

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA GENETIKY A ZEMĚDĚLSKÝCH BIOTECHNOLOGIÍ

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

ING. LUCIE WALTEROVÁ

České Budějovice 2024

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorand: Ing. Lucie Walterová

Studijní program: Biotechnologie

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Název práce: Identifikace a charakterizace mykovirů u václavků rodu *Armillaria*

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant práce: Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

Oponenti: Ing. Jaroslav Salava, Ph.D.

prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

Abstrakt

Zástupci rodu *Armillaria* jsou široce rozšířenými lesními patogeny, proti nimž dosud nebyla vyvinuta účinná ochrana. Vzhledem k jejich dlouhověkosti a tvorbě rozsáhlých klonálních jedinců by mohlo být výhodné použití mykovirů jako prostředků biologické kontroly proti těmto patogenům. Tato práce popisuje druhové zastoupení václavek rodu *Armillaria* v ČR, a následně detekci a charakterizaci virů u *Armillaria* spp. nasbíraných v České republice. U druhů *Armillaria ostoyae* a *A. cepistipes* bylo detekováno celkem pět ssRNA virů, včetně viru z čeledi *Tymoviridae* a čtyř virů patřících do nedávno popsané skupiny "ambivirů" s kruhovým ambisense uspořádáním genomu. Ve všech ambivirových sekvencích byly popsány ribozymy hammerhead (HHRz) i hairpin ribozymy (HpRz). Nově detekované viry byly porovnány pomocí fylogenetické analýzy a na základě sekvenačních dat byly navrženy primery a optimalizována metoda RT-PCR pro rychlý screening přítomnosti těchto virů.

Klíčová slova: *Armillaria*, kořenová hniloba, viry, ambivirus, tymovirus, biologická kontrola

Abstract

Members of the genus *Armillaria* are widespread forest pathogens against which effective protection has not yet been developed. Given their longevity and the formation of large clonal individuals, the use of mycoviruses as biological control agents could be an effective alternative against these pathogens. This paper describes the species distribution of *Armillaria* spp. in the Czech Republic, followed by the detection and characterization of viruses in *Armillaria* spp. collected in the Czech Republic. A total of five ssRNA viruses were detected in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes*, including a virus from the family Tymoviridae and four viruses belonging to the recently described group of "ambiviruses" with a circular ambisense genome arrangement. Both hammerhead ribozymes (HHRz) and hairpin ribozymes (HpRz) have been described in all ambivirus sequences. The newly detected viruses were compared by phylogenetic analysis and primers were designed based on the sequencing data and the RT-PCR method was optimized for rapid screening for the presence of these viruses.

Keywords: *Armillaria*, Root rot, viruses, ambivirus, tymovirus, biological control

Obsah

1	ÚVOD	6
2	Cíle práce a hypotézy.....	8
3	Materiál a metodika	9
3.1	Identifikace druhů václavek rodu <i>Armillaria</i>	9
3.2	Detekce mykovirů u hub rodu <i>Armillaria</i>	10
4	Výsledky a diskuze	12
4.1	Druhové zastoupení václavek rodu <i>Armillaria</i>	12
4.2	Mykoviry vyskytující se v českých populacích <i>Armillaria</i>	12
4.2.1	Identifikace ssRNA virů	13
4.2.2	Fylogenetická analýza virů.....	17
4.2.3	RT-PCR screening.....	20
5	Závěr	21
6	Seznam použité literatury	22
7	Životopis	26
8	Seznam publikovaných prací	27

1 ÚVOD

Václavky (*Armillaria*) představují rod rostlinných patogenních hub, který zahrnuje asi 40 známých morfologických a nejméně 129 biologických druhů (Coetzee a kol., 2018). Mnohé z nich jsou patogeny, které způsobují onemocnění projevující se hnilobou kořenů u široké škály stromů a keřů, včetně hospodářsky významných jehličnanů. V našich podmínkách se často vyskytují ve smrkových porostech. Jsou snadno rozeznatelné podle svých rhizomorf, které slouží k vyhledávání potravy a zároveň přetrvávají v půdě za nepříznivých podmínek pro růst. Stejně jako ostatní houby způsobující bílé hniloby mohou *Armillaria* rozkládat všechny složky ligninového dřeva, a lze je tak zařadit mezi houby patogenní i saprofytické (Sipos a kol., 2018). Produkují enzymy rozkládající polysacharidy lignin a celulózu, což houbám umožňuje žít se i již odumřelou organickou hmotou (Rodriguez a kol., 1997). Houbám rodu *Armillaria* se daří převážně ve vlhkých podmínkách, v suchých a chladných podmínkách přečkávají ve formě rhizomorf (Denman a kol., 2000). Nakažení václavkami může probíhat přes půdu rhizomorfy nebo přímým kontaktem s myceliem rostoucím v infikované rostlině (Charles a kol., 1991). Mezi limitující faktory ohrožující život saprofytních hub patří konkurence mezi jednotlivými druhy hub žijícími ve společném prostoru, dále stres způsobený nevhodnými klimatickými, výživovými nebo mikrobiotickými podmínkami a disturbance. U smrkových porostů často dochází ke konkurenci mezi václavkou obecnou (*Armillaria mellea*), troudnatcem kopytovitým (*Fomes fomentarius*), ohňovci (*Phellinus*) a lesklokorkami (*Ganoderma*; Klán, 1989).

Dalším limitujícím faktorem, omezujícím růst a patogenitu václavek mohou být mykoviry. Mykoviry obecně byly detekovány ve všech hlavních skupinách patogenních hub (Ghabrial a Suzuki, 2009). Jsou to převážně dvouvláknové (ds) RNA viry, ale vyskytují se i ve formě jednovláknových (ss) RNA virů a kruhových jednovláknových (ss) DNA virů. Ve svém replikačním cyklu neprochází extracelulární fází, jsou přenášeny intracelulárně prostřednictvím spor nebo skrz spojování hyf (Ghabrial, 1998). Účinnost přenosu spor se liší podle typu spor a taxonomického zařazení hostitelských hub (Ihrmark, 2004). Ve většině hostitelů přežívají asymptomaticky, zatímco u některých byla prokázána snížená schopnost virulence hostitelských hub. Tato vlastnost, označovaná jako hypovirulence, může být užitečná především kvůli rozsáhlosti houbových chorob v zemědělství a lesnictví a omezeným možnostem kontroly těchto chorob.

Existují významné lesní patogenní houby, jako jsou např. *Cryphonectria parasitica*, *Phytophthora* spp., *Ophiostoma* spp., *Gremmeniella abietina*, *Hymenoscyphus fraxineus*, *Heterobasidion annosum* a *Armillaria* spp., které hostí mykoviry s různými vztahy mezi houbami a viry (Muñoz-Adalia a kol. 2016; Vainio a kol. 2018; Sutela a kol. 2021). U *Armillaria* popsali již Blattny a kol. (1973) a Reaves a kol. (1988) přítomnost virům podobných částic u *A. mellea* a *A. ostoyae*, ale teprve v roce 2021 byly viry potvrzeny pomocí molekulárních metod (Linnakoski a kol., 2021).

V dosavadních studiích týkajících se mykovirů václavek *Armillaria* bylo popsáno několik RNA virů. Cílem těchto studií bylo především porozumět rozmanitosti a vlivu těchto mykovirů na druhy rodu *Armillaria* a zaměřit se na jejich ekologickou roli a potenciální vliv na virulenci hub. Doposud byl virom rodu *Armillaria* molekulárně zkoumán ve vzorcích z Finska, Ruska (Sibiř), Jižní Afriky a Švýcarska. Bylo popsáno několik pozitivních i negativních ssRNA virů a dva dsRNA mykoviry. U pěti různých druhů rodu *Armillaria* (*A. mellea*, *A. borealis*, *A. cepisti-pes*, *A. ostoyae*, *A. gallica*) byly popsány mitoviry, ourmia-like viry, tymoviry, flegiviry, ambi-like viry, několik dosud neklasifikovaných (+)ssRNA a dva neklasifikované dsRNA viry (Linnakoski a kol. 2021; Shamsi a kol. 2024).

2 Cíle práce a hypotézy

Tato práce byla primárně zaměřena na detekci mykovirů u houbových patogenů rodu *Armillaria*.

Díličmi cíli bylo:

- Monitorování druhového zastoupení václavek rodu *Armillaria* ve vzorcích sbíraných v České republice se zaměřením na druhové odlišení pomocí molekulárních markerů
- Detekování a identifikace jednotlivých mykovirů vyskytujících se v českých populacích václavek *Armillaria*
- Genomová analýza a fylogenetické zařazení popsaných mykovirů
- Návrh a optimalizace metody RT-PCR (Reverse-transcription polymerase chain reaction) pro rychlý screening přítomnosti mykovirů

Hypotézy:

- Na základě molekulární markerů lze odlišit jednotlivé druhy rodu *Armillaria*
- Houby rodu *Armillaria* v ČR jsou hostiteli mykovirů
- Metodu RT-PCR lze využít pro detekci RNA virů

3 Materiál a metodika

3.1 Identifikace druhů václavek rodu *Armillaria*

První část této práce je zaměřena na přesnou identifikaci václavek rodu *Armillaria* pomocí molekulárních markerů. Mimo použití dalších markerů byla vyvinuta i metoda LAMP (loop mediated isothermal amplification) k přesné identifikaci *Armillaria ostoyae* v polních podmínkách. K vývoji a optimalizaci nového testu LAMP pro určení druhu bylo použito celkem 101 izolátů hub rodu *Armillaria*, které zahrnovaly *A. ostoyae*, *A. cepistipes* a *A. gallica*. K zavedení a testování metody LAMP byla použita sbírka sta vzorků z východní části České republiky a jednoho vzorku z CCBAS218 (*Armillaria gallica* – Sběrka kultur basidiomycetů, Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR, Česká republika, <http://www2.biomed.cas.cz/ccbas/fungi.htm>). DNA byla ze vzorků izolována pomocí roztoku CTAB-PVP (cetyltrimethylamoniumbromid – polyvinylpyrrolidon; Čurn a kol. 2019) a extrahovaná DNA byla resuspendována v 1x TE pufru a uchovávána při -20°C. Druhy václavek rodu *Armillaria* byly určeny na základě molekulárních markerů. Pro přesné odlišení druhů byla použita kombinace markerů pro ITS oblast a pro eukaryotický elongační faktor 1-alfa (EF 1- α). Byla provedena nested PCR s primery pro ITS oblast: ITS1 a ITS4, a vnitřními primery AR1 a AR2 (Lochman a kol., 2004) a PCR amplifikace s primery pro oblast EF 1- α EF1160F a EF1750R (Kausrud a Schumacher, 2003). Amplifikované fragmenty byly sekvenovány v externí laboratoři SEQme s.r.o (Dobříš, Česká republika), pomocí softwaru blastn porovnány s databází GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a přiřazeny k jednotlivým druhům *Armillaria*.

Z databáze GenBank byl získán soubor sekvencí genu *Armillaria* tef1 od zástupců všech hlavních evropských druhů a byl vytvořen alignment pro určení konzervativních oblastí vhodných k návrhu primerů. Na základě tohoto alignmentu bylo pomocí LAMP designer softwaru (OptiGene Limited; Version 1.12, 2017) navrženo pět LAMP primerů pro detekci *A. ostoyae* a asimilační sonda značená fluorescenční sloučeninou TAMRA (5-karboxytetramethylrhodamin) na 5'konci. Reakce byly provedeny ve třech opakováních pomocí systému QuantStudioTM 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) a na ručním zařízení Smart-DART (Diagenetix, USA).

3.2 Detekce mykovirů u hub rodu *Armillaria*

Zatímco první část práce byla zaměřena na druhovou identifikaci václavek, následující části se zabývají detekcí a charakterizací mykovirů vyskytujících se u hub rodu *Armillaria* v České republice. Vzorky hub rodu *Armillaria* byly sbírány v letech 2019-2020 v České republice, především na severovýchodní Moravě, v Moravském krasu a jihovýchodních Čechách. Spory z plodnic nebo rizomorfy byly přeneseny a kultivovány na ME agaru při 25 °C po dobu přibližně čtyř týdnů před sběrem. Následně byly vzorky na stejném ME agaru skladovány při 4 °C.

U vzorků byla nejdříve provedena detekce přítomnosti virových dsRNA molekul. Mycelium z jedné Petriho misky bylo lyofilizováno a následně vortexováním s ocelovými kuličkami homogenizováno. dsRNA byla extrahována dle protokolu Morris a Dodds (1979) s některými modifikacemi, jak je popsáno v práci Tonka a kol. (2021). Izoláty *Gremmeniella* a *Phytophthora* s dříve potvrzenou přítomností dsRNA mykovirů byly používány jako pozitivní kontrola.

Následně bylo pro sekvenční analýzu celkové RNA vybráno 13 vzorků pocházejících z různých lokalit České republiky. Celková RNA byla izolována pomocí extrakčního kitu RNA SPLIT (Lexogen, Vídeň, Rakousko) a uchovávána při -80°C. Izolovaná RNA vybraných 13 vzorků *Armillaria* byla sloučena do jednoho směsného vzorku a ošetřena pomocí TURBO DNA-free TM Kit (Invitrogen™ (Waltham, MA, USA)). Takto připravený směsný vzorek byl odeslán do společnosti SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika) ke konstrukci knihovny a NGS sekvenování RNA. Před přípravou knihovny byla ribozomální RNA (rRNA) depletována pomocí soupravy NEB-Next rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat). Knihovna byla připravena pomocí sady NEB-Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina. Kvalita připravené knihovny byla zkontrolována pomocí soupravy Agilent Bioanalyzer 2100 High sensitivity DNA Kit, soupravy Invitrogen Colibri Library Quantification Kit a soupravy Qubit 1X dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Knihovny byly čteny pomocí pair-end sekvenování (PE) (2 × 150 nt) na přístroji NovaSeq6000 (DS-150) (Illumina, San Diego, CA, USA) s použitím sady činidel NovaSeq S4 v1.5. Sekvenační data byla stažena z datového uložště společnosti SEQme s. r. o. (Dobříš, Česká republika) a softwarově zpracována pomocí programů FASTQC v.0.11.9 (Andrews, 2010) a Cutadapt v3.4 (Martin, 2012).

Po zpracování surových sekvenčních dat, byly odstraněny sekvence patřící hostitelským houbám. K tomuto účelu byl použit program STAR v2.7.9a (Dobin a kol., 2013). K odhalení již známých virů byla použita databáze Viral NCBI

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) a následně byla provedena analýza de novo sestavených sekvencí pomocí programu SPAdes verze 3.15.3 (Bankevich a kol., 2012), které byly porovnávány s databázemi Virus UniProt KB (<https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=10239>), Virus NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>), RVDB (<https://rvdb.dbi.udel.edu/>) a Virus-Host DB (<https://www.genome.jp/virushostdb/>).

V této práci bylo detekováno a popsáno celkem pět mykovirů, které zahrnovaly čtyři viry přiřazené k mykovirové skupině „ambiviry“ a jeden vir náležící do čeledi *Tymoviridae*. Aminokyselinové (aa) sekvence RdRP oblastí každého viru byly zahrnuty do fylogenetických analýz. Sekvence byly porovnány v Geneious v. 8.1.9 pomocí MUSCLE v3.8.425 (Edgar, 2004) spolu se známými aa sekvencemi příbuzných virů. Fylogenetické stromy byly sestaveny pomocí metody maximální pravděpodobnosti (Stamatakis a kol., 2008) v RAxML-HPC v.8 na XSEDE běžícím na webovém portálu CIPRES Science Gateway (Miller a kol., 2010). Bootstrapping byl proveden s použitím doporučených parametrů poskytovaných portálem CIPRES Science Gateway. Stromy byly vizualizovány ve FIGTREE (V1.4.4).

Přítomnost virů v jednotlivých izolátech byla ověřena metodou RT-PCR (Reverse transcription – PCR) a následným Sangerovým sekvenováním. Pro syntézu cDNA byl použit LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, UK) a úspěšnost syntézy byla ověřena amplifikací oblasti tefa, která byla vizualizována na agarózovém gelu. cDNA byla dále použita pro PCR reakci s virově specifickými primery, které byly navrženy na základě sekvenačních dat. PCR produkty byly vizualizovány gelovou elektroforézou, výsledné fragmenty byly vyříznuty a přečištěny pomocí NucleoSpin® Gel a PCR Clean-up kit-Macherey-Nagel (BioTech as, Česká republika) a ExoSAP-IT™ PCR Product Clean-up Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Poté byly fragmenty odeslány do SEQme (Dobříš, Česká republika) a sekvenovány.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Druhové zastoupení václavek rodu *Armillaria*

Na základě amplifikace ITS/tef1 oblastí a srovnání s GenBank databází bylo identifikováno celkem 64 izolátů *A. ostoyae*, 33 *A. cepistipes* a 3 *A. gallica*. Výsledky testů LAMP oblasti tef1 *A. ostoyae* jasně prokázaly pozitivitu při testování DNA izolátů *A. ostoyae* z různých lokalit. Při screeningu jiných druhů rodu *Armillaria* (*A. cepistipes*, *A. gallica*) nebyl ani jedním z testů získán žádný pozitivní signál. Detekční limit testu LAMP byl stanoven na $1.6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ na reakci.

Výhodou metody LAMP oproti konvenční PCR je její jednodušší a rychlejší provedení a snadnější hodnocení výsledků. Navíc citlivost metody LAMP je 10x-100x vyšší než u konvenční PCR (Wang a kol., 2015). Kromě PCR a LAMP je další molekulární technikou uplatňovanou k identifikaci a kvantifikaci hub kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) (Aslam a kol., 2017). Metoda qPCR umožňuje identifikaci a kvantifikaci DNA sekvencí a je často využívána k detekci fytopatogenních hub v tkáních infikovaných rostlin (Hariharan a Prasannath, 2021). Nicméně je qPCR využívána především pro kvantifikace nukleových kyselin v biologických vzorcích a není široce využívána pro druhovou identifikaci. Navíc je pro analýzu qPCR zapotřebí drahé přístrojové vybavení s fluorescenčními detekčními moduly, zatímco tato práce popisuje metodu LAMP provedenou pomocí přenosného ručního zařízení použitelného přímo v terénu.

Jedná se o první záznam využití metody LAMP pro identifikaci václavek *Armillaria*. Metoda LAMP v kombinaci s použitím asimilační sondy je jednoduchý, rychlý, citlivý a specifický identifikační test. Protože nevyžaduje použití žádného specializovaného vybavení, lze jej snadno použít přímo v terénu pro rychlou detekci *A. ostoyae* a může tak být užitečným monitorovacím nástrojem těchto lesních patogenů.

4.2 Mykoviry vyskytující se v českých populacích *Armillaria*

Tato práce popisuje genomy celkem pěti domnělých jednořetězcových (ss) RNA mykovirů izolovaných z českých populací václavek rodu *Armillaria*. Mezi tyto mykoviry patří čtyři viry náležící do skupiny „ambivirů“ a jeden vir přiřazený k virové čeledi *Tymoviridae*. U zkoumaných izolátů nebyly při extrakci detekovány žádné dsRNA částice, což bylo následně potvrzeno i vysokovýkonným sekvenováním (HTS) celkové RNA. Některé viry ssRNA mohou během své replikace produkovat meziprodukty dsRNA. Ne všechny viry ssRNA však generují dsRNA a produkované množství se u jednotlivých druhů virů liší. Náš výsledek souhlasí se

studiem Linnakoski a kol. (2021), která se zabývala detekcí mykovirů v izolátech hub rodu *Armillaria* z Finska, Ruska a severní Afriky a odpovídá i výsledkům práce Dvořák (2008), který v houbách *Armillaria* z ČR nezachytil dsRNA viry. Nicméně Shamsi a kol. (2024) ve své práci uvádějí dva detekované mykoviry s genomem dsRNA (partitivirus a flegivirus) ve vzorcích pocházejících ze Švýcarska.

4.2.1 Identifikace ssRNA virů

Sekvenování celkové RNA vygenerovalo 113 milionů pair-end čtení. Po softwarovém kvalitativním zpracování bylo získáno 8809 kontigů delších než 1 kb. Srovnání kontigů BLASTX odhalilo čtyři virové kontigy se sekvenční podobností se členy skupiny kruhových RNA virů „ambiviry“ a jeden se vztahuje k členům řádu *Tymovirales*, konkrétně čeledi *Tymoviridae* (Tab. 1).

Tabulka 1. Mykoviry detekované ve vzorcích *Armillaria* v této studii.

Virus Name	Acronym	L	Accession Number ^a	Most Similar Virus ^b	E Value	Q (%)	I (%)	Mapped Reads	Depth of Coverage
Armillaria ambi-like virus 1	AALV1	4663	ON380550	Armillaria spp. ambi-like virus 3	0.0	96	96.31	24,902	780.91
Armillaria ostoyae ambi-like virus 2	AoALV2	4541	ON380551	Phlebiopsis gigantea ambi-like virus 2	2×10^{-103}	41	36.65	27,239	863.10
Armillaria ostoyae ambi-like virus 3	AoALV3	4562	ON380552	Armillaria mellea ambi like virus 4	0.0	56	80.94	21,362	678.90
Armillaria ostoyae ambi-like virus 4	AoALV4	4549	ON380553	Armillaria ambi-like virus 3	0.0	46	91.57	6169	196.26
Armillaria ostoyae tymovirus 1	AoTV1	6824	ON380554	Lentinula edodes tymo-like virus 1	0.0	94	68.16	4959	106.22

Práce Sutela a kol. (2020) byla první studií, která popsala „ambiviry“ u endomykorhizních hub *Ceratobasidium* sp. a *Tulasnella* sp. Poté byly objeveny u *Cryphonectria parasitica* (Forgia a kol., 2021) a mnoha agaricomycetes, včetně *Armillaria* spp. (Linnakoski a kol., 2021; Shamsi a

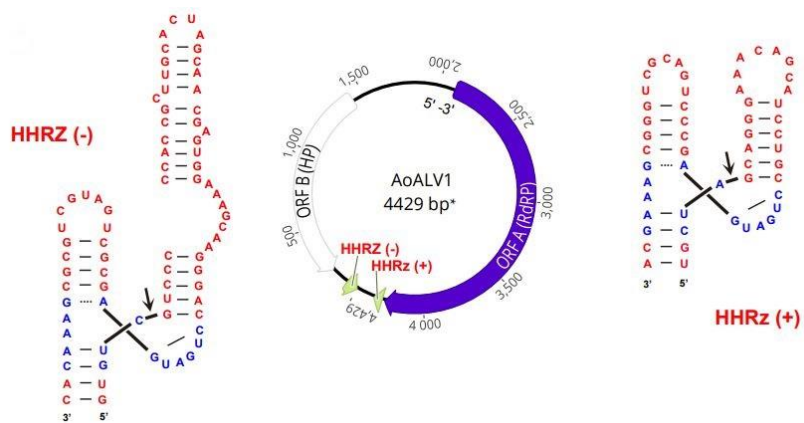
kol., 2024) *Heterobasidion* spp. (Sutela a kol., 2021), *Rhizoctonia* spp. (Linnakoski a kol., 2021) a *Phlebiopsis gigantea* (Drenkhan a kol., 2022). Stejně jako v těchto studiích, genomové sekvence domnělých ambi-like virů detekovaných v českých izolátech *Armillaria* spp. byly cca. 4,5 kb dlouhé a obsahovaly typické RdRP konzervované domény včetně motivu GDD. Na základě procentuálního porovnávání párových sekvencí (PASC; Tab. 2 A, B) byly identifikovány čtyři různé viry a považovány za různé druhy podle stejných kritérií jako Sutela a kol. (2020), Forgia a kol. (2021) a Turina a kol. (2023).

Tabulka 2, **A.** Párové sekvenční srovnání (PASC; %) na základě nukleotidové sekvence ambi-like virů; **B.** PASC % na základě RdRP aminokyselinové (aa) sekvence ambi-like virů

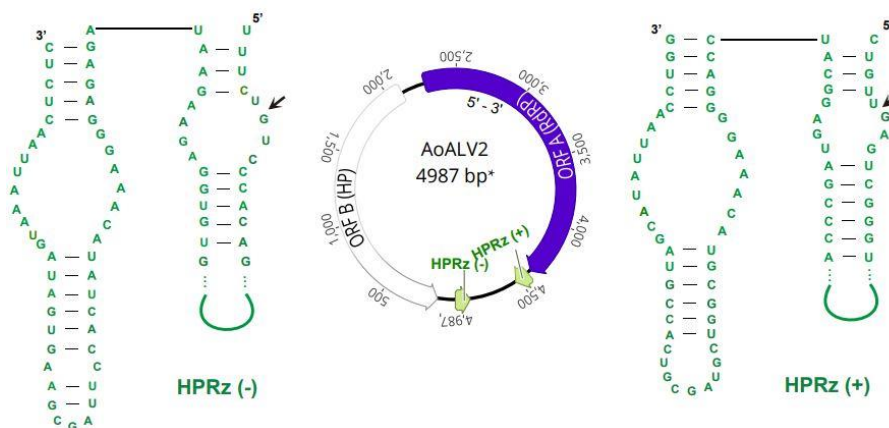
A				B			
	AoALV1	AoALV2	AoALV3		AoALV1	AoALV2	AoALV3
AoALV2	27.66			AoALV2	19.53		
AoALV3	31.40	31.90		AoALV3	77.46	18.65	
AoALV4	85.73	29.82	30.09	AoALV4	90.93	19.20	77.52

Viry byly předběžně pojmenovány s ohledem na jejich hostitelskou identitu (Tab. 1). AALV1, AoALV2 a AoALV3 obsahovaly dva a AoALV4 obsahovaly tři nepřekrývající se ambisense ORF. AALV1 kóduje první pozitivní (+) sense ORF (ORF A) odpovídající RdRP (713 aa dlouhý) a druhý negativní (-) sense ORF (ORF B) odpovídající hypotetickému proteinu (HP) dlouhému 410 aa. AoALV2 kóduje (-) sense ORF B-HP 655 aa long a (+) sense ORF A-RdRP 710 aa long. AoALV3 obsahuje první (+) sense ORF odpovídající hypotetickému proteinu (ORF B) dlouhému 400 aa a druhý negativní sense ORF (ORF A) odpovídající RdRP 682 aa dlouhému. Toto uspořádání ukazuje, že kontig byl sestaven v orientaci 3' až 5'. AoALV4 kóduje první (-) smysl ORF B-HP 405 aa dlouhý, druhý negativní ORF 220 aa dlouhý a třetí (+) smysl ORF A-RdRP 713 aa dlouhý (Obr. 1).

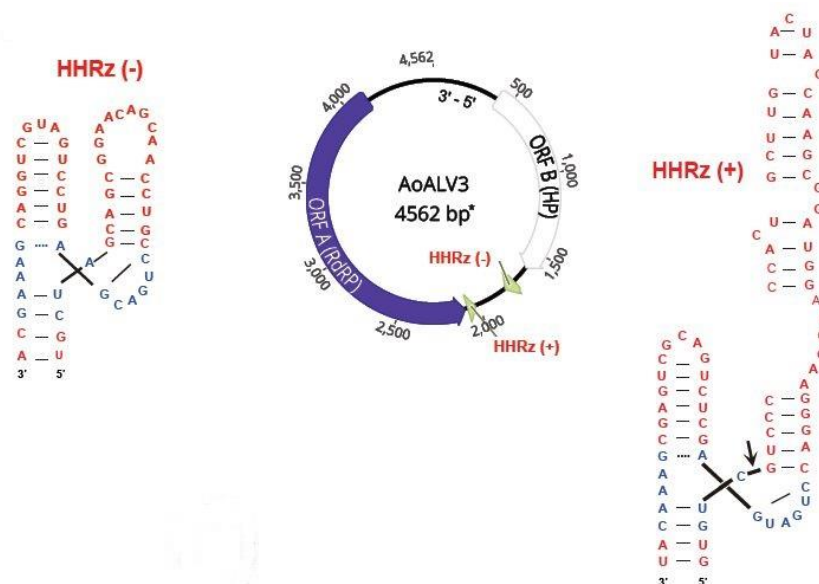
A

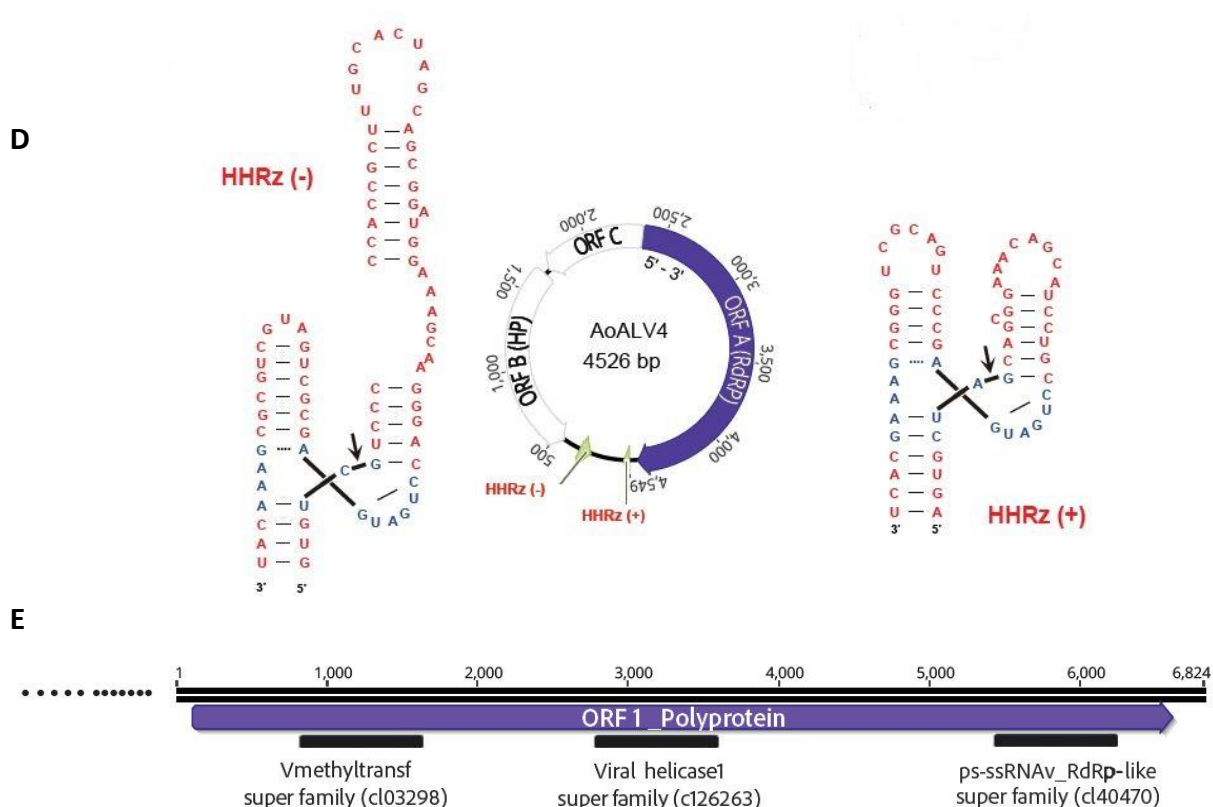


B



C



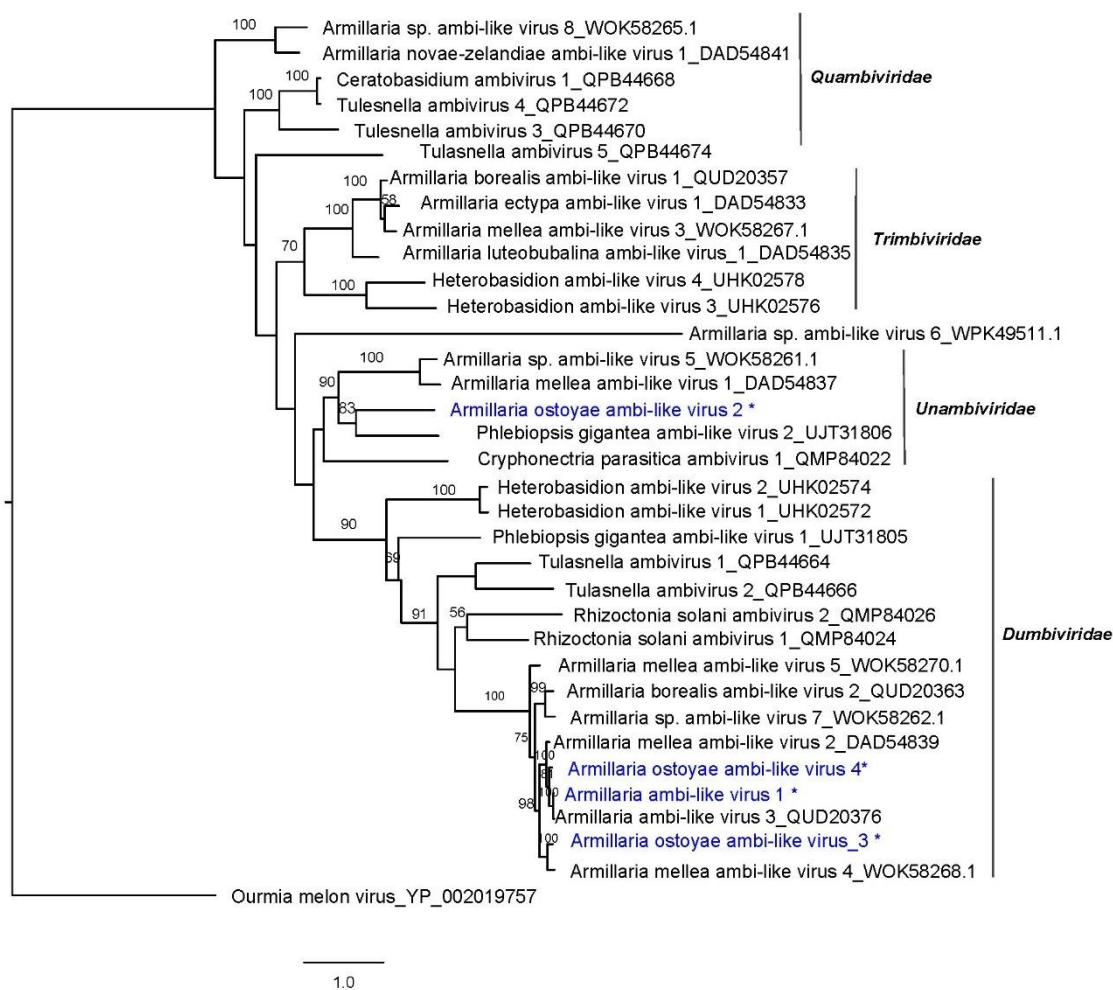


Obrázek 1. Schematické znázornění genomů AALV1 (A), AoALV2 (B), AoALV3 (C) a AoALV4 (D) s predikovanými sekundárními strukturami ORF a ribozymy (rbz) nakreslenými jako inlay; černé šipky ukazují potenciální místo samoštěpení na předpokládaných motivech HHRz a HPRz. Konzervované zbytky jsou zvýrazněny modře; (E) schematické znázornění genomu AoTV1 s předpokládaným ORF a jeho konzervovanými motivy. Polarita rbz (+) je definována jako řetězec RNA kódující polymerázu (ORF A).

Ambivirové genomy mají jedinečnou vlastnost, že mají kruhové genomy kódující RdRP a divergentní ribozymy v různých kombinacích v sense i antisense orientaci (Forgia a kol., 2023). V našich analýzách bylo detekováno několik hammerhead (HHRz) a hairpin (HPRz) riboenzymů. To je v souladu se zjištěními Forgia a kol. (2023), kteří popisují motivy HHRz a HPRz a předpověděli místa štěpení u známých „ambivirů“. Ačkoli se HHRz typicky skládá z 30 až 40 nukleotidů (nt), u „ambivirů“ václavek se některé z nich zdají být o něco delší, v rozmezí od 55 do 78 nt.

4.2.2 **Fylogenetická analýza virů**

Fylogenetické vztahy českých ambivirů *A. ostoyae* s jinými ambiviry ukazují, že se sdružují do dvou oddělených shluků virů, přičemž oba zahrnují viry z *A. mellea* a *A. borealis* (Obr. 2). Tento výsledek naznačuje monofyletický původ ambivirových sekvencí u *Armillaria* spp.



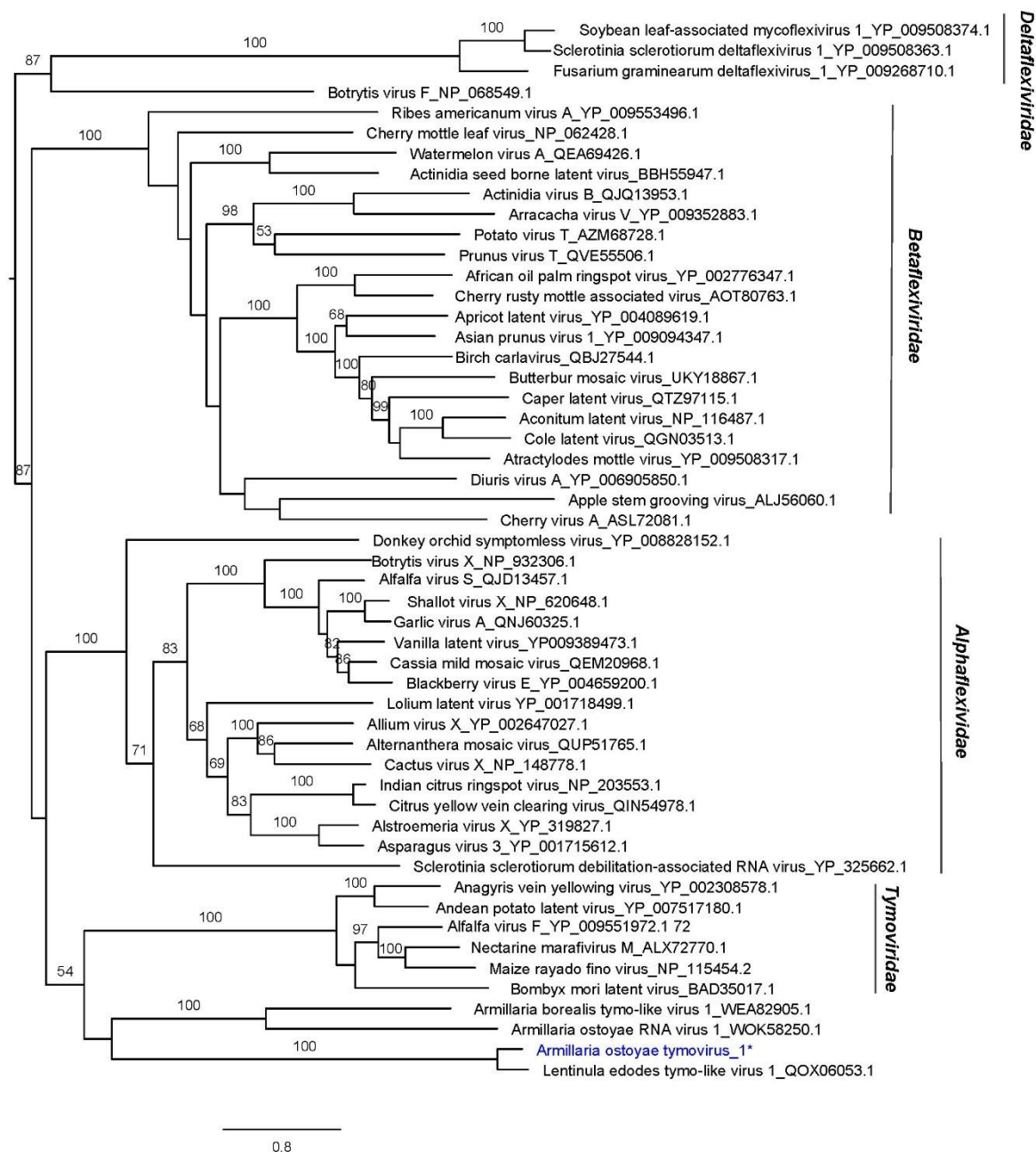
Obrázek 2. Fylogenetický strom RAXML sestavený na RdRP reprezentativních ambivirů. Uzly jsou označeny hodnotami bootstrap ≥ 50 %. Délky větví jsou škálovány podle očekávaného základního počtu aminokyselinových substitucí. Strom je zakořeněný ve středu a jako vnější skupinu používá Ourmia melon virus. Viry z českých václavků rodu *Armillaria* jsou psány modře a označeny hvězdičkou.

Dále byl a *Armillaria ostoyae* detekován virový kontig připomínající znaky těch z rodu *Tymoviridae*. *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 má délku přibližně 6,8 kb a kóduje jeden (+) sense ORF s 2172 aa (Obr. 1E). Na základě sekvenční analýzy tymovirů byly odhaleny konzervované

sekvence, včetně konzervovaných oblastí patřících do pfam01660 superrodiny Vmethyltransfcl03298 v oblasti 143–314 (E-hodnota $6,72 \times 10^{-9}$). Tato methyltransferázová doména byla detekována v širokém spektru virů a podílí se na překrývání mRNA. Kromě toho byly detekovány konzervované sekvence patřící do PFAM01443 Superfamily Viral_Helicase1 CL26263 LO-CATED 1113–1322 (E-hodnota $2,66 \times 10^{-14}$) a PS-SSRNAV_RDRP SUPER Family CL40470 Nachází se 1600–1799 (E- 10^{-14} –25) (Lu a kol., 2020).

Řád *Tymovirales* byl poprvé popsán v roce 2004 a v současnosti zahrnuje pět čeledí: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Deltaflexiviridae* a *Tymoviridae* (Adams a kol., 2011). Členové řádu *Tymovirales* obsahují 5,9 až 9,0 kb (+) ssRNA genom, který jsou často polyadenylované. Největší protein, polyprotein asociovaný s replikací (RP), je kódován všemi členy řádu *Tymovirales*. *Tymovirales* RP obvykle obsahuje sady konzervovaných funkčních domén (King a kol., 2012). *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 je druhý tymovirus popsáný v rámci rodu *Armillaria* po studii Shami a kol. (2024).

Fylogenetické vztahy s dalšími členy z řádu *Tymovirales* z GenBank ukazuje Obr. 3. Fylogeneticky nejbližší virus k viru AoTV1 je *Lentinula edodes tymo-like virus 1*, který byl detekován v čínském vzorku houby *Lentinula edodes* (GenBank: QOX06053).



Obrázek 3. Fylogenetický strom RAXML založený na RdRP *Armillaria ostoyae* tymoviru 1 (modrá písmena a *) a dalších členů řádu *Tymovirales*. Uzly jsou označeny hodnotami bootstrap ≥ 50 %. Délky větví jsou škálovány podle očekávaného počtu aminokyselinových substitucí.

4.2.3 RT-PCR screening

Některé viry popsané v této práci byli detekované ve více izolátech, a dokonce i u různých druhů *Armillaria*. AALV1 byl přítomen v jednom izolátu *A. ostoyae* a v *A. cepistipes*. AoALV2 byl detekován pouze v jednom izolátu, zatímco AoALV3 byl detekován ve dvou izolátech, AoALV4 ve čtyřech a AoTV1 pouze v jednom izolátu. Zajímavé je, že izoláty, mezi nimiž došlo k mezidruhovému přenosu viru, byly shromážděny na lokalitách vzdálených od sebe přibližně 50 km. Tyto výsledky naznačují, že ambiviry jsou účinně přenášeny v *Armillaria* v České republice stejně jako v jiných oblastech severní polokoule (Linnakoski a kol., 2021; Shamsi a kol., 2024), kde bylo zjištěno, že ambi-like viry jsou velmi běžné u izolátů *Armillaria*. Tato účinnost by také mohla souviset se skutečností, že zástupci rodu *Armillaria*, stejně jako další houby způsobující hnilobu kořenů stromů, jako jsou *Heterobasidion* spp. nebo *Rosellinia necatrix*, obvykle tvoří velké klonální jedince, kteří rostou po celá desetiletí. Lze tedy předpokládat, že akumulace virů a mezidruhový přenos mykovirů jsou považovány spíše za vzácné. Laboratorní experimenty však ukázaly, že jsou možné v rámci houbových rodů *Aspergillus* (Coenen a kol., 1997), *Sclerotinia* (Melzer a kol., 2002) a *Cryphonectria* (Liu a kol., 2003). Studie in vitro prokázaly přenosy mykovirů mezi somaticky nekompatibilními kmeny hub *Heterobasidion* (Ihmark a kol., 2002; Vainio a kol., 2010; Vainio a kol., 2011), které jsou relativně běžné jak v laboratoři, tak v přírodě.

5 Závěr

V rámci této práce byly splněny všechny vytyčené cíle:

- Na základě molekulárních metod bylo identifikováno 64 druhů *A. ostoyae*, 33 *A. cepistipes* a 3 *A. gallica* sbíraných v České republice
- Byly popsány nové ssRNA mykoviry u hub *Armillaria ostoyae* a *cepistipes*
 - 4 viry náležící do virové skupiny „ambiviry“
 - 1 vir náležící do virové čeledi *Tymoviridae*
- Byly charakterizovány genomy detekovaných virů a provedena fylogenetická analýza se všemi popsánymi sekvencemi
- Byla navržena a optimalizována metoda RT-PCR pro rychlou detekci popsáných RNA virů
- Některé z popsáných virů se vyskytovaly ve více než jednom izolátu, a dokonce i u různých druhů *Armillaria*

Zároveň byly v této práci potvrzeny všechny stanovené hypotézy:

- Prokázalo se, že na základě molekulárních markerů lze spolehlivě odlišit jednotlivé druhy rodu *Armillaria*
- Bylo popsáno několik mykovirů izolovaných z václavků rodu *Armillaria* pocházejících z ČR
- Metodou RT-PCR byla syntetizována cDNA, která byla využita pro potvrzení přítomnosti mykovirů a metoda RT-PCR se tak ukázala vhodná pro použití při detekci známých mykovirů.

6 Seznam použité literatury

Adams, M.J.; Kreuze, J.F.; Martelli, G.P. Tymovirales. (2011). In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*; International Committee on Taxonomy of Viruses. Waltham (USA). Elsevier. pp. 901–903.

Andrews, S. (2010). Babraham Bioinformatics—FastQC. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Soil. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M.F., Alam, M.W., Shedayi, A.A., Sadia S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – A mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12: 493–504.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., a kol. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.*, 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.

Blattny, O., Kralik, O., Veselsky, J., Kasala, B., a Herzova, H. (1973). Particles resembling virions accompanying the proliferation of agaric mushrooms. *Česká mykologie*, 27, 1-5.

Coenen, A.; Kevei, F.; Hoekstra, R.F. (1997). Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* 69, 1–10.

Coetzee, M. P., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. (2018). *Armillaria* root-rot pathogens: species boundaries and global distribution. *Pathogens*, 7(4), 83.

Čurn V., Tonka T., Křížová L., Jozová E. (2019): Metodika izolace a DNA analýzy molekulárních markerů u hub, České Budějovice

Denman, S., Coetzee, M. P. A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., a Crous, P. W. (2000). *Armillaria* root rot. A new disease of cut-flower proteas in South Africa. *Fynbos Research*, 33, 1-6.

Dobin, A., Davies, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Sonali, J., Philippe, B., Chaisson, M., Gingeras, T.R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

Drenkhan, T.; Sutela, S.; Veeväli, V.; Vainio, E.J. (2022). *Phlebiopsis gigantea* strains from Estonia show potential as native biocontrol agents against *Heterobasidion* root rot and contain diverse dsRNA and ssRNA viruses. *Biol. Control*, 167, 104837.

Dvořák, J. (2008). Výskyt RNA elementů u rodu *Armillaria*. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita. Praha. ČR.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1792–1797.

Forgia, M.; Isgandarli, E.; Aghayeva, D.N.; Huseynova, I.; Turina, M. (2021) Virome characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates from Azerbaijan unveiled a new mymonavirus and a putative new RNA virus unrelated to described viral sequences. *Virology*. 553, 51–61.

Forgia, M.; Navarro, B.; Daghino, S.; Cervera, A.; Gisel, A.; Perotto, S.; Aghayeva, D.N.; Akinyuwa, M.F.; Gobbi, E.; Zheludev, I.N. a kol. (2023). Hybrids of RNA viruses and viroid-like elements replicate in fungi. *Nat. Commun.* 14, 2591.

Ghabrial, S.A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*. 16(1):119–131.

Ghabrial, S. A., a Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 47, 353-384.

Hariharan, G., Prasannath, K. (2021). Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 600234.

Charles, G., Shaw, C. G., a Kile, G. A. (1991). *Armillaria* root disease (No. 691). Forest Service, US Department of Agriculture.

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

Kauserud, H. a Schumacher, T. (2003). Ribosomal DNA variation, recombination and inheritance in the basidiomycete *Trichaptum abietinum*: implications for reticulate evolution. *Heredity*, 91:163-172.

King, A.M.Q.; Michael, J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*; American Press/Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.

Klán (1989). *Co víme o houbách*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Knižnice mládeže (SPN). ISBN 80-04-21143-7.

Linnakoski, R.; Sutela, S.; Coetzee, M.P.A.; Duong, T.A.; Pavlov, I.N.; Litovka, Y.A. (2021). *Armillaria* root rot fungi host single-stranded RNA viruses. *Scientific Reports*, 11, 7336.

Liu, Y.; Linder-Basso, D.; Hillman, B.; Kaneko, S.; Milgroom, M.G. (2003). Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. *Mol. Ecol.* 12, 1619–1628.

Lochman, J., Šerý, O., Mikeš, V. (2004) The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 105-110.

Lu, S.; Wang, J.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; a kol. (2020). CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* 48, D265–D268.

Martin, M. (2012). Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. Available online: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable>.

Melzer, M.S.; Ikeda, S.S.; Boland, G.J. (2002). Interspecific transmission of double-stranded RNA and hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. Minor*. *Phytopathology*. 92, 780–784.

Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop, New Orleans, LA, USA.

Morris, T.J. a Dodds, J.A. (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*. 69, 854.

Muñoz-Adalia, E. J., Fernández, M. M., a Diez, J. J. (2016). The use of mycoviruses in the control of forest diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 26(5), 577-604.

Reaves, J. L., Allen, T. C., Shaw III, C. G., Dashek, W. V., & Mayfield, J. E. (1988). Occurrence of viruslike particles in isolates of *Armillaria*. *Journal of ultrastructure and molecular structure research*, 98(2), 217-221.

Rodriguez, R. J., a Redman, R. S. (1997). Fungal life-styles and ecosystem dynamics: biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. In *Advances in botanical research* (Vol. 24, pp. 169-193). Academic Press.

Shamsi W., Heinzelmann R., Ulrich S., Kondo H. a Cornejo C. (2024). Decoding the RNA virome of the tree parasite *Armillaria* provides new insights into the viral community of soil-borne fungi. *Environmental Microbiology*. 26(2).

Sipos, G., Anderson, J. B., a Nagy, L. G. (2018). *Armillaria*. *Current Biology*, 28(7), R297-R298.

Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J., Diego, S., Jolla, L. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 57, 758–771.

Sutela, S.; Forgia, M.; Vainio, E.J.; Chiapello, M.; Daghino, S.; Vallino, M.; Martino, E.; Girlanda, M.; Perotto, S.; Turina, M. (2020) The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. *Virus Evol.*, 6, 76.

Sutela, S., Piri, T., a Vainio, E. J. (2021). Discovery and community dynamics of novel ssRNA mycoviruses in the conifer pathogen *Heterobasidion parviporum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 770787.

Tonka, T., Walterová, L., Hejna, O., Čurn, V. (2021). Metodika identifikace, determinace a přenosu mykovirů u hub rodu *Armillaria*. Certifikovaná metodika, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Turina, M.; Lee, B.D.; Sabanadzovic, S.; Vainio, E.J.; Navarro, B.; Simmonds, P. (2023). Create one new phylum, Ambiviricota, including one new class, one new order, four new families, four new genera, and 20 new species, in kingdom Orthornavirae (realm Riboviria).

Vainio, E.J.; Korhonen, K.; Tuomivirta, T.T.; Hantula, J. (2010). A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. *Fungal Biol.* 114, 955–965.

Vainio, E.J.; Hakanpää, J.; Dai, Y.C.; Hansen, E.; Korhonen, K.; Hantula, J. (2011). Species of *Heterobasidion* host a diverse pool of partitiviruses with global distribution and interspecies transmission. *Fungal Biol.* 2011, 115, 1234–1243.

Vainio E. J., Jurvansuu J., Hyder R., Kashif M., Piri T., Tuomivirta T., Poimala A., a kol. (2018). Heterobasidion partitivirus 13 mediates severe growth debilitation and major alterations in the gene expression of a fungal forest pathogen. *Journal of Virology*. 92(5):1744.

Wang, X.R., Wu, L.F., Wang, Y., Ma, Y.Y., Chen, F.H., Ou, H.L. (2015). Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loopmediated isothermal amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 882–891.

7 Životopis

Jméno: Ing. Lucie Walterová

Rodné příjmení: Křížová

Vzdělání

SOŠ veterinární, mechanizační a zahradnická a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky, České Budějovice

2010 - 2014

Obor: Veterinářství

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – bakalářské studium

2014 - 2017

Obor: Zemědělské biotechnologie (živočišná specializace)

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – magisterské studium

2017-2019

Obor: Zemědělské biotechnologie

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – doktorské studium

2019 – současnost

Obor: Zemědělské biotechnologie

Pracovní zkušenosti

Státní veterinární ústav Jihlava

2013 – měsíční praxe

Stafila, s.r.o.

2015 – měsíční praxe

Střední zemědělská škola v Písku

2020 – půlroční zástup

Výuka předmětů biotechnologie a chemie

Centrum lékařské genetiky

2022 – současnost

Molekulárně genetická laboratoř, pozice: Vysokoškolský odborný pracovník

8 Seznam publikovaných prací

Publikace impaktové

Tonka T., Stehlíková D., Walterová L., Čurn V. (2022): Development of loop mediated isothermal amplification for rapid species detection of *Armillaria ostoyae* using assimilating probe. J. For. Sci., 68: 00–00.

Tonka, T., Walterová, L., Čurn, V. (2022). Biological control of pathogenic fungi: Can mycoviruses play an important role?. Journal of Central European Agriculture, 23(3), 540-551.

Tonka, T., Walterová, L., Čurn, V. (2022). Development of RT-PCR for rapid detection of ssRNA ambi-like mycovirus in a root rot fungi (*Armillaria* spp.). Acta Virologica.

Tonka, T., Walterová, L., Hejna, O., Čurn, V. (2022). Molecular characterization of a ssRNA mycovirus isolated from the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*. Acta virologica, 66(3), 290-294.

Walterová, L., Botella, L., Hejna, O., de la Peña, M., Tonka, T., a Čurn, V. (2024). Characterization of Mycoviruses in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes* in the Czech Republic. Viruses, 16(4), 610.

Publikace recenzované

Stehlíková D., Tonka T., Křížová L., Čurn V. (2019): Detekce *Armillaria cepistipes* metodou loop-mediated isothermal amplification. Úroda (vědecká příloha časopisu), 12/2019, 237–241.

Walterová L., Tonka T., Hejna O., Čurn V. (2021) Mykoviry hub r. *Armillaria* jako potencialní biopreparáty? Úroda (vědecká příloha časopisu), 12/2021, 315-320.

Metodiky

Čurn V., Tonka T., Křížová L., Jozová E. (2019): Metodika izolace a DNA analýzy molekulárních markerů u hub, České Budějovice

Tonka T., Walterová L., Hejna O., Čurn V. (2021). Metodika identifikace, determinace a přenosu mykovirů u hub rodu *Armillaria*, České Budějovice

Tonka T., Walterová L., Čurn V. (2021): Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s přenosy mykovirů václavěk v poloprovozních podmínkách. ZF JU v Českých Budějovicích, Certifikovaná metodika.