Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Bakalářská práce

RNA viry u basidiomycetů
RNA viruses in *Basidiomycetes*

Jiří Dvořák

V Praze 2006

vedoucí práce
RNDr. Jiří Gabriel DrSc.

Abstrakt

Basidiomycety jsou převážně vláknité houby, které vytvářejí přehrádkované zpravidla dikaryotické mycelium. Nejnápadněji se projevují tvorbou plodnic. Patří mezi ně jak houby hospodářsky užitečné, tak i významní škůdci. Ty pro člověka užitečné druhy se často pěstují ve velkém. Slouží buď jako potrava, nebo se z nich získávají nejrůznější látky. Dřevokazné a fytopatogenní houby jsou příkladem basidiomycetů, kteří způsobují lidem velké hospodářské ztráty. Výzkum virů basidiomycetů je zaměřen právě na tyto skupiny hub.

Modelovým organismem basidiomycetů pro studium virů je *Agaricus bisporus*. Je to také z tohoto hlediska nejdéle studovaný zástupce této skupiny hub. Byl u něho objeven vůbec první mykovirus. *Agaricus bisporus* patří mezi hojně pěstované houby. Hlavním důvodem intenzivního studia tohoto druhu je fakt, že tyto objevené viry mají na svého hostitele silně negativní účinek. Žampiony napadené těmito viry jsou většinou neprodejné a houbové farmy postižené takovouto virovou infekcí přicházejí často o celou úrodu. Viry byly nalezeny i u jiných jedlých hub, které se komerčně pěstují. Některé z těchto virů mají podobný negativní účinek na své hostitele jako viry u *Agaricus bisporus*.

Dřevokazné a fytopatogenní houby začaly být studovány na přítomnost virů právě proto, že byly v pěstovaných jedlých houbách objeveny viry, které mají negativní vliv na své hostitele. Pokud by se podařilo objevit podobné viry u těchto zástupců basidiomycetů, mohly by být využíváni k potlačení přirozeného výskytu hospodářsky škodlivých hub. V dřevokazných a fytopatogenních druzích hub ale byly dosud objeveny jen latentní viry a možnosti jejich šíření jsou značně omezené.

Dosud objevené viry basidiomycetů mají určité společné vlastnosti. Všechno jsou to RNA viry. Často mají segmentovaný genom. Většinou jsou enkapsidované, ale u mnohých druhů RNA elementů se nepodařilo určit jejich přítomnost ve virových kapsidách. Viry basidiomycetů postrádají, stejně jako ostatní mykoviry, extracelulární fázi životního cyklu. Šíří se pomocí anastomóz, které se vytvářejí mezi různými mycelii stejného druhu a také pomocí spor. Kvůli velkému množství RNA elementů, které byly objeveny v infikovaných buňkách hub, je poměrně obtížné identifikovat striktně vymezené druhy virů.

Seznam použitých zkratek

ABV1 ….. ***Agaricus bisporus*** **virus 1**

BBMV ….. broad bean mottle virus

BWYV ….. beet western yellows virus

BYDV ….. barley yellow dwarf virus

CarMV ….. carnation mottle virus

CcOAF ….. cytochrome c oxidace assembly factor

dsRNA ….. double-stranded RNA

ErLV ….. ***Erysimum*** **latent virus**

GlV ….. ***Giardia lamblia*** **virus**

LIV ….. La France infectious virus

MBV ….. mushroom bacilliform virus

MVX ….. mushroom virus X

OMIV-I ….. oyster mushroom isometric virus I

OMIV-II ….. oyster mushroom isometric virus II

OMSV ….. oyster mushroom spherical virus

ORF ….. open reading frame

PEMV ….. pea enation mosaic virus

PLRV ….. potato leafroll virus

PoV1 ….. ***Pleurotus ostreatus*** **virus 1**

RdRp ….. RNA-dependentní RNA-polymeráza

SBMV ….. southern bean mosaic virus

ScV-L-A ….. ***Saccharomyces cerevisiae*** **virus-L-A**

ssRNA ….. single-stranded RNA

UmV ….. ***Ustilago maydis*** **virus**

Seznam latinských a českých názvů hub

***Agaricus bisporus* ….. žampion dvojvýtrusný**

***Agrocybe aegerita* …..polnička topolová**

***Amanita muscaria* ….. muchomůrka červená**

***Armillaria cepistipes* ….. václavka drobná**

***Armillaria gallica* ….. václavka hlízovitá**

***Armillaria ostoyae* ….. václavka smrková**

***Flammulina velutipes* ….. penízovka sametonohá**

***Fomes fomentarius* ….. troudnatec kopytovitý**

***Heterobasidion annosum* ….. kořenovník vrstevnatý**

***Laricifomes officinalis* ….. troudnatec lékařský**

***Lentinula edodes* ….. houževnatec jedlý**

***Phallus impudicus* ….. hadovka smrdutá**

***Piptoporus betulinus* ….. březovník obecný**

***Pleurotus ostreatus* ….. hlíva ústřičná**

***Rhizoctonia solani* ….. kořenomorka bramborová**

***Serpula lacrymans* ….. dřevomorka domácí**

Obsah

1. Úvod 6

2. Charakteristika basidiomycetů 6

2.1. Zařazení 6

2.2. Obecná charakteristika 7

2.3. Ekologická charakteristika 7

2.4. Životní cyklus 8

2.5. Hospodářský význam basidiomycetů 9

3. Obecná charakteristika virů v basidiomycetách 11

3.1. Genom a míra patogenity 11

3.2. Životní cyklus a šíření virů 11

3.3. Klasifikace virů basidiomycetů 12

3.4. Oblasti směřování výzkumu virů basidiomycetů 13

3.5. Vhodné modelové organismy pro studium virů 14

4. Viry u *Agaricus bisporus* 15

4.1. Charakteristika druhu 15

4.2. LIV 15

4.3. *La France disease* 16

4.4. MVX 17

4.5. MBV 18

4.6. Problematika studia virů u *Agaricus bisporus* 20

5. Viry u *Pleurotus ostreatus* 20

5.1. Charakteristika druhu 20

5.2. dsRNA viry u *Pleurotus ostreatus* 21

5.3. OMSV 21

6. Viry u *Rhizoctonia solani* 22

6.1. Charakteristika druhu 22

6.2. dsRNA elementy u *Rhizoctonia solani* 22

7. Další směřování této práce 24

8. Seznam použité literatury 25

1. Úvod

Do dnešní doby bylo popsáno mnoho mykovirů z mnoha různých skupin hub. Pravděpodobně nejvíce prozkoumaný zástupce mykovirů je ScV-L-A ze *Saccharomyces cerevisiae* a s ním spojené satelitní dsRNA. Obecné vlastnosti mykovirů, jako je jejich šíření a vliv na hostitele, byly zkoumány v 70. letech na řadě zástupců ascomycetů (např. rody *Penicillium, Aspergillus*). Vůbec první popsaný mykovirus pocházel z *Agaricus bisporus*.

Zástupci basidiomycetů nepatřily zpočátku mezi intenzivně zkoumané druhy ohledně výskytu virů. Nejvíce studovaným byl právě *Agaricus bisporus*. Infekce této houby viry se totiž projevuje množstvím nápadných symptomů. Postupem času byla objevena řada RNA elementů i v jiných basidiomycetech. Většinou však nemají na hostitele žádný účinek. V 80. a polovině 90. let probíhal intenzivní výzkum virů u hospodářsky významných basidiomycetů. V této době bylo odhaleno několik virů, které byly zodpovědné za choroby těchto pro člověka významných druhů hub. V dnešní době jsou výzkumy virů zaměřeny na poznání jejich ekologie a přirozeného výskytu. Zkoumá se vliv virů na fytopatogenní houby. Některé současné výzkumy potvrzují dřívější teorie o původu určitých mykovirů z buněčných genů. Byly objeveny zajímavé podobnosti mezi některými mykoviry a zástupci určitých skupin rostlinných RNA virů.

Dosavadní výzkumy virů basidiomycetů nedávají příliš ucelenou představu o jejich působení na molekulární úrovni. Stejně tak zůstávají nevyřešeny vztahy mezi jednotlivými druhy RNA elementů, které spolu koexistují v hostitelských buňkách. Často velké množství druhů RNA molekul nalezených současně v jednotlivých hostitelích znesnadňuje identifikaci jednotlivých virových entit. Ukazuje se, že některé viry popsané jako distinktní druhy jsou pravděpodobně výsledkem různých kombinací RNA molekul ve virových kapsidách. V dnešní době se proto obecně přechází od popisného výzkumu houbových virů k jejich funkčnímu poznávání.

2. Charakteristika basidiomycetů

2.1 Zařazení

Basidiomycety patří mezi jednu ze tří hlavních tříd Basidiomycot. Druhé dvě hlavní třídy se nazývají *Uredinomycetes* a *Ustilaginomycetes*. Mezi basidiomycety řadíme zhruba 2000 druhů, což je téměř 70% známých Basidiomycot. Naprostá většina basidiomycetů patří do skupiny *Agaricomycetidae* (Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungus, 9th Edition).

2.2. Obecná charakteristika

Basidiomycety jsou především vláknité houby, jejichž nejnápadnější charakteristikou je tvorba plodnic. Plodnice jsou mnohobuněčné rozmnožovací útvary. Jsou tvořeny spletencem hyf a vytváří nepravé pletivo zvané plektenchym. Nejdůležitějším typem buněk v plodnicích jsou tzv. basidie, ve kterých vznikají basidiospory. Plodnice mohou být velmi drobné (několik milimetrů), ale některé druhy vytvářejí plodnice vážící přes 100 kg (např. *Bridgeoporus nobilissimus*); (Burdsall *et al.* 1996). Většina jedlých hub patří mezi basidiomycety.

Nejdéle trvající fází životního cyklu basidiomycetů je dikaryotické (někdy i monokaryotické) přehrádkované mycelium. To se může rozrůstat pod povrchem půdy do velkých ploch. Mycelium ve středové části těchto ploch časem odumírá, a na okraji tak vzniká prstenec mycelia, ze kterého pak vyrůstají plodnice jakoby v kruhu. Takto seskupeným plodnicím se říká čarodějné kruhy (Velenovský 1920).

Jednotícím morfologickým znakem basidiomycetů jsou tzv. dolipory. Jsou to otvory v přehrádkách přilehlých buněk. Dolipory jsou ohraničeny strukturami, které se nazývají „parenthesomes“. Basidiomycety můžeme dělit do jednotlivých skupin na základě rozdílné morfologie „parenthesomes“. Tyto útvary se nazývají „parenthesomes“, protože na snímcích z transmisní elektronové mikroskopie připomínají závorky, angl. parentheses.

2.3. Ekologická charakteristika

Basidiomycety se významnou měrou podílejí na koloběhu uhlíku v přírodě. Zvláště důležité jsou pro rozklad dřevní hmoty, hlavně ligninu. Mezi basidiomycetami se vyskytují saprofyti, parazité i symbiotické houby.

Saprofytické houby (např. *Agaricus* sp.) jsou součástí detritového řetězce spolu s bakteriemi, aktinomycetami a detritofágními živočichy. Basidiomycety se uplatňují hlavně v posledních fázích rozkladu detritu.

Významné parazitické houby jsou houby především dřevokazné. Jedná se zejména o fakultativní parazity, kteří mohou růst na mrtvém i živém dřevě (např. *Heterobasidion annosum, Pleurotus ostreatus, Armillaria* sp.). Basidiomycety mohou napadat i významné kulturní plodiny. Příkladem je *Rhizoctonia solani*, která parazituje na bramborech. Podle enzymatické výbavy rozdělujeme dřevokazné houby do dvou skupin. První skupinu hub tvoří tzv. houby hnědé hniloby, které mají jen celuázu a celobiózu. Dřevo se zbarvuje do hněda uvolněným ligninem (např. *Fomtopsis* sp., *Piptoporus* sp., *Gloeophyllum* sp.). Druhou skupinu tvoří tzv. houby bílé hniloby, které mají navíc i ligninolitické enzymy. Dřevo se rozkládá úplně. (např. *Pleurotus* sp., *Phellinus* sp.)

Symbiotické houby vytvářejí řadu interakcí především s rostlinami, ale i s živočichy. Mykorhiza představuje hlavní způsob interakcí mezi houbami a cévnatými rostlinami. Tento vztah mezi houbou a rostlinou je prospěšný pro obě strany. Mycelium houby rozrostlé na velké ploše umožňuje rostlině čerpat vodu a v ní rozpuštěné minerální látky. Hyfy hub pokrývají povrch kořenů, a poskytují jim tak mechanickou ochranu. Obecně pak mykorhiza umožňuje vyšší adaptabilitu rostlin na extrémní podmínky. Rostlina zase houbě poskytuje sacharidy a některé vitamíny. Kořeny rostlin také vylučují určité látky, které jsou nezbytné pro tvorbu plodnic. Základní rozdělení mykorhizy na endomykorhizu a ektomykorhizu je založeno na tom, jestli houba proniká do rostlinných buněk nebo ne (Gryndler a kol. 2004). U basidiomycetů se vyskytují oba druhy symbiózy. Příkladem interakce mezi zástupcem basidiomycet a živočichů je vztah mezi africkými termity a houbou z rodu *Termitomyces.* Termiti ze skupiny *Macrotermitinae* pěstují tyto houby uvnitř svých kolonií (Aanen & Eggleton 2005). Termiti se živí směsí dřeva a těchto hub. Exoenzymy vylučované houbou rozkládají dřevní hmotu a zvyšují tak její stravitelnost pro termity. Obecně u hub neexistují ostré hranice mezi mutualistickou symbiózou, saprotrofií a parazitismem.

2.4. Životní cyklus

Basidiospory jsou pohlavně diferencovány. Jednojaderná haploidní basidiospora vyklíčí v tzv. primární přehrádkované mycelium. To je poměrně krátkověké a musí se setkat s pohlavně odlišným myceliem. Při kontaktu kompatibilních mycelií dochází k plazmogamii. Vzniká tzv. sekundární mycelium, které je dikaryotické (Klaban 2005). Dikaryotické mycelium představuje významnou fázi v životním cyklu basidiomycetů. Mycelium je přehrádkované a většinou se tvoří přezky. Tvorba přezek je považována za primitivní znak (časté jsou například u chorošů). Jen z dikaryotického mycelia mohou vznikat plodnice. Výjimkou je například *Agaricus bisporus*, u kterého mohou vzniknout plodnice z primárního haploidního mycelia.

Plodnice jsou nejnápadnějšími útvary vytvářené basidiomycetami. Jejich vzniku předchází nahloučení hyf a tvorba primordií. Jsou to struktury většinou velmi krátkověké. Plodnice *Phallus impudicus* vyroste za několik hodin a brzy odumírá. Plodnice chorošů ovšem mohou růst až několik měsíců. Pletivo plodnic může obsahovat až tři typy hyf. Hyfy generativní, skeletové a vazbové. Na základě toho rozdělujeme hyfové systémy na monomitické, které mají jen generativní hyfy (naprostá většina *Agaricales*). Dimitické systémy, které mají generativní a skeletové hyfy a trimitické sytémy mající všechny tři typy

hyf. Přítomnost vícero typů hyf v plodnici zvyšuje jejich pevnost. Nejdůležitější částí plodnice je výtrusorodá vrstva, která se nazývá hymenium.

Hymenium je vrstva různých buněk s různou funkcí, z nichž nedůležitější jsou tzv. basidie. Basidie mají na svém povrchu hrbolky (budoucí spory). Spojení mezi těmito útvary a basidiemi se nazývá sterigma. V každé basidii se tvoří od dvou do osmi basidiospor. Basidie jsou buňky, kde dochází ke karyogamii dvou haploidních jader a následně k meióze. Výsledkem těchto procesů jsou čtyři haploidní jádra, která posléze migrují do čtyř spor. Nejčastěji tak vznikají čtyři basidiospory. Proces basidiosporogeneze však může být složitější a může docházet k takzvané post-meiotické mitóze, při které vzniká osm haploidních jader. Post-meiotická mitóza může proběhnout v basidiích, sporách nebo sterigmatech. Dalšími typy buněk vyskytujícími se v hymeniu jsou bazidioly, cystidy, hyfoidy a sety.

Bazidioly jsou útvary morfologicky podobné basidiím. Jsou sterilní a tvoří jakousi podpůrnou strukturu hymenia. Vývojově se pravděpodobně jedná o basidie, které ztratily svou původní funkci a zůstaly jako výstelka.

Cystidy jsou sterilní buňky druhově charakteristického tvaru. V hymeniu mohou i chybět. Vylučují terpeny a silice, a dávají tak houbám charakteristickou vůni.

Hyfoidy a sety jsou dalšími sterilními elementy v hymeniu. Vytvářejí určitý vzduchový prostor okolo basidiospor, a umožňují tak výměnu plynů.

Basidiomycety vytvářejí i trvanlivé útvary, pomocí kterých přečkávají nepříznivá období. Jedná se o takzvaná sklerocia, útvary různého tvaru a velikostí. Vnitřek je tvořen tenkostěnnými hyfami obsahující množství zásobních látek. Na povrchu se nachází kompaktní ochranná vrstva tlustostěnných hyf, které mohou být různě barevné (Velenovský 1920). Za příznivých podmínek pak mohou ze sklerocia vyrůstat přímo plodnice. Jiným typem trvalých struktur jsou rhizomorfy vytvářené *Armillariemi*. Rhizomorfy jsou kompaktní provazce mycelia, rozrůstající se pod kůrou napadených stromů. Vnitřek provazců je tvořen bílými vlákny. Na povrchu je hnědočervená až hnědočerná kůra. Jsou to vytrvalá vlákna podhoubí, pomocí nichž se *Armillarie* šíří od jednoho stromu k druhému (Jirout 1928).

2.5. Hospodářský význam basidiomycetů

U basidiomycetů se setkáváme s druhy, které jsou pro člověka užitečné. Ale i s druhy způsobující velké ekonomické ztráty v různých odvětvích hospodářství.

Některé druhy basidiomycetů se průmyslově pěstují. V Evropě je nejrozšířeněji pěstovanou houbou *Agaricus bisporus*. Jeho výhodou je, že tvoří plodnice na haploidním myceliu. V 16. století byl ve Francii pěstován v pařeništích na koňském trusu. Roku 1678

Marchant přesadil bílá vlákna pod houbami do nové půdy, a dokázal tak vypěstovat nové plodnice. Od této doby se datuje rozmach pěstování žampionů v Evropě. Průmyslový rozvoj pěstování hub pak nastal po 2. světové válce. U nás se žampiony nejdříve pěstovaly v zámeckých zahradách. Od poloviny 20. století jsou budovány kryté žampionárny. Dalším velmi často pěstovaným druhem hub je *Pleurotus ostreatus*. Basidiomycety jsou pěstovány nejen v Evropě. Některé druhy se hojně pěstují v Asii. V Číně je známo pěstování *Auricularií* od 3. století před naším letopočtem. V Japonsku je pěstování hub *Lentinula edodes* (shii-take) datováno do 2. století našeho letopočtu. Jinými druhy hub zde pěstovanými jsou *Hydnum olidum* (kawa-take), *Pleurotus subfunereus* (ynka) (Velenovský 1920). Na Tchaj-wanu a v Japonsku je pěstována *Flammulina velutipes*, v Číně zase *Volvariella volvacea*.

Některé druhy basidiomycetů jsou využívány pro získávání různých látek. Například z houby *Amanita muscaria* se získává kyselina ibotenová. Ta se používá v potravinářství jako náhrada za glutamát sodný (konzervační činidlo). Některé houby se používaly v lidovém léčitelství. *Fomes fomentarius* byl používán k lokálnímu zastavení krvácení. Prášek z dužiny houby *Laricifomes officinalis* se užíval pro podporu trávení, byl přidáván do žaludečních likérů. V některých basidiomycetech byla objevena cytostatika (např. *Lentinula edodes, Flammulina velutipes, Piptoporus betulinus*).

Jinou skupinou basidiomycetů jsou houby, které negativně zasahují do různých odvětví lidské činnosti. Nejvýznamnější jsou houby dřevokazné. Jedná se především o fakultativní parazity. Takové houby zpravidla rostou na mrtvém dřevě. Živé stromy dokáží infikovat v důsledku jejich fyziologického oslabení (Černý 1989). Vstupní branou pro infekci jsou lokální mechanická poranění na kořenech, kmenech a větvích. Napadené stromy pak postupně ztrácejí strukturální stabilitu a jsou náchylné k vývratům. Dřevokazné houby tedy způsobují velké ekonomické škody v lesnictví. Napadené dřevo vykazuje estetické i strukturální vady a je nepoužitelné téměř ve všech odvětvích dřevozpracujícího průmyslu. Jako příklady takovýchto dřevokazných hub lze uvést *Armillaria ostoyae, Heterobasidion annosum*. Velké škody ve stavebnictví způsobuje houba hnědé hniloby *Serpula lacrymans*. Napadá pouze mrtvé dřevo. Vyskytuje se v prostředí s velkou vlhkostí a příznivou teplotou (zatékající půdy, teplé sklepy). Vytváří velmi pevné a odolné provazce mycelia, které nelze téměř zničit. Mycelium dokáže prorůstat i kamennou zdí. *Serpula lacrymans* byla dokonce nalezena i ve výdřevách uranových dolů 500 metrů pod zemí. Způsobuje kuboidní rozpad dřeva, který nakonec vede ke zhroucení napadených dřevěných struktur. Některé basidiomycety mohou parazitovat i na kulturních plodinách (např. *Rhizoctonia solani*).

3. Obecná charakteristika virů v basidiomycetách

3.1. Genom a míra patogenity

Všechny dosud objevené viry v basidiomycetách jsou RNA viry. Naprostá většina těchto virů jsou dsRNA viry. Doposud byly z basidiomycetů izolovány pouze dva ssRNA viry. OMSV z *Pleurotus ostreatus* (Hyun *et al.* 2003) a MBV z *Agaricus bisporus* (Tavantzis *et al.* 1980). Genomy virů objevené v basidiomycetech jsou segmentované i nesegmentované. Většinou se jedná o genomy enkapsidované, ale byly nalezeny i nahé dsRNA elementy u *Agrocybe aegerita* (Barroso & Labarere 1990). Stejně tak nebyla například u všech dsRNA elementů, které byly nalezeny u *Agaricus bisporus*, prokázána přítomnost v izolovaných kapsidách.

Roku 1950 byla u pěstovaných žampionů popsaná choroba, která způsobovala citelné ztráty na úrodě. Hollings v roce 1962 označil za původce této choroby virus. Jednalo se o vůbec první popsaný virus hub (Lemke & Nash 1974). Choroba byla podle místa svého největšího rozšíření nazvána *La France disease*. U žampionů se setkáváme asi s nejagresivnějšími projevy houbových virů. A dosud nebyl nalezen žádný kmen *Agaricus bisporus*, který by byl rezistentní proti virům. Naprostá většina všech houbových virů je ale latentních a jejich výskyt v houbách není spojen s žádnými symptomy. U basidiomycetů nebyl popsán žádný virus, který by byl pro svého hostitele smrtící. Tím můžeme vysvětlit, proč byly objeveny tak pozdě.

3.2. Životní cyklus a šíření virů

U žádného zástupce viru basidiomycetů nebyly dopodrobna popsány všechny fáze jeho životního cyklu. Poměrně malá část izolovaných dsRNA elementů byla podrobena hlubšímu zkoumání. Přesto můžeme říci, že se u virů basidiomycetů vyskytují všechny strategie exprese genomu, které se obecně vyskytují u RNA virů. Byla popsána tvorba fúzovaných polypeptidů a subgenomových RNA. Při translaci se může uplatňovat ribozomální posun čtecí fáze. Jiný možný mechanismus je sklouznutí ribozómu po AUG kodónu prvního ORF, který se překrývá s následným ORF. Segmentované genomy virů zase umožnují diferenciální translaci jednotlivých RNA elementů, které kódují jednotlivé proteiny. Pro viry basidiomycetů je obecně charakteristické, že postrádají ve svém životním cyklu extracelulární fázi. Viry nelyzují napadené buňky a nejsou schopny infikovat buňky chráněné buněčnou stěnou (Lemke & Nash 1974).

Viry ke svému šíření využívají schopnost basidiomycetů tvořit anastomózy. Anastomózy jsou propojení mezi hyfami jednotlivých mycelií stejného druhu a umožňují vzájemnou výměnu buněčných obsahů. Jedná se o tzv. horizontální přenos virů. Aby byl tento přenos úspěšný, musí být fúzující mycelia geneticky kompatibilní. Inkompatibilita mycelií představuje jednu z možných přírodních bariér v šíření virů. Nicméně nejedná se o bariéru absolutní a byl prokázán přenos dsRNA elementů u jinak navzájem reprodukčně izolovaných populací *Heterobasidion annosum* (Ihrmark *et al.* 2002). Viry se také mohou šířit pomocí spor. Jde o tzv. vertikální přenos virů. Úspěšnost přenosu virů do spor závisí na typu spor a druhu houby. Přenos dsRNA elementů do nepohlavních spor (konidií), který byl studován u basidiomycetu *Heterobasidion annosum*, probíhá s mnohem menší úspěšností než přenosy dsRNA elementů do konidií u ascomycetů (Ihrmark *et al.* 2004). Naopak přenos dsRNA elementů do basidiospor byl pozorován téměř u všech basidiomycetů. U jednotlivých druhů i izolátů se však setkáváme s rozdíly v úspěšnosti infekce basidiospor. Nabízí se dvojí vysvětlení. Určité druhy hub by mohly disponovat mechanismy, které znesnadňují přenos dsRNA elementů do basidiospor. Tento dosud nepotvrzený předpoklad by byl zajímavým příkladem aktivní obrany basidiomycetů proti šíření virů. Jinou možností je, že úspěšnost infekce basidiospor závisí na koncentraci dsRNA elementů v myceliu. Poměrně častý přenos dsRNA elementů do basidiospor se vyskytuje u hub *Phaffia rhodozyma*, *Agaricus bisporus* a *Rhizoctonia solani* (Ihrmark *et al.* 2004). Naopak u druhu *Agrocybe aegerita* se zatím přenos dsRNA elementů do basidiospor nepodařilo jednoznačně prokázat (Barroso & Labarere 2000).

3.3. Klasifikace virů basidiomycetů

Do dnešní doby bylo izolováno z basidiomycetů mnoho různých dsRNA elementů. Na základě funkčních počítačových analýz osekvenovaných dsRNA se podařilo některé objevené viry zařadit do již stávajících skupin houbových virů (*Totiviridae, Partitiviridae, Barnaviridae*). Srovnávací analýzy nukleotidových a aminokyselinových sekvencí poukázaly na homologie v primární struktuře určitých proteinů mezi některými houbovými viry a některými skupinami rostlinných virů (např. sobemoviry, bromoviry, luteoviry, tymoviry).

Totiviridae Název této rodiny je odvozen od latinského slova *totus* (nedělený). Viry náležející do této skupin mají genom tvořený jedinou molekulou dsRNA o velikosti 4,6 – 7,0 kbp. Izometrické viriony o průměru 30 – 40 nm obsahují jeden hlavní kapsidový protein o velikosti 70 až 100 kDa (Pospíšek 1998).

Partitiviridae Zahrnuje viry izolované z hub a rostlin. Název je odvozen z latinského slova *partitius* (dělený). Genom partitivirů je tvořen dvěma segmenty dsRNA. Segmenty mají velikost 1,4 až 3,0 kbp. Menší segment kóduje kapsidový protein, větší RNA polymerázu. Izometrické viriony mají 30 – 40 nm v průměru (Pospíšek 1998).

Barnaviridae Tato rodina má jediného zástupce. Jedná se o MBV, jehož hostitelem je *Agaricus bisporus*. Genom je tvořen jedinou molekulou (+) ssRNA o délce 4 kbp (Revill *et al.* 1994). Viriony mají protáhlý tvar o délce 48 – 53 nm a šířce 18 – 20 nm. Jsou složeny z jednoho hlavního kapsidového proteinu o velikosti 24,4 kDa (Pospíšek 1998).

3.4. Oblasti směřování výzkumu virů basidiomycetů

Naprostá většina studií virů u basidiomycetů je zaměřena na pěstované jedlé houby. Důvodem je velký negativní dopad objevených virů na produkci těchto hub, a s tím spojených velkých ekonomických ztrát. *Agaricus bisporus* je nejdéle a nejintenzivněji studovaným zástupcem basidiomycetů ohledně výskytu virů.

U této houby bylo poprvé dokázáno, že odpovědnost za nemoc postihující houby nese virus. Do dnešní doby bylo u druhu *Agaricus bisporus* objeveno velké množství různých RNA elementů. Některé tyto elementy byly osekvenovány. Ale pouze u malé části z nich se podařilo určit jejich informační smysl. A stejně tak není zatím jasně určena odpovědnost jednotlivých elementů za konkrétní symptomy choroby. *Agaricus bisporus* může být infikován několika různými virovými entitami současně. Projevy všech těchto virů jsou ale téměř totožné. Z toho důvodu nelze na základě fenotypového projevu choroby určit, jaký virus je za ni odpovědný. Dokonce i patogeni nevirového původu mohou u žampionů vyvolávat choroby, které se svými symptomy podobají těm virovým. Výzkum se proto v tomto případě zaměřuje na jasnou, rychlou a snadnou detekci jednotlivých elementů. V případě vypuknutí epidemie by pak bylo snadné určit, zda je za její propuknutí odpovědný virus. Případně o který virus se jedná (Romaine & Schlagnhaufer 1995). Rychlá a spolehlivá detekce virů je důležitá zejména pro lokalizaci ohnisek nákazy a zamezení dalšímu šíření virové infekce. Infekce se šíří pomocí fragmentů infikovaného mycelia a infikovanými sporami.

Viry byly také nalezeny v jiných komerčně pěstovaných houbách. Příkladem může být *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* a *Pleurotus ostreatus* (Magae & Hayashi 1999) Jedná se o houby zvláště hojně pěstované v Asii. I v těchto případech způsobují virové nákazy často citelné ztráty na úrodě. U těchto druhů je množství objevených RNA elementů zatím menší

než u žampionů. Nicméně u *Pleurotus ostreatus* byl objeven v pořadí teprve druhý ssRNA virus basidiomycetů (Hyun *et al.* 2003).

Mezi basidiomycety patří velké množství různých druhů, které parazitují na hospodářsky významných rostlinách. Jedná se především o houby dřevokazné (např. *Heterobasidion annosum*, *Serpula lacrymans*). Ale najdeme zde i zástupce, kteří parazitují na kulturních plodinách např. *Rhizoctonia solani*. Tito parazité představují druhou skupinu basidiomycetů, na které je zaměřen výzkum virů. Doposud nebyl u žádné dřevokazné houby objeven virus, který by jí výraznějším způsobem škodil. A i neinfekčnost houbových virů a jejich omezené možnosti šíření, znesnadňuje jejich potenciální využití v biologickém boji proti dřevokazným houbám. Nicméně v některých provedených studiích u *Heterobasidion annosum* se potvrdilo, že basidiospory obsahující dsRNA elementy mají sníženou klíčivost (Ihrmark *et al.* 2004). Viry by tedy mohly teoreticky znesnadňovat šíření dřevokazných hub. Zatím se ale v přírodě nepodařilo prokázat, že by nějaké druhy dřevokazných hub byly ve svém šíření omezovány viry.

3.5. Vhodné modelové organismy pro studium virů

Basidiomycety používané pro studium virů by měly splňovat určitá základní kritéria. Především důležitá je častá tvorba plodnic. Tato podmínka je snadno splnitelná při studiu komerčně pěstovaných hub. Neméně podstatné je, aby nasbírané plodnice pocházely z co možná největšího počtu lokalit. To je důležité zejména pro studium přirozeného výskytu a ekologie virů. Nasbírané plodnice mohou přímo sloužit jako vzorky na analýzu RNA elementů. Tento postup se často používá tehdy, když je potřeba rychle určit přítomnost virů v plodnicích z houbových farem. Z plodnic mohou být také odebrány části plektenchymu, které se následně pěstují ve vhodných kultivačních mediích. Takto získané a přesně definované laboratorní kmeny se používají například pro studium přenosu RNA elementů mezi jednotlivými izoláty.

S tím souvisí další problematika výběru vhodného druhu basidiomycetu. Úspěšnost pěstování a rychlost růstu závisí na tom, jakou používá daná houba potravní strategii. Relativně nejsnadněji se za laboratorních podmínek pěstují houby dřevokazné. Tyto druhy disponují výkonným enzymatickým aparátem, který rozkládá celulózu a někdy i lignin (tzv. houby bílé hniloby). To jsou velmi stálé a odolné biopolymery. Dřevokazné houby proto dobře rostou na jakémkoli komplexním mediu. Poněkud hůře se za laboratorních podmínek pěstují saprofytní houby. Jejich hlavní nevýhodou je pomalý růst. Nejhůře kultivovatelnými houbami jsou druhy mykorhizní, které ke svému růstu potřebují často velmi specifické látky.

Tyto látky dostávají v přírodě od svých rostlinných symbiontů. Takové specifické podmínky lze ale při laboratorním pěstování těžko zajistit. Studium přenosu virů do basidiospor je ještě obtížnější. Vyžaduje si tvorbu plodnic za laboratorních podmínek. Pouze poměrně malé množství nenáročných druhů basidiomycetů dokáže fruktifikovat v laboratoři. Nalezení vhodných podmínek, za kterých houby tvoří plodnice, může být obtížné a je to úkol často neproveditelný.

4. Viry u *Agaricus bisporus*

4.1. Charakteristika druhu

Agaricus bisporus je houba v přírodě rostoucí mimo les. Hojně se vyskytuje na hnojených loukách, travnatých pastvinách. Všude kde má dostatečný zdroj dusíku. Vytváří plodnice od května do podzimu. Dnes jsou některé kmeny pěstovány uměle v obrovských množstvích. Jeho hlavní výhoda při pěstování spočívá v tom, že tvoří plodnice i na primárním haploidním myceliu. Klobouk má 5 – 8 cm v průměru. Barva klobouku je bělavá nebo hnědavá. Třeň je bělavý a má přes centimetr v průměru. Má válcovitý tvar o délce zhruba stejné, jako je průměr klobouku. Lupeny jsou v mládí narůžovělé. Postupem času jejich barva hnědne až černá. Výtrusy jsou hnědé. Mají vejčitý tvar o průměru 8 – 9 µm (Velenovský 1920, pod jménem *Psalliota campestris*).

4.2. LIV

LIV (La France isometric virus) patří mezi nejintenzivněji studované viry basidiomycetů. Jedná se o enkapsidovaný virus. Virové částice mají 34 nm v průměru. Tento virus je pravděpodobně odpovědný za chorobu zvanou *La France disease* (Van der Lende *et al.* 1995). V postižených plodnicích se nacházejí i částice jiných velikostí. V infikovaných vzorcích bylo nalezeno zpravidla devět někdy deset dsRNA elementů. Van de Lende navrhuje název ABV1 (Agaricus bisporus virus 1), protože dosud nebyl s jistotou určen příčinný vztah tohoto viru k *La France disease*. Označení a velikosti elementů v kpb jsou následující: L1(3,6), L2(3,0), L3(2,8), L4(2,7), L5(2,5), L6(2,35), M1(1,6), M2(1,35), S1(0,86), S2(0,78); (Van der Lende *et al.* 1996). Byly osekvenovány elementy L3, M1, M2 (Harmsen *et al.* 1991); L1, L5 (Van der Lende *et al.* 1996). V purifikovaných virionech byly nalezeny elementy L1, L2, L3, L4, L5, M2. Občas byly doprovázeny dalšími třemi elementy M1, S1, S2 (Van der Lende *et al.* 1994). dsRNA element L6 byl nalezen v nemocných i zdravých

plodnicích (Van der Lende *et al.* 1996). Viriony obsahují dva hlavní proteiny o velikostech 90 kDa a 120 kDa a jeden minoritní protein o velkosti 115 kDa (Van der Lende *et al.* 1994).

L1 segment má jeden velký ORF, který obsahuje 1087 aminokyselin. To by teoreticky odpovídalo proteinu o velikosti 121,8 kDa. Funkční počítačová analýza odhalila homologie mezi tímto proteinem a již známými RdRp jiných virů. Největší podobnosti se ukázaly s viry ScV-L-A, UmV a GlV (Van der Lende *et al.* 1996). Tyto viry patří mezi *Totiviridae* (Pospíšek 1998). Do této rodiny ale nemůžeme LIV zařadit. Zástupci této rodiny totiž mají na rozdíl od LIV nesegmentovaný genom. L1 segment tedy kóduje RdRp a odpovídá mu minoritní kapsidový protein o velikosti 115 kDa. I když odvozená aminokyselinová sekvence předpokládala protein o velikosti 121,8 kDa (Van der Lende *et al.* 1994, Van der Lende *et al.* 1996).

L3 segment pravděpodobně kóduje kapsidový protein o velikosti 90 kDa (Harmsen *et al.* 1991). Největší s virionem spojený protein o velikosti 120 kDa je zřejmě kódován L2 segmentem, jediným zbývajícím dsRNA elementem, který má dostatečnou kódovací kapacitu. L5 segment má ORF o 427 aminokyselinách, což by teoreticky odpovídalo proteinu o velikosti 81 kDa. Nebyla zjištěna žádná homologie mezi tímto domnělým proteinem a známými proteiny (Van der Lende *et al.* 1996).

M2 dsRNA kóduje protein, který byl objeven v cytoplasmě postižených plodnic. Tento protein o velikosti 40 kDa (Harmsen *et al.* 1991) se ale nevyskytuje ve virionech. Funkce tohoto proteinu je neznámá, ale může souviset s rozvojem choroby (Van der Lende *et al.* 1996).

4.3. *La France disease*

La France disease je jedna z nejvážnějších chorob běžně pěstovaných hub. Na rozvoji této nemoci se může podílet více virů. S chorobou ale vždy souvisí 34 nm virové částice. A v postižených houbách bylo většinou nalezeno devět specifických dsRNA elementů. Jde o již výše zmíněný LIV. Občas se v infikovaných plodnicích nachází také tzv. MBV. Je to ssRNA virus (Romaine & Schlagnhaufer 1995). Jeho podíl na rozvoji choroby je neznámý. Houbové farmy postižené touto chorobou přicházejí často o celou úrodu. Je rozšířená po celém světě a dá se těžko vymýtit.

Symptomy choroby jsou ve svých důsledcích zodpovědné za snížené výnosy, nebo až za úplnou neprodejnost vypěstovaných hub. Mycelium roste na záhonech pomalu. Na záhonech se také tvoří holá místa. Vyskytují se různé malformace plodnic. Obecně je choroba nebezpečná hlavně při první fázi pěstování, kdy na substrátu klíčí čerstvě naočkované

mycelium. Pokud dojde k infekci později, je celý průběh nemoci už mírnější. Choroba se šíří pomocí fragmentů infikovaného mycelia a pomocí infikovaných spor (Irvine & Moran 1999).

Proti chorobě se bojuje zpřísněním hygienických pravidel na houbových farmách. Důležité je hlavně důsledné oddělení jednotlivých fází pěstování tak, aby mezi nimi nedocházelo k přenosu spor a mycelia. Proto se na farmách používají různé filtry ve vzduchotechnice a těsnění na dveřích, které zamezují vzájemným kontaminacím z jednotlivých místností. Nový substrát se musí před vlastním zaočkováním zbavit všech nežádoucích houbových spor. To se provádí sterilizací při 65 °C po dobu 16 hodin. Dodržení tohoto postupu je důležité, protože právě infekce při klíčení mycelia způsobuje často ztrátu celé úrody. Jako účinné se osvědčily i některé změny ve výrobních postupech. Dnes například výroba substrátu a vlastní pěstování probíhá v oddělených provozech.

4.4. MVX

V polovině 90. let se v Britanii na houbových farmách objevila nová choroba. Symptomy byly podobné jako u *La France disease*, ale komerční test na 34 nm virus byl negativní. Ukázalo se, že příčinou choroby jsou nové dsRNA elementy (Gaze *et al.* 2000). Choroba byla nazvána mushroom virus X (MVX). Z velkého množství vzorků odebraných v různých místech postižení bylo izolováno celkem 26 druhů dsRNA elementů. Jejich velikost se pohybovala v rozmezí od 640 bp do 20,2 kbp. Většina z těchto elementů nebyla nikdy předtím u *Agaricus bisporus* popsána.

Tyto elementy byly odpovědné za velké množství symptomů, z nichž některé se podobaly těm u *La France disease*. Ale objevily se zde i symptomy zcela nové. Příkladem může být hnědé zbarvení plodnic u jinak bílých kmenů žampionů. V jiných případech zase plodnice ztratily barvu. Tyto symptomy se nikdy nevyskytly u *La France disease*. Takto znehodnocené houby nemohly přijít do prodeje. Postižení bylo na různých místech odlišné. V některých oblastech se vyskytlo jen málo příznaků. Jiné oblasti byly těžce zasaženy a objevovaly se tam malformace plodnic jako při *La France disease*. Na takových místech docházelo k velkým ztrátám na úrodě. Vzorky z různých oblastí byly podrobeny analýze na výskyt dsRNA elementů. Získané dsRNA profily se lišily podle místa odběru. Frekvence výskytu jednotlivých druhů dsRNA byly různé. Z 26 dsRNA se tři elementy běžně vyskytovaly i u asymptomatických vzorků. Tyto elementy mají velikost 16,2 kbp, 9,4 kbp a 2,4 kbp. Čtyři nejmenší dsRNA elementy o velikosti 2,0 kbp, 1,8 kbp, 0,8 kbp a 0,6 kbp byly vždy nalezeny ve spojitosti s hnědnutím plodnic. Pouze u těchto čtyř druhů RNA se podařilo určit jejich spojitost s nějakým symptomem. MVX se šíří podobně jako LIV infikovaným

myceliem a sporami. Stejně tak obrana proti MVX se podobá obraně proti *La France disease* a její podstatou je zpřísnění hygienických pravidel na postižených farmách.

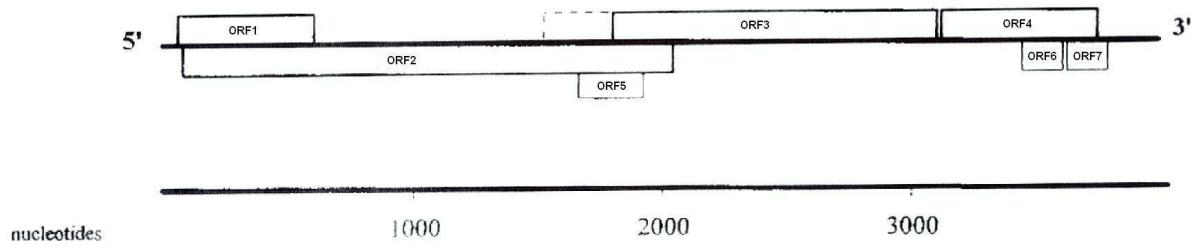
Mezi MVX a LIV existují významné rozdíly. LIV je enkapsidovaný virus, který je vždy spojený s devíti určitými dsRNA elementy a choroba *La France disease* je po symptomatické stránce jasně definovaná. Naproti tomu houby postižené MVX obsahují různé profily dsRNA elementů. Stejně tak kombinace možných symptomů jsou variabilní. U MVX se zatím nepodařilo objevit virion, který by se vyskytoval společně s těmito elementy. Celková šíře dsRNA elementů, které se vyskytují u MVX, je větší než množství dsRNA elementů spojených s LIV. dsRNA elementy LIV se v cytoplasmě vyskytují v mnohem větších koncentracích než dsRNA elementy MVX. To může být jedna z příčin, proč byly tyto elementy objeveny tak pozdě. Velké množství dsRNA elementů u MVX naznačuje, že se jedná o více než jeden virus (Grogan *et al.* 2003).

4.5. MBV

MBV (mushroom bacilliform virus) byl objeven roku 1980. Dlouho byl považován za jediného zástupce (+) ssRNA virů u basidiomycetů. Je jediným zástupcem rodiny *Barnaviridae* (Pospíšek 1998). Má nesegmentovaný genom o délce 4009 nukleotidů (Revill *et al.* 1994). Virion má rozměry 19×50 nm. Virus se nalézá v plodnicích postižených *La France disease* spolu s LIV. Genom kóduje sedm ORF (viz Obr. 1.). Na 5’ konci má navázaný Vpg protein. V mnohých ohledech je podobný některým rostlinným virům, které patří mezi luteoviry a sobemoviry. MBV má neobvykle organizovaný genom. Posloupnost jím kódovaných proteinů od 5’konce k 3’ konci je proteáza-Vpg-polymeráza. Toto genomové uspořádání je u ssRNA virů poměrně vzácné a mnohem častěji se u nich vyskytuje uspořádání Vpg-proteáza-polymeráza. Stejnou genomovou organizaci jako MBV má například PLRV, který patří mezi luteoviry. Velikost Vpg proteinu MBV je zase podobná jinému luteoviru a sice BYDV (Revill *et al.* 1998).

ORF1 a ORF2 se na 5’ konci překrývají. ORF1 kóduje polypeptid o velikost 21 kDa, ORF2 kóduje protein o velikosti 72 kDa. U tohoto proteinu byla zjištěna přítomnost motivu serinové proteázy. Tento protein pravděpodobně autokatalyticky vyštěpuje Vpg. Ale zatím to nebylo potvrzeno přímým pozorováním. Podobné motivy serinových proteáz byly nalezeny u luteovirů BWYV, PEMV a sobemoviru SBMV. Při translaci ORF2 se nejspíše uplatňuje strategie sklouznutí RdRp po AUG ORF1 tak, aby se mohl translatovat i ORF2 (Revill *et al.* 1998). ORF3 obsahuje sekvenční motiv SGxxxTxxxNTxxNx_nGDD, kde x značí libovolnou aminokyselinu. Tento motiv je důležitý pro replikaci RNA (Pospíšek 1998). Tato sekvence se

vyskytuje u RdRp mnohých rostlinných virů ze skupiny luteovirů a sobemovirů. ORF3 se na svém začátku překrývá s ORF2 a jeho čtecí fáze má vůči ORF2 -1 posun. ORF3 (polymerázový gen) je pravděpodobně exprimován -1 ribozomálním posunem čtecí fáze (Revill *et al.* 1994). Tento mechanismus si vyžaduje dvě specifické oblasti na molekule RNA. První je tzv. *slippery site*, což je sedminukleotidová sekvence, která umožňuje sklouznutí ribozómu o jednu bázi zpět takovým způsobem, aby po tomto skluzu bylo zachováno správné párování na prvním i druhém místě kodónu. Druhou oblastí je vlásenková struktura se smyčkou. Tato struktura dokáže na chvilku zastavit pohyb ribozómu po RNA právě v místě *slippery site*, což umožní skluz o jednu bázi vzad. Pro fungování tohoto mechanismu je velmi důležitá vzdálenost mezi *slippery site* a vlásenkovou strukturou. Jen specifická vzdálenost mezi těmito dvěma místy totiž zajistí zastavení ribozómu právě na *slippery site* (Pospíšek 1998). ORF4 na 3' konci genomu kóduje kapsidový protein o velikosti 22 kDa. Kapsidový protein je zřejmě translatován ze subgenomové RNA. Tato RNA má velikost asi 0,9 kb (Revill *et al.* 1999). Tuto hypotézu podporují určité podobnosti mezi MBV a CarMV. Existují sekvenční homologie mezi kapsidovými proteiny těchto dvou virů. Kapsidový protein CarMV je translatován ze subgenomové RNA. Délka genomu tohoto viru je 4003 nukleotidů. To je téměř stejné jako u MBV. 5'a 3' nekódující oblasti těchto dvou virů jsou sekvenčně podobné (Revill *et al.* 1994).



Obr. 1. Genom a uspořádání ORF u MBV, (převzato z Revill *et al.* 1994)

MBV byl vždy nalézán ve spojitosti s *La France disease*. Ve zdravých plodnicích se nevyskytoval. Jeho přítomnost ale nebyla zjištěna ve všech případech *La France disease*. MBV byl proto považován za satelitní virus jednoho z virů způsobujícího tuto chorobu. Nejčastěji byl spojován s LIV. Není určen ani jeho podíl na rozvoji choroby (Revill *et al.* 1999). Nicméně někteří autoři uvádějí, že se jim podařilo izolovat MBV ze zdravých plodnic, které nebyly postiženy *La France disease* (Romaine & Schlagnhaufer 1995). To by představovalo první důkaz o nezávislosti replikace MBV a také o tom, že MBV je asymptomatický virus.

4.6. Problematika studia virů u *Agaricus bisporus*

U *Agaricus bisporus* bylo nalezeno mnoho různých dsRNA elementů a virových částic. Jen malé množství z těchto elementů bylo osekvenováno. Příslušnost jednotlivých elementů k určitým virionům je také často neznámá. Velikost jednotlivých elementů odhadnutá po elektroforetickém rozdělení se u jednotlivých studií mírně odlišují. A je dosti možné, že některé dsRNA elementy podobných velikostí představují vlastně jeden druh RNA (Grogan *et al.* 2003). Dále se například ukázalo, že S3 segment vyskytující se při *La France disease* je vnitřně deletovanou variantou M2 segmentu (Harmsen *et al.* 1991). Bylo nalezeno poměrně velké množství dsRNA elementů, které se vyskytují ve zdravých i nemocných plodnicích a nemají žádný negativní vliv na růst houby. U elementů vyskytujících se jen u nemocných plodnic, nebyla většinou určena jejich přímá odpovědnost za nějaký symptom. Toto všechno zatím dává velmi chabou představu o mechanismech podílejících se na etiologii *La France disease*. Jedno z množných vysvětlení spočívá v rozdílnosti kodónových sad používaných virovými geny a hostitelem. Během vytváření plodnic se u houby výrazně zvyšuje syntéza proteinů. To sebou přináší i velkou utilizaci aminoacyl~tRNA. Tvorba virových proteinů může snižovat koncentraci vzácných aminoacyl~tRNA využívaných hostitelem až na takovou úroveň, která je nedostatečná pro translaci hostitelských mRNA. To může v konečném důsledku způsobovat malformace plodnic. Zároveň to naznačuje, že za symptomy choroby je odpovědná spíš replikace viru, než jeho pouhá přítomnost v buňkách (Van der Lende *et al.* 1996).

5. Viry u *Pleurotus ostreatus*

5.1. Charakteristika druhu

Pleurotus ostreatus je dřevokazná houba rostoucí na pařezech a kmenech listnatých stromů. Plodnice vyrůstají v trsech od října do března. Na povrchu jsou bělavé až šedavé. Lupeny jsou bílé. Výtrusy mají bílou barvu, válcovitý tvar a jsou velké 8 – 10 µm (Velenovský 1920). Klobouk má v průměru 6 – 18 cm. Třeň je krátký a bělavý. Spolu žampiony patří k často pěstovaným houbám. Zvláště hojně se pěstuje v Asii. Její pěstování je technologicky méně náročné než u *Agaricus bisporus*. Roste na různých biologických odpadech (např. piliny, sláma). Pěstuje se také na dřevěných špalcích.

5.2. dsRNA viry u *Pleurotus ostreatus*

Z *Pleurotus ostreatus* bylo izolováno několik druhů izometrických virových částic. Tyto částice se navzájem lišily svou velikostí a obsahem RNA molekul. PoV1 má genom tvořený dvěma molekulami dsRNA. Virové částice mají v průměru asi 30 nm. dsRNA-1 má 2296 nukleotidů a kóduje protein o velikosti 82,2 kDa. dsRNA-2 má 2223 nukleotidů a kóduje protein o velikosti 71,7 kDa. Větší segment kóduje pravděpodobně RdRp, menší zřejmě kóduje kapsidový protein. Sekvence těchto dvou předpokládaných proteinů vykazuje homologii s RdRp a kapsidovým proteinem partitivirů (Lim *et al.* 2005).

OMIV-I je virus s kapsidou o průměru 34 nm. Obsahuje dvanáct různých dsRNA molekul. Kapsidový protein má velikost 71 kDa. Tento virus byl vždy nalezen ve spojitosti s OMSV. OMIV-II má stejnou velikost jako OMIV-I (34 nm). Kapsida obsahuje tři dsRNA elementy. Dva z těchto elementů se vyskytují i v OMIV-I. Kapsidový protein má velikost 62 kDa (Hyun *et al.* 2004). Van der Lende izoloval z plodnic virové částice. Ty obsahovaly tři dsRNA molekuly. Bylo prokázáno, že tyto elementy jsou odpovědné za sníženou rychlost růstu. Byl prokázán i přenos těchto elementů mezi dvěma mycelii skrz anastomózy (Van der Lende *et al.* 1995). Všechny tyto tři dsRNA elementy se vyskytovaly i u OMIV-I.

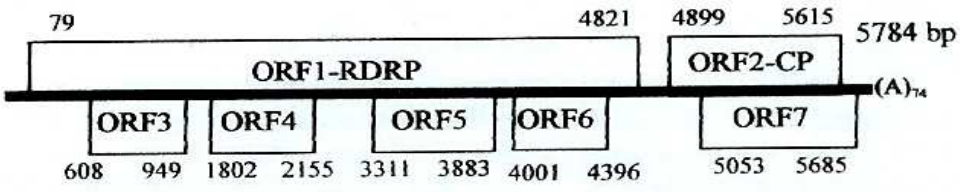
Určení přesné identity všech těchto virových částic bude předmětem dalšího výzkumu. Nápadné podobnosti mezi velikostmi kapsid a obsahem RNA naznačují, že tyto viry jsou spíše různými formami jednoho druhu viru.

5.3. OMSV

OMSV (oyster mushroom spherical virus) byl nedávno objeven jako teprve druhý zástupce (+) ssRNA virů u basidiomycetů. Sférický virion má průměr 27 nm a je tvořen kapsidovým proteinem o velikosti 28,5 kDa. Genom je tvořen jedinou molekulou (+) ssRNA o délce 5,78 kb. Na 3’ konci genomu je poly(A) úsek o délce 74 nukleotidů. Nukleotidová sekvence odhalila přítomnost sedmi ORF (viz Obr. 2.). Tento virus je pravděpodobně zodpovědný za chorobu zvanou *oyster mushroom Die-back disease*. Tato choroba se velmi rychle šíří a její propuknutí často způsobí ztrátu celé úrody. OMSV byl izolován pouze z napadených plodnic a ve zdravých plodnicích se nenachází.

ORF1 představuje nejdelší gen. Zabírá celých 83 % genomu. Kóduje protein o velikosti 174 kDa. Aminokyselinová sekvence tohoto proteinu vykazuje homologie se sekvencemi RdRp některých rostlinných virů. Největší sekvenční podobnost vykazuje OMSV s ErLV, který patří mezi tymoviry. ORF2 je umístěný na 3’ konci genomu. Po ORF1 je druhý největší a kóduje protein o velikosti 28,5 kDa. Jedná se o kapsidový protein. Tento protein nevykazuje

žádnou homologii s jiným známým proteinem. Celkově má OMSV nejblíže k tymovirům. Nemá žádnou podobnost v organizaci genomu s MBV (Hyun *et al.* 2003). Nedávno se ukázalo, že by ve virové částici mohly být dvě molekuly ssRNA (Hyun *et al.* 2004).



Obr. 2. Genom a uspořádání ORF u OMSV, (převzato z Hyun *et al.* 2003)

6. Viry u *Rhizoctonia solani*

6.1. Charakteristika druhu

Rhizoctonia solani je významný parazit brambor a mnoha jiných kulturních plodin. Vytváří velké množství kmenů s rozdílnou hostitelskou specializací i infekčností. Na povrchu bramborových hlíz vytváří nápadná sklerocia. Pomocí sklerocií houba přezimuje. Napadené rostliny vytvářejí deformované hlízy. Při silném napadení vznikají hlízy nad zemí v paždí listů. Houba postupně způsobuje nekrózy podzemních částí rostliny. Také dochází ke žloutnutí a svinování vrcholových listů.

6.2. dsRNA elementy u *Rhizoctonia solani*

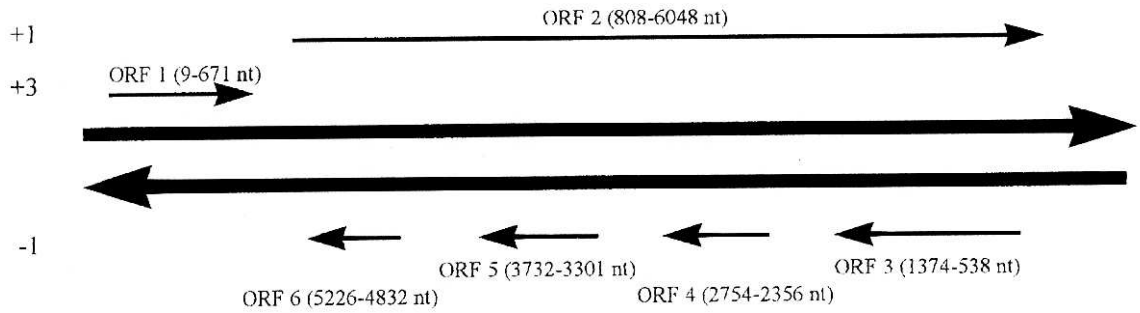
Rhizoctonia solani tvoří mnoho populací geneticky odlišných skupin, které se specializují na různé hostitele. Do dnešní doby bylo v různých skupinách nalezeno velké množství dsRNA elementů. Jednotlivé izoláty z určitých skupin obsahovaly navzájem odlišné profily RNA elementů (Bharathan *et al.* 2005). Byl zkoumán podíl RNA molekul na míru patogenity *Rhizoctonia solani* vůči jejím hostitelům. Výsledky se v jednotlivých pozorováních lišily. Některé výzkumy ukazovaly na zvýšení virulence *Rhizoctonia solani* v důsledku přítomnosti dsRNA molekul. Jiné zase naznačovaly, že za hypovirulenci některých kmenů *Rhizoctonia solani* mohou právě dsRNA elementy. Vysvětlení těchto rozdílných zjištění spočívá ve velké variabilitě jak genotypů jednotlivých zkoumaných kmenů, tak v nich nalezených RNA molekul (Jian *et al.* 1998).

Zkoumání virulentního kmenu Rhs1AP a od něj odvozených nevirulentních kmenů Rhs1A1, Rhs1A2 a Rhs1A3 odhalila přítomnost RNA elementů, které mohou být zodpovědné

jak za zvýšení virulence, tak za hypovirulenci (Lakshman & Tavantzis 1994; Strauss *et al.* 2000). Kmen Rhs1AP obsahoval dva segmenty dsRNA o velkosti 23 kbp (tzv. L2 segment) a 6,5 kbp (tzv. M1 segment). Zatímco hypovirulentní kmen Rhs1A1 obsahoval další tři elementy o velikosti 25 kbp, 3,6 kbp (tzv. segment M2) a 1,2 kbp. Kmeny Rhs1A2 a Rhs1A3 vykazovaly snížený růst a postrádaly segmenty L2 a M1. RNA molekula o velikosti 1,2 kbp se nacházela ve všech kmenech odvozených od Rhs1AP (Lakshman & Tavantzis 1994). Další výzkum se zaměřil na segmenty M1 a M2. U M2 segmentu se předpokládá, že je zodpovědný za hypovirulenci *Rhizoctonia solani*. M1 segment je zase považován za původce zvýšené virulence této houby.

M2 segment byl nalezen v cytoplasmě a mitochondriích. Ukázalo se, že genom *Rhizoctonia solani* v sobě obsahuje DNA kopii tohoto elementu. Sekvence jednoho řetězce kóduje protein, který má v sobě motivy RdRp. Tento protein také vykazuje význačnou sekvenční podobnost se dvěma doménami pentafunkčního proteinu, který katalyzuje pět centrálních kroků šikimátové dráhy u kvasinek a vláknitých hub (Lakshman *et al.* 1998). Šikimátová dráha se vyskytuje u rostlin a mikroorganismů. Je nezbytná pro tvorbu aromatických sloučenin, které se uplatňují v primárním metabolismu (např. aromatické aminokyseliny); (Coggins *et al.* 2003).

M1 segment se také nachází v cytoplasmě a mitochondiích. M1 má šest ORF (viz. Obr. 3.). Největší je ORF2 na (+) řetězci. Jedná se o helikázový gen, který kóduje protein o velikosti 199 kDa. Tento protein má význačnou podobnost s A1 proteinem BBMV, který patří mezi bromoviry. ORF5 na (–) řetězci tvoří komplementární úsek k části ORF2. Tento ORF kóduje protein, který vykazuje značnou podobnost k CcOAF. CcOAF je pokládán za chaperonin. Pomáhá ke správnému sbalení podjednotkám cytochrom oxidázy. Toto naznačuje možný původ části M1 segmentu z mitochondiálního genomu, který nese elektrontransportní geny. M1 segment nenese žádný motiv RdRp, ale vždy se vyskytuje společně s L2 segmentem. Sekvenční analýza tohoto segmentu odhalila přítomnost motivů, které se vyskytují u RdRp. To by mohlo naznačovat, že M1 je svojí replikací závislí na L2 (Jian *et al.* 1998). Sekvenční motivy nalezené u M1 a M2 segmentů, které vykazují podobnost s určitými buněčnými geny, mohou podporovat hypotézu evoluce RNA virů hub a rostlin z těchto genů.



Obr. 3. Uspořádání ORF u segmentu M1 izolovaného z *Rhizoctonia solani* (převzato z Jian *et al.* 1998)

7. Další směřování této práce

V předchozích kapitolách jsem nastínil problematiku houbových virů u zástupců basidiomycetů, kteří jsou z tohoto hlediska dlouho a intenzivně studováni. To ale neznamená, že by se výzkum omezoval jen na tyto druhy. I u jiných pro člověka důležitých basidiomycetů byly nalezeny dsRNA elementy. Například z kmenů *Flammulina velutipes*, u kterých se vyskytla tvorba hnědých plodnic, byly izolovány virové částice o průměru přibližně 40 – 50 nm. Uvnitř virionů byly nalezeny dva dsRNA elementy o velikosti 1,9 a 1,8 kb (Magae & Hayashi 1999). Výzkum virů v basidiomycetech se v současnosti zaměřuje i na nepříliš známé druhy hub, jako je třeba *Phaffia rhodozyma*. Z několika kmenů této houby bylo izolováno několik různých druhů RNA elementů (Pfeiffer *et al.* 1996). Vzhledem k velkému nárůstu poznatků o virech u dosud zkoumaných druhů hub se hledání nových virů obrací směrem k těm zástupcům basidiomycetů, které zatím stály na okraji zájmu výzkumu.

Já se dále po praktické stránce hodlám zaměřit na výzkum virů v několika druzích rodu *Armillaria*. Konkrétně se jedná o druhy *A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*. Václavky jsou dřevokazné houby. Rostou na mrtvém i živém dřevě a napadají hlavně jehličnany. Patří mezi hospodářsky nejvýznamnější dřevokazné houby. Mohou postihovat obrovské plochy zalesněných území. Václavky napadené stromy fyziologicky oslabují a umožňují tak průnik sekundárních parazitů. Rostou hlavně na bázi kmenu a v kořenech. Jejich vlivem dochází k uhnívání kořenů. To u semenáčků vede k jejich odumření, u vzrostlých stromů dochází k vývratům. Napadené stromy jsou snadno rozeznatelné podle tvorby plodnic. Václavky tvoří plodnice zhruba od října do konce listopadu. Tvorba plodnic neprobíhá každý rok a musí pro to být vhodné podmínky. Ztluštělá báze kmene je jiným příznakem, který indikuje napadení stromu *Armillarií*. Po odloupnutí kůry můžeme na napadeném dřevě pozorovat silné provazce mycelií (tzv. rhizomorfy); (Černý 1989).

U *Armillarií* nebyla dosud přítomnost virů zkoumána. Přesto existují určité důvody, proč by hledání virů v těchto druzích mohlo být úspěšné. Václavky patří mezi nejdéle žijící organismy. Jejich mycelium se může rozrůstat do ohromných ploch. U jedince druhu *Armillaria bulbosa* (syn. *Armillaria gallica*) bylo zjištěno, že jeho mycelium pokrývá plochu větší než 15 hektarů. Jeho stáří bylo odhadnuto na více než 1500 let (Smith *et al.* 1992). Právě obrovský prostorový dosah mycelia *Armillarií* a jejich dlouhověkost z nich činní vhodného kandidáta pro hledání nových virů. Václavky žijící na tak velkých plochách a po tak dlouhou dobu mohou totiž vytvářet množství spojení skrz anastomózy s jinými jedinci svého druhu. Vznikají tak téměř "nesmrtelné sítě" provazců hyf. Prostřednictvím anastomóz pak dochází k míšení buněčných obsahů v celém tomto propojeném systému mycelií. Navíc houby vytvářejí velmi těsné interakce se svými rostlinnými hostiteli. Takto složitý, celistvý a dlouhověký systém může disponovat dostatečným množstvím vstupních bran, které by mohly umožňovat průnik různých RNA elementů. U *Armillarií* nebyly popsány symptomy, které by se podobaly symptomům dosud známých virových chorob u jiných druhů hub. To by mohlo znamenat, že tyto hypotetické RNA molekuly jsou latentní a nebudou svému hostiteli způsobovat žádnou znatelnou újmu.

Dřevokazná houba *Heterobasidion annosum*, která se svou ekologií podobá *Armillariím*, byla zkoumána ohledně výskytu a přenosu dsRNA elementů. Nalezené RNA molekuly neměly vliv na růst této houby. Ale ukázalo se, že basidiospory infikované těmito elementy mají sníženou klíčivost (Ihrmark *et al.* 2004). To obecně nastoluje otázku, zda a s jakou účinností by dsRNA elementy mohly omezovat šíření hospodářsky škodlivých basidiomycetů.

Na závěr bych rád poděkoval Simoně Moravcové za pečlivé přečtení první verze tohoto textu. Jsem velmi vděčný za její cenné připomínky, bystré postřehy a nové nápady, které velmi přispěly ke zvýšení celkové úrovně této práce.

Seznam použité literatury

Aanen D., K., Eggleton P., 2005, Fungus growing termites originated in African rain forest, Curr. Biol., 15(9), 851–855

Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungus, 9th Edition 2001, CAB International, University Press, Cambridge

Barroso G., Labarere J., 1990, Evidence for viral and naked double-stranded RNAs in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*, Curr. Genet., 18, 231-237

Barroso G., Labarere J., 2000, Distribution and transmission of *Agrocybe aegerita* dsRNAs, Science and Cultivation of Edible Fungi, 1, 271-280

Bharathan N., Saso H., Gudipati L., Bharathan S., Whited K., Antony K., 2005, Double-stranded RNA distribution and analysis among isolates of Rhizoctonia solani AG-2 to-13, Plant Pathology, 54(2), 196

Burdsall H., H., Jr., Volk T., J., Ammirati J., F., Jr., 1996, *Bridgeporus*, a new genus to accomodate *Oxyporus nobilissimus* (*Basidiomycotina, Polyporaceae*), Mycotaxon, 60, 387-395

Coggins J., R., Abell C., Evans L., B., Frederickson M., Robinson D., A., Roszak A., W., Lapthorn A., P., 2003, Experiences with the shikimate-pathway enzymes as target for rational drug design, Biochemical Society Transaction, 31(3)

Černý Alois 1989, Parazitické dřevokazné houby, SZN

Gaze R., H., Calvo-Bado L., Challen M., P., Adie B., Romaine C., P., 2000, A new virus disease of *Agaricus bisporus*?, Mushroom Science, 15, 701-705

Grogan H., M., Adie B., A., T., Gaze R., H., Challen M., P., Mills P., R., 2003, Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus*, Mycol. Res., 107(2), 147-154

Gryndler M. a kol., 2004, Mykorhizní symbióza, Academia

Harmsen M., C., Tolner B., Kram A., Go S., J., De Haan A., Wessels J., G., H., 1991, Sequences of three dsRNAs associated with *La France disease* of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*), Curr. Genet., 20, 137-144

Hyun Jae Yu, Dongbin Lim, Hyun-Sook Lee, 2003, Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*, Virology, 314, 9-15

Hyun Jae Yu, Lee Jung Sun, Lee Nam Joo, Ha Si Jung, Kim So Yeon, Gang Fu Joo, Bae Dong Won, Chang Moo Ung, Lee Hyun Sook, 2004, Identification of three Isometric Viruses from *Pleurotus ostreatus*, Journal of Huazhong Agricultural University, 23(1), 150-156

Ihrmark K., Johannesson H., Stenström E., Stenlid J., 2002, Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*, Fungal Genetics and Biology, 36(2), 147-154

Ihrmark K., Stenström E., Stenlid J., 2004, Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*, Mycol. Res., 108(2), 149-153

Irvine G., Moran J., 1999, *La France disease* of cultivated mushrooms, Agriculture notes 0518, State of Victoria, Department of Primary Industies, 2006

Jian J., Lakshman D., K., Tavantzis S., M., 1998, A Virulence-Associated, 6,4-kb, Double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* Is Phylogenetically Related to Plant Bromoviruses and Electron Transport Enzymes, MPMI, 11(7), 601-609

Jirout F., 1928, Dřevo, díl I., ŠNČMP

Klaban V., 2005, Ilustrovaný mikrobiologický slovník, Galén

Lakshman D., K., Jian J., H., Tavantzis S. M., 1998, A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 95(11), 6425-6429

Lakshman D., K., Tavantzis S., M., 1994, Spontaneous appearance of genetically distinct double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani*, Phytopathology, 84(6), 633-639

Lemke P., A., Nash C., H., 1974, Fungal Viruses, Bacteriological Reviews, 38, 29-56

Lim W., S., Jeong J., H., Jeong R., D., Yoo Y., B., Yie S., W., Kim, K., H., 2005, Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus*, Virus Research, 108(1-2), 111-119

Magae Y., Hayashi N., 1999, Double-stranded RNA and virus-like particles in the edible basidiomycete *Flammulina velutipes*, FEMS Microbiology Letters, 180, 331-335

Pffeifer I., Kucsera J., Varga J., Parducz A., Ferenczy L., 1996, Variability and inheritance of double-stranded RNA viruses in *Phaffia rhodozyma*, Curr. Genet., 30(4) 294-297

Pospíšek M., 1998, Kvasinkové dsRNA viry I, Biologické listy, 63(2), 81-113

Revill P., A., Davidson A., D., Wright P., J., 1994, The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: A single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus*, Virology, 202, 904-911

Revill P., A., Davidson A., D., Wright P., J., 1998, Mushroom bacilliform virus RNA: The initiation of translation at the 5' end of the genome and identification of the Vpg, Virology, 249, 231-237

Revill P., A., Davidson A., D., Wright P., J., 1999, Identification of subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus, Virology, 260, 273-276

Smith M., L., Bruhn J., N., Anderson., J., B., 1992, The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organism, Nature, 356, 428-431

Strauss E., E., Lakshman D., K., Tavantzis S., M., 2000, Molecular characterization of the genome of a partitivirus from basidiomycete *Rhizoctonia solani*, J. Gen. Virol., 81, 549-555

Van der Lende T., R., Duitman E., Gunnewijk M., G., W., Li Yu, Wessels J., G., H., 1996, Functional analysis of dsRNAs (L1, L3, L5, and M2) associated with isometric 34-nm virions of *Agaricus bisporus* (white button mushroom), Virology, 217, 88-96

Van der Lende T., R., Harmsen M., C., Go S., J., Wessels J., G., H., 1995, Double-stranded RNA mycovirus in mycelium of *Pleurotus ostreatus*, FEMS Microbiology Letters, 125, 51–56

Van der Lende T., R., Harmsen M., C., Wessels J., G., H., 1994, Double-stranded RNAs and proteins associated with the 34 nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* , J. Gen. Virol., 75, 2533-2536

Velenovský J., 1920, České houby, díl I., ČSBS