

Management obilných virů přenosných *Polymyxa graminis* s důrazem na viry mozaikového komplexu ječmene

Certifikovaná metodika

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.¹ 35 %

Ing. Lenka Grimová, Ph.D.¹ 35 %

Ing. Jana Chrpová, CSc.² 10 %

Mgr. Taťána Sumíková, Ph.D.² 20 %

1 Katedra ochrany rostlin, FAPPZ ČZU v Praze

2 Odbor genetiky a šlechtění rostlin, VÚRV, v.v.i., Praha Ruzyně

Metodika je výsledkem řešení projektu NAZV QJ1230159. Je zveřejněna na stránkách ČZU (<http://metodiky.agrobiologie.cz>) a

VÚRV (http://www.vurv.cz/index.php?p=vydavatelska_cinnost&site=pro_verejnost)

Oponentní posudky vypracovali:

Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D., Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž

Ing. Jana Pekárková, Ph.D., ÚKZÚZ

ISBN:

978-80-213-2723-8 (Česká zemědělská univerzita v Praze)

978-80-7427-232-5 (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.)

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně uděleno osvědčení č. 003040/2017 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1. Rod <i>Polymyxa</i>	2
2.1.1. <i>Polymyxa graminis</i>	3
2.1.2. Viry přenosné <i>P. graminis</i>	4
2.1.3. Ochrana proti virům přenosným <i>P. graminis</i>	5
2. CÍL METODIKY.....	6
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	6
3.1. Rozšíření <i>Polymyxa graminis</i> v ČR.....	6
3.2. Determinace <i>P. graminis</i>	7
3.2.1. Determinace mikroskopická.....	7
3.2.2. Determinace molekulární.....	8
3.3. Diagnostika virů.....	9
3.3.1. Determinace sérologická.....	9
3.3.2. Determinace molekulární.....	10
3.4. Využití rezistence.....	14
3.4.1. Detekce genů rezistence ozimého ječmene proti virům mozaikového komplexu.....	14
3.4.2. Odolné a náchylné odrůdy ječmene.....	15
3.5. Analýza situace v ČR, rekapitulace výše uvedených významných faktů a doporučení k omezení škodlivosti virů přenosných <i>P. graminis</i> a především mozaikového komplexu ječmene.....	16
4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	17
5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....	18
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	18
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	23
9. PŘÍLOHY.....	24

1. ÚVOD

Obilniny patří mezi nejdůležitější plodiny ve všech částech světa. Závažné škody na jejich výnosech způsobují nejrůznější škůdci a také houbové choroby. Proti těmto škodlivým organismům lze většinou s větším či menším úspěchem využít klasickou chemickou ochranu. Na druhé straně jsou však obilniny napadány i celou řadou virů, proti nimž je ochrana daleko komplikovanější vzhledem k tomu, že jsou přenášeny různými druhy vektorů a musíme se snažit zabránit infekci rostlin, protože jednou infikovanou rostlinu už nelze vyléčit. V ČR byl význam virových chorob dlouhodobě podceňován a tato situace se změnila teprve relativně nedávno především kvůli epidemickému výskytu některých virů přenášených hmyzem – viru žluté zakrslosti ječmene, přenosného mšicemi, a viru zakrslosti pšenice přenosnému křísy. Tyto dva viry jsou v současnosti jednoznačně nejdůležitějšími virovými patogeny obilnin, ale neměli bychom přitom zapomínat ani na potenciál škodlivého působení virů přenosných roztoči a také virů přenosných půdním organismem *Polymyxa graminis*, na které je zaměřena tato metodika.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Rod *Polymyxa*

Rod *Polymyxa* představuje jeden z deseti rodů čeledi *Plasmodiophoraceae*, spadající do řádu *Plasmodiophorales*, kmene *Cercozoa*, a říše *Rhizaria* (Simpson, Roger, 2004). V rámci tohoto rodu jsou vyčleněny dva samostatné druhy, které jsou morfologicky bez viditelných rozdílů (Barr, 1988) a jejich rozlišení je založeno pouze na odlišném hostitelském okruhu. Prvním zástupcem je *Polymyxa graminis*, o které poprvé podal zprávu Ledingham v 1939 v Kanadě a charakterizoval tento, do té doby neznámý organismus, jako parazita kořenů pšenice (*Triticum aestivum* L.). Druhým druhem je *Polymyxa betae*, která byla poprvé identifikována v Evropě v roce 1964 (Keskin) na kořenech řepy (*Beta vulgaris* L.).

P. graminis infikuje zejména jednoděložné druhy z čeledi lipnicovité (*Poaceae*) (Barr, 1979; Kanyuka et al., 2003), zatímco *P. betae* parazituje na dvouděložných rostlinách z čeledí merlíkovité (*Chenopodiaceae*), laskavcovité (*Amaranthaceae*), šruhovité (*Portulacaceae*) a hvozdíkovité (*Caryophyllaceae*) (Barr, Asher, 1992; Legrève et al., 2002; Rush, 2003). V literatuře však můžeme najít i zprávy o *P. graminis* infikující dvouděložné rostliny (Ratna et al., 1991) a naopak, o *P. betae* nalezené na rostlinách jednoděložných.

2.1.1. *Polymyxa graminis*

Polymyxa graminis je eukaryotní obligátně biotrofní nepatogenní půdní parazit kořenů obilnin (Kanyuka *et al.*, 2003), který může být spolu s dalšími zoosporickými kořenovými parazity příčinou menších kořenových nekrot (Wiese, 1977). Pozornost široké veřejnosti zaujal díky jeho schopnosti přenášet ekonomicky významné rostlinné viry (Maraite, 1991).

Druh *P. graminis* byl popsán na celé řadě kulturně pěstovaných, ale i divoce rostoucích rostlin po celém světě, jmenovitě v USA, Kanadě, Mexiku, Brazílii, Austrálii, Novém Zélandě, Číně, Indii, Pákistánu, Japonsku, Senegal, Libanonu, Iránu a Turecku (Ledingham, 1939; Linford, McKinney, 1954; Karling, 1966; Thocchetto, 1974; Thouvenel, Fauquet, 1980; Ward, Adams, 1998; Sahandpour, Izadpanah, 1999; Henry, Legrève, unpublished; Legrève *et al.*, 2002; Subr *et al.*, 2002, Anonymous 2007; Mouhanna *et al.*, 2008; Erkan, Yilmaz, 2009, Thompson *et al.*, 2011; Cox *et al.*, 2014). Jeho přítomnost byla potvrzena i v mnoha evropských zemích, konkrétně ve Velké Británii, Německu, Polsku, Francii, Dánsku, Belgii a také v České republice (Legrève *et al.*, 2002; Ziegler *et al.*, 2015; Ketta *et al.*, 2011).

Velmi široký hostitelský okruh *P. graminis* v sobě zahrnuje například různé druhy pšenice (*Triticum* sp.) a ječmene (*Hordeum* sp.), dále žito (*Secale cereale*), pýr plazivý (*Agropyron repens*), několik druhů sveřepu (*Bromus* sp.), čiroku (*Sorghum* sp.), rýže (*Oryza sativa*), ovesa (*Avena sativa*), kukuřice (*Zea mays*), *Pennisetum glaucum*, některé druhy jetele (*Trifolium* sp.), *Cynodon dactylon*, *Agrostis stolonifera*, *Dactylis*, *Festuca*, *Poa*, druhy rodu *Phleum*, *Cyperus rotundus*, *Eleusine coracana*, *Tridax procumbens* a *Arachis hypogaea*. Všechny tyto rostliny mohou sloužit jako rezervoár parazita (Kanyuka *et al.*, 2003).

Na základě velmi vysoké molekulární heterogenity mezi jednotlivými studovanými kmeny *P. graminis* navrhli Legrève *et al.* (2002) klasifikaci parazita do pěti různých skupin, tzv. „*formae speciales*“. Každá z pěti skupin (neboli ribotypů) zahrnuje populace jedinců s totožným hostitelským okruhem a s podobnými požadavky na teplotu okolního prostředí. Jedná se jmenovitě o formy:

(A) *P. graminis* f. sp. *temperata* (Pg-I), která infikuje zejména ječmen, ale i pšenici, tritikale, žito, lipnici a *Pennisetum glaucum*. Optimální teploty pro její vývoj se pohybují v rozmezí od 15 do 20 °C a její přítomnost byla potvrzena v oblastech mírného klimatu, jmenovitě v

Belgii, Dánsku, Polsku, Číně, Francii, Německu, Velké Británii, České republice, Kanadě a na Novém Zélandu.

(B) *P. graminis* f. sp. *tepida* (Pg-II) napadající zejména kořeny pšenice, dále ječmene, tritikale, žita a ovsa. Optimální teplota vývoje parazita je opět v teplotní rozmezí od 15 - 20 °C. Výskyt byl potvrzen v oblastech mírného klimatu, konkrétně v České republice, Kanadě a Velké Británii.

(C) *P. graminis* f. sp. *tropicalis* (Pg-III_a or III_b) napadá čirok, proso a kukuřici, občas pšenici a ječmen. Optimální teplota pro její vývoj se pohybuje kolem 23 °C a výskyt byl potvrzen pouze v tropických oblastech Indie a Senegal.

(D) *P. graminis* f. sp. *subtropicalis* (Pg-IV_a or IV_b) parazituje na čiroku, prosu, ale také na pšenici a ječmeni. Optimální teplota je kolem 23 °C. Patogen byl detekován v subtropických oblastech Indie a Pákistánu.

(E) *P. graminis* f. sp. *colombiana* (Pg-V) byla popsána na rýži a její výskyt byl potvrzen pouze v Kolumbii.

O několik let později Cox et al. (2014) přidali k již existujícím formám *P. graminis* ještě jednu populaci, konkrétně (F) Pg-VI, pocházející ze západní Afriky a Austrálie a infikující rostliny pšenice. Je třeba zdůraznit, že na kořenech jednoho hostitele může v tu samou dobu parazitovat více než jeden ribotyp *P. graminis* (Ward et al., 2005; Vaianopoulos et al., 2007; Smith et al., 2011).

Životní cyklus *Polymyxa graminis* je rozdělen do dvou fází, jmenovitě sporangiální fáze (primární), vedoucí k produkci zoospor; a sporogenická fáze (sekundární), vedoucí k tvorbě klidových spor (Kanyuka et al., 2003). Každá fáze je zahájena přichycením zoospor k rostlině a penetrací epidermálních buněk nebo kořenového vlášení.

Jak a kdy dochází k získání viru patogenem *P. graminis*, popřípadě jakým způsobem virus vstupuje do hostitelské rostliny, není dosud úplně objasněno. Nicméně se předpokládá, že tyto procesy probíhají buď při penetraci zoospor do hostitelských buněk a následně při pohybu jejich obsahu v rostlině, nebo při sporogenické fázi plasmodia, kdy je odděleno od buněčné cytoplasmy pouze slabou membránou (Prokop, 2010). Získané viry jsou přenášeny zřejmě v odpočívajících sporách a zoosporách. Viry nelze ze zoospor odstranit po promytí nebo inaktivovat použitím antiséra. Navíc, odpočívající spory zůstávají virulentní i po ošetření zředěným NaOH a HCl (Rao a Brakke, 1969). Do dnešní doby nebylo zjištěno, zda jsou viry schopny se uvnitř těla vektora množit.

Mezi hlavní zdroje *P. graminis* patří kontaminovaná zemina, která současně umožňuje i její šíření při větrné erozi, pomocí závlahové vody, při kultivaci zamořených pozemků a na mechanizačních prostředcích. Šíření je možné také kontaminovaným chlévským hnojem a kejdou (Bittner, 2012). Vzhledem k tomu, že klidové spory obsahující částice viru mohou přežívat v půdě mnoho let, jsou klasické agronomické postupy, jako například střídání plodin nebo zařazování určitých plodin na kontaminovaný pozemek z pohledu možné ochrany proti těmto virovým chorobám bezvýznamné. Chemické metody jsou zase ekologicky nepřijatelné, takže jedinou možnou ochranou je šlechtění rezistentních kultivarů obilnin. V současné době jsou k dispozici kultivary rezistentní k jednomu nebo k určité kombinaci virů. Bohužel dosud nebyly identifikovány genotypy rezistentní proti vektoru (Prokop, 2010).

2.1.2. Viry přenosné *P. graminis*

Do dnešní doby bylo popsáno přinejmenším 15 různých druhů virů z rodů *Bymovirus* [*Barley yellow mosaic virus* (BaYMV), *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), *Oat mosaic virus* (OMV), *Rice necrosis mosaic virus* (RNMV), *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV) a *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV)], dále z rodu *Furovirus* [*Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV), *Chinese wheat mosaic virus* (CWMV), *Japanese soil-borne wheat mosaic virus* (JSBWMV), *Oat golden stripe virus* (OGSV) a *Sorghum chlorotic spot virus* (SCSV)], *Benyvirus* [*Rice stripe necrosis virus* (RSNV)] a *Pecluvirus* [*Peanut clump virus* (PCV) a *Indian peanut clump virus* (IPCV) (Kanyuka et al., 2003; Anonymous, 2016)], které jsou přenášeny právě *P. graminis*. Některé z nich jsou původci významných chorob obilnin, které značně snižují jejich výnos. Mezi nejškodlivější choroby patří mozaiky způsobené na ozimém ječmenu dvěma viry – BaMMV a BaYMV. Oba viry se obvykle vyskytují společně, a proto v jejich případě mluvíme o mozaikovém komplexu ječmene. Ztráty při napadení rostlin u nich běžně dosahují 20-30 %, ale výjimkou nejsou ani ztráty okolo 70 %. Jak naznačují názvy většiny z virů, nejběžnější příznakem napadení je mozaika ve formě čárkovitosti, která později může přecházet do celkového žloutnutí (Obr. 1). Tyto příznaky jsou zcela nespecifické a mohou být zaměněny s příznaky způsobenými dalšími viry. Důležitá je tedy přesná diagnostika původců. Ze zmiňovaných 15 virů přenosných *P. graminis* byly v Evropě prokázány tyto: BaMMV, BaYMV, SBCMV, SBWMV, WSSMV, OGSV a OMV (Kanyuka et al., 2003), ovšem viry ovsa se vzhledem k jeho nižšímu významu nebudeme dále zabývat.



Obrázek 1. Příznaky mozaiky způsobené virem mírné mozaiky ječmene na listech ozimého ječmene náchylné odrůdy Florian.

2.1.3. Ochrana proti virům přenosným *P. graminis*

Ochrana proti těmto virům je obzvláště obtížná, neboť, jak bylo výše uvedeno, v podstatě nemáme žádné prakticky použitelné možnosti omezení jejich vektora. Největší naděje jsou vkládány do šlechtění na rezistenci, ale je třeba zdůraznit, že u většiny těchto virů je tato práce na samém počátku, kdy se teprve identifikují její potenciální zdroje a jen výjimečně jsou už k dispozici nějaké odolné odrůdy. Ty však zatím výnosem a kvalitou neodpovídají požadavkům praxe (Kanyuka et al., 2003).

Pouze u virů mozaikového komplexu ječmene je už situace poměrně dobře řešitelná. Dosud bylo v různých šlechtitelských materiálech identifikováno celkem 13 genů *rym*, které většinou zajišťují odolnost proti oběma virům současně (Werner et al., 2003). Je zajímavé, že jsou recesivní, což naznačuje, že u daných rostlin chybí nějaký faktor nutný k navázání kompatibilního vztahu mezi patogenem a jeho hostitelem. U některých z nich (*rym1*, *rym2*, *rym4*, *rym5* a *rym11*) se celkově snižuje obsah virů v rostlině, ale jindy (*rym7*, *rym8* a *rym10*) jde zřejmě spíše o nějakou bariéru, která brání translokaci virů z kořenů do nadzemní části

rostliny. Při mechanické inokulaci listů tedy v jejich případě dochází normálně k infekci. Rezistence podmíněná těmito geny je také anulována při teplotách nad 20 °C. Naopak *rym9* brání vzniku infekce listů, ale ne kořenů (McGrann a Adams, 2003).

V praxi je nejvíce využíván gen *rym4*, ovšem jí podmíněná rezistence je překonávána kmenem BaYMV2, který se díky tomu rozšiřuje v oblastech, kde se masově pěstují odrůdy s *rym4*. Dalším prakticky využívaným genem je *rym5*, který funguje i proti BaYMV2. I když se někdy mluví o imunitě rostlin podmíněné přítomností těchto genů, nejde o imunitu, ale o skutečnou rezistenci. Virus je totiž v těchto rostlinách přítomen, ale v nízké koncentraci. Nelze ho tedy dokázat ELISA, ale pomocí citlivější PCR ano (Vaianopoulos et al., 2007). Nicméně rezistence založená pouze na jednom genu je patogenem relativně snadno překonatelná, jak ukazuje například izolát BaMMV překonávající rezistenci podmíněnou *rym5* v Anglii (Kanyuka et al., 2003). Proto byla vypracována metoda tzv. pyramidování více genů, kdy by rezistence byla stabilnější (Werner et al., 2005), ovšem takové odrůdy zatím nejsou prakticky dostupné.

2. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je jednak sumarizace poznatků o *P. graminis* a jí přenosných virech, a jednak představení možností, které lze použít k minimalizaci ztrát způsobených na obilninách viry přenosnými tímto vektorem. Největší důraz je kladen na viry tzv. mozaikového komplexu ječmene, kde může ochrana být neúčinnější díky rezistenci u řady odrůd. Nedílnou součástí metodiky je i představení diagnostických metod, které jsou nezbytné pro přesnou determinaci virů i jejich vektora a metod detekce genů rezistence *rym4/rym5* v rostlinách.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1. Rozšíření *Polymyxa graminis* v ČR

Jak ukazují výsledky našeho průzkumu, *P. graminis* je v ČR značně rozšířena, a to jak na orné půdě, tak i na loukách a dalších stanovištích, kde se vyskytují lipnicovité rostliny. Byly u nás prokázány obě formy speciales, které se vyskytují v mírném pásu, tj. *P. graminis* f. sp. *tepida* i f. sp. *temperata*. Nicméně výsledky této části výzkumu už byly shrnuty v rámci specializované mapy s odborným obsahem „Výskyt *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* a f.sp. *tepida* jako potenciálních vektorů některých virů obilnin na území ČR“ a nebudeme se

jimi dále zabývat. Pro účely této metodiky je ale nutné zdůraznit, že u nás reálně hrozí nebezpečí přenosu a šíření virů přenosných tímto organismem a je tedy potřeba s ním počítat.

3.2. Determinace *P. graminis*

3.2.1. Determinace mikroskopická

Mikroskopicky lze poměrně snadno determinovat cystosory *P. graminis* v kořenech lapacích rostlin ječmene. Odebrané vzorky zeminy je vhodné promíchat s práným sterilizovaným pískem v poměru 3:1, aby se později snáze uvolňovaly kořeny lapacích rostlin. Do směsi se vyseje osivo ječmene odrůdy Florian, případně Maris Otter, a výsevy se umístí do kultivačního boxu s teplotou 18 °C. Po pěti až šesti týdnech se lapací rostliny vyjmou ze substrátu, kořeny se propláchnou vodovodní vodou, vloží se do tenké vrstvy vody v Petriho misce nebo víčku od ELISA desky a prohlížejí se pod inverzním mikroskopem při zvětšení cca 200x. Cystosory mají obvykle tvar různě dlouhého oválu složeného z jednotlivých trvalých spor (Obr. 2). Přestože jde o poměrně charakteristický tvar, je potřeba mít v pozorování určitou zkušenost, aby nedošlo k záměnám s různými jinými strukturami, které ho mohou připomínat. Záměna hrozí zejména v případě, kdy je cystosorů v kořenech málo a je tedy potřeba je pracně hledat.



Obrázek 2. Typické cystosory *P. graminis* v kořenech ozimého ječmene Florian.

3.2.2. Determinace molekulární

Molekulárně lze *P. graminis* detekovat jak v kořenech rostlin, tak i přímo v půdních vzorcích. Z každé testované lokality se odebere cca 3 kg zeminy formou většího počtu jednotlivých vrypů (asi 20-30 podle plochy pozemku). Zemina se nechá vyschnout při normální teplotě, proseje se na sítu o velikosti ok 2 mm a důkladně se promísí. Z každého vzorku se dále odeberou 3 dílčí vzorky o hmotnosti 250 mg a rozetřou se v třecí misce na jemný prach. Z nich se extrahuje celková DNA pomocí *GeneMatrix Soil DNA Purification Kit* (EURx) dle návodu výrobce.

V případě rostlinného materiálu (listy nebo kořeny) se tento rozdrtí ve třecí misce pomocí tekutého dusíku a následně se převede pomocí sterilní špachtle do mikrozkušavky (navážka 100 mg). Ke vzorku se přidají 3 drtící koule (o průměru 3 mm) a 100 µl CTAB pufru (těsně před použitím do pufru přidat 2-merkaptóetanol v poměru 1,56 µl na 1 ml pufru). Vzorek se homogenizuje pomocí oscilačního mlýna po dobu 1,5 min rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté se do mikrozkušavky přidá 400 µl CTAB pufru a vzorek se po dobu 2 min opět třepe stejnou rychlostí. Následně se do mikrozkušavky přidá dalších 400 µl CTAB pufru a vzorek se inkubuje 1 hod při 64 °C ve vodní lázni.

Ke vzorku se přidá 900 µl směsi fenolu (pH 8): chloroform - izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1. Vzorek se třepe (2 200 RPM, 10 min) a následně centrifuguje (7 000 x g, 10 min, 4 °C). Poté se do nové mikrozkušavky převede vodní fáze a předchozí krok se jednou zopakuje.

Vodní fáze se převede do nové mikrozkušavky a ke směsi se přidá stejné objemové množství chloroform - izoamylalkoholu (24:1). Vzorek se třepe (2 200 RPM, 10 min) a poté centrifuguje (7 000 x g, 10 min, 4 °C). Vodní fáze se převede do nové mikrozkušavky, do které se následně přidá stejné množství ledového izopropylalkoholu. Směs se promíchá (několikrát převrácením v ruce) a ponechá se přes noc v mrazicím boxu (- 24 °C), popřípadě pro urychlení postupu lze provést chlazením 3 x 3 minuty v tekutém dusíku.

Poté se vzorek centrifuguje (10 000 x g, 15 min, 4 °C) a vodní fáze se odstraní. Peleta se promyje v 70% chlazeném absolutním etanolu a centrifuguje (10 000 x g, 10 min, 4 °C),

Po odstranění vodní fáze se mikrozkušavka ponechá při laboratorní teplotě inkubovat 10 min. Peleta se rozpustí v 50 µl TE pufru a vzorek se uskladní v mrazicím boxu (- 28 °C), nebo je ihned použit pro další analýzy.

Použité chemikálie:

CTAB pufr: 2 % CTAB (cetyltrimetylamonium bromid); 0,1 M Tris (pH 8); 20 mM EDTA;
0,7 M NaCl; 2merkaptoetanol

fenol (pH 8)

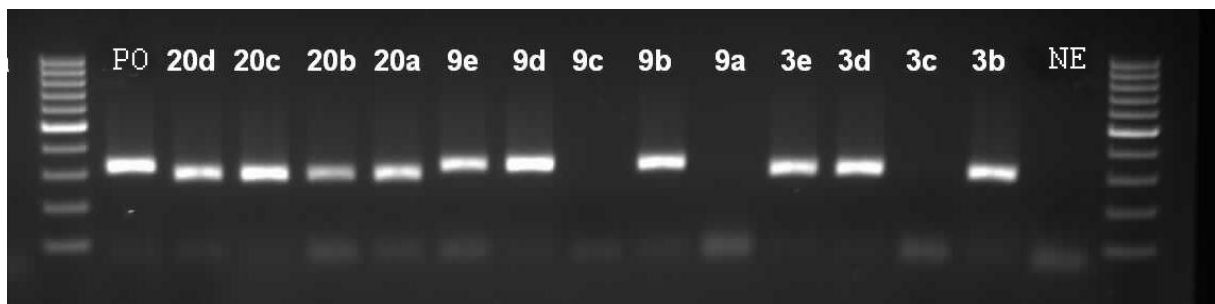
chloroform - izoamylalkohol (24:1)

izopropylalkohol

70% etanol

TE pufr: 10 mM Tris (pH 8); 1 mM EDTA

Izolovaná DNA může být dále testována pomocí PCR s párem primerů Pgfwd2/Pxrev7, který amplifikuje 280 pb fragment obecně *P. graminis* (Ward, Adams, 1998), nebo s páry primerů specifických pro jednotlivé formy speciales, konkrétně párem Pg.F2/Pg.R2, který amplifikuje fragment 430 pb *P. graminis* f. sp. *tepida* a párem Pg.F1/Pg.R1, který amplifikuje 292 pb fragment *P. graminis* f. sp. *temperata* (Ward et al., 2005).



Obrázek 3. Detekce *P. graminis* v půdě metodou PCR, detekce dvou různých typů (forem speciales) patogena. Elektroforeogram PCR produktů po separaci na agarózovém gelu. Použité primery Pgfwd2/Pxrev7 (Ward and Adams, 1998), velikost PCR produktů 280 bp a 320 bp. Hmotnostní standard *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas); NE: ddH₂O; PO: pozitivní kontrola *P. graminis* typ II.; 20a, 20b, 20c, 20d: *P. graminis* typ I.; 3d, 3e, 9b, 9e: *P. graminis* typ II.

3.3. Diagnostika virů

3.3.1. Determinace sérologická

Sérologická detekce a determinace všech virů, které se vyskytují v Evropě, nedělá s výjimkou virů ovsa problémy. Diagnostické protilátky pro metodu ELISA lze zakoupit hned

u několika dodavatelů, avšak právě s výjimkou protilátek proti OMV a OGMV. Loewe Biochemica a DSMZ Braunschweig mají v nabídce všechny zbývající protilátky, firma Adgen dodává protilátky proti BaMMV, BaYMV a SBMV a firma Agdia má protilátky proti SBMV a WSSMV. Podle našich zkušeností u mozaikového komplexu ječmene nejlépe fungovaly protilátky od firmy Adgen, ale ty jsou současně i nejdražší a minimálně je možné koupit 250 testů, zatímco od ostatních firem je minimum pouze 100 testů.

Testovat lze jak kořeny, tak i listy podezřelých rostlin. Testy probíhají v souladu s doporučením jednotlivých dodavatelů.

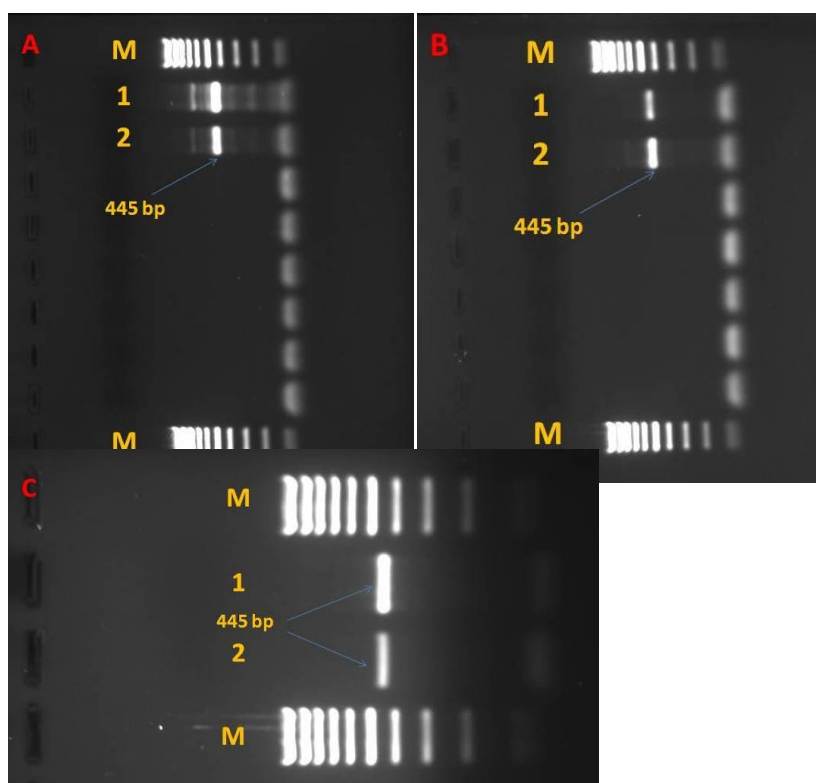
3.3.2. Determinace molekulární

Pro molekulární detekci virů přenosných *P. graminis* lze doporučit metody, které jsou popsány v literatuře, a my jsme některé z nich prakticky otestovali.

Pro extrakci RNA z infikovaných rostlin je možné použít více metod včetně klasické metody fenol-chloroformové, nicméně v našich podmínkách dávala nejlepší výsledky extrakce pomocí magnetických partikulí na robotu InnuPure kitem dodávaným k přístroji.

Protokol:

1. 50 mg infikovaného pletiva homogenizovat za přítomnosti tekutého dusíku v třecí misce;
2. Prášek převést do 2 ml minizkumavky s 450 µl lysis solution RL;
3. Vortexovat 10 min a centrifugovat 1 min. 15000 g, při 4 °C. Supernatant převést do nových mikrozkuvek (spin filter D), pelety vyhodit;
4. Centrifugovat 2 min. při 12000 g, při 4 °C;
5. Vyhodit filtry D;
6. Přidat 50 µl MAG suspenze do každé jamky na desce (Pack A reagent cavity);
7. Převést filtráty vzorků do jamek desky;
8. Přidat Reagent Pack B do držáku (InnuPure[®] C12);
9. Vložit do držáku MFR špičky;
10. Vložit do držáku eluční mikrozkuvky;
11. Držák vložit do robota a spustit program.



Obrázek 4. Výsledky detekce BaMMV pomocí PCR s RNA extrahovanou pomocí GeneJet kitu (A), fenol-chloroformovou metodou (B) a magnetickou metodou InnuPure (C). M marker, 1,2 pozitivní vzorky.

Detekce *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV)

Clover a Henry (1999) navrhli a optimalizovali detekci WSSMV pomocí one-step a two-step RT-PCR s využitím primerů Oligod(T)Not1/WSSMVf, amplifikující 3'koncový úsek RNA 1 genomu s velikostí PCR produktu 982 nt. Autoři doporučují extrakci celkové RNA z rostlin dle Clover et al. (1999). Jako biologický materiál jsou používány kořeny či listy pšenice (navážka jednoho vzorku činí 200 mg).

Vaïanopoulos et al. (2006) optimalizovali detekční techniky RT-PCR a real-time RT-PCR využívající SYBR-Green. Pro konvenční RT-PCR použili tři různé páry primerů, jmenovitě WSSMV1-F/WSSMV1-R, WSSMVc1-F/WSSMVc1-R a WSSMVc2-F /WSSMVc1-R, amplifikující produkty o stejné velikosti, konkrétně 199 bp. Pro detekci patogena pomocí RT-qPCR aplikovali iQ SYBR Green Supermix od firmy Bio-Rad s primery WSSMVc2-F /WSSMVc1-R. Real-time RT-PCR reakce probíhala v termocykléru Bio-Rad iCycler. Autoři doporučují extrakci celkové RNA pomocí FastRNA Pro Green Kit (QBIogene) a FastPrep

systemu. Jako rostlinný materiál využívali listy či kořeny obilnin (navážka jednoho vzorku činí 300 mg).

Detekce *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV)

Clover et al. (2001) navrhli za účelem detekce všech známých izolátů SBWMV metody two-step a one-step RT-PCR s využitím primerů SBWMV-UNIR/SBWMV-UNIF, amplifikující PCR produkt o velikosti 338 nt. Jedná se o úsek genu pro bílkovinný obal nacházející se na RNA 2 genomu. Pouze pro evropské izoláty SBWMV je autory doporučeno využití primerů SBWMV-UNIR a specifického forwardového primeru SBWMV-EF, amplifikující PCR produkt o velikosti 643 nt.

Pro detekci SBWM byla dále využita i metoda Immunocapture (IC)-RT-PCR za využití polyklonálních protilátek od firmy DSMZ a následné RT-PCR popsané v předchozím odstavci.

Pro extrakci celkové RNA autoři doporučují extrakci dle Clover et al. (1999). Jako biologický materiál využívají kořeny či listy pšenice s navážkou 200 mg.

Detekce WSSMV a SBWMV

Deb a Anderson (2007) vyvinuli metodu multiplex RT-PCR za účelem simultánní detekce a determinace osmi obilných virů, mezi nimiž jsou i zařazeny WSSMV a SBWMV. Pro detekci WSSMV byly použity nově navržené primery WSSMVL1/WSSMVR1, amplifikující PCR produkt o velikosti 154 nt a pro detekci SBWMV primery SBMV L2/SBMVR2, amplifikující PCR produkt dlouhý 219 bp.

Pro extrakci celkové RNA autoři využili TRizol (Invitrogen), jako rostlinný materiál použili listy obilnin.

Gitton et al. (1999) navrhli metodu multiplex RT-PCR pro detekci WSSMV a SBWM. Celková RNA byla extrahována dle modifikované Hall et al. (1978), popsané autory Schenk et al. (1995). Jako rostlinný materiál použili listy pšenice v navážce 200 mg.

Pro detekci WSSMV byly použity primery Fw4 /Rw4, amplifikující PCR produkt o velikosti 457 bp a pro detekci SBWM primery Fs5/Rs5, amplifikující PCR produkt o velikosti 718 bp. Použité primery Fs5/Rs5 byly schopné detekovat pouze evropské izoláty SBWM.

Detekce *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV)

Za účelem simultánní detekce a kvantifikace SBCMV navrhli Ratti et al. (2004) metody RT-PCR a multiplex RT-qPCR. Pro detekci viru byly navrženy primery SBCMVCPR/CPF,

kódující PCR produkt o velikosti 87 bp, kódující část bílkovinného obalu na RNA 2, spolu se specifickou fluorescenční sondou SBWMV237Fa. Pro účely qPCR byl použit PCR core kit (Applied Biosystems), samotná RT-qPCR reakce probíhala v termocykléru 7700 nebo 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Jako rostlinný materiál byly použity listy a kořeny obilovin s navázkou v rozmezí 100 až 200 mg. Celková RNA byla izolována pomocí modifikované izolační metody využívající CTAB (Chang et al., 1993).

Vaianopoulos et al. (2009) vyvinuli širokospektrální RT-PCR za účelem detekovat všechny doposud známé izolátů viru SBCMV. Celková RNA byla izolována pomocí FastRNA Pro Green Kit (QBIogene) a FastPrep system. Jako biologický materiál byly použity listy či kořeny obilnin v navážce 300 mg.

Pro účely RT-PCR byly navrženy primery FURO1-F/FURO1-R, amplifikující PCR produkt o délce 190 bp. Tyto primery byly využity i pro RT-qPCR analýzu, využívající iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Amplifikace byla provedena v přístroji Bio-Rad iCycler.

Detekce *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV)

Peerenboom et al. (1992) navrhli pro detekci patogena metodu RT-PCR využívající primerů BaYMV1/BaYMV2, amplifikující PCR produkt o délce 433 bp, situovaných na RNA 1 genomu. Celková RNA byla na počátku analýz extrahována z listů ječmene dle Schenk et al. (1995).

Detekce *Barley mild mosaic virus* (BaMMV)

Dle Hariri et al. (2003) byla detekce BaMMV provedena pomocí RT-PCR za využití specifických primerů BaMMV-1/BaMMV-2, amplifikující PCR produkt o velikosti 1150 bp. Autoři doporučují pro izolaci celková RNA extrakci dle Schenk et al. (1995). Jako biologický materiál využívají listů ječmene.

Achon et al. (2003) navrhli a následně použili pro detekci BaMMV metodu RT-PCR využívající primery BaMMV1/BaMMV2, kódující úsek bílkovinného obalu o velikosti 445 bp.

Simultánní detekce BaYMV a BaMMV (Mumford et al., 2004)

Mumford et al. (2004) navrhli simultánní detekci virů BaYMV a BaMMV za využití metod RT-qPCR a multiplex RT-qPCR. Jako rostlinný materiál byly využity listy ječmene

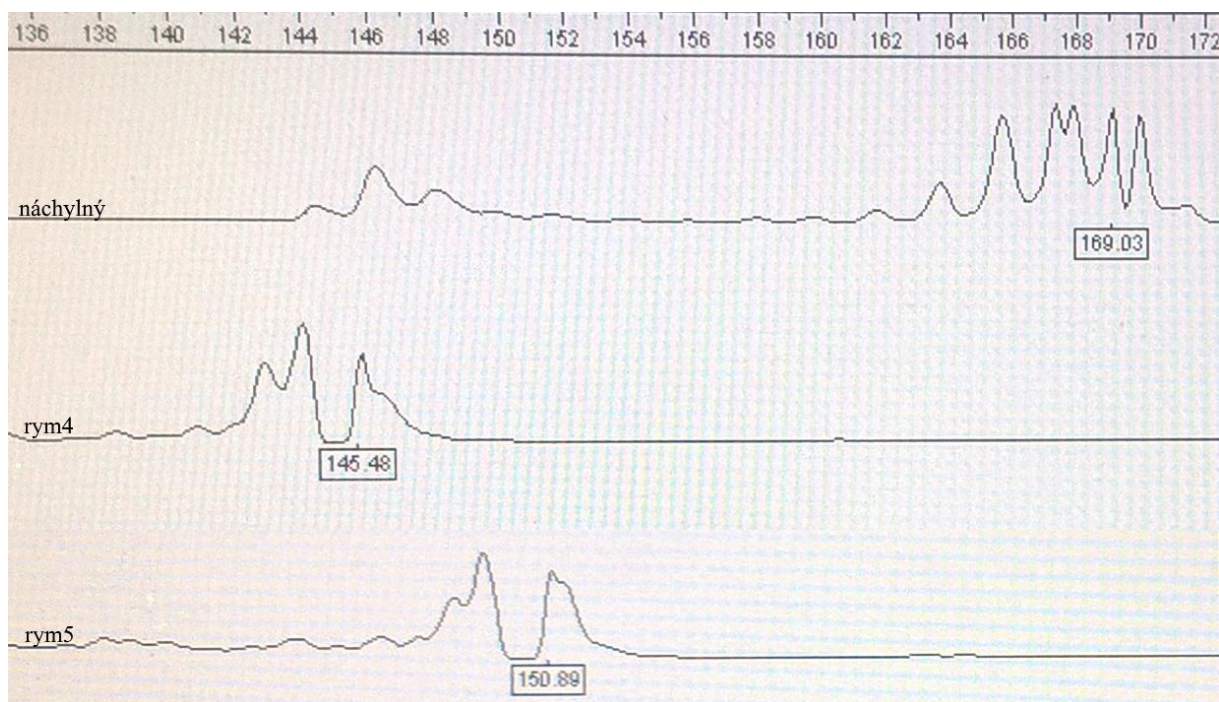
(navážka jednoho vzorku činila 100 mg). Celková RNA byla izolována dle Mumford et al. (2002) pomocí modifikované CTAB metody (Chang et al., 1993) nebo za využití poloautomatické extrakce RNA Kingfisher® mL system (Thermo Labsystems) a Kingfisher® total RNA extraction kit (Thermo Labsystems).

Pro detekci patogenů byla použita metoda one-step multiplex TaqMan® RT-qPCR využívající TaqMan® core reagent kit (Applied Biosystems). Real-time RT-PCR reakce probíhala v termocykléru ABI Prism 7700 nebo 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems), podmínky během amplifikace byli popsány Mumford et al. (2000). Pro detekci BaYMV byly navrženy primery BaYMV 520F/BaYMV595R a sonda BaYMV544T značená barvou VIC, pro detekci BaMMV primery BaMMV 1189F2 /BaMMV 1261R a sonda BaMMV 1209T značená barvou FAM.

3.4. Využití rezistence

3.4.1. Detekce genů rezistence ozimého ječmene proti virům mozaikového komplexu

Ne u všech odrůd, které se v ČR pěstují, je dodavateli deklarována jejich odolnost či náchylnost k BaMMV a BaYMV, a tudíž je třeba ji experimentálně stanovit. Detekci nejvýznamnějších genů *rym4* a *rym5*, nesoucích rezistenci k virovým mozaikám, lze provést s použitím mikrosatelitního markeru *Bmac29*, který je amplifikován primery *Bmac29F-HEX-5'ATCCAGCGATTCAAACACAAC-3'* (fluorescenčně značen) a *Bmac29R-5'-CTTCTCACTGACCGAC TTATACCA-3'* (Graner et al., 1999) ve 20 µl reakční směsi obsahující 10x pufr (Qiagen), 1,5mM MgCl₂, 200 µM směs dNTP (Invitrogene), 0,2 µM obou primerů (Sigma Aldrich), 1 jednotka enzymu Taq polymeráza (Qiagen) a 100 ng DNA. PCR cyklus na termocykleru Veriti (Applied Biosystems): 94 °C 3 min, 35 cyklů při 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, finální extenze při 72 °C 5 min. Kvalita PCR produktů se po obarvení ethidiumbromidem ověřuje separací 5 µl vzorku v 2% agarózovém gelu s následnou vizualizací pod UV lampou. Následně je provedena fragmentační analýza PCR produktů: 1µl PCR produktu je denaturován s 5 µl směsi deionizovaného formamidu (Sigma) a délkového standardu Tamra500 (Applied Biosystems) ve vzájemném poměru 470 µl formamidu a 30 µl Tamra500 při 95 °C 7 min. Zdenaturované vzorky jsou separovány pomocí kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Přesná délka separovaných PCR produktů v jednotkách páru bází je stanovena s použitím softwaru Genescan a Genotyper (Applied Biosystems). Vzorky s délkou PCR produktu 148 bp jsou nositelé genu *rym5*, s délkou 144 bp jsou nositelé genu *rym4* a s délkou 168 bp jsou náchylné odrůdy.



Obrázek 5. Výsledky analýzy PCR produktů po jejich elektroforetickém rozdělení s použitím softwaru Genescan a Genotyper.

3.4.2. Odolné a náchylné odrůdy ječmene

Celkem bylo výše uvedeným způsobem otestováno 59 odrůd ze sortimentu pěstovaného v ČR (příloha 1). Z nich bylo 13 odrůd prokázáno jako náchylné a téměř všechny zbývající odrůdy nesou gen *rym4*, který rostlinám zaručuje vysoký stupeň odolnosti vůči BaMMV a BaYMV. Gen *rym5*, který má výhodu oproti *rym4* v tom, že navíc funguje i proti kmenu BaYMV2, byl prokázán pouze v odrůdě Travira. Naše výsledky byly dále porovnány s údaji deklarovanými v popisu odrůd od příslušných dodavatelů osiva. Pokud se tato informace v popisu nacházela (např. u firmy Selgen), shodovala se s našimi výsledky. Protože údaje o ploše, na které se pěstují jednotlivé odrůdy, nejsou dostupné, získali jsme alespoň přibližné údaje o ploše, na které se množí. Z tohoto údaje lze pak zhruba odhadnout podíl jednotlivých odrůd na celkové ploše ozimého ječmene. Z odrůdových pokusů ÚKZÚZ jsme získali údaje o výnosech doporučených odrůd. Z těchto údajů potom vycházejí naše doporučení.

3.5. Analýza situace v ČR, rekapitulace výše uvedených významných faktů a doporučení k omezení škodlivosti virů přenosných *P. graminis* a především mozaikového komplexu ječmene

- *Polymyxa graminis* jako potenciální vektor řady významných obilních virů je v ČR značně rozšířena na většině polí, kde se pěstují obilniny. Můžeme je však nalézt i na dalších stanovištích, kde rostou lipnicovité rostliny, jako jsou louky i lesní podrost. Vyskytují se u nás obě evropské formy speciales, tj. f. sp. *tepida* a f. sp. *temperata*. Samotná *P. graminis* pravděpodobně nezpůsobuje žádné přímé ztráty.
- Proti vektoru nelze bojovat žádnými dostupnými pesticidy. Běžné fungicidy nezabrání infekci v půdě a účinnější fumiganty jednak nejsou povoleny a jednak by ošetření bylo neúměrně drahé i technicky náročné. Není známa ani rezistence obilnin vůči *P. graminis*. Boj proti ní je tedy velmi obtížný. Proto je třeba pokud možno využít preventivních metod, aby se zabránilo rozšíření příslušných virů.
- Utužení půdy a úzké osevní sledy s obilninami zlepšují podmínky pro *P. graminis* a zvyšují její koncentraci v půdě.
- Ozimý ječmen je k infekci viry mozaikového komplexu daleko více náchylný, než ječmen jarní. Podle dostupných údajů je poměr ploch ozimého a jarního ječmene v zemích, kde mozaikový komplex způsobuje největší škody, jako jsou Francie a Německo, obrácený oproti ČR. Ve Francii je poměr asi 2:1 a v Německu dokonce 3:1, zatímco v ČR je to zhruba 1:4. To lze považovat za jednu z možných příčin nižší škodlivosti mozaikového komplexu u nás.
- Odrůdy ozimého ječmene pěstované v ČR mají většinou geny rezistence proti virům mozaikového komplexu a až donedávna tyto odrůdy zcela dominovaly (>99 %). V tom lze spatřovat druhý důvod jeho nižší škodlivosti. Nicméně v posledních letech náhle vzrostl podíl odrůd náchylných až na téměř 14 %. Především jde o nárůst u odrůdy Lester, ale i dalších, jako je Marissa a Saffron. Je otázkou, co stojí za tímto navýšením, protože alespoň podle údajů z pokusů ÚKZÚZ není odrůda Lester nijak vynikající ani výnosově, ani např. odolností vůči dalším chorobám. Za zmínku stojí její vyšší mrazuvzdornost, ale při současném průběhu většiny zim je přínos této vlastnosti diskutabilní.

Jako profylaktická opatření k zamezení rozšíření virů přenosných *P. graminis* lze doporučit především:

- Provádět monitoring výskytu virů přenosných *P. graminis* s laboratorními rozbory na přítomnost jednotlivých virů. Je důležité si uvědomit, že příznaky viróz se u obilnin ve vyšším stadiu velmi často podobají příznakům způsobeným abiotickými činiteli a při jejich dlouhodobém přehlížení může dojít k akumulaci virů v populacích *P. graminis*. Rostliny napadené virem přenosným *P. graminis* jsou většinou na polích soustředěny do menších či větších ohnisek a mají světlejší barvu. Zvláště u oz. ječmene je třeba monitoring provádět v předjaří nebo časně na jaře. Později už jsou příznaky méně patrné i specifické.
- U ozimů, které jsou nejvíce ohroženy, vybírat a pěstovat odrůdy, které snášejí pozdější výsev, kdy už teploty nejsou dostatečně vysoké pro infekci *P. graminis*. Případné jarní infekce už jsou daleko méně škodlivé.
- U ozimého ječmene se zaměřit na odrůdy s geny rezistence *rym4/rym5*. Zvláště u genu *rym4* je výběr odrůd opravdu velký jak u dvouřadých, tak i víceřadých odrůd. Jejich výnosy i další vlastnosti jsou alespoň srovnatelné s odrůdami náchylnými, ale spíše jsou lepší. Naopak náchylné odrůdy bez zvláštních důvodů pokud možno nepěstovat vůbec. Vhodným řešením by byla pyramidace *rym4/rym5* s jinými geny rezistence, např. *rym1*, *rym2*, a *rym11* s podobným účinkem, ovšem o jejich případném výskytu v našich odrůdách nemáme žádné zprávy. Další geny rezistence, jako jsou *rym7*, *rym8* a *rym10* poskytují rostlinám částečnou rezistenci, která může být kompletně anulována vyššími teplotami, což opět navozuje otázku pozdějšího setí.
- Nedílnou součástí boje proti *P. graminis* a jí přenášeným virům by měla být správná agrotechnika, např. snižování utuženosti půd a celková péče o půdní úrodnost, aplikace organické hmoty, vápnění a pokud možno co nejširší osevní sledy obilnin. Tato opatření sice nesníží ztráty tam, kde se už začnou projevovat, ale mohou tento stav oddálit.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Existence virů přenosných *P. graminis* je mezi naší odbornou veřejností jen málo známa a ani v česky psané literatuře se mnoho informací nevyskytuje. Obdobná metodika zatím neexistuje a informace o výskytu genů rezistence v řadě odrůd nejsou běžně pěstitelům k dispozici. Z tohoto hlediska lze metodiku považovat za zcela novou a originální.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena pro pěstitele, šlechtitele i výzkumné organizace zabývající se pěstováním obilnin. Využít by ji měli i úředníci státní správy, kteří ovlivňují celkovou situaci v sektoru obilnářství, např. prostřednictvím uznávání odrůd. Dalšími uživateli mohou být střední a vysoké zemědělské školy, které ji mohou využít při výuce. Metodika bude volně dostupná na webových stránkách České zemědělské univerzity v Praze (www.czu.cz).

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Škodlivost virů přenosných *P. graminis* zatím nebyla v ČR kvantifikována, ale zahraniční zdroje udávají například u mozaikového komplexu ječmene jako běžné ztráty v rozmezí 20-30 % a v případě silného napadení ztráty až 75 %. I když je v ČR mozaikový komplex zatím považován za minoritní problém, je nutné pomocí vhodných metod zabránit jeho epidemickému výskytu a následným problémům, které se už obtížně řeší. Z výše uvedených údajů lze při ploše ozimého ječmene (přes 100 tis. ha), který je ohrožen především, významném výskytu virů pouze na 10 % ploch, průměrném výnosu přes 4 t/ha, výnosové depresi na úrovni pouze 10 % a ceně 3500 Kč/t odhadovat ztráty v ČR na cca 140 mil. Kč ročně.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Achon M. A., Ratti C., Rubies-Autonell C. (2003): Occurrence of *Barley mild mosaic virus* on barley in Spain. *Disease Notes* 87, 8.
- Anonymous (2007): The First report of *Polymyxa graminis* Led. in Northern Syria. *Arab and Near East Plant Protection Newsletter* 45, 39.
- Anonymous (2016): International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- Barr DJS (1979): Morphology and host range of *Polymyxa graminis*, *Polymyxa betae* and *Ligniera pilorum* from Ontario and some other area. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1, 85-94.
- Barr, D. J. S. 1988. Zoosporic plant parasites as fungal vectors of viruses: taxonomy and life cycles of species involved. In: Cooper, J. I. and Asher, M. J. C. (eds) *Developments in*

- Applied Biology II. Viruses with Fungal Vectors Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK. p. 123 – 137.
- Barr KJ, Asher MJC (1992): The host range of *Polymyxa graminis* (Plasmodiophoromycetes). Canadian Journal of Botany, 60, 2496-2504.
- Bittner, V. 2012. Škodliví činitelé cukrové řepy – choroby cukrovky: Rizománie řepy. Listy cukrovarnické a řepářské. Roč. 128, č. 5/6, 182-183 s. ISSN 1210-3306.
- Clover G., Henry Ch. (1999): Detection and discrimination of *Wheat spindle streak mosaic virus* and *Wheat yellow mosaic virus* using multiplex RT-PCR. European Journal of Plant Pathology 105, 891–896.
- Clover G.R.G, Hugo S. A., Harju V.A., Wright D.M. and Henry C.M. (1999): Preliminary investigations of an uncharacterized virus of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in England. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 106, 275–283.
- Clover G. R. G., Ratti C., Henry C. M. (2001): Molecular characterization and detection of European isolates of *Soil-borne wheat mosaic virus*. Plant Pathology 50, 761-767.
- Cox BA, Luo H, Jones RAC (2014): *Polymyxa graminis* isolates from Australia: Identification in wheat roots and soil, molecular characterization, and wide genetic diversity. Plant Disease 98, 1567-1575.
- Deb M., Anderson J. M. (2008): Development of a multiplexed PCR detection method for *Barley and Cereal yellow dwarf viruses*, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. Journal of Virological Methods 148, 17–24.
- Erkan E, Yilmaz NDK (2009): Determination of virus diseases in wheat growing areas of Samsun province. Anadolu Journal of Agricultural Sciences 24, 67-75.
- Gitton F., Diao A., Ducrot O., Antoniw J. F., Adams M. J., Maraite H. (1999): A two-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection of *Soil-borne wheat mosaic virus* and *Wheat spindle streak mosaic virus* from France. Plant Pathology 48, 635–641.
- Hall T.C., Ma Y., Buchbinder B.V., Pyne J.W., Sun S.M., Bliss F.A. (1978). Messenger RNA for G1 protein of French bean seeds: cell-free translation and product characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **75**: 3196–200.
- Hariri D., Meyer M., Prud'homme H. (2003): Characterization of a new *Barley mild mosaic virus* pathotype in France. European Journal of Plant Pathology 109, 921–928.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reports 11, 113–116.
- Kanuyuka K, Ward E, Adams MJ (2003): *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. Molecular Plant Pathology, 4, 393–406.

- Karling JS (1966): Some zoosporic fungi of New Zealand. XI. Plasmodiophorales. *Sydowia Annales Mycologici*, 20, 151-156.
- Keskin B (1964): *Polymyxa betae* n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Archives für Mikrobiologie* 49, 348-374.
- Ketta H, Zouhar M, Rysanek P (2011): First report of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata*, a vector of soilborne cereal viruses in the Czech Republic. *Plant Disease* 95, 353.
- Ledingham GA (1939): Studies on *Polymyxa graminis* n. gen. n. sp., a plasmodiophoraceous root parasite of wheat. *Canadian Journal of Research C Botanical Sciences*, 17, 38–51.
- Legrève A, Delfosse P, Maraite H (2002): Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 106, 138-147.
- Linford MB, McKinney HH (1954): Occurrence of *Polymyxa graminis* in roots of small grains in the United States. *Plant Disease Report*, 38, 711-713.
- Maraite H (1991): Transmission of viruses by soil fungi. In: Beemster ABR, Bollen GJ, Gerlagh M, Ruissen MA, Schippers B, Tempel A (eds) *Developments in agricultural and managed-forest ecology: biotic interactions and soil-borne diseases*. Proceedings of the first conference of the European Foundation for plant pathology. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, 67-82.
- McGrann, G., Adams, M. J. 2003. Characterisation of resistance to *Barley mild mosaic virus*. In *Proceedings of the Fifth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, Zürich, Switzerland, 22 - 25 July 2002 (Rush, C.M. and Merz, U., eds), Denver, CO: American Society of Sugar Beet Technologists. p. 72 - 75.
- Mouhanna AM, Choueiri E, Langen G (2008): First report of *Polymyxa betae* and *Polymyxa graminis* in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, 90, 585-589.
- Mumford R., Skelton A., Metcalfe E., Walsh K., Boonham N. (2004): The reliable detection of Barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods* 117, 153–159.
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., Boonham, N. (2000): The detection of *Potato mop-top* and *Tobacco rattle viruses* using a multiplex real-time fluorescent RT-PCR assay (TaqMan®). *Phytopathology* 90, 488–493.
- Peerenboom E., Pröls M., Schell J., Steinbiss H. H., Davidson A.D. (1992): The complete nucleotide sequence of RNA1 of a German isolate of *Barley yellows mosaic virus* and its comparison with a Japanese isolate. *Journal of General Virology* 73, 1303-1308.

- Prokop, M. 2010. Rostlinné viry přenášené houbovými parazity v půdě. Úroda. Roč. 58, č. 9, 18-20 s. ISSN 0139 - 6013.
- Rao, A. S., Brakke, M. K. 1969. Relation of *Soil – borne wheat mosaic virus* and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. Phytopatology 59, 581 - 587.
- Ratna AS, Rao AS, Reddy AS, Nolt BL, Reddy DVR, Vijayalakshmi M, McDonald D (1991): Studies on transmission of *Indian peanut clump virus*-disease by *Polymyxa graminis*. Annals of Applied Biology 118, 1, 71-78.
- Ratti C., Budge G., Ward L., Clover G., Rubies-Autonell C., Henry C. (2004): Detection and relative quantitation of *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®). Journal of Virological Methods 122, 95–103.
- Rush CM (2003): Ecology and epidemiology of Benyviruses and plasmodiophorid vectors. Annual Review of Phytopathology 41, 567-592.
- Sahandpour A, Izadpanah K (1999): Report of *P. graminis* and a virus resembling *Wheat soilborne mosaic virus* from Fars. Iranian Journal of Plant Pathology 35, 61.
- Simpson AGB, Roger AJ (2004): The real ‘kingdoms’ of eukaryotes. Current Biology, 14, 17, 693-696.
- Schenk P., Antoniw J.F., de Batista M.F., Jacobi V., Adams M.J., Steinbiss H.H. (1995): Movement of *Barley mild mosaic* and *Barley yellow mosaic virus* in leaves and roots of barley. Annals of Applied Biology 126, 291–305.
- Smith MJ, Adams MJ, Ward E (2011): Evidence that *Polymyxa* species may infect *Arabidopsis thaliana*. FEMS Microbiology Letter, 318, 35-40.
- Subr ZW, Kastirr U, Kuhne T (2002): Subtractive cloning of DNA from *Polymyxa graminis* – an obligate parasitic plasmodiophorid. Journal of Phytopathology, 150, 564–568.
- Thocchetto A (1974): Constatacao do fungo *Polymyxa graminis* Ledingham am *Triticum aestivum* L., no Rio Grande do Sul. Agronomia Sulriograndense, 10, 227-231.
- Thompson JP, Clewett TG, Jennings RE, Sheedy JG, Owen KJ, Persley DM (2011): Detection of *Polymyxa graminis* in a barley crop in Australia. Australian Plant Pathology 40, 66–75.
- Thouvenel JC, Fauquet C (1980): *Polymyxa graminis* on new Sorghum species in Africa. Plant Disease 64, 957-958.
- Vaianopoulos C., Legrève A., Lorca C., Moreau V., Steyer S., Maraite H., Bragard C. (2006): Widespread Occurrence of *Wheat spindle streak mosaic virus* in Belgium. Plant Disease 90, 6.

- Vaianopoulos C, Bragard C, Moreau V, Maraite H, Legrève A (2007): Identification and quantification of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* and *P. graminis* f. sp. *tepida* on barley and wheat. *Plant Disease* 91, 857-864.
- Vaianopoulos C., Legrève A., Moreau V., Bragard C. (2009). Broad-spectrum detection and quantitation methods of *Soil-borne cereal mosaic virus* isolates. *Journal of Virological Methods* 159, 227–232.
- Ward E, Adams MJ (1998): Analysis of ribosomal DNA sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus and species - specific PCR primers. *Mycology Research* 102, 965-974.
- Ward E, Kanyuka K, Motteram J, Korniyukhin D, Adams MJ (2005): The use of conventional and quantitative real – time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist* 165, 875–885.
- Werner K, Friedt W, Laubach E, Waugh R, Ordon F, 2003. Dissection of resistance to soil-borne yellow-mosaic-inducing viruses of barley (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in a complex breeders' cross by means of SSRs and simultaneous mapping of BaYMV/BaYMV-2 resistance of var. 'Chikurin Ibaraki 1'. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 1425–1432.
- Werner K, Friedt W, Ordon F, 2005. Strategies for pyramiding resistance genes against the Barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Molecular Breeding*, 16, 45.
- Wiese MV (1977): Primitive root fungi. In: *Compendium of wheat diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 54-55.
- Ziegler A, Fomitcheva V, Zakri AM, Kastirr U (2015): Occurrence of *Polymyxa graminis* ribotypes in Germany and their association with different host plants and viruses. *Cereal Research Communication* 44, 251-262.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Grimová L., Winkowska L., Špuláková B., Růžičková P., Ryšánek P.: Detection of two formae speciales of *Polymyxa graminis* in the Czech Republic. *Scientia Agriculturae Bohemica*, přijato do tisku.
- Ketta H., Ryšánek P., Zouhar M. 2011: Transmissibility of *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) by Czech isolates of *Polymyxa graminis*. *Sborník abstraktů, IX. Mezinárodní konference doktorandů experimentální biologie rostlin Ostrava*, s. 18.

Ketta H., Ryšánek P., Zouhar M. 2011: Detection of *Polymyxa graminis* in a barley crop in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 48, 65-71.

Ketta, H., Zouhar, M., Ryšánek, P. 2011: First report of *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata*, a vector of soilborne cereal viruses in the Czech Republic. *Plant Disease* 95, 353.

Ryšánek P., Zouhar M., Grimová L. 2015: Přenos rostlinných virů organismy z rodu *Polymyxa*. *Rostlinolékař* 26 (6), 11-13.

Ryšánek P., Grimová L., Zouhar M., Konrady M. 2016: Výskyt *Polymyxa graminis* f. sp. *temperata* a f. sp. *tepida* jako potenciálních vektorů některých virů obilnin na území České republiky. Specializovaná mapa s odborným obsahem. ČZU v Praze, č. osvědčení ÚKZÚZ 052731/2016.

Ryšánek P., Grimová L., Zouhar M., Špuláková B. 2013: *Polymyxa graminis* – vektor významných virů obilnin. *Úroda* 61 (12), 9-10.

Ryšánek P., Zouhar M., Ketta H., Kazda J., Opplová K. 2009: První zpráva o výskytu *Polymyxa graminis* (Ledingham, 1939) v České republice. Sborník abstraktů, XVIII. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin, s. 115.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1. Výsledky testování odrůd ozimého ječmene na přítomnost genů *rym4* a *rym5* a jejich přibližný podíl na množitelských plochách v jednotlivých letech.

odrůda	gen/ genotyp	přibližný podíl na množitelské ploše (%)			
		2011	2012	2013	2014
Alinghi	<i>rym4</i>				
Alissa	<i>rym4</i>				
Amarena	<i>rym4</i>	8,5	4,4		
Antonella	<i>rym4</i>				
Breunskyliie	<i>rym4</i>	1,2	1,4	0,4	0,7
Camera	<i>rym4</i>				
Campanile	<i>rym4</i>	1,5	1,3	0,4	
Campill	náchylný				
Casanova	<i>rym4</i>	0,2	1,2	1,4	0,5

Colonia	rym4				
Conny	rym4				
Doreen	rym4				0,6
Fabian	rym4				
Faraon	rym4				
Finesse	náchylný				
Fridericus	rym4	14,3	9,3	8,1	2,7
Gilberta	náchylný				
Graciosa	rym4				
Heike	rym4				
Henriette	rym4	0,3	3,2	8,4	7,7
Highlight	rym4	5	3,3	1,7	0,4
Hobbit	rym4				
Johanna	rym4				
Jup	rym4	7,9	8,8	9,5	5,4
KWS Ariane	rym4				5,6
KWS Glacier	rym4				0,2
KWS Meridian	rym4		2,6	5,4	9,8
KWS Tenor	rym4			1,6	3,3
KWS Tonic	rym4				
Lancelot	rym4				0,2
Laverda	rym4	12,8	7,3	3,9	2,8
Leopard	rym4				1,1
Lester	náchylný		4,3	8,5	6,6
Luran	náchylný				0,4
Luxor	náchylný				

Marissa	náchylný			3,2	3,7
Mascara	náchylný				
Merlot	rym4	4,6	0,3	0,6	0,5
Nero	rym4		8,1	8,1	5,9
Okal	náchylný				
Padura	náchylný				
Paso	rym4				
Reni	náchylný				
Saffron	náchylný	0,4	0,6	0,2	0,8
Sandra	rym4	0,4	1,3	2,2	3,6
Saturn	náchylný		1,2	0,8	2,4
Scarpia	rym4				
Semper	rym4	1,3	2,1	0,7	
Souleyka	rym4				
Sylva	rym4		3,3	8,2	5,9
Tamina	rym4				
Tatra	rym4	0,3	1,3	1,2	1,3
Titus	rym4			2	11,7
Traminer	rym4	2,5	1,3	1,6	
Travira	rym5				2,1
Wendy	rym4	10,7	8,9	7,1	5,5
Wintmalt	rym4	13,6	15,6	8,8	1,7
Wootan	rym4				
Yatzy	rym4	3,4	3,3	0,9	0,5
náchylné celkem		0,4	6,1	12,7	13,9