U studovaných izolátů byla vyhodnocena genetická variabilita a procentuální identita genomických a aminokyselinových sekvencí porovnáním sekvencí mezi sebou, se sekvencemi PhV izolátů dostupnými v databázi GenBank a s dalšími vybranými viry (viz tabulka 13) za využití p-distance analýzy v programu MEGA v. 11.0 (Tamura *et al.*, 2021). Viry byly vybrány na základě toho, že jednotlivé genové produkty PhV vykazují podobnost s proteiny různých virových čeledí – RdRp PhV odpovídá RdRp virů čeledi *Nodaviridae* a CP PhV odpovídá CP virů čeledi *Tombusviridae*. Další viry byly vybrány na základě podobnosti zjištěné v předchozích studiích (Grasse *et Spring*, 2017).

Genetická variabilita byla vizualizována pomocí 'heat mapy' vytvořené v programu Microsoft Excel 2010. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi PhV dostupnými v databázi GenBank a případně dalšími příbuznými sekvencemi pomocí mnohočetného alignmentu na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí, pomocí programu ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Získaný mnohočetný alignment byl použit pro fylogenetickou analýzu. Haplotypová síť byla konstruována pomocí algoritmu Median Joining Network programu PopArt (Leigh *et Bryant*, 2015). Fylogenetické analýzy genomických sekvencí byly provedeny pomocí maximum parsimony algoritmu s bootstrap opakováním 1000. Pomocí

algoritmu Modeltest byl jako nejvhodnější vyhodnocen pro aminokyselinové sekvence model JTT (Jones *et al.*, 1992). Fylogenetické analýzy aminokyselinových sekvencí byly provedeny pomocí neighbor-joining algoritmu s bootstrap opakováním 1000 (Felsenstein, 1985; Saitou *et Nei*, 1987). Fylogenetické stromy byly vizualizovány pomocí programu Tree Explorer (všechny analýzy MEGA v. 11.0).

Tabulka 13: Seznam sekvencí virových izolátů použitých v bioinformatických analýzách a jejich GenBank Accession Numbers.

| Název viru (zkratka)/název izolátu | RNA1 | RNA2 |
|--|-------------|-------------|
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph8-99 | HM453713.1 | HM453718.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph1-00 | -- | HM453721.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph10-00 | -- | HM453725.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph19-01 | -- | HM453719.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph1-97 | -- | HM453723.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph4-93 | -- | HM453722.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph9-98 | -- | HM453720.1 |
| plasmopara halstedii virus A (PhV)/Ph5-05 | -- | HM453724.1 |
| bat associated nodavirus ^a (BGaV) | MT734811.1 | -- |
| mosinivirus ^a (MoNV) | KJ632942.1 | -- |
| pariacoto virus ^a (PaV) | AF171942.1 | -- |
| nodamura virus ^a (NoV) | NC_002690.1 | NC_002691.1 |
| flock house virus ^a (FHV) | NC_004146.1 | -- |
| sclerophthora macrospora virus ^c (SmV-A) | NC_005817.1 | -- |
| lake sinai virus 1 ^c (LSV-1) | NC_035466.1 | -- |
| hibiscus chlorotic ringspot virus ^b (HCRSV) | -- | OP779319.1 |
| pelargonium leaf curl virus ^b (PLCV) | -- | HM461992.1 |
| tomato bushy stunt virus ^b (TBSV) | -- | M21958.1 |
| cucumber bulgarian latent virus ^b (CBV) | -- | KJ572966.1 |
| pothos latent virus ^b (PoLV) | -- | NC_000939.2 |
| neckar river virus ^b (NRV) | -- | MZ130936.1 |
| pear latent virus ^b (PeLV) | -- | AY100482.1 |
| tobacco necrosis virus A ^b (TNV-A) | -- | AY546104.1 |
| olive mild mosaic virus ^b (OMMV) | -- | KY769774.1 |
| lake sinai virus 1 ^c (LSV-1) | -- | NC_035466.1 |
| tombunodavirus UC1 ^c (ToNoV) | -- | KF510030.2 |
| sclerophthora macrospora virus A ^c (SmV-A) | -- | NC_005818.1 |
| chimeric virus 14 ^c (ChiV-14) | -- | NC_027196.1 |

^a – viry čeledi *Nodaviridae*, ^b – viry čeledi *Tombusviridae*, ^c – nezařazené viry

4.4 Metodika stanovení ras *Plasmopara halstedii* a test přenosu PhV

4.4.1 Množení *P. halstedii*

Množení izolátů *P. halstedii* bylo prováděno metodou „whole seedling inoculation” (WSI) na kultivarech slunečnice roční *Helianthus annuus* cv. Giganteus, cv. Peredovik a cv. Iregi szürke csíkos, jež postrádají geny rezistence a jsou tedy náchylné vůči napadení dosud známými *P. halstedii*. Práce s izoláty byla prováděna podle postupu, který publikovali v Trojanová *et al.* (2017).

Semena náchylného kultivaru *H. annuus* byla desinfikována 10% roztokem Sava s několika kapkami detergentu po dobu 10–15 min, propláchnuta kohoutkovou vodou a umístěna do plastové krabičky s vlhkou vrstvou buničiny a filtračního papíru. Semena klíčila 2–3 dny při teplotě 19°C ve tmě. Pro inokulaci byla vybrána semena bez známek poškození či bakteriální infekce s kořeny dlouhými 1–2 cm a zbavena osemení.

Inokulum bylo připravováno buď z čerstvých, nebo zamražených děložních listů slunečnice se sporulací *P. halstedii* (cca 4 děložní listy se sporulací/5 ml destilované vody). Suspenze sporangií byla zkontrolována světelným mikroskopem a hustota inokulace upravena na cca 10 000 životaschopných sporangií na 1 ml vody.

Do připraveného inokula byla vložena naklíčená semena tak, aby byla celá ponořená. Inokulace probíhala 2–5 hod ve tmě při 19 °C. Po inokulaci byla semena rovnoměrně vysazena do květináčů do ¾ naplněných perlitem. Květináče byly označeny a umístěny do beden odděleně podle izolátů tak, aby v jedné bedně byly pouze rostliny inokulované jedním izolátem. Inokulované rostliny byly pěstovány ve fytotronu při teplotě 19 °C s fotoperiodou 12/12 hod 11 dní. Prvních 24 hod byly bedny s květináči přiklopeny víkem, aby byly rostliny ve tmě. Pro vyvolání sporulace vyžaduje *P. halstedii* 100% vlhkost po dobu minimálně 8 hod a tmu. Jedenáctý den byly rostliny navlhčeny vodou a i s květináči umístěny do igelitového pytle. Rostliny byly do dalšího dne uchovávány ve tmě.

Děložní listy se sporulací bylo možno použít pro experimenty, další inokulaci nebo uchovat v –20 °C pro pozdější využití.

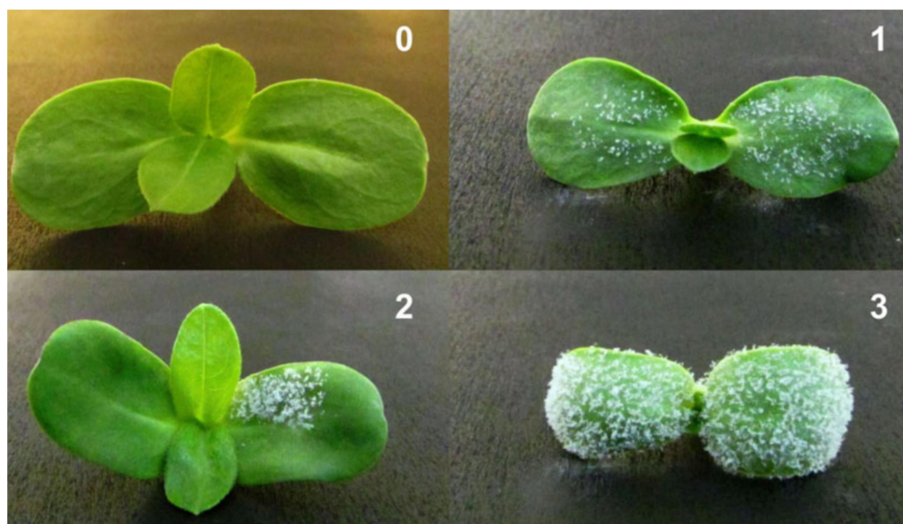
4.4.2 Testování ras *P. halstedii* na diferenciačním souboru slunečnic metodou SDI

Rasy izolátů *P. halstedii* (viz tabulka 2) byly určovány metodou „soil drench inoculation” (SDI; Trojanová *et al.*, 2017) na diferenciačním souboru slunečnic. Na tyto tzv. patotesty bylo používáno 15 genotypů *H. annuus* tvořících 5 tripletů (HA-304, RHA-265, RHA-274; PMI-3, PM-17, 803-1; HAR-4, QHP-2, HA-335; Y7Q, PSC8, XA; PSS2RM, VAQ, RHA-419) a jedna kontrolní linie (*Helianthus annuus* cv. Giganteus, resp. cv. Peredovik). Semenáčky jednotlivých genotypů *H. annuus* byly připravovány podle postupu, viz kapitola 4.4.1. Na táč naplněný navlhčeným perlitem byla v řadách vysázena naklíčená semena, minimálně 10 semen na každou diferenciační linii. Semena byla sázena do perlitu kořenem dolů tak, aby část semene vyčnívala na povrch perlitu.

Inokulum bylo připravováno stejně, jako je popsáno v kapitole 4.4.1. Pomocí Bürkerovy komůrky byla spočítána koncentrace inokula za použití vzorce $\frac{x \cdot 1000}{0,04 \cdot 0,1 \cdot 12} = \text{počet sporangií} \cdot \text{ml}^{-1}$, kde x = počet částic v úhlopříčce Bürkerovy komůrky (12 počítaných čtverců). Následně se spočítal objem inokula, které obsahovalo 10 000 životaschopných zoosporangií. Optimální objem byl rozmezí 20–30 μl , případně bylo inokulum dodatečně naředěno nebo zahuštěno přidáním děložního listu se sporulací a setřepáním zoosporangií pomocí třepačky.

Na každý semenáček byl nanesen daný objem inokula s 10 000 zoosporangií. Semenáčky byly po inokulaci překryty perlitem. Celý táč byl umístěn do bedny a inokulované rostliny byly pěstovány ve fytotronu při teplotě 19 °C s fotoperiodou 12/12 hod asi 11 dní. Prvních 24 hod byly rostliny uchovávány ve tmě. Rostliny byly zalévány každý den. Jedenáctý den rostliny navlhčeny vodou a dalších 24 hod byly rostliny uchovávány ve tmě.

Pomocí semikvantitativní stupnice byla vyhodnocena míra napadení rostlin *P. halstedii*. Podle procenta plochy listů se sporulací *P. halstedii* byl rostlině přiřazen stupeň napadení v rozmezí hodnot 0–3 (viz obr. 8).



Obr. 8: Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *Plasmopara halstedii*. Převzato z Trojanová *et al.* (2017). 0 – žádná viditelná sporulace na listech, 1 – omezená sporulace, 2 – < 50 % povrchu děložních listů pokryto sporulací, 3 – > 50 % povrchu děložních listů pokryto sporulací.

Po určení stupně napadení každé rostliny v každé diferenciační linii byla stanovena míra napadení jednotlivých diferenciačních linií. Pro výpočet byl použit vzorec $P = \frac{\sum n \cdot v}{x \cdot N} \cdot 100 [\%]$, kde P je celková míra napadení, n je počet rostlin daného stupně napadení, v je stupeň napadení (0–3), x je rozmezí hodnot stupnice napadení (v tomto případě 3) a N je celkový počet rostlin v dané diferenciační linii (minimálně 10). Pokud bylo procentuální napadení vyšší než 60 %, byla rostlina vyhodnocena jako náchylná vůči napadení *P. halstedii*, pokud bylo napadení nižší než 40 %, byla rostlina vyhodnocena jako rezistentní. Pokud bylo procentuální napadení v rozmezí 40–60 %, bylo potřeba patotest opakovat. K tomu, aby byl patotest vyhodnocen jako prokazatelný, bylo potřeba, aby míra napadení kontrolní linie byla vyšší než 70 %.

Na závěr byl stanoven pětimístný kód virulence, který označoval výslednou rasu daného izolátu. Pokud byla první linie tripletu vyhodnocena jako náchylná, odpovídala jí hodnota 1. Pokud byla druhá linie tripletu vyhodnocena jako náchylná, byla jí přiřazena hodnota 2, pokud byla jako náchylná vyhodnocena třetí linie tripletu, byla jí přiřazena hodnota 4. Kód virulence byl poté spočítán sečtením hodnot přiřazeným v rámci tripletu.

4.4.3 Přenos PhV

Přenos viru proběhl podle upraveného postupu uvedeného v Grasse *et al.* (2013). Pro přenos byl zvolen bezvirózní izolát 2109 a donorem virózních zoosporangií byl izolát H5-22. K přenosu virózních zoosporangií byly použity čerstvé děložní listy izolátu H5-22, tento izolát byl přemnožen postupem uvedeným v kapitole 4.4.1. Předem bylo naklíčeno 65 semen náchylného kultivaru *Helianthus annuus* (cv. Iregi szürke csíkos).

Pro infikování bezvirózního izolátu *P. halstedii* byla získána zoosporangia z virózního izolátu. Z 6 čerstvých děložních listů izolátu H5-22 byla zoosporangia smyta do přibližně 5 ml vody. Postupnou centrifugací a odstraňováním supernatantu bylo inokulum zahuštěno, dále se pracovalo s asi 600 μl koncentrovaného inokula. Zoosporangia byla rozdrčena v ultrazvukové lázni (60 kHz, 5 min). Stav zoosporangií byl zkontrolován pod mikroskopem, protože nedošlo k porušení zoosporangií a uvolnění zoospor, bylo potřeba rozdrčit zoosporangia mechanicky. Mechanická homogenizace proběhla v homogenizátoru FastPrep 24 (MP Biomedicals) při rychlosti $5,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 30 s. Opět byl stav zoosporangií zkontrolován pod mikroskopem a protože stále nebyla většina zoosporangií porušena, bylo potřeba homogenizovat dál za přísnějších podmínek. Proběhla tedy znovu mechanická homogenizace, ale při rychlosti $6,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 40 s. Homogenizace byla ještě jednou zopakována. Homogenát byl filtrován přes uhelon o velikosti ok 25/30 μm (uhelon 130 T extra; Silk Progress) pro odstranění zbytků buněk. Filtrát byl zkontrolován pod mikroskopem, v ideálním případě nebyla pozorována žádná zoosporangia. Polovina filtrátu byla rovnou použita na přenos viru, druhá polovina byla ještě filtrována přes Chromafil CA-45/25 (Macherey-Nagel) o velikosti ok 0,45 μm . Část virové suspenze, která byla filtrována pouze uhelonem, byla použita na inokulaci 4 naklíčených semen, což sloužilo jako negativní kontrola.

Bylo připraveno inokulum izolátu 2109 ze zmražených děložních listů s viditelnou sporulací *P. halstedii* (postup viz kapitola 4.4.1). Polovina inokula byla smíchána s virovou suspenzí, která byla filtrována pouze uhelonem, druhá polovina inokula byla smíchána s virovou suspenzí, která byla filtrována i pomocí Chromafil CA-45/25 (Macherey-Nagel). Každé inokulum bylo použito pro inokulaci 30 naklíčených semen. Inokulace probíhala za podmínek standardních pro inokulaci (viz kapitola 4.4.1). Při práci se dbalo na čistotu práce, veškeré nástroje a květináče byly průběžně desinfikovány 1% roztokem KOH, dle doporučení prof. O. Springa a jeho kolegů (ústní sdělení). Děložní listy s viditelnou sporulací byly použity pro kontrolní detekci PhV (viz kapitola 4.3.3.1).

5 Výsledky

'Plasmopara halstedii virus' (PhV) je novým a stále ne příliš známým mykovirem infikujícím *Plasmopara halstedii*. Tato diplomová práce zaměřila na molekulárně genetickou charakteristiku českých a maďarských izolátů PhV s cílem rozšíření znalostí o genetické variabilitě tohoto viru a doplnění studií z jiných zemí, které proběhly v předchozích letech (Heller-Dohmen *et al.*, 2011; Grasse *et Spring*, 2015; 2017).

Pro analýzu bylo použito 23 izolátů českého a 12 maďarského původu (viz tabulka 3). U těchto izolátů byla potvrzena přítomnost viru pomocí RT-PCR a specifických primerů. U 18 českých a 7 maďarských izolátů PhV byly Sangerovým sekvenováním získány téměř kompletní sekvence obou molekul RNA, u 2 českých a jednoho maďarského izolátu byla získána pouze téměř kompletní sekvence RNA2, u 3 českých a 3 maďarských izolátů byla získána parciální sekvence RNA2 a maďarského izolátu H4 byla získána pouze parciální sekvence RNA1 (detaily viz tabulka 14). Finální genomické sekvence byly získány spojením jednotlivých fragmentů. Identita sekvencí byla potvrzena na základě podobnosti vůči referenční sekvenci izolátu Ph8-99 (GenBank Acc. No. pro RNA1 HM453713.1 a pro RNA2 HM453718.1).

Tabulka 14: Seznam získaných sekvencí českých a maďarských izolátů PhV.

| izolát | RNA1 | RNA2 |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | délka sekvence [nt] (lokalizace)* | délka sekvence [nt] (lokalizace)* |
| 1405 | 2693 (52–2745) | 1431 (46–1477) |
| 1416 | 2738 (52–2790) | 1386 (86–1472) |
| 1605 | 2670 (64–2734) | 1441 (52–1493) |
| 1608 | 2724 (52–2776) | 1387 (85–1472) |
| 1610 | 2650 (97–2747) | 1404 (86–1490) |
| 1611 | 2644 (95–2739) | 1385 (89–1474) |
| 1708 | 2694 (52–2746) | 1391 (87–1478) |
| 1709 | 2705 (39–2744) | 1390 (87–1477) |
| 1710 | 2685 (56–2741) | 1385 (87–1472) |
| 1711 | -- | 584 (78–662) |
| 1712 | 2722 (57–2779) | 1387 (85–1472) |
| 1713 | 2727 (52–2779) | 1410 (87–1497) |
| 1714 | 2695 (52–2747) | 1369 (85–1454) |
| 1715 | 2730 (52–2782) | 1412 (85–1497) |
| 1716 | 2636 (105–2741) | 1372 (51–1423) |
| 1718 | 2697 (52–2749) | 1387 (85–1472) |
| 1720 | 2693 (52–2745) | 1412 (83–1495) |
| 1721 | -- | 1274 (85–1359) |
| 1801 | 2691 (52–2743) | 1413 (103–1516) |
| 1901 | -- | 582 (83–665) |
| 1904 | -- | 1354 (102–1456) |
| 1905 | 2678 (95–2773) | 1394 (78–1472) |
| 1906 | -- | 579 (85–664) |
| H1 | -- | 588 (89–677) |
| H2 | -- | 576 (89–665) |
| H3 | 2701 (52–2753) | 1344 (87–1431) |
| H4 | 1886 (52–1938) | -- |
| H5 | 2659 (81–2740) | 1432 (83–1515) |
| H7 | 2688 (51–2739) | 1396 (83–1479) |
| H9 | -- | 544 (122–666) |
| H10 | 2695 (52–2747) | 1396 (76–1472) |
| H11 | 2743 (34–2777) | 1403 (76–1479) |
| H12 | 2690 (51–2741) | 1386 (87–1473) |
| H13 | 2708 (39–2747) | 1390 (87–1477) |
| H14 | -- | 1396 (76–1472) |

* pozice vůči referenční sekvenci Ph8-99 (RNA1 – HM453713.1 a RNA2 – HM453718.1, GenBank)

-- sekvence nebyla získána

5.1 Genetická variabilita PhV

Porovnáním genomických sekvencí PhV izolátů mezi sebou bylo identifikováno 19 variabilních míst (SNPs). Pozice SNPs jsou vztahovány vůči referenční sekvenci izolátu Ph8-99 (GenBank Acc. No. pro RNA1 HM453713.1 a pro RNA2 HM453718.1). V ORF RNA1 (viz tabulka 15) bylo identifikováno 7 SNPs; A→T⁹³, T→C⁷⁰², A→G¹²⁴², C→T¹³⁶⁰, G→A¹⁹⁷², C→T¹⁹⁷³, G→A²⁴⁴³. Ve třech případech se jedná o nesynonymní mutaci, substituce G→A¹⁹⁷² vede k záměně Ala→Thr, C→T¹⁹⁷³ vede k záměně Ala→Val, výskyt GC→AT¹⁹⁷²⁻¹⁹⁷³ vede k záměně Ala→Ile a G→A²⁴⁴³ vede k záměně Ala→Thr. V nepřekládaných (5'-UTR, 3'-UTR) oblastech RNA1 nebyla identifikována žádná variabilní místa.

V ORF RNA2 (viz tabulka 16) byly identifikovány 2 SNPs; T→C³⁷² a C→T⁶⁸⁵. Ve jednom případě se jedná o nesynonymní mutaci, substituce C→T³⁷² vede k záměně Ala→Val. V nepřekládaných (5'-UTR) oblastech RNA2 byly identifikovány 2 SNPs; C→T¹²⁵, G→A¹³⁷; v nepřekládaných (3'-UTR) oblastech RNA2 byly identifikovány také 2 SNPs; T→C¹⁴⁴⁹ a G→A¹⁵⁰⁴.

Tabulka 15: Detekovaná variabilní místa v RNA1 molekule PhV.

| izolát | ORF1 | | | | | | | | | | | |
|---------|------|-----|-----|------|------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 93 | 702 | 888 | 1242 | 1360 | 1972 ^{a,h} | 1973 ^{b,h} | 2173 ^c | 2443 ^d | 2467 ^e | 2583 ^f | 2598 ^g |
| | A/T | T/C | C/A | A/G | C/T | G/A | C/T | A/G | G/A | T/G | C/A | T/A |
| Ph 8-99 | A | T | C | A | C | G | C | A | G | T | C | T |
| 1405 | A | T | C | A | C | A | T | A | A | T | C | T |
| 1416 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1605 | A | C | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1608 | A | C | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1610 | A | C | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1611 | A | C | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1708 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1709 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1710 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1712 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1713 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1714 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1715 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1716 | A | C | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1718 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1720 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1801 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| 1905 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| H3 | A | T | C | G | T | G | C | A | A | T | C | T |
| H4 | A | T | C | G | T | * | * | * | * | * | * | * |
| H5 | T | T | C | G | T | G | C | A | A | T | C | T |
| H7 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| H10 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| H11 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| H12 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |
| H13 | A | T | C | G | C | G | C | A | A | T | C | T |

Jako referenční sekvence sloužila sekvence izolátu Ph8-99 (GenBank Acc. No. HM453713.1). Tučně zvýrazněné pozice v záhlaví označují variabilní místa podle Grasse et Spring (2015). * – chybějící sekvence.

Nesynonymní mutace označeny horním indexem: a: Ala→Thr, b: Ala→Val, c: Met→Val, d: Ala→Thr, e: Phe→Val, f: Asp→Glu, g: His→Gln, h: Ala→Ile.

Tabulka 16: Detekovaná variabilní místa v RNA2 molekule PhV.

| izolát | 5'UTR | | ORF2 | | | | | | | | | | 3'UTR | | | | | | | |
|--------|-------|-----|------------------|------------------|------------------|-----|------------------|------------------|-----|-----|------------------|------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 125 | 137 | 372 ^a | 400 ^b | 542 ^c | 637 | 674 ^d | 679 ^e | 685 | 700 | 728 ^f | 888 ^g | 1322 | 1394 | 1449 | 1461 | 1464 | 1475 | 1482 | 1504 |
| | C/T | G/A | T/C | T/G | G/A | A/G | G/C | C/A | C/T | T/C | T/A | C/T | G/A | A/C | T/C | G/A | G/A | T/G | A/C | G/A |
| Ph8-99 | C | G | T | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | G |
| 1405 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | C | G | G | T | * | * |
| 1416 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | C | G | G | * | * | * |
| 1605 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | C | G | G | T | A | G |
| 1608 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | C | G | G | * | * | * |
| 1610 | C | A | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | C | G | G | T | A | * |
| 1611 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | C | G | G | T | * | * |
| 1708 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | * | * |
| 1709 | T | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | * | * |
| 1710 | T | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | * | * | * |
| 1711 | T | G | C | T | G | A | G | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 1712 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | * | * | * |
| 1713 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | * |
| 1714 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | * | * | * | * | * |
| 1715 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | * |
| 1716 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | A | * | * | * | * | * | * |
| 1718 | T | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | * | * | * |
| 1721 | C | G | C | T | G | A | G | C | T | T | T | C | G | * | * | * | * | * | * | * |

Jako referenční sekvence sloužila sekvence izolátu Ph8-99 (GenBank Acc. No. HM453718.1). Tučně zvýrazněné pozice označují variabilní místa popsaná v Grasse et Spring (2015). * – chybějící sekvence.

Nesynonymní mutace označeny horním indexem: a: Ala→Val, b: Ile→Met, c: Val→Ile, d: Glu→Gln, e: Asn→Lys, f: Ser→Thr, g: Thr→Ile.

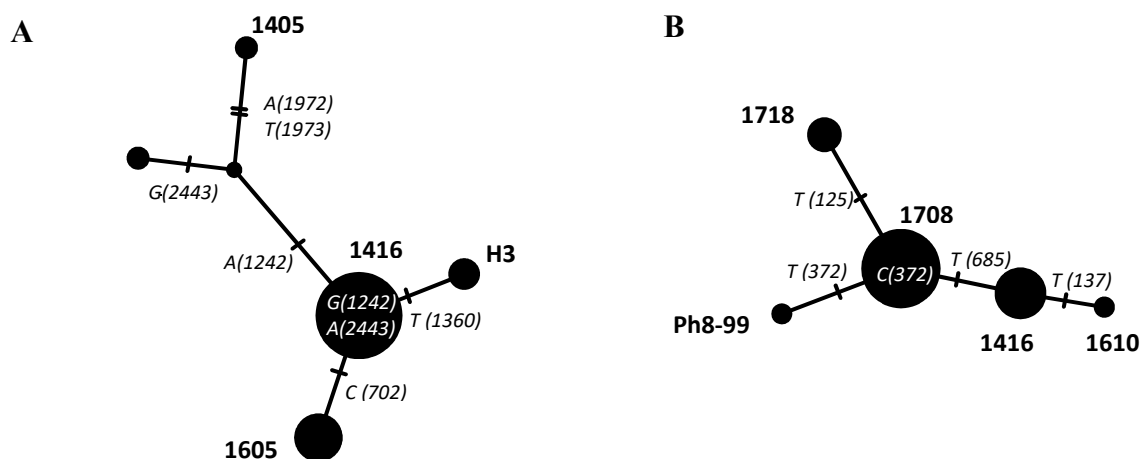
Tabulka 16, pokračování: Detekovaná variabilní místa v RNA2 molekule PhV.

| izolát | 5'UTR | | ORF2 | | | | | | | | | | 3'UTR | | | | | | | |
|--------|-------|-----|------------------|------------------|------------------|-----|------------------|------------------|-----|-----|------------------|------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 125 | 137 | 372 ^b | 400 ^c | 542 ^d | 637 | 674 ^e | 679 ^f | 685 | 700 | 728 ^g | 888 ⁱ | 1322 | 1394 | 1449 | 1461 | 1464 | 1475 | 1482 | 1504 |
| | C/T | G/A | T/C | T/G | G/A | A/G | G/C | C/A | C/T | T/C | T/A | C/T | G/A | A/C | T/C | G/A | G/A | T/G | A/C | G/A |
| Ph8-99 | C | G | T | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | G |
| 1720 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | * |
| 1801 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | A |
| 1901 | C | G | C | T | G | A | G | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| 1904 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | * | * | * | * | * |
| 1905 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | * | * | * |
| 1906 | C | G | C | T | G | A | G | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| H1 | C | G | C | T | G | A | G | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| H2 | C | G | C | T | G | A | G | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| H3 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | * | * | * | * | * | * |
| H5 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | A | A |
| H7 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | * | * |
| H9 | C | G | C | T | G | A | G | C | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| H10 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | * | * | * |
| H11 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | * | * |
| H12 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | * | * |
| H13 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | T | * | * |
| H14 | C | G | C | T | G | A | G | C | C | T | T | C | G | A | T | G | G | * | * | * |

Jako referenční sekvence sloužila sekvence izolátu Ph8-99 (GenBank Acc. No. HM453718.1). Tučně zvýrazněné pozice označují variabilní místa popsaná v Grasse et Spring (2015). * – chybějící sekvence.

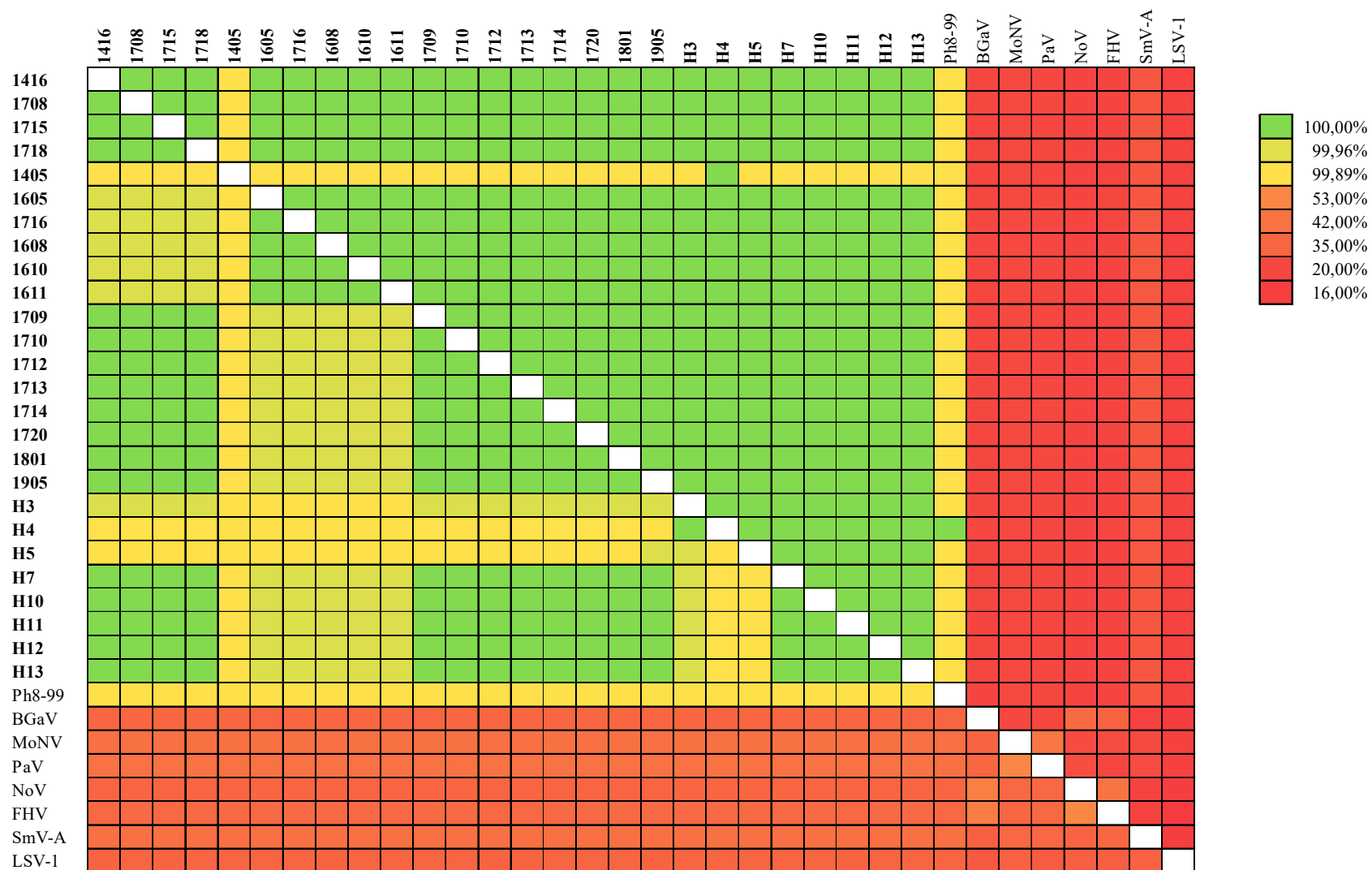
Nesyonymní mutace označeny horním indexem: a: Ala→Val, b: Ile→Met, c: Val→Ile, d: Glu→Gln, e: Asn→Lys, f: Ser→Thr, g: Thr→Ile.

Na základě výskytu SNPs v molekule RNA1 byly izoláty rozděleny do 6 genotypů, respektive 5 haplotypů (viz obr. 9A). České izoláty PhV byly relativně homogenní, 12 izolátů z 18 se řadilo k jednomu převládajícímu genotypu. Genotyp je charakteristický přítomností SNPs $A \rightarrow G^{1242}$ a $G \rightarrow A^{2443}$ a byl detekován u českých izolátů 1416, 1708, 1715, 1718, 1709, 1710, 1712, 1713, 1714, 1720, 1801 a 1905. Tento genotyp byl podobně četný i mezi maďarskými izoláty PhV, řadilo se k němu 5 izolátů PhV z 8, a sice H7, H10, H11, H12 a H13. Ostatní genotypy detekované u českých izolátů, a nově popsané pro PhV, se od tohoto převládajícího genotypu lišily v jednom, resp. třech SNPs. Mezi českými izoláty byl druhý nejpočetnější genotyp, který je charakterizovaný výskytem SNPs $T \rightarrow C^{702}$, $A \rightarrow G^{1242}$ a $G \rightarrow A^{2443}$ a který byl detekován u izolátů 1605, 1716, 1608, 1610 a 1611. Genotyp charakterizovaný přítomností SNPs $G \rightarrow A^{1972}$, $C \rightarrow T^{1973}$ a $G \rightarrow A^{2443}$ byl zastoupen pouze izolátem 1405. Zbývající tři maďarské PhV izoláty reprezentovaly minimálně dva nové genotypy. Genotyp izolátu H3 je charakteristický přítomností SNPs $A \rightarrow G^{1242}$, $C \rightarrow T^{1360}$ a $G \rightarrow A^{2443}$. Sekvence izolátu H4 je pouze parciální, byly u něj detekovány pouze SNPs $A \rightarrow G^{1242}$ a $C \rightarrow T^{1360}$, jeho přesné zařazení proto není možné. Izolát H5 má genotyp, který je specifický výskytem SNPs $A \rightarrow T^{93}$, $A \rightarrow G^{1242}$, $C \rightarrow T^{1360}$ a $G \rightarrow A^{2443}$. Izolát 1405 je unikátní lokalitou původu a genotypem, u ostatních izolátů nebyla zjištěna žádná souvislost mezi lokalitou původu, rokem sběru izolátů a genotypem.

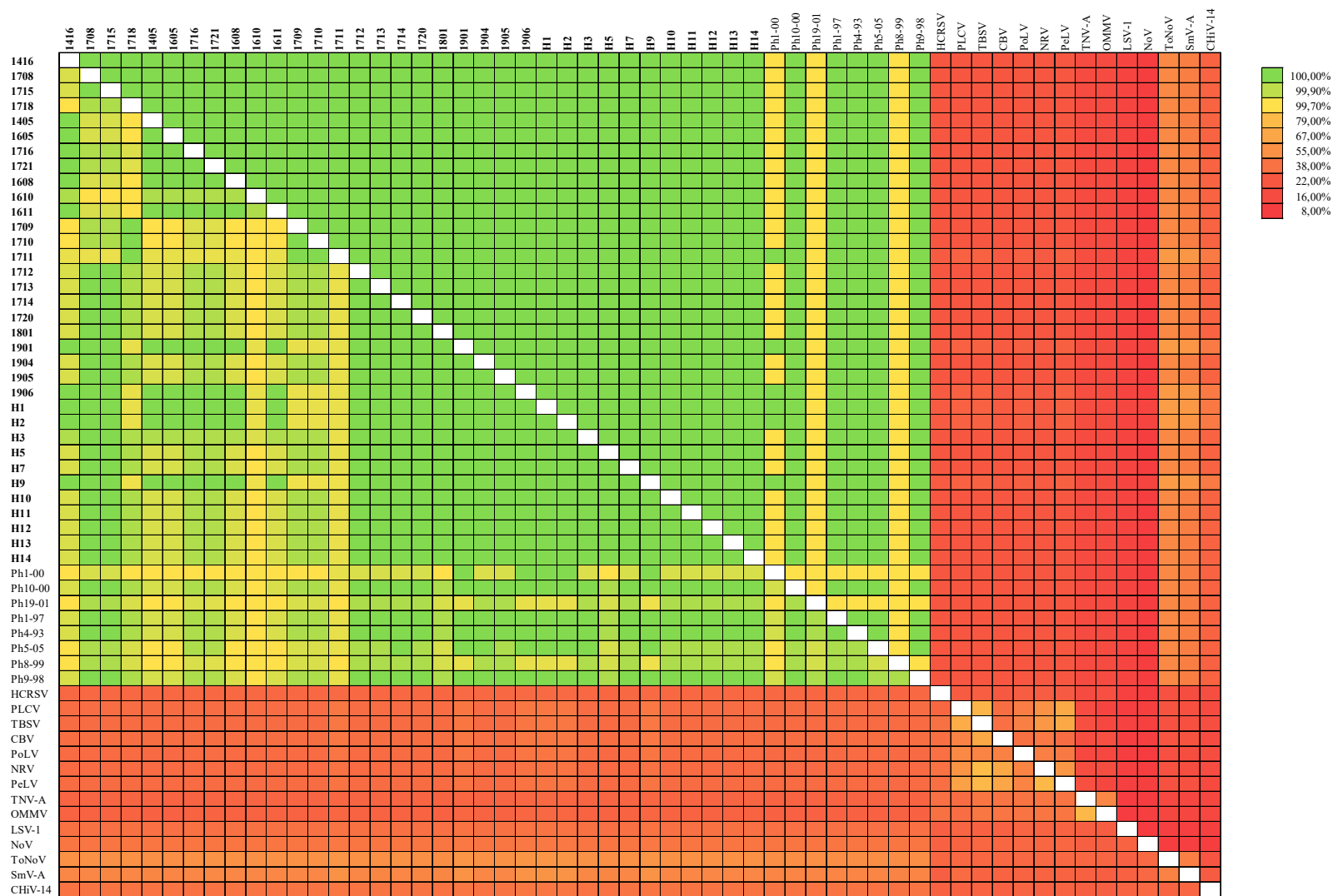


Obr. 9: Haplotypová síť PhV studovaných izolátů konstruovaná na základě A) RNA1, B) RNA2. Velikost kruhů odpovídá frekvenci genotypů, úsečky zastupují jednotlivé SNP, tučně uvedeny příklady PhV izolátů.

Na základě výskytu SNPs v molekule RNA2 byly izoláty rozděleny do 6 genotypů (z toho pět nově popsanych), respektive 5 haplotypů (viz obr. 9B). Nejčastěji detekovaná ve srovnání s referenční sekvencí Ph8-99 (Acc. No. HM453718.1) byla záměna T→C³⁷², která byla převažující jak u českých, tak u maďarských izolátů. Tento genotyp byl zjištěn u 10 z 23 českých PhV izolátů, konkrétně u izolátů 1708, 1715, 1712, 1713, 1714, 1720, 1901, 1904, 1905 a 1906. Maďarské izoláty PhV byly velmi homogenní, tento genotyp byl zjištěn u 10 izolátů z 11, a sice H1, H2, H3, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13 a H14. U maďarského izolátu H5 byla získána delší sekvence než u ostatních maďarských izolátů, takže byl u tohoto izolátu zjištěn i SNP v pozici 1505, tj. G→A¹⁵⁰⁴. Mezi českými izoláty PhV druhý nejčastější genotyp je charakteristický přítomností SNPs T→C³⁷², C→T⁶⁸⁵ a T→C¹⁴⁴⁹ a byl zaznamenán u izolátů 1416, 1405, 1605, 1608 a 1611. U českých izolátů 1716 a 1721 byla získána sekvence dosahující pouze 1423, resp. 1359 nt (pozice vztahovány vůči referenční sekvenci izolátu Ph8-99, GenBank Acc. No. HM453718.1), genotyp těchto izolátů je specifický výskytem SNPs T→C³⁷² a C→T⁶⁸⁵, přítomnost záměny v pozici 1449 proto nemohla být vyhodnocena. Izoláty 1718, 1709, 1710 a 1711 mají genotyp charakteristický přítomností SNPs C→T¹²⁵ a T→C³⁷², u izolátu 1711 byla ale získána jen částečná sekvence o délce 662 nt (vůči referenční sekvenci izolátu Ph8-99). Genotyp izolátu 1610 je specifický přítomností nejvíce SNPs; G→A¹³⁷, T→C³⁷², C→T⁶⁸⁵ a T→C¹⁴⁴⁹. U izolátu 1801 byl detekován stejný genotyp jako u maďarského izolátu H5, tento genotyp je charakteristický přítomností SNPs T→C³⁷² a G→A¹⁵⁰⁴.



Obr. 10: Procentuální identita genomických sekvencí RNA1 a aminokyselinových RdRp sekvencí PhV izolátů a dalších virů. Levá dolní polovina obrázku představuje genomické sekvence, pravá horní polovina aminokyselinové sekvence. Barevná škála reprezentuje procentuální identitu. Tučně zvýrazněny nové české a maďarské izoláty.



Obr. 11: Procentuální identita genomických sekvencí RNA2 a aminokyselinových CP sekvencí PhV izolátů a dalších virů. Levá dolní polovina obrázku představuje genomické sekvence, pravá horní polovina aminokyselinové sekvence. Barevná škála reprezentuje procentuální identitu. Tučně zvýrazněny nové české a maďarské izoláty.

Genomické sekvence RNA1 českých i maďarských izolátů PhV vykazovaly vysokou homogenitu. Vzájemná identita genomických sekvencí RNA1 českých izolátů byla 99,85–100 %, identita maďarských izolátů se pohybovala v rozmezí 99,92–100 % (viz obr. 10). Mezi českými izoláty vykazoval nejmenší podobnost (99,85 %) izolát 1405 s izoláty 1605, 1716, 1608, 1610 a 1611, izolát 1405 se od ostatních zmíněných odlišoval 4 variabilními místy. V rámci maďarských izolátů vykazoval nejmenší podobnost (99,92 %) izolát H5 s izoláty H7, H10, H11, H12 a H13, izolát H5 se od ostatních zmíněných izolátů odlišoval dvěma variabilními místy. Genomické sekvence RNA1 českých izolátů PhV vykazovaly s genomickými sekvencemi maďarských izolátů identitu 99,81–100 %, nejmenší podobnost mezi sebou vykazovaly izoláty H5 a 1405 (99,81 %), které se odlišují 5 variabilními místy.

Srovnáním genomických sekvencí RNA1 českých izolátů s izolátem PhV Ph8-99 (Acc. No. HM453713.1) byla zjištěna podobnost 99,89–99,3 %, nejmenší identitu s izolátem Ph8-99 vykazovaly české izoláty 1405, 1605, 1716, 1608, 1610 a 1611 (99,89 %), které se od izolátu Ph8-99 odlišovaly 3 variabilními místy; ostatní české izoláty PhV se od izolátu Ph8-99 odlišovaly ve dvou variabilních mstech a vykazovaly identitu 99,93 %. Srovnáním genomických sekvencí RNA1 maďarských izolátů s izolátem PhV Ph8-99 (Acc. No. HM453713.1) byla zjištěna identita 99,85–99,93 %, nejmenší identitu s izolátem Ph8-99 vykazoval maďarský izolát H5 (99,85 %), který se od izolátu Ph8-99 odlišoval 4 variabilními místy.

P-distance analýzou byla při srovnání genomických sekvencí RNA1 českých a maďarských izolátů PhV s viry čeledi *Nodaviridae* zjištěna podobnost 34,88–42,62 %, PhV izoláty jsou si nejpodobnější s pariacoto virus (Acc. No. AF171942.1; 41,8–42,62 %) a mosinivirus (Acc. No. KJ632942.1; 41,02–41,52 %). Z dalších evolučně příbuzných virů vykazují české a maďarské izoláty PhV největší podobnost genomických sekvencí s sclerophthora macrospora virus A (Acc. No. NC_005817.1; 40,79–41,32 %). Nejmenší identitu genomických sekvencí vykazují české a maďarské izoláty PhV s lake sinai virus 1 (Acc. No. NC_035466.1; 34,85–35,29 %), z virů čeledi *Nodaviridae* vykazují české a maďarské izoláty PhV nejmenší identitu s nodamura virus (Acc. No. NC_002690.1; 35,43–35,73 %).

Aminokyselinové sekvence RdRp českých i maďarských izolátů PhV jsou také velmi homogenní. Vzájemná identita aminokyselinových sekvencí RdRp českých izolátů byla 99,89–100 %, identita maďarských izolátů byla 100% (viz obr. 10). Mezi českými izoláty vykazoval nejmenší podobnost (99,89 %) izolát 1405 s ostatními českými izoláty, izolát 1405

se v rámci aminokyselinových sekvencí od ostatních českých izolátů odlišoval v jedné aminokyselině. Aminokyselinové sekvence RdRp českých izolátů PhV vykazovaly s aminokyselinovými sekvencemi RdRp maďarských izolátů identitu 99,89–100 %, nejmenší identitu vykazoval izolát 1405 (99,89 %) s maďarskými izoláty PhV (kromě izolátu H4, u kterého byla zjištěna pouze parciální sekvence), izolát 1405 se v rámci aminokyselinových sekvencí od maďarských izolátů odlišoval v jedné aminokyselině.

Srovnáním aminokyselinových sekvencí RdRp českých izolátů s izolátem PhV Ph8-99 (Acc. No. HM453713.1) byla zjištěna podobnost 99,78–99,89 %, nejmenší identitu s izolátem Ph8-99 vykazoval český izolát 1405 (99,78 %), který se od izolátu Ph8-99 odlišoval ve 2 aminokyselinách; ostatní české izoláty PhV se od izolátu Ph8-99 odlišovaly v jedné aminokyselině a vykazovaly identitu 99,89 %. Srovnáním aminokyselinových sekvencí RdRp maďarských izolátů s izolátem PhV Ph8-99 (Acc. No. HM453713.1) byla zjištěna identita 99,89–100 %, největší identitu s izolátem Ph8-99 vykazoval maďarský izolát H4 (100 %), který je reprezentován pouze parciální sekvencí pokrývající 52–1938 nt vůči referenční sekvenci, kterou je právě izolát Ph8-99; ostatní maďarské izoláty PhV se od izolátu Ph8-99 odlišovaly v jedné aminokyselině a vykazovaly identitu 99,89 %.

P-distance analýzou byla při srovnání aminokyselinových sekvencí RdRp českých a maďarských izolátů PhV s viry čeledi *Nodaviridae* zjištěna podobnost 17,77–18,72 %, PhV izoláty vykazují největší identitu s pariacoto virus (Acc. No. AF171942.1; 19,49–20,07 %) a mosinivirus (Acc. No. KJ632942.1; 20,45–20,9 %). Z dalších evolučně příbuzných virů vykazují české a maďarské izoláty PhV největší podobnost aminokyselinových sekvencí RdRp s sclerophthora macrospora virus A (Acc. No. NC_005817.1; 16,99–28,47 %). Nejmenší identitu aminokyselinových sekvencí RdRp vykazují české a maďarské izoláty PhV s lake sinai virus 1 (Acc. No. NC_035466.1; 16,99–17,08 %), z virů čeledi *Nodaviridae* vykazují české a maďarské izoláty PhV nejmenší identitu s nodamura virus (Acc. No. NC_002690.1; 17,77–18,72 %).

Genomické sekvence RNA2 českých i maďarských izolátů PhV vykazovaly vysokou homogenitu. Vzájemná identita genomických sekvencí RNA2 českých izolátů byla 99,65–100 %, identita genomických sekvencí RNA2 maďarských izolátů byla 100 % (viz obr. 11). Z českých izolátů vykazoval obecně nejnižší identitu s ostatními českými izoláty izolát 1610 (99,65–99,93 %), který je jedinečným svým SNP G→A¹³⁷. Genomické sekvence RNA2 českých izolátů PhV vykazovaly s genomickými sekvencemi maďarských izolátů identitu

99,78–100 %, od maďarských izolátů se nejvíc lišil český izolát 1610 (99,78 %), který se od kompletních sekvencí maďarských izolátů odlišoval ve třech variabilních místech.

Srovnáním genomických sekvencí RNA2 českých izolátů s dalšími izoláty PhV dostupnými v databázi GenBank (seznam viz tabulka 13) byla zjištěna podobnost 99,64–100 %, nejmenší identitu vykazoval český izolát 1610 s izolátem Ph1-00 (Acc. No. HM453721.1; 99,64 %). Srovnáním genomických sekvencí RNA2 maďarských izolátů s dalšími izoláty PhV dostupnými v databázi GenBank byla zjištěna identita 99,79–100 %, nejmenší identitu vykazoval maďarský izolát H5 s izolátem Ph1-00 (Acc. No. HM453721.1; 99,79 %).

P-distance analýzou byla při srovnání genomických sekvencí RNA2 českých a maďarských izolátů PhV s viry čeledi *Tombusviridae* zjištěna identita 28,87–41,3 %, PhV izoláty vykazují největší identitu s cucumber bulgarian latent virus (Acc. No. KJ572966.1; 35,3–41,05 %) a tomato bushy stunt virus (Acc. No. M21958.1; 34–41,3 %). Z dalších evolučně příbuzných virů vykazují české a maďarské izoláty PhV na základě p-distance analýzy největší podobnost genomických sekvencí RNA2 s sclerophthora macrospora virus A (Acc. No. NC_005818.1; 48,6–56,7 %) a tombunodavirus UC1 (Acc. No. KF510030.2; 53,6–57,9 %). Nejmenší identitu genomických sekvencí vykazují české a maďarské izoláty PhV s lake sinai virus 1 (Acc. No. NC_035466.1; 36,6–38,8 %), z virů čeledi *Tombusviridae* vykazují české a maďarské izoláty PhV nejmenší identitu s olive mild mosaic virus (Acc. No. KY769774.1; 28,9–31,9 %).

Aminokyselinové sekvence CP českých i maďarských izolátů PhV jsou homogenní. Vzájemná identita aminokyselinových sekvencí CP českých i maďarských izolátů byla 100 % (viz obr. 11). Aminokyselinové sekvence CP českých izolátů PhV vykazovaly s aminokyselinovými sekvencemi maďarských izolátů identitu tedy také 100 %.

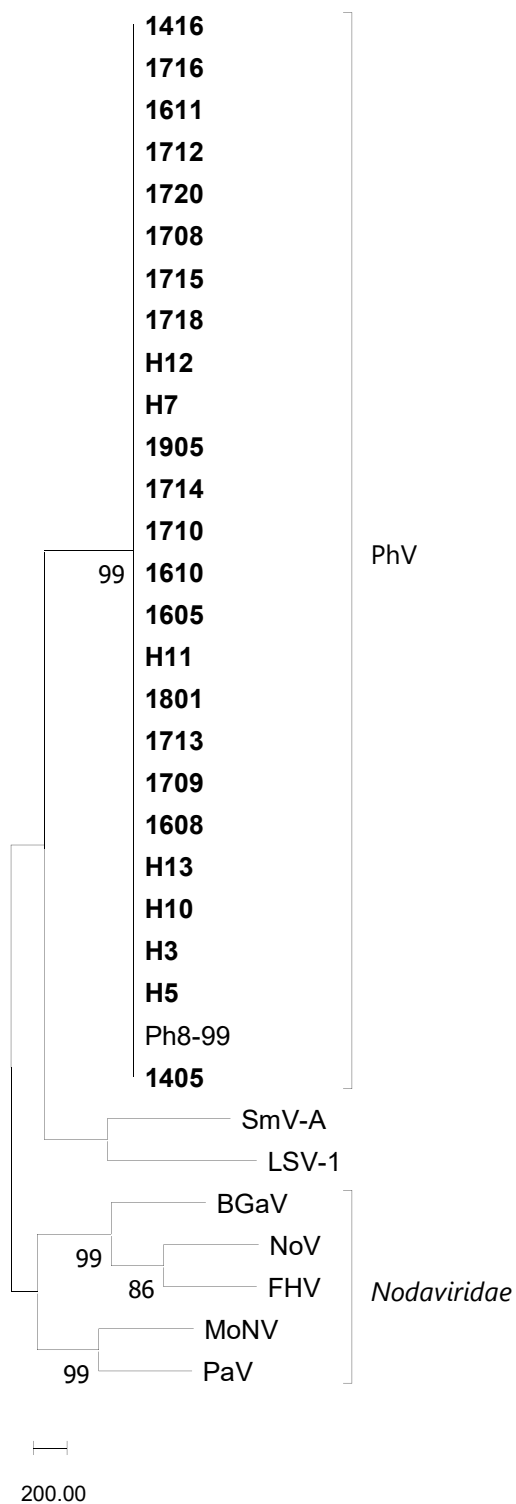
Srovnáním aminokyselinových sekvencí CP českých a maďarských izolátů s dalšími izoláty PhV dostupnými v databázi GenBank (seznam viz tabulka 13) byla zjištěna podobnost 99,4–100 %, nejmenší identitu vykazovaly české a maďarské izoláty PhV (99,7 %), u kterých byla získána téměř kompletní sekvence, s izoláty Ph1-00 (Acc. No. HM453721.1), Ph19-01 (Acc. No. HM453719.1) a Ph8-99 (Acc. No. HM453718.1).

P-distance analýzou byla při srovnání aminokyselinových sekvencí CP českých a maďarských izolátů PhV s viry čeledi *Tombusviridae* zjištěna podobnost 15,6–28,7 %, PhV izoláty vykazují největší identitu s pelargonium leaf curl virus (Acc. No. HM461992.1; 22,02–

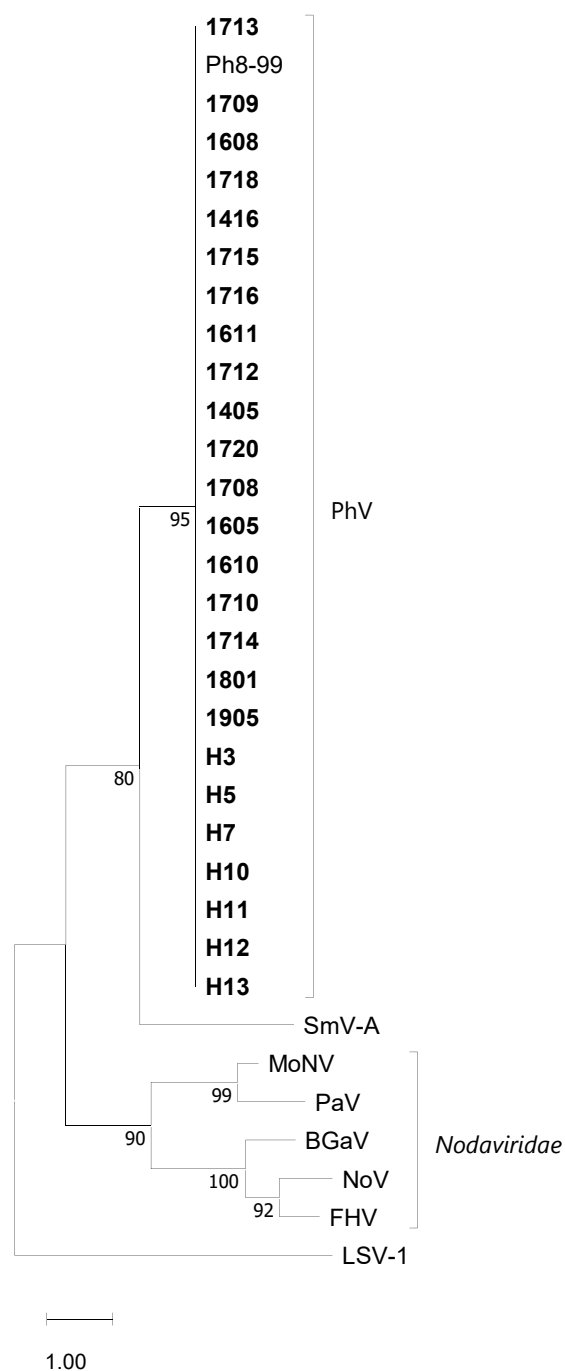
28,48 %), tomato bushy stunt virus (Acc. No. M21958.1; 22,39–28,66 %), pear latent virus (Acc. No. AY100482.1; 22,32–27,85 %), pothos latent virus (Acc. No. NC_000939.2; 22,4–27,15 %) a hibiscus chlorotic ringspot virus (Acc. No. OP779319.1; 22,51–25,63 %). Z dalších evolučně příbuzných virů vykazují české a maďarské izoláty PhV na základě p-distance analýzy největší podobnost aminokyselinových sekvencí CP s sclerophthora macrospora virus A (Acc. No. NC_005818.1; 44,69–58,93 %) a tombunodavirus UC1 (Acc. No. KF510030.2; 50,41–61,4 %). Nejmenší identitu genomických sekvencí vykazují české a maďarské izoláty PhV s nodamura virus patřícím do čeledi *Nodaviridae* (Acc. No. NC_002691.1; 8,75–12,05 %), z virů čeledi *Tombusviridae* vykazují české a maďarské izoláty PhV nejmenší identitu s olive mild mosaic virus (Acc. No. KY769774.1; 15,58–16,78 %).

5.2 Fylogenetická analýza

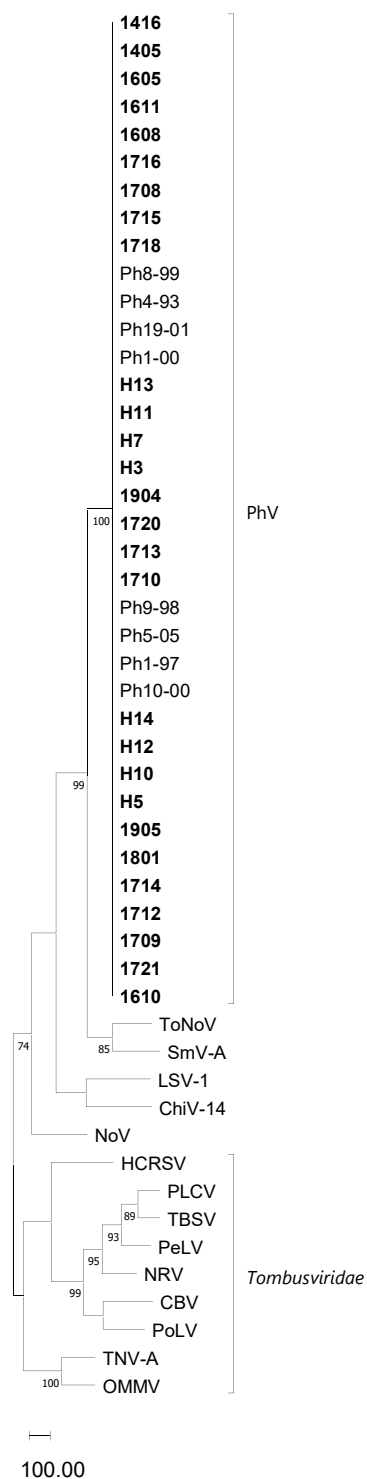
Vysokou homogenitu izolátů PhV potvrdila fylogenetická analýza genomických sekvencí RNA1 a RNA2 (viz obr. 12 a 14) provedená pomocí algoritmu maximální parsimonie a aminokyselinových sekvencí RdRp a CP (viz obr. 13 a 15) provedená pomocí neighbor-joining algoritmu, kde izoláty PhV tvořily vždy samostatnou signifikantní skupinu s minimálním větvením. Topologie stromu potvrzuje unikátnost tohoto viru a jeho velkou evoluční vzdálenost. Analýza získaných nukleotidových sekvencí RNA1 (viz obr. 12) prokázala fylogenetickou příbuznost s viry SmV-A a LSV-1, viry čeledi *Nodaviridae* tvořily samostatnou skupinu. Analýza aminokyselinových sekvencí RdRp (viz obr. 13) potvrdila pozici SmV-A, viry čeledi *Nodaviridae* tvořily opět samostatnou skupinu, naopak virus LSV-1 tvořil samostatnou, evolučně vzdálenou větev. Při fylogenetické analýze nukleotidových sekvencí RNA2 (viz obr. 14) se jako PhV izolátům nejpodobnější jeví viry ToNoV a SmV-A. Druhou nejbližší skupinu tvořily viry LSV-1 a ChiV-14. Virus NoV patřící do čeledi *Nodaviridae* se vyvětvil do samostatné větve; viry čeledi *Tombusviridae* tvořily fylogeneticky nejvzdálenější skupinu. Na základě analýzy aminokyselinových sekvencí CP (viz obr. 15) vykazují k PhV izolátům největší příbuznost viry ToNoV, SmV-A a ChiV-14, viry čeledi *Tombusviridae* tvořily opět samostatnou skupinu a nejvzdálenější se jeví LSV-1 a NoV.



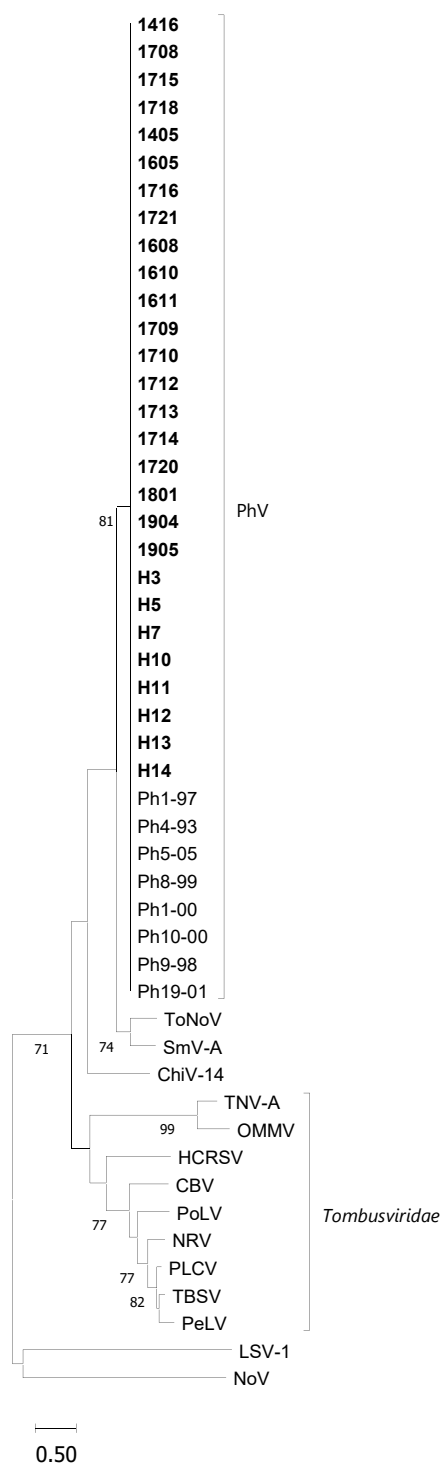
Obr. 12: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě genomických sekvencí RNA1 pomocí algoritmu maximální parsimonie. Analyzované izoláty vyznačeny tučně. Měřítko představuje 200 substitucí na celou sekvenci.



Obr. 13: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí RdRp pomocí neighbor-joining analýzy. Analyzované izoláty vyznačeny tučně. Měřítko představuje 1 substituci na pozici.



Obr. 14: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě genomických sekvencí RNA2 pomocí algoritmu maximální parsimonie. Analyzované izoláty vyznačeny tučně. Měřítko představuje 100 substitucí na celou sekvenci.



Obr. 15: Fylogenetický strom PhV izolátů a dalších vybraných virů konstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí CP pomocí neighbor-joining analýzy. Analyzované izoláty vyznačeny tučně. Měřítko představuje 0,5 substituce na pozici.

5.3 Určení ras *P. halstedii* a přenos PhV

U izolátů 2104, 2107, 2109, 2110 (viz tabulka 2) zvolených pro určení rasy *P. halstedii* byla potvrzena přítomnost PhV pomocí RT-PCR a specifických primerů, izolát H5-22 byl bezvirózní a byl proto zvolen pro přenos viru.

Metodou SDI byly na diferenční souboru slunečnic testovány 4 české izoláty *P. halstedii*, jejichž sběr proběhl v roce 2021 (viz tabulka 2). Určená rasa *P. halstedii* byla označena unikátním pětímístným číselným kódem, který odpovídá fenotypové reakci pěti tripletů diferenčních linií slunečnice na přítomnost patogenu. Určení rasy u izolátu 2104 bylo obtížné, protože se zřejmě jednalo o směs dvou ras (700 60 a 712 60). Výsledky určení ras jsou uvedeny v tabulce 18.

Metodou SDI byly 4 izoláty *P. halstedii* na základě fenotypové reakce na diferenčních liniích slunečnice zařazeny do 3 ras, izoláty 2107 a 2110 patří k rase 710 60, izolát 2109 patří k rase 700 60 a v případě izolátu 2104 byl identifikován směsný vzorek rasy 700 60 a nové, dosud neidentifikované, rasy 712 60 (souhrn viz tabulka 17).

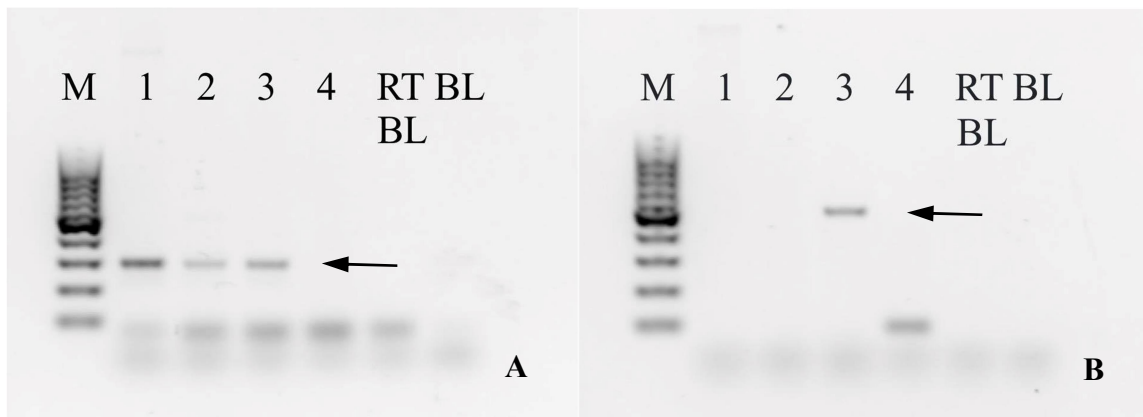
Tabulka 17: Identifikované rasy *P. halstedii*.

| Název izolátu | Lokalita | Rasa |
|---------------|--------------------|---------------|
| 2104 | Přelíc | 700 60/712 60 |
| 2107 | Nová Ves u Mělníka | 710 60 |
| 2109 | Nová Ves u Mělníka | 700 60 |
| 2110 | Přelíc | 710 60 |

V rámci práce byla za použití modifikovaného postupu podle Grasse *et al.* (2013) testována možnost přenosu PhV z virozního izolátu *Plasmopara halstedii* do bezvirózního izolátu. Byly porovnávány dva způsoby přípravy inokulačního homogenátu, který byl filtrován (1) přes uhelon o velikosti ok 25/30 μm anebo (2) přes uhelon o velikosti ok 25/30 μm a Chromafil CA-45/25 o velikosti ok 0,45 μm . Virová RNA byla detekována pomocí RT-PCR amplifikace pouze při filtrování homogenátu zoosporangií uhelonem (viz obr. 15). Naopak při filtrování homogenátu zoosporangií uhelonem a pomocí Chromafil CA-45/25 nebyla detekována přítomnost žádné virové RNA.

Spolu s přenosem PhV proběhlo přemnožení dvou dlouhodobě uchovávaných, zamražených, virozních izolátů *P. halstedii* – H5-22 a H4-22 s cílem oživení materiálů pro potenciální

biologické testy. Toto přemnožení ale nebylo úspěšné, v namnoženém vzorku *P. halstedii* byla detekována pouze přítomnost virové RdRp, druhá genomická RNA nebyla zjištěna.



Obr. 15: Detekce PhV po přenosu viru za použití primerů (A) PHV_RdRp_polR1/PHV_RdRp_polF1 (RNA1) a (B) PHV_WG_F2/ PHV_WG_R2 (RNA2).

M – marker molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp DNA ladder), dráhy: 1 – H4-22 po přemnožení, 2 – H5 po přemnožení, 3 – přenos PhV (filtrace uhelon 30/25 um), 4 – přenos PhV (filtrace uhelon 25/30 um, Chromafil CA-45/25), RT BL – RT negativní kontrola, BL – PCR negativní kontrola.; šipka označuje specifický produkt.

6 Diskuze

'Plasmopara halstedii virus' (PhV) je relativně nově popsaným virem napadajícím obligátně biotrofní patogen *Plasmopara halstedii*, patřící do oddělení Peronosporomycota. K jeho prvotní detekci došlo v 90. letech 20. století (Gulya *et al.*, 1990) v USA, v České republice byl výskyt PhV zaznamenán vůbec poprvé až v roce 2014 v lokalitách Brno-Chrlice, Podivín, Lednice a Olomouc-Holice (Pospíchalová, 2014). Genom PhV byl částečně popsán v rámci izolátů z Německa, Maďarska, Francie a USA v roce 2008, genetická diverzita získaných sekvencí byla velmi malá (Heller-Dohmen *et al.*, 2008). Kompletní sekvence genomu PhV byla získána poprvé v roce 2011 (Heller-Dohmen *et al.*, 2011). Při následné rozsáhlé analýze kompletních sekvencí 22 izolátů PhV z různých zemí světa byla opět zjištěna velmi nízká genetická variabilita PhV (Grasse *et Spring*, 2015). V rámci těchto studií ale nebyly zahrnuty české izoláty, proto se tato diplomová práce zaměřila na molekulárně genetickou charakteristiku mj. českých izolátů PhV.

Analýza českých a maďarských izolátů 'plasmopara halstedii virus' umožnila identifikaci již známých (Grasse *et Spring*, 2015), ale i zcela nových variabilních míst, jak v kodujících, tak v nekódujících oblastech genomických RNA sekvencí. Nově bylo identifikováno 6 SNP, čímž se počet známých SNP v genomu PhV zvedl z 27 na 33 SNP. Výskyt indel oblastí (--) \rightarrow AA (30) zjištěné u referenčního francouzského izolátu Ph8-99 bohužel nemohl být potvrzen nebo vyvrácen, protože sekvence RNA získané v rámci diplomové práce byly kratší a tuto 5'-UTR oblast nezahrnovaly.

Mezi českými a maďarskými izoláty bylo detekováno 6 genotypů na základě výskytu SNPs v molekule RNA1 a 6 genotypů na základě výskytu SNPs v molekule RNA2. Převládající RNA1 genotyp (SNPs A \rightarrow G¹²⁴² a G \rightarrow A²⁴⁴³) byl detekován již dříve u 11 izolátů z různých zemí světa, konkrétně z Indie, USA, Maroka, Jihoafrické republiky, Francie, Itálie, Španělska, Turecka a Bulharska (Grasse *et Spring*, 2015). Také nejčastěji detekovaný genotyp v molekule RNA2 (SNP T \rightarrow C³⁷²) byl již dříve zaznamenán, a sice u izolátů původem z Německa, Španělska, Jihoafrické republiky a USA (Grasse *et Spring*, 2015). Ostatní genotypy byly detekovány poprvé. Provedená genotypizace a nemožnost spojit výskyt konkrétního RNA1 a RNA2 genotypu s lokalitou nebo rokem sběru potvrzuje situaci zjištěnou v rámci první PhV studie před téměř deseti lety (Grasse *et Spring*, 2015). Záchyt nových PhV genotypů a zjištěná variabilita může být daná tím, že tak rozsáhlý soubor izolátů z jedné země doposud nikdo neanalyzoval.

I přesto, že bylo detekováno několik nových genotypů, genetická variabilita českých i maďarských izolátů PhV byla obecně velmi nízká, jednalo se v obou případech o velmi homogenní virovou populaci. Tyto výsledky korelují s výsledky Grasse *et* Spring (2015), kteří nezjistili žádnou významnější variabilitu v rámci genomu PhV. Z toho je možné usuzovat, že je PhV pravděpodobně evolučně mladý virus a zatím nedošlo k výraznějšímu genetickému rozrůznění. Vzhledem k úzké specializaci PhV na svého hostitele a způsobu jeho přenosu je také pravděpodobné, že na virus působí velký selekční tlak.

V nedávné studii zabývající se taxonomickým zařazením PhV byla zjištěna podobnost RdRp PhV a SmV-A s RdRp virů čeledi *Nodaviridae* a podobnost CP PhV a SmV-A s CP virů čeledi *Tombusviridae* (Grasse *et* Spring, 2017). Tato podobnost byla potvrzena fylogenetickou analýzou. Také genomické sekvence RNA1 (34,88–42,62 %) a aminokyselinové sekvence RdRp (17,77–18,72 %) virů čeledi *Nodaviridae* vykazovaly určitou shodu s odpovídajícími sekvencemi RdRp PhV izolátů. Stejně tak vykazovaly genomické sekvence RNA2 (28,87–41,3 %) a aminokyselinové sekvence CP (15,6–28,7 %) virů čeledi *Tombusviridae* určitou identitu s odpovídajícími sekvencemi CP PhV izolátů.

Rasa *Plasmopara halstedii* 712 60 je zcela unikátní, jedná se o první záchyt nejen v České republice, ale i na světě. Vzhledem k směsné povaze vzorku je ale pro její potvrzení nutné diferenční experiment zopakovat. Izoláty 2107 a 2110 byly vyhodnoceny jako rasa 710 60, která je v České republice poměrně běžná (Drábková-Trojanová *et al.*, 2018). Izolát 2109 byl vyhodnocen jako rasa 700 60, což je další v České republice běžně se vyskytující rasa.

V rámci práce byl proveden pokus o přenos viru na bezvirozní kmen *Plasmopara halstedii* pomocí postupu podle Grasse *et al.* (2013). I když autoři ve své práci dokládají úspěšný přenos PhV, samotný experimentální přenos mykovirů mezi hostiteli je obecně velmi obtížný a jeho úspěšné provedení podmíněno řadou biologických faktorů (Cortesi *et al.*, 2001, Wu *et al.*, 2017). A tato skutečnost se potvrdila i v této práci. Virus se podařilo přenést, pokud byl homogenát připraven sonikací při 60 kHz a filtrován přes uhelon o velikosti ok 25/30 μm . To je v souladu s Grasse *et al.* (2013), i když účinnost přenosu je nižší. Není ale jasné, zda při dostupné metodě homogenizace došlo k účinnému rozbití zoospor a nelze vyloučit, že oka uhelonu propustila i spory plasmopary, protože jejich průměrná velikost je 15–30 μm (Diagnostiscs, 2014). Je možné, že nedošlo k přenosu jen viru, ale plasmopary infikované PhV, a tím došlo ke vzniku směsné infekce. Proto by bylo vhodné pokračovat v analýze

výsledku přenosového experimentu, tedy po provedení přenosu viru určit rasu takto vzniklého izolátu, aby se vyloučil vznik směsného vzorku.

Při filtraci uhelonem i pomocí Chromafil CA-45/25 o velikosti ok 0,45 μm virus detekován nebyl. To potvrzuje, že virus není (nebo je jen velmi obtížně) přenosný prostřednictvím samostatných virionů, jejichž velikost je v průměru 37 nm, ale pro úspěšnou infekci bezvirozního kmene plasmopary, stejně jako u dalších mykovirů, je nezbytná anastomóza, tedy fúzi houbových hyf obsahující virus a zdravých hyf a výměna cytoplasmatického obsahu (Grasse *et al.*, 2013, Pearson *et al.*, 2009). Navození tohoto v přírodě běžného stavu (Pearson *et al.*, 2009; Sutela *et al.*, 2019) je experimentálně náročné.

7 Závěr

Tato práce rozšiřuje znalosti o genetické varibilitě 'plasmopara halstedii virus'. Počet variabilních míst zaznamenaných v genomu 'plasmopara halstedii virus' byl rozšířen z 27 známých variabilních míst na 33. Genetická variabilita izolátů 'plasmopara halstedii virus' je velmi malá, jak česká, tak maďarská populace viru je velmi homogenní. Izoláty viru byly zařazeny do 6 RNA1 a 6 RNA2 genotypů, z nich 5 pro každou RNA bylo zjištěno nově a mohly by být výsledkem jeho postupného evolučního rozrůznění. Distanční a fylogenetickou analýzou byla potvrzena podobnost získaných PhV izolátů a jejich jednotlivých RNA molekul s doposud popsányi izoláty PhV původem z různých zemí a kontinentů a nebyla zjištěna korelace mezi variabilitou a geografickým původem nebo rokem sběru virozního kmene *Plasmopara halstedii*. I když v přírodě pravděpodobně dochází k přenosu mykovirů relativně často, jen velmi malá úspěšnost přenosového pokusu potvrdila jeho obtížnost v experimentálních podmínkách a nutností navození optimálních podmínek pro anastomózu mezi virozním a bezvirozním kmenem PhV hostitele.

Byly určeny rasy čtyř izolátů *Plasmopara halstedii*, dvě z nich, 700 60 a 710 60, jsou v České republice běžné. V jednom případě byla identifikována zcela nová rasa 712 60, která ale se vyskytovala ve směsné infekci se běžnou rasou 710 60.

8 Seznam použité literatury

- Ahola T., Karlin D. G. (2015): Sequence analyses reveals a conserved extension in the capping enzyme of the alphavirus supergroup, and homologous domain in nodaviruses. *Biology Direct* 10: 16.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389–3402.
- Bán R., Kovács A., Nisha N., Pálinkás Z., Zalai M., Ibrahim A., Yousif A., Körösi K. (2021): New and high virulent pathotypes of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in seven countries in Europe. *Journal of Fungi* 7(7): 549.
- Baltimore D. (1971): Expression of animal virus genomes. *Bacteriology Reviews* 35: 235–41.
- Botella L., Jung T. (2021): Multiple Viral Infections Detected in *Phytophthora condilina* by Total and Small RNA Sequencing. *Viruses* 13(4): 620.
- 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.
- 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.
- Burgess T. I., Simamora A. V., White D., Williams B., Schwager M., Stukely M. J. C., Hardy G. E. S. J. (2018): New species from *Phytophthora* clade 6a: Evidence for recent radiation. *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 41: 1–17.
- Cai G., Hillman B. (2013): *Phytophthora* Viruses. *Mycoviruses. Advances in Virus Research* 86: 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.
- 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(1): 165–169.
- Cai G., Myers K., Fry W. E., Hillman B. I. (2018): *Phytophthora infestans* RNA virus 2, a novel RNA virus from *Phytophthora infestans*, does not belong to any known virus group. *Archives of Virology* 164(2): 567–572.

- 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(1): 52–61.
- Cortesi P., McCulloch C. E., Song H., Lin H., Milgroom M. G. (2001): Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159: 107–118.
- Chiapello M., Rodríguez-Romero J., Ayllón M. A., Turina M. (2020): Analysis of the virome associated to grapevine downy mildew lesions reveals new mycovirus lineages. *Virus Evolution* 6(2): veaa058.
- Choi G., Nuss D. (1992): Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257(5071): 800–803.
- Constantinescu O., Thines M. (2010): *Plasmopara halstedii* is absent from Australia and New Zealand. *Polish Botanical Journal* 55(2): 293–298.
- Diemer G. S., Stedman K. M. (2012): A novel virus genome discovered in an extreme environment suggests recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses. *Biology Direct* 7: 13.
- 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.
- Farlow W. G., Seymour A. B. (1890): A Provisional Host-index of the Fungi of the United States. Cambridge, Library of Harvard.
- Felsenstein J. (1974): The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78(2): 737–756.
- Fukunishi M., Sasai S., Tojo M., Mochizuki T. (2021): Novel Fusari- and Toti-like Viruses, with Probable Different Origins, in the Plant Pathogenic Oomycete *Globisporangium ultimum*. *Viruses* 13(10): 1931.
- Ghabrial S. A. (1998): Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*. 16(1): 119–131.
- Ghabrial S. A., Caston J. R., Jiang D., Nibert M. L., Suzuki N. (2015): 50-plus years of fungal viruses. *Virology* (479–480): 356–368.
- 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(1): 6–15.

- 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.
- 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.
- 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.
- Henry, A.W. & Gilbert, H.C. (1924) Important fungous diseases of the common sunflower. *Minnesota Studies in Plant Science*, 5, 285–305 of the USA. Cambridge: Library of Harvard. In: Kitner M., Thines M., Sedlářová M., Vaculná L., Bán R., Körösi K., Iwebor M., Antonova T., Ali T., Nádvorník P., Lebeda A., Spring O. (2023): Genetic structure of *Plasmopara halstedii* populations across Europe and South Russia. *Plant Pathology* 72(2): 361–375.
- 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(5): 653–658.

- Jones D. T., Taylor W. R., Thornton J. M. (1992): The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences* 8(3): 275–282.
- Kovalíková A. (2020): *Plasmopara halstedii* virus v České republice. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Krupovic M., Zhi N., Li J., Hu G., Koonin E. V., Wong S., Shevchenko S., Zhao K., Young N. S. (2015): Multiple layers of chimerism in a single-stranded DNA virus discovered by deep sequencing. *Genome Biology and Evolution* 7(4): 993–1001.
- Leigh J. W., Bryant D. (2015): PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110–1116.
- Novotelnova N. S. (1966): Downy mildews of sunflower. Moscow, Leningrad, Nauka.
- Mayhew D. E., Cook A. L., Gulya T. J. (1992): Isolation and characterization of a mycovirus from *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* 70(9): 1734–1737.
- Miranda-Fuentes P., García-Carneros A. B., Molinero-Ruiz L. (2021): Updated Characterization of Races of *Plasmopara halstedii* and Entomopathogenic Fungi as Endophytes of Sunflower Plants in Axenic Culture. *Agronomy* 11(2): 268.
- Molinero-Ruiz L. (2022): Sustainable and efficient control of sunflower downy mildew by means of genetic resistance: a review. *Theoretical and Applied Genetics* 135(1): 3757–3771.
- Muhire B. M., Varsani A., Martin D. P. (2014): SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. *PLoS One*, 9(9): e108277.
- Myers J., James J. M. (2022): Mycoviruses. *Current Biology*: 32(4): R150–R155.
- 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): 115–128.
- Poimala A., Vainio L. J. (2020): Complete genome sequence of a novel toti-like virus from the plant-pathogenic oomycete *Phytophthora cactorum*. *Archives of Virology* 165(7): 1679–1682.
- Pospíchalová R. (2014): Výskyt *Plasmopara halstedii* viru v české populaci plísně slunečnicové. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Roux S., Enault F., Bronner G., Vaulot D., Forterre P., Kropovic M. (2013): Chimeric viruses blur the borders between the major groups of eukaryotic single-stranded DNA viruses. *Nature Communications* 4: 2700.

- Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(1): 406–425.
- Sasai S., Tamura K., Tojo M., Herrero M. L., Hoshino T., Ohki S. T., Mochizuki T. (2018): A novel non-segmented double-stranded RNA virus from an Arctic isolate of *Pythium polare*. *Virology* 522: 234–243.
- 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.
- Shiba K., Hatta C., Sasai S., Tojo M., Ohki S. T., Mochizuki T. (2018): Genome sequence of a novel partitivirus isolated from the oomycete *Pythium nunn*. *Arch. Virol.* 163, 2561–2563.
- Shiba K., Hatta C., Sasai S., Tojo M., Ohki S. T., Mochizuki T. (2019): A novel toti-like virus from a plant pathogenic oomycete *Globisporangium splendens*. *Virology* 537: 165–171.
- Shirako Y., Ehara Y. (1985): Composition of viruses isolated from *Sclerophthora macrospora* infected rice plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 51: 459–464.
- 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(3): 149–158.
- Spring O., Zipper R. (2006): Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* 110(6): 657–663.
- Sutela S., Poimala A., Vainio E. J. (2019): Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(5).
- Tamura K., Stecher G, Kumar S. (2021): MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673–80.
- 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., Rohce S., Serre F., Leguillon M., Delmotte F., Bordat A., Godiard L., Vincourt P., Vear F. (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.
- 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(63): 149–162.
- Wu S., Cheng J., Fu Y., Chen T., Jiang D., Ghabrial S. A., Xie J. (2017): Virus-mediated suppression of host non-self recognition facilitates horizontal transmission of heterologous viruses. *PLoS Pathogens* 13(3): e1006234
- Xie J., Wei D., Jiang D., Fu Y., Li G., Ghabrial S., Peng Y. (2006): Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Journal of General Virology* 87: 241–249.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- 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): 344–349.
- Yokoi T., Yamashita S., Hibi T. (2003): The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* Virus A. *Virology* 311(2): 394–399.
- Zimmer D. E. (1974): Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology* 64(11): 1465–1467.

Internetové zdroje:

Diagnostics (2014). *Plasmopara halstedii*. Bulletin OEPP/EPPO 44(3), 350–359. [online] [navštíveno 4. 3. 2023] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12160>

Index Fungorum. [online] [navštíveno 2. 3. 2023]. Dostupné z: <https://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=203446>

Lifemap NCBI. [online][navštíveno 2. 3. 2023]. Dostupné z <https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/>

Patogenita. NZIP – Národní zdravotnický informační portál [online] [navštíveno 7. 3. 2021] Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3781>