

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Studijní program:

Biotechnologie

Studijní obor:

Zemědělské biotechnologie

Katedra genetiky a biotechnologií

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

Disertační práce

**Identifikace a charakterizace mykovirů u
václavek rodu *Armillaria***

Autor práce: Ing. Lucie Walterová

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

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

České Budějovice

2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

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 sekvenčních 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

Grantová podpora

Tento výzkum byl finančně podpořen projekty Ministerstva zemědělství ČR (QK1920412) a Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 080/2022/Z).

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

Poděkování

Ráda bych zde v první řadě poděkovala svému vedoucímu práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. a konzultantovi práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce a cenné rady, které mi poskytovali v průběhu celého studia. Dále bych ráda poděkovala Leticii Botelle Sanchez, Ph.D. za její odborné konzultace a příležitosti, které mi poskytla. V neposlední řadě děkuji i celému týmu Katedry genetiky a biotechnologií, který mě provázel mým studiem. A na závěr velké díky patří celé mé rodině, za jejich důvěru a podporu.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	Václavky rodu <i>Armillaria</i>	10
2.1	Taxonomické zastoupení václavek v ČR	11
2.2	Molekulární determinace druhů václavek	13
2.3	Šíření václavek a vliv na smrkové porosty ČR.....	14
2.4	Metody ochrany smrkových porostů	16
3	Mykoviry	17
3.1	Taxonomie mykovirů.....	18
3.2	Genomová organizace mykovirů.....	19
3.3	Hostitelé a přenos mykovirů	20
3.4	Hypovirulence a biologická kontrola houbových patogenů.....	22
3.4.1	Hypovirulence v biologické ochraně rostlin	23
4	Mykoviry václavek rodu <i>Armillaria</i> v ČR.....	27
4.1	Tymoviry	27
4.2	Ambiviry	27
5	Cíle práce a hypotézy.....	30
6	Komentář k publikacím.....	31
7	Publikace č. 1	36
8	Publikace č. 2	44
9	Publikace č. 3	50
10	Publikace č. 4	54
11	Závěr	69
12	Seznam použité literatury:	70
13	Publikace a metodiky.....	82

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 přechávají 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 hostitelích 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. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. gallica*) byly popsány mitoviry, ourmia-like viry, tymoviry, flegiviry, ambilike viry, několik dosud neklasifikovaných (+)ssRNA a dva neklasifikované dsRNA viry (Linnakoski a kol. 2021; Shamsi a kol. 2024).

2 Václavky rodu *Armillaria*

Houbové patogeny hrají v lesních ekosystémech důležitou roli. Významně ovlivňují rozmanitost, strukturu a dynamiku lesních společenstev (Hansen a kol., 2000). Houby rodu *Armillaria* (dle Maphosa (2005): čeleď *Tricholomataceae*; řád *Agaricales*; třída *Basidiomycetes*), také známé pod českým názvem václavka, jsou skupinou hub, které se vyskytují po celém světě. Tyto houby patří k nejrozšířenějším houbám na světě a mají velmi důležitou roli v lesní ekologii. Jejich hlavní funkcí je rozklad organického materiálu v lesních ekosystémech a jsou popsány jejich symbiotické vztahy i s některými orchidejemi např. *Galeola septentrionalis* (Ogura-Tsujita, 2021).

Armillaria se živí odumřelým dřevem a zásadně pomáhají při rozkladu dřeva v lese. Při tomto procesu dochází k obnově půdy a uvolňování živin z mrtvého dřeva do půdy, což poskytuje živiny pro další rostliny a houby. *Armillaria* primárně likvidují nemocné či již odumřelé stromy, které pomáhají rozkládat a tím udržovat zdravý les a snižovat riziko přenosu infekce na další zdravé stromy. Napadají však i zdravé jedince, narušují jejich vodní režim a mohou tak způsobovat odumírání i jinak zcela zdravých stromů. Tyto houby se mohou napojit na kořeny stromů, způsobit jejich ochabnutí a smrt. Tento proces je známý jako hniloba kořenů, pro lesní hospodářství může být velmi problematický a vést k velkým ekonomickým ztrátám (Baumgartner a kol., 2011). Kromě toho, *Armillaria* mohou sami přenášet viry a bakterie mezi jednotlivými stromy, což vede k šíření dalších onemocnění. *Armillaria* jsou považovány za nejvýznamnější patogeny poškozující smrkové porosty v nižších a středních polohách. Největší dopad mívají v lesích oslabených pěstováním na hranici ekologického optima. Dřeviny se tak stávají citlivějšími vůči jakýmkoliv stresovým faktorům (Křístek a Urban, 2013). V roce 2022 bylo převážně na severní Moravě a ve Slezsku evidováno 115 000 m³ „václavkového dříví“ (Lubojacký a kol., 2023). Kromě jehličnanů napadají houby rodu *Armillaria* i další rostlinné druhy, bylo popsáno více než 600 dalších druhů, které mohou být hostiteli těchto patogenů, patří mezi ně i zemědělsky významné druhy jako jsou např. obilniny, vinná réva a brambory (Jančařík a Jankovský, 1999).

Houby rodu *Armillaria* jsou zajímavá také svou dlouhověkostí a jsou považovány za nejrozsaňlejší organizmy světa. V USA je známá václavka *Armillaria ostoyae*, která je rozlehlá na

890 hektarech lesa a její stáří je odhadováno na 2 400 let (Maheshwari, 2005). Další zajímavostí je, že se u václavek můžeme setkat s bioluminiscencí. Ve václavkách dochází k reakci kyslíku s luciferinem katalyzované enzymem luciferázou, to vede k světélkování mycelia a mladých rizomorf. Ekologický význam tohoto jevu zatím nebyl objasněn (Sochor a kol., 2015).

Užitečná může být i schopnost václavek detoxikovat půdu od fenolů a ropných derivátů, díky enzymům rozkládajícím dřevo. Tyto látky se do lesních půd dostávají především kvůli lesnické mechanizaci (Jankovský a Scháněl, 1997). V posledních letech se vědci snaží využít schopnosti václavek k rozkladu dřeva při produkci alternativních paliv a bio materiálů. Toto využití má potenciál snížit závislost společnosti na fosilních palivech (Hadibarata a kol., 2015; Kim a kol., 2023).

Smrk ztepilý (*Picea abies*) je významným hostitelem hub rodu *Armillaria* v České republice. Zdá se, že v posledních letech dochází k úbytku smrku ztepilého v Evropě, který je umocněn i patogenními houbami, jako jsou václavky rodu *Armillaria* (Cienciala a kol., 2017). Hojnost a druhové složení populací václavek r. *Armillaria* je obtížné určit. Onemocnění kořenovou hnilobou lze u smrku často rozpoznat pomocí odumírání koruny, chlorotických jehlic nebo pryskyřičných výtoků. Tyto příznaky je obtížné odlišit od příznaků, které jsou vyvolány jinými patogeny nebo škůdci (Holuša a kol., 2018). Přesnější údaje o distribuci lze získat z přítomnosti plodnic, mycelií nebo rizomorf na kořenech napadených stromů (Morrison a kol., 2004).

K úbytku smrkových porostů v ČR i Evropě houby rodu *Armillaria* významně přispívají, příčinou je i změna prostředí, která jehličnaté porosty stresuje, a ty se pak stávají náchylnější k patogenům. K současnému stavu smrkových porostů významně přispívá i nevhodné monokulturní složení lesů, které vzniká za účelem co největší produkce dřeva a vede k posouvání pěstování smrku na okraj ekologického optima (Jankovský, 2014).

2.1 Taxonomické zastoupení václavek v ČR

Taxonomická historie rodu *Armillaria* sahá až do 17. století, kdy byl tento rod poprvé zaznamenán dánským botanikem Martinem Vahlem. Tento rod obsahuje 40 morfologických druhů, z nichž některé jsou velmi podobné a obtížně rozeznatelné. Nicméně, díky pokroku v molekulární biologii, se taxonomie této houby stává přesnější, umožňuje správné určení

druhů a byl na základě ní objeven značný počet biologických druhů tohoto rodu (Baumgartner a kol., 2011). V současnosti je rozpoznáno nejméně 129 biologických druhů (Coetzee a kol., 2018) a probíhají další výzkumy v oblasti taxonomie této houby pro lepší pochopení její evoluce a fylogeneze. Jedním z cílů tohoto výzkumu je zjistit, jaký vliv má *Armillaria* na ekosystémy a jak může být využita v lékařských a technologických aplikacích (Gao a kol., 2009, Muszynska a kol., 2011; Kim a kol., 2023).

V České republice se dle práce Antonín a Tomšovský (2010) vyskytuje pět prstenatých: václavka smrková (*A. ostoyae*), václavka obecná (*A. mellea*), václavka hlíznatá (*A. gallica*, *syn. bulbosa*), václavka severská (*A. borealis*), václavka cibulkotřenná (*A. cepistipes*) a dva bezprstenaté druhy václavek: václavka bezprstenná (*A. socialis*, *syn. A. tabescens*) a václavka bažinná (*A. ectypa*).

Nejrozšířenějším druhem v České republice je václavka smrková, která způsobuje většinu kořenových chorob smrků ve středních a nižších polohách. K velkým ekonomickým ztrátám dochází především ve smrkových monokulturách, ve smíšených lesích je václavka smrková spíše saprofyt a k parazitickému vztahu dochází jen s oslabenými jedinci (Schwarze a kol., 2000). Václavku obecnou v našich podmínkách nalezneme výhradně na listnatých, zejména ovocných stromech v teplejších oblastech (Antonín a Tomšovský, 2010). Václavka severská roste převážně ve středních až vyšších polohách a napadá převážně smrkové porosty, ale může se vyskytovat i na listnatých stromech (Jankovský, 2003). Václavka hlíznatá byla pozorována na největším počtu hostitelů. Jehličnaté stromy však napadá vzácně, nalezneme ji spíše na dubech, habrech a dalších listnatých stromech, především v teplých nížinatých oblastech (Antonín a kol., 2009). Václavka cibulkotřenná se vyskytuje převážně ve vyšších a vlhkých oblastech, kde parazituje na dřevě buků, smrků, jasanů i dalších (Antonín a kol., 2009).

Václavka bezprstenná se v České republice nachází pouze v nejteplejších místech na jižní a střední Moravě. Je to teplomilná houba, která žije převážně saprofyticky v doubravách a lužních lesích (Antonín a Tomšovský, 2010). Její výskyt je spíše vzácný a je proto zařazena v Červeném seznamu hub České republiky (Holec a Beran, 2006). Václavka bažinná je dalším ohroženým druhem, především kvůli vodohospodářským a lesním zásahům. Je to saprofyt rostoucí pouze na silně podmáčených loukách a rašeliništích. Pro svou vzácnost a výskyt na

omezených stanovištích je zařazena mezi kriticky ohrožené druhy v Seznamu zvláště chráněných druhů podle zákona o ochraně přírody č. 114/92 Sb. a vyhlášky č. 395/92 Sb. (Antonín a Bieberová, 1995). V ČR se pravidelně vyskytovala na jediném stanovišti – NPR Ruda v CHKO Třeboňsko. Dále byla překvapivě nalezena v 2009 ještě v Českomoravské vrchovině – PR v Lísovech u Počátek (Antonín a Tomšovský, 2010).

Houby rodu *Armillaria* jsou považovány za hlavní abiotický faktor, který způsobuje chřadnutí a úbytek smrkových lesů v České republice. Nejčastější příčinou je konkrétně na našem území václavka smrková, následně václavka cibulková a v menší míře i václavka severská. V nižších lokalitách může smrkové porosty napadat i václavka hlízovitá, zatímco václavka obecná nebyla na smrku pozorována (Jankovský, 2014).

2.2 Molekulární determinace druhů václavek

Morfologická identifikace druhů rodu *Armillaria* je vzhledem k jejich mezidruhové podobnosti poměrně obtížná, často i nemožná. Pro přesnou identifikaci je potřeba mikroskopické analýzy, jako je například zkoumání charakteristických struktur výtrusů, hyf a bazidiomů (Gezaghe a kol., 2004). Proto se v současnosti přistupuje spíše k identifikaci založené na molekulárních metodách. Často využívaným markerem pro druhovou identifikaci rodu *Armillaria* jsou například oblasti ITS (Internal Transcribed Spacer). ITS se nachází v nekódující oblasti jaderné rRNA. Jsou to krátké intergenové regiony oddělující strukturní ribozomální podjednotky 18S, 5,8S a 28S (Anderson a Stasovski, 1992). Ačkoliv byly ITS několikrát úspěšně použity pro odlišení jednotlivých druhů *Armillaria* (Koch a kol., 2021, Kim a kol., 2006, Schulze a kol., 1997), neposkytují dostatečnou variabilitu pro odlišení druhů *A. gallica* a *A. cepistipes* (Antonín a kol., 2009). Další využívanou oblastí pro molekulární identifikaci je oblast IGS-1 (Intergenic Spacer Region 1), která se nachází mezi ribozomální podjednotkou 28S a genem 5S. Tento marker byl úspěšně využit např. ve studiích Tsykun a kol. (2013), Kim a kol. (2006) a White a kol. (1998). Při identifikaci několika afrických druhů *Armillaria* byla však popsána inverze genu 5S, což znemožnilo použití tohoto markeru (Coetzee a kol., 2018). Z kódujících oblastí je ve fylogenezi rodu *Armillaria* často využíván gen pro elongační faktor *1- α* . Tento gen je přítomen ve všech eukaryotických organismech, obsahuje vysoce konzervované sekvence, které umožňují druhovou analýzu u mnoha taxonů. Dostatečnou variabilitu pro druhovou diferenciaci zajišťují degenerované nukleotidy na třetích pozicích

kodonů aminokyselin. Ty však zároveň komplikují návrh univerzálních primerů a ztěžují tak amplifikaci (Djernæs a Damgaard, 2005). Přesto je gen *EF 1-α* často využíván a považován za jeden z nejlepších molekulárních markerů v identifikaci hub (Coetzee a kol., 2018).

Další kódující oblastí, která je využívána k mezidruhové identifikaci hub je gen pro beta-tubulin. Sekvence tohoto genu obsahuje variabilní introny a stejně jako u genu *EF 1-α* obsahuje degenerované třetí pozice kodonů aminokyselin, což umožňuje jeho využití na mezidruhové nebo dokonce i vnitrodruhové úrovni v taxonomii hub (Geiser a kol., 1998; Myllys a kol., 2001; Sung a kol., 2007; Guo a kol., 2016).

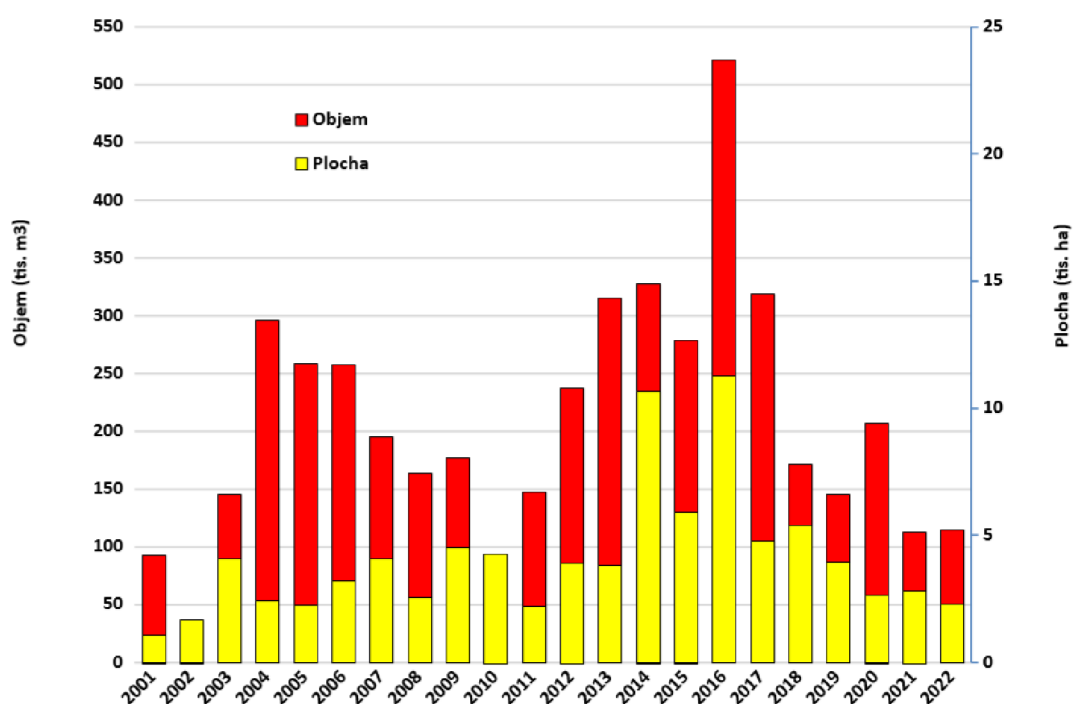
2.3 Šíření václavek a vliv na smrkové porosty ČR

Nejčastější způsob šíření hub *Armillaria* je vegetativně pomocí mycelia, ale je možné i generativní rozmnožování pomocí výtrusů – bazidiospor. Bazidiospory klíčí pouze v dostatečně vlhkém prostředí a dokážou se vzduchem rozšířit až do vzdálenosti 100 km (Vasaitis a kol., 2008). Vegetativně *Armillaria* využívají k šíření mycelium, které tvoří rizomorfy. Rizomorfy jsou dlouhé provazovité útvary, spletené z povrchového mycelia, pomocí nichž se václavky dostávají do lýkových částí kořenového systému a dále i do dřevných a pryskyřičných kanálků (Jankovský, 1997).

Podmínkou pro napadení václavkou je predispozice hostitele, ke které často vede narušení vodního režimu, ať už nadměrným suchem nebo nadměrnou vlhkostí a následnou hypoxií. I krátkodobé narušení vodního režimu vede k oslabení jedinců a vzniku predispozice pro napadení houbovým patogenem (Jankovský, 2014). Příznaky infekce jsou pozorovatelné až ve chvíli, kdy strom už hyne. Nejprve se projeví změna barvy jehličí na světle zelenou až šedou, následně dochází k omezení růstu stromu, usychání a opad jehličí, a nakonec k úplnému odumírání stromu (Pešková a Soukup, 2013).

Pod kůrou infikovaných jedinců lze pozorovat typický bílý povlak, tzv. syrociium, které se rozrůstá od kořenů a postupuje k bázi kmene (Jankovský, 1997). Infekce václavkami vede k charakteristické bílé hnilobě, která pomocí enzymů způsobí mineralizaci dřeva. To vede ke zvětšení dřevní hmoty, ale snížení hmotnosti a tvrdosti dřeva (Jankovský a kol., 2005). Mezi příznaky infekce patří i ronění pryskyřice na kmenech stromů (Jankovský, 1997).

V roce 2019, kdy bylo evidováno 145 tisíc m³ „václavkového dříví“, došlo k mírnému zlepšení a poklesu václavkami napadených porostů oproti předchozím rokům, přesto jsou stále oblasti, kde situace zůstává vážná. Tyto oblasti se nachází především na Moravě a ve Slezsku (Knížek a Liška, 2020). V roce 2020 byl zaznamenán další nárůst objemu „václavkového dříví“ na 207 tisíc m³ (Knížek a Liška, 2021). V následujících letech se trend opět otočil a došlo k výraznému poklesu. V roce 2021 bylo hlášeno celkem 113 tisíc m³ „václavkového dříví“ (Lubojacký a kol., 2022), v roce 2022 bylo evidováno 115 tisíc „václavkového dříví“ (Lubojacký a kol., 2023). Tento výrazný pokles objemu znehodnoceného dříví je, ale pravděpodobně způsoben vytěžením mnoha postižených porostů v předchozích letech ((Lubojacký a kol., 2022).



Obr.1: Evidovaný objem vytěženého smrkového václavkového dříví a rozloha smrkových porostů napadených václavkami v letech 2001–2022 (Lubojacký a kol., 2022)

Václavka tedy prokazatelně přispívá k úbytku smrkových porostů jako patogen narušující jejich vodní cyklus a zároveň působí i jako stresor oslabující stromy, které jsou následně snadno napadnutelný pro kůrovce (např. *Ips typographus*; Sierota a Grodzki, 2020).

2.4 Metody ochrany smrkových porostů

V současnosti existuje několik způsobů ochrany smrkových porostů proti václavkám rodu *Armillaria*. Patří mezi ně výkop kořenového límce nebo chemické fungicidy. Jako účinná ochrana proti *A. ostoyae* se ukázalo také odstranění nakažených pařezů (Cleary a kol., 2013). Žádná ze zavedených metod však nedokáže zcela eliminovat mycelium z kontaminovaného místa (Linnakoski a kol., 2021). Mycelia těchto patogenů jsou velmi odolná vůči vysokým teplotám. Přežívají dokonce i rozsáhlé lesní požáry (Smith a kol., 1992). Zároveň nelze vyléčit už napadené stromy. Vykácením napadených porostů se neodstraní zbytky kořenů, ze kterých se *Armillaria* mohou šířit i několik dalších let (Cox a kol., 2004). Účinná by mohla být preventivní opatření zahrnující včasné vytěžení napadených porostů a změnu dřevinné skladby ze současných smrkových monokultur na přirozené smíšené dřevinné porosty (Pešková a Soukup, 2013). Další potenciální možnosti ochrany proti těmto patogenům, by mohly být, v současnosti velmi diskutované, mykoviry. Virom těchto patogenů však nebyl doposud dostatečně prozkoumán.

3 Mykoviry

Mykoviry jsou různorodá skupina virů, které infikují houby, včetně kvasinek a plísní. Jsou to stejně jako ostatní druhy virů nebuněčné intracelulární organismy neschopné samostatné existence mimo svého hostitele, tj. jsou biotrofní. Poprvé byly objeveny v 60. letech 20. století. 14 let poté, co byla v Pensylvánii hlášena nemoc „La France“ u hub *Agaricus bisporus*, charakterizována deformovanými plodnicemi a ztrátou výnosu. Podobné nemoci byly hlášeny i z Evropy a Japonska, což následně vedlo k objevu mykovirů a prvnímu popisu virových částic uvnitř houbového hostitele (Hollings, 1962). Od té doby vědci identifikovali mnoho různých druhů mykovirů, které infikují houby napříč širokou škálou taxonů (Herrero a kol., 2009; Herrero a kol. 2013; Nerva a kol., 2019). Mykoviry jsou předmětem velkého zájmu vědců studujících ekologii hub a patologii rostlin, protože mohou mít významný dopad na růst, reprodukci a virulenci jejich houbových hostitelů.

Vztah mykovirů s jejich houbovými hostiteli je jeden z fascinujících aspektů výzkumu. Mykoviry mohou mít významný dopad na fyziologii a biologii svého hostitele a způsobit různé fenotypové účinky. Některé mykoviry jsou pro houby škodlivé a způsobují příznaky jako je snížený růst, abnormální morfologie, změna rychlosti replikace a snížená virulence. Jiné mykoviry nemají na své houbové hostitele žádný vliv. Některé mohou dokonce poskytovat svým houbovým hostitelům výhody ve formě zrychleného růstu, odolnosti vůči environmentálním stresorům a zvýšené virulence. Bylo prokázáno, že některé mykoviry dokonce ovlivňují produkci sekundárních metabolitů jejich hostitelských hub, což vede ke změnám v jejich aromatických a chuťových profilech (Nerva a kol., 2019; Ninomiya a kol., 2020; Kotta-Loizou 2021).

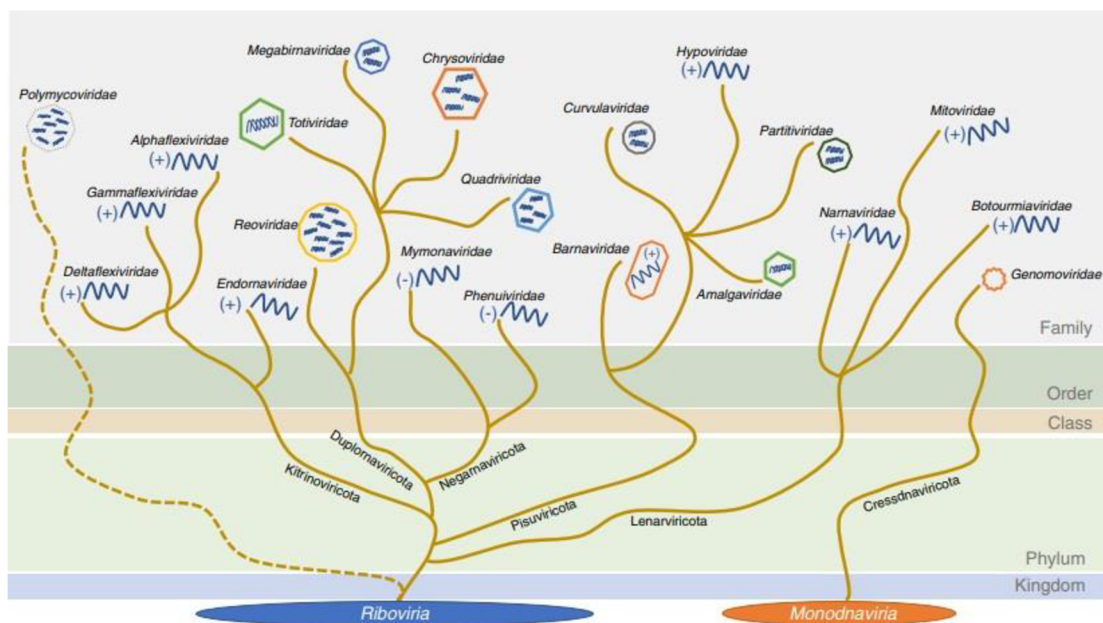
Jedním z důvodů rozsáhlého studia mykovirů je jejich potenciál v biologické ochraně rostlin. Použití mykoviru jako biologického agens bylo poprvé popsáno ve spojitosti s epidemií plísně kaštanové (Turchetti a Maresi, 1993; Milgroom a Cortesi, 2004). To zásadně přispělo ke zvýšení zájmu o houbové viry a rozvoji nových detekčních metod. Zavedení technologie vysokovýkonného sekvenování (HTS) značně usnadnilo a zrychlilo objevy nových mykovirů. Rozsáhlým výzkumem bylo potvrzeno, že mykoviry jsou v říši hub všudypřítomné a zároveň byla odhalena jejich pozoruhodná rozmanitost (Herrero a kol., 2012; Sutela a kol., 2019, García-Pedrejas a kol., 2019).

3.1 Taxonomie mykovirů

Taxonomie mykovirů je předmětem studia po mnoho let a neustále se vyvíjí s tím, jak jsou objevovány nové druhy virů. Původně byly pro pojmenovávání virů hub využívány tři termíny – mykoviry (Bozarth, 1972), mykofágy (Nash a kol., 1973) a virům podobné částice („virus-like particles“, VLP). Jedná se však pouze o rozdílnou terminologii jednotlivých výzkumníků, která nemá souvislost se strukturou nebo funkcí jednotlivých virů hub (Bozarth, 1979). Někteří autoři používají termín VLP pro částice detekované u houbových hostitelů podobné virům, které ještě nebyly dostatečně charakterizovány, zatímco termín mykoviry používají pro dostatečně popsané částice, u kterých je známá morfologie a nukleoproteinové složení (Ghabrial, 1980).

Zprvu se zdálo, že všechny mykoviry mají dsRNA genomovou strukturu. Tato teorie byla s dalšími popsanými mykoviry vyvrácena. ICTV (Regenmortel a kol., 2000) uváděl ještě v roce 2000, že většina mykovirů má dsRNA genom, pouze u dvou známých mykovirů byl popsán ssRNA genom, a to *Mushroom bacilliform virus* z plodnic *Agaricus bisporus* nakažených chorobou „La France“ způsobující jejich deformace (Revill a kol., 1999) a *Sclerophthora macrospora virus B* z mycelia *Sclerophthora macrospora* (Yokoi a kol., 1999). V roce 2005 ICTV (Fauquet a kol., 2005) popisuje již 28 ssRNA virů, které tvoří téměř třetinu ze všech tehdy známých mykovirů. Od té doby je evidováno stále narůstající množství ds i ssRNA virů. Dnes se mykoviry na základě jejich genomu dělí na dvouřetězcové RNA viry (dsRNA), jednořetězcové pozitivní RNA viry (+ssRNA), jednořetězcové negativní RNA viry (-ssRNA) a kruhové jednořetězcové DNA viry (ssDNA; Ghabrial a kol., 2015).

Houbové viry jsou zařazeny do několika virových čeledí, z nichž některé obsahují pouze mykoviry, jiné čeledi, jako například *Partitiviridae* obsahují zástupce, kteří mohou napadat jak houby, tak i rostliny a zvířata. Mykoviry se dělí primárně do devíti čeledí obsahující dsRNA viry a devíti čeledí obsahující pozitivní +ssRNA viry, dále je popsáno jen několik zástupců s negativním – ssRNA a ssDNA genomem (Obr. 2).



Obr. 2: Fylogenetické rozdělení mykovirových čeledí; *Polymycoviridae* nebyly doposud zařazeny. (Jillian a kol., 2022)

Existují také další faktory, které lze použít k rozdělení druhů mykovirů. Jedním z takových faktorů je typ hostitele, kterého virus infikuje. Některé mykoviry například infikují pouze specifické typy hub, zatímco jiné mohou infikovat širokou škálu různých druhů hub či rostlin, případně živočichů (Gillings a kol., 1993; Hacker a kol., 2005; Pearson a kol., 2009; Herrera a kol., 2012). Mykoviry byly dokonce nalezeny i v lidských patogenních houbách (Kotta-Loizou a Coutts, 2017). Taxonomie mykovirů se neustále vyvíjí, protože jsou objevovány nové druhy a překlasičovány ty stávající. Pokroky v technologiích genomového sekvenování usnadnily identifikaci a klasifikaci nových mykovirů a výzkumníci neustále pracují na lepším pochopení rozmanitosti a vlastností těchto virů.

3.2 Genomová organizace mykovirů

Genomová organizace mykovirů je zajímavou a stále zkoumanou oblastí v oboru virologie. Jak bylo popsáno výše mykoviry mohou mít svou genetickou informaci kódovanou jak v RNA, tak DNA. Přičemž každý typ má specifické charakteristiky a mechanismy replikace. Genomy mykovirů mohou být lineární, kruhové, jednořetězcové nebo dvouřetězcové. Často mají překrývající se čtecí rámce (frameshift reading), což umožňuje vytváření více proteinů z jednoho genu. Většina z nich je tvořena pouze malými genomy, které kódují jen

několik proteinů (Ghabrial a kol., 2015; Lefkowitz a kol., 2018). Nejjednodušší doposud známý mykovir je +ssRNA mytovirus z čeledi *Narnaviridae*, který se často vyskytuje jako koinfekce u mykovirových infekcí a kóduje pouze jeden protein, RdRP (RNA dependentní RNA polymeráza), nezbytný pro replikaci viru (Hillman a kol., 2018; Sutela a kol., 2019).

Replikace mykovirů je zcela závislá na hostitelských buňkách a probíhá v jejich cytoplazmě. Výjimkou jsou členové čeledi *Botourmiaviridae*, kteří se replikují v hostitelských mitochondriích (Hillman a kol., 2018). RNA viry jsou obecně náchylné k chybám v procesu replikace, přičemž mutační rychlost je vypočítána na 10^{-3} – 10^{-5} na nukleotid v jednom replikačním cyklu (Domingo a Holland, 1997). V důsledku toho se populace RNA virů skládají z komplexních a dynamicky se vyvíjejících sekvencí, tzv. kvazi-druhů (Domingo a Holland, 1997; Van Regenmortel, 2007). Výskyt kvazi-druhů může být pro RNA viry evolučně výhodné, umožňuje totiž rychlé přizpůsobování se novému prostředí (García-Arenal a kol., 2001; Schneider a Roossinck, 2001).

Výzkum genomové organizace mykovirů má velký význam pro pochopení interakcí mezi virem a hostitelskou houbou. Pomáhá nám lépe porozumět evoluci a diverzitě mykovirů, jejich replikačním mechanismům a adaptabilitě na různá prostředí. To může vést k vývoji nových strategií pro ochranu rostlin a hub před patogenními mykoviry a rozšíření našich znalostí o virální ekologii.

3.3 Hostitelé a přenos mykovirů

V současnosti je popsáno více než 150 000 druhů hub (<https://www.speciesfungorum.org/Names/Names.asp>) a předpokládá se, že jich je ještě řádově více neobjevených. Na základě odhadu, že mykoviry napadají 30–80 % z nich (Ghabrial a Suzuki, 2009) lze očekávat velkou rozmanitost stále nepopsaných druhů mykovirů. Spektrum hostitelů mykovirů je poměrně široké a bylo prokázáno, že infikují různé druhy hub napříč třídami, jako jsou Ascomycetes, Basidiomycetes a Zygomycetes, ale vyskytují se i u houbám podobných organismů náležících do říše Chromista.

Přesto, že jsou mykoviry taxonomicky různorodé, zdá se, že všechny sdílí cyklus přenosu se svými hostiteli (Villarreal, 2008). Mykoviry se množí uvnitř houbové tkáně a houbových bu-

něk. Replikují se převážně v buněčné cytoplazmě, ale jsou i druhy replikující se v mitochondriích hostitelských buněk, např. mitovirus (Göker a kol., 2011, Milgroom a Hillman, 2011). Životní cyklus mykovirů na rozdíl od jiných virů postrádá extracelulární fázi. Proto nejsou infekční v klasickém slova smyslu. Omezení styku s extracelulárním prostředím ovlivňuje i potřebu vytváření částic pro ochranu genetické informace. Spousta mykovirů jako jsou např. členové taxonomických rodin *Narnaviridae* a *Hypoviridae*, ani nevytváří kapsidový protein (Nuss, 2005). K přenosu dochází horizontální cestou skrz intracelulární hyfální anastomózu vedoucí k cytoplazmatické výměně u vegetativně kompatibilních druhů (Zhang a kol., 2014). K vertikálnímu způsobu přenosu mykovirů dochází v přírodě pomocí houbových spor (Ghabrial a kol., 2015; Sutela a kol., 2019) Uvnitř hostitele se mykoviry šíří buněčným dělením. Mykoviry nenarušují buňky hub, které infikují, ale spíše využívají buněčný aparát svého hostitele, aby se replikovaly. Infikované houby proto mohou vypadat naprosto zdravě, ale přesto budou schopny přenést vir na jiné houby.

Mykoviry jsou obecně považovány za pouze endogenní viry (Ghabrial a Suzuki, 2009; Ghabrial, 1998; Lemke, 1979) a předpokládá se, že úplně postrádají extracelulární fázi v jejich multiplikačních cyklech. Yu a kol. (2013) ve své práci popisují, že purifikované částice DNA mykoviru *Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-asociovaný DNA virus 1* (SsHADV-1), jsou infekční při extracelulární aplikaci na svého hostitele *Sclerotinia sclerotiorum*. Virové částice izolované z infikovaného hostitele mohou infikovat hyfy bezvirového *S. sclerotiorum* přímo, když jsou aplikovány na hyfy pěstované na bramborovém dextrózovém agaru nebo nastříkané na listy *Arabidopsis thaliana* a *Brassica napus*, bez ohledu na příslušnost k vegetativní kompatibilitě.

Kromě přímého extracelulárního přenosu byla v několika studiích popsána i možnost přenosu mykovirů pomocí vektorových organismů jako jsou háďátka, roztoči pancířníci (*Oribatida*) či roztoč *Thyrophagus corticalis* (Hillman a kol., 2004; Yaegashi a kol., 2013; Simoni a kol., 2014; Petrzik a kol., 2016). Mykovirus v myceliu *Rosselinia necatrix*, fytopatogenu způsobujícím bílou hnilobu kořenů jablek, během inkubace v půdě vedl k hypotéze, že krmení mikročlenovci nebo háďátky může vést k mezidruhovému přenosu RNA virů (Yaegashi a Kanematsu, 2012). Dále Liu a kol. (2016) ve své práci popisují možnost SsHADV-1 infikovat mykofágní hmyz, *Lycoriella ingenua*, a jeho využití jako přenosového vektoru. Virus získaný larvami živícími se koloniemi virem infikovaného kmene *S. sclerotiorum* byl replikován a

uchovávan v larvách, kuklách, dospělých i vejčích. Potomstvo larev vylíhnutých z virulentních vajíček bylo přenašečem viru a mohlo virus také úspěšně přenášet.

Oba tyto pro mykoviry netypické mechanismy přenosu překonávají vegetativní inkompatibilitu a mohou tak usnadnit výzkum a využití mykovirů v biologické ochraně rostlin. Vegetativní inkompatibilita představuje hlavní překážku pro úspěšný horizontální přenos houbových virů mezi druhy nebo kmeny hub. Hyfy se neslučují a je zahájena programovaná buněčná smrt, která brání horizontálnímu přenosu mykoviru (Wu a kol., 2017). Proto by překonání této bariéry významně usnadnilo využití mykovirů v praxi.

3.4 Hypovirulence a biologická kontrola houbových patogenů

Hypovirulence je termín používaný k popisu jevu, při kterém normálně virulentní patogen ztrácí schopnost způsobit u hostitele onemocnění. Může být zprostředkována působením virové infekce, mitochondriálními defekty nebo mutacemi v genomu hub (Ghabrial a Suzuki, 2008). Když se patogenní houba nakazí mykovirem, virus naruší normální fungování houby, což vede ke snížení virulence. Přesný mechanismus, kterým mykoviry vyvolávají hypovirulenci, není plně objasněn. Předpokládá se, že virus interferuje s expresí genů zapojených do patogenity. V důsledku toho infikovaná houba již není schopna způsobit onemocnění u svého hostitele. Zároveň hypovirulence bývá spojována s dalšími fenotypovými změnami, jako jsou snížená pigmentace, snížená sporulace a růstové defekty (Hillman a kol., 2018). Tyto fenotypové změny jsou způsobeny změnami v expresi genů hub a jsou indukovány pomocí umlčování RNA, změnami genové exprese a disruptivním transkriptem (Nuss, 2005; Nuss, 2011).

Hypovirulence byla poprvé pozorována v polovině minulého století u patogenní houby *Cryphonectria parasitica*, která na počátku 20. století zpusťovala porosty kaštanovníku v Severní Americe a následně byla zavlčena i do Evropy. V 50. letech 20. století bylo v Itálii zjišřeno, že v některých sadech došlo ke spontánnímu uzdravení kaštanovníků z infekce *C. parasitica* a infekce se přestala šířit. Virus izolovaný z této houby vykazoval v laboratoři nízkou virulenci. Tento objev vyprovokoval extenzivní výzkum mykovirů a odstartoval program biologické kontroly k ošetření kaštanovníkových sadů (Turchetti a Maresi, 1993; Heiniger a Rigling, 1994; Dawe a Nuss, 2001; Milgroom a Cortesi, 2004).

3.4.1 Hypovirulence v biologické ochraně rostlin

Mykoviry mají několik výhod ve srovnání s tradičními pesticidy používanými v ochraně rostlin. Jednou z výhod je, že mykoviry jsou specifické vůči určitým druhům hub a neovlivňují ostatní organismy v ekosystému. To znamená, že se minimalizuje riziko nepříznivých dopadů na přírodní nepřátele škůdců nebo na benefiční organismy, které jsou důležité pro udržení ekologické rovnováhy. Dále jsou mykoviry biologicky rozložitelné a nezanechávají žádná rezidua. To je v souladu s požadavky na udržitelnost a bezpečnost v zemědělství. Další výhodou mykovirů je jejich schopnost přirozeného šíření. Infikované houby mohou být nositeli mykovirů a šířit je mezi ostatními houbami. Tento přirozený mechanismus snižuje náklady na aplikaci mykovirů a zvyšuje jejich efektivitu v ochraně rostlin. Navíc, mykoviry mají schopnost přežívat v půdě a dlouhodobě udržovat svou aktivitu, což zvyšuje jejich účinnost i v dalších vegetačních obdobích (Nuss 2005; Muñoz-Adalia a kol. 2016; Villan Larios a kol. 2023).

Doposud byla prokázána schopnost způsobit hypovirulenci hostitelů u desítek mykovirů, zde jsou nejznámější příklady:

Cryphonectria parasitica. Je velmi destruktivní patogen ovlivňující dřeviny z rodu *Castanea*, zejména kaštanovníky. *C. parasitica* patří mezi ascomycetové houby a byla poprvé identifikována v Severní Americe, kde byly devastující důsledky jejího působení na místní populace kaštanovníků. Nemoc se nakonec rozšířila i do Evropy a Asie, což způsobilo další ničivé dopady na tamní populace kaštanovníků. Infekce *C. parasitica* začíná na povrchu kůry dřeviny, kde se vyvíjí kožovité léze. Tyto léze postupně pronikají hluboko do kůry a dřeva, což vede k odumírání cévních svazků a následnému stále většímu oslabení stromu. Postižení kaštanovníky často vykazují symptomy, jako je odumírání koruny, vrstvení kůry a tvorba drobných dřevěných výrůstků, které jsou charakteristické pro tuto nemoc (Anagnostakis, 2016). Jak již bylo popsáno výše, poprvé byla hypovirulence zaznamenána u patogenu plísně kaštanové *C. parasitica*. Mykoviry *Cryphonectria hypovirus 1–4* (CHV1-4) náleží do rodu *Hypovirus* z čeledi *Hypoviridae* (Nuss a Hillman, 2011) a infikují své houbové hostitele v Evropě, Asii a Severní Americe. Ve svém hostiteli kromě hypovirulence způsobují změnu morfologie a pigmentace z jasně oranžové na bílou, lehce naoranžovělou a jsou přenášeny pomocí hyfální anastomózy a prostřednictvím konidiospor (Kyrychenko a kol., 2018;

Ghabrial a kol., 2015; Rigling a Prospero, 2018). Infekční cDNA klony hypoviru CHV1-EP713 byly zkonstruovány z RNA a způsobují hypovirulenci po propuknutí infekce. cDNA je integrována do jaderné DNA *C. parasitica* nebo přímo do fungálních sféroplastů. Tyto transfekované systémy CHV1-EP713 RNA byly zavedeny také do kmene *C. cubensis* příbuzného *C. parasitica* v Jižní Africe za účelem kontroly onemocnění rakovinou eukalyptu. Nedávno byl tento systém zaveden dále u *Phomopsis* a *Valsa ceratosperma*, patogenů ovocných stromů, a vedl ke snížení infekčnosti u obou patogenů. *C. parasitica* infikovaná hypovirem CHV1 snížila produkci oranžového pigmentu, který je produkován kmeny neobsahující mykoviry. Zbarvení je využíváno jako marker pro odlišení infikovaných a neinfikovaných kmenů hub (Hillman a kol. 2004).

***Sclerotinia sclerotiorum*.** Tento notoricky známý rostlinný houbový patogen řepky olejky, sóji a mnoha zelenin je rozšířen po celém světě a napadá více než 400 druhů rostlin, včetně *Brassicaceae*, *Fabaceae* a *Solanaceae* (Jiang et al., 2013). *S. sclerotiorum* produkuje bílou plíseň a způsobuje tmavé léze na stoncích svých hostitelů, prostřednictvím hyfálních agregátů – sklerocií přezimuje v půdě a infikuje plodiny v následujících sezónách (Heffer Link a Johnson, 2007). V současnosti se pro kontrolu tohoto rozšířeného patogenu používají fungicidy, což negativně ovlivňuje životní prostředí a nevyhnutelně vytváří izoláty odolné vůči fungicidům. Mykoviry u *S. sclerotiorum* byly poprvé popsány již před více než 30 lety (Boland, 1992). Od té doby bylo u tohoto patogenu identifikováno několik různých mykovic (viry ssRNA, dsRNA a ssDNA) včetně několika spojených s hypovirulencí, např. DNA virus 1 (SsHADV-1 kmen DT-8) nebo mykovirus SsDRV (Yu a kol., 2015; Li a kol. 2019). *Sclerotinia sclerotiorum* s hypovirulencí asociovaný DNA virus 1 je zároveň prvním popsaným DNA virem infikujícím houby. Zhang a kol. (2020) ve své práci prokázali, že houba infikovaná virem *S. sclerotiorum* SsHADV-1 působí endofyticky a snižuje růst svých hostitelů ve srovnání s bezvirovými kmeny.

***Rhizoctonia solani*.** *Rhizoctonia solani* je jedním z nejvíce rozšířených fytopatogenních organismů patřících do třídy *Basidiomycota*. Jeho rozšíření je globální a postihuje různé druhy rostlin, včetně zemědělských plodin a okrasných rostlin. *R. solani* se vyskytuje ve formě mycelia, které se nachází buď v půdě, nebo na povrchu rostlin a do tkání svých hostitelů proniká prostřednictvím ran nebo kořenových špiček. Tato infekce vede k nejrůznějším chorobám, včetně cévního hnědnutí, skvrnitosti listů, padlí a hniloby kořenů. *R. solani* je

schopna přežít v půdě nebo na rostlinných zbytcích po dobu několika let. Škody způsobené *R. solani* jsou nejen ekonomickou ztrátou, ale také mají negativní dopad na zemědělskou udržitelnost a potravinovou bezpečnost (Sneh a kol. 2013). Zheng a kol. (2020) ve své práci popsali dsRNA mykovir z čeledi *Partitiviridae* - *Rhizoctonia solani* partitivirus 2 (RsPV2). Purifikované částice tohoto mykoviru zavedené do protoplastů virulentního kmene *R. solani* vedly k vytvoření izogenního kmene se sníženým růstem mycelia a hypovirulencí vůči listům rýže. Proto má tento mykovir potenciální využití v biologické ochraně.

Fusarium graminearum. Je fytopatogenní houba napadající obilniny, zejména pšenici, ječmen a kukuřici. Tento patogen je rozšířen po celém světě a jeho přítomnost v polních kulturách představuje vážné hrozby pro zemědělce a potravinovou bezpečnost. *F. graminearum* způsobuje hnědou skvrnitost, onemocnění rostlin, které nejvíce postihuje klasy u obilovin. Tato choroba se projevuje hnědo-zlatými nebo růžovými skvrnami na klasech, které postupně přecházejí na obaly semen a způsobují jejich hnědnutí. Infikované rostliny často produkují méně zrna a mohou být náchylné k dalším patogenům a hmyzím škůdcům. *F. graminearum* je také známá produkcí mykotoxinu deoxynivalenol (DON), který je toxický pro lidi i zvířata. Mykotoxiny, které jsou produkovány touto houbou, jsou kontaminanty v potravinářských výrobcích, jako je mouka, pečivo, krmiva a alkoholické nápoje. Kontrola této houby je obtížná z důvodu její životaschopnosti ve venkovním prostředí, odolnosti proti chemickým látkám a schopnosti přežít v půdě po dlouhou dobu (Goswami a Kistler, 2004). Darissa a kol. (2012) ve své práci popisují dsRNA mykovir FgV-ch9 detekovaný u houby *F. graminearum*, který ve středních a vyšších koncentracích v hostiteli dokáže snížit růst mycelia, snížit konidiační kapacitu, způsobit abnormální morfologii kolonií, dezorganizovat cytoplazmu, a především snížit virulenci svého hostitele.

Rosellinia necatrix. Je závažný půdní patogen z čeledi *Roselliniaceae* způsobující bílou hnilobu kořenů ovocných stromů a jiných dřevin. Při infekci se houba dostává do kořenů rostliny a způsobuje vznik charakteristických hnědých dutin. Tyto dutiny postupně ničí kořeny a kmen rostliny, což má za následek snížení jejího růstu a v konečném důsledku může vést až k úplnému odumření. *R. necatrix* má schopnost přežívat v půdě až 20 let. Její výskyt je zvláště problematický v oblastech s teplým a vlhkým podnebím, které jsou ideální pro růst této houby. Infekce se šíří prostřednictvím půdních částic, vodou, hmyzem a také pomocí vegetativního množení. Chiba a kol. (2009) ve své práci popsali mykovir *Rosellinia necatrix*

megabirnavirus (RnMBV1) izolovaný z *R. necatrix*. Následně vyvinuli transfekční protokol s použitím purifikovaných virionů a dokázali tak, že je tento mykovir zodpovědný za snížení virulence a růstu mycelia u několika hostitelských kmenů.

Botrytis cinerea. Botrytida, známá také jako "šedá plíseň", je houbová choroba, která ovlivňuje různé rostliny, zejména vinnou révu. Tato choroba může způsobit vážné škody na sklizni a kvalitě plodů. Tato houba se vyvíjí za vlhkého a teplého počasí, které poskytuje ideální podmínky pro její růst a šíření. Infekce začínají drobnými skvrnami, které se postupně rozšiřují a mění barvu na hnědou nebo šedou. Postižené rostliny a plody jsou obalené sivým povlakem, což je charakteristický příznak botrytidy (Williamson a kol., 2007). U druhů botrytis byly popsány různé mykoviry včetně Botrytis virus F (BVF), Botrytis virus X (BVX), Botrytis cinerea mitovirus 1 (BcMV1) a Botrytis porri RNA virus 1 (BpRV1) (Howitt a kol., 2001; Castro a kol., 2003; Pearson a Bailey, 2013).

Mykoviry mají potenciál být účinným a ekologicky šetrným prostředkem pro boj proti škůdcům rostlin. V současné době se objevuje stále více studií zabývajících se využitím mykovirů v biologické ochraně rostlin. Jejich potenciál je velký a mohou se stát klíčovým prvkem udržitelného zemědělství. Zatímco konvenční pesticidy mají negativní dopad na životní prostředí a lidské zdraví, mykoviry nabízejí šetrnější a efektivnější alternativu. Jejich využití by mohlo snížit závislost na chemických postřicích a přispět k udržitelnému rozvoji zemědělství.

4 Mykoviry václavek rodu *Armillaria* v ČR

Vzhledem k omezeným možnostem ochrany smrkových porostů vůči patogenním houbám rodu *Armillaria* v České republice byl v této práci zkoumán jejich virom jako potenciální možnost detekce mykovirů využitelných v biologické ochraně. Jedná se o první studii na toto téma, po práci Bllatný (1973) a Reaves a kol. (1988) v českých populacích václavek. Zahraniční výzkum odhalil několik RNA virů spojených s těmito organismy. Virom *Armillaria* byl dosud molekulárně zkoumán ve vzorcích z Finska, Ruska (Sibiře), Jižní Afriky a Švýcarska. Bylo popsáno několik ssRNA virů a dva dsRNA viry. U pěti různých druhů rodu *Armillaria* (*A. mellea*, *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. gallica*) byly identifikovány mykoviry, které patří do virových čeledí mitovirů, ourmi-like virů, tymovirů, flegivirů, ambi-like virů a několik dosud neklasifikovaných (+)ssRNA a dvou neklasifikovaných dsRNA virů (Linnakoski a kol., 2021; Shamsi a kol., 2024). U hub rodu *Armillaria* byly v této práci detekováni zástupci virového rodu *Tymovirus* a nedávno popsané virové skupiny ambiviry.

4.1 Tymoviry

Tymoviry představují viry infikující převážně rostliny náležící do čeledi *Tymoviridae* a virového řádu *Tymovirales*. Tymovirové infekce u hub jsou relativně vzácné ve srovnání s jejich prevalencí v rostlinách. Jejich přítomnost však byla zjištěna u různých druhů hub patřících do různých taxonomických skupin, včetně *Ascomycota* a *Basidiomycota* (Howitt a kol., 2001; Howitt a kol., 2006; Xie a kol., 2006; Shamsi a kol., 2024). Tymoviry infikující houby mají obecně podobné vlastnosti jako ty, které infikují rostliny. Jsou to neobalené kulovité částice s dvacetistěnnou kapsidovou strukturou a jednovláknovým genomem RNA s pozitivním smyslem. Genom tymovirů bývá z pravidla monopartitní, přibližně 6-8 kb velký, s neobvykle vysokým obsahem cytidinu (32 až 50 %; Martelli a kol., 2002; King a kol., 2012). Na rozdíl od mnoha rostlinných tymovirů nebyla u tymovirů infikující houby detekována sekvence kódující pohybový protein (Li a kol., 2016).

4.2 Ambiviry

Ambiviry jsou relativně nedávno popsanou, zatím taxonomicky nezařazenou mykovirovou skupinou. Jedná se o ssRNA viry s bicistronickým nesegmentovaným genomem. Jejich genom je velký přibližně 5 kb a obsahuje dva otevřené čtecí rámce (ORF A a B) charakteristicky

v ambisense orientaci (Sutela a kol., 2020; Forgia a kol., 2021). ORF A obsahují konzervované sekvence motivu GDD charakteristické pro RNA-dependent RNA-polymerázy (RdRP) a proto se předpokládá, že ORF A jsou ambivirové RdRP (Sutela a kol., 2020; Forgia a kol., 2021; Kondo a kol., 2022). ORF B – kódované proteiny jsou homologní s některými ORFy (nehostitelské RNA bez významné podobnosti se známými proteinovými sekvencemi) *Agaricus bisporus*, jinak je jeho funkce zatím neobjasněna (Deakin a kol., 2017; Kondo a kol., 2022; Chong a Lauber, 2023).

Tyto mykoviry byly poprvé objeveny u *R. solani* (Picarelli a kol., 2019). Dále byly ambiviry popisovány u endomykorhizních hub (Sutela a kol., 2020), a u fytopatogenních hub, jako jsou *C. parasitica* (Forgia a kol., 2021), *Armillaria spp.* (Linnakoski a kol., 2021; Shamsi a kol., 2024) a *H. parviporum* (Sutela a kol., 2021). Všechny dřívější práce předpokládali, že jsou ambiviry lineární a sekvenční nejasnosti vysvětluje tvorba dimerů. Zároveň nebyly zaznamenány žádné fenotypové změny hostitelských hub související s virovou infekcí (Linnakoski a kol., 2021).

Současné práce (Forgia a kol., 2022; Sato a Suzuki, 2023; Chong a Lauber, 2023; Shamsi a kol., 2024) však původní tvrzení o lineárním genomu ambivirů vyvrací. Dokonce zpochybňují i fakt, že mohou být ambiviry jednoznačně považovány za mykoviry. Forgia a kol. (2022) na základě de novo sestaveného transkriptu popsali spojitost mezi 3' a 5' terminálními konci, což vylučuje typický lineární genom RNA viru. Předpokládají, že ambiviry mají kruhové RNA genomy, kódující párové samoštěpící ribozymy. To umožňuje replikaci mechanismem rotujícího kruhu podobného viroidům. Zdá se, že by ambiviry mohly vzniknout hybridizací genomového základu podobnému viroidům s genem pro RdRp, který je charakteristický pro RNA viry. Jako takové, mohou být odlišnou třídou infekčního agens. Chong a Lauber (2023) popisují ambiviry jako „Hybridní infekční elementy kódující charakteristický gen RNA virů RNA-dependentní RNA polymerázu a samoštěpící RNA ribozymy nalezené v mnoha viroidech“.

Při podrobnější analýze transkriptomů se ukázalo, že kromě dvou hypotetických proteinů kódují ambiviry dva ribozymy, pro každý ORF jeden. Ty slouží ke štěpení jejich multimerních replikačních produktů a nacházejí se blízko C-koncové části každého ORF v oblasti genomu

nekódující protein. Nejčastěji jsou to ribozymy HHR (hammerhead) a HPR (hairpin), ale mohou kódovat i jiné typy (Chong a Lauber, 2023). Predikce sekundárních struktur odhalila tyčinkovou nebo kvazi-tyčinkovou strukturu ambivirů s velmi vysokou stabilitou podobnou většině rostlinných viroidů. Zároveň asi 10 % ambivirových genomů má vysoce rozvětvenou, ale stále stabilní konformaci RNA s hlavní tyčinkovitou architekturou. Tato nová zjištění o hybridním složení ambivirových genomů spojují sféry virů a viroidů a vyvolávají otázky týkající se jejich původu a koevoluce (Forgia a kol., 2022).

5 Cíle práce a hypotézy

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

Dílčími 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

6 Komentář k publikacím

První publikace „Development of loop mediated isothermal amplification for rapid species detection of *Armillaria ostoyae* using assimilating probe“ je zaměřena na přesnou identifikaci *Armillaria ostoyae* v polních podmínkách pomocí metody LAMP (loop mediated isothermal amplification). 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 václavků 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 QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) a na ručním zařízení Smart-DART (Diagenetix, USA).

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.

Zatímco první publikace byla zaměřena na druhovou identifikaci václavek, následující práce se specializují na detekci a charakterizaci mykovirů vyskytujících se u hub rodu *Armillaria* v České republice. V publikaci č. 2 „Molecular characterization of a ssRNA mycovirus isolated from the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*.“ a publikaci č. 3 „Development of RT-PCR for rapid detection of ssRNA ambi-like mycovirus in a root rot fungi (*Armillaria* spp.)“ jsou popisovány průběžné výsledky práce. Publikace č. 4 uvádí kompletní shrnutí a nejnovější poznatky naší práce.

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. Žádný dsRNA element nebyl ve zkoumaných vzorcích detekován.

Pro sekvenční analýzu celkové RNA bylo 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 Invitro-gen Collibri 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 úložiště 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*. V druhé publikaci „Molecular characterization of a ssRNA mycovirus isolated from the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*“ je popsán jeden lineární ssRNA mykovir s genomem v ambi-sense uspořádání. Jedná se o první záchyt virové sekvence ze sekvenačních dat. Mykovir byl na základě dosud známých dat přiřazen ke skupině ambivirů a považován za lineární. Nicméně se po dalším podrobném zkoumání sekvenačních dat prokázala přítomnost kromě tymoviru i dalších ambi-like virů a prokázalo se jejich kruhové uspořádání, jak je detailně popsáno ve čtvrté publikaci „Characterization of mycoviruses in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes* in the Czech Republic“. Genomové sekvence domnělých ambi-like virů byly cca 4,5 kb dlouhé a obsahovaly typické RdRP konzervované domény včetně motivu GDD. Čtyři různé druhy ambi-like virů byly rozlišeny na základě procenta párového porovnání sekvencí (PASC) a byly pojmenovány s ohledem na jejich hostitelskou identitu – *Armillaria* ambi-like virus 1, *Armillaria ostoyae* ambi-like virus 2-4 (AALV1, AoALV2-4). AALV1, AoALV2 a AoALV3 obsahovaly dva a AoALV4 obsahoval tři nepřekrývající se ambisense ORF (open reading frame). Tymovir popsán ve čtvrté publikaci obsahoval přibližně 6,8 kb a byl pojmenován *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 (AoTV1). AoTV1 kóduje jeden (+) sense ORF a na základě sekvenční analýzy byly odhaleny konzervované sekvence, včetně konzervovaných oblastí patřících do pfam01660 superrodiny Vmethyltransf cl03298 a konzervované sekvence patřící do PFAM01443 Superfamily Viral_Helicase1. *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 je druhý tymovirus popsáný v rámci rodu *Armillaria* po studii Shami a kol. (2024).

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). 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*. Tento výsledek naznačuje monofyletický původ ambivirových sekvencí u *Armillaria* spp. Fylogeneticky nejbližší virus k viru AoTV1 je *Lentinula edodes* tymo-like virus 1, který byl detekován v čínském vzorku houby *Lentinula edodes* (GenBank: QOX06053).

Přítomnost virů v jednotlivých izolátech byla ověřena metodou RT-PCR (Reverse transcription – PCR) a následným Sangerovým sekvenováním jak je popsáno ve třetí publikaci „Development of RT-PCR for rapid detection of ssRNA ambi-like mycovirus in a root rot fungi (*Armillaria* spp.)“. 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. Rozšíření metody o další specifické primery je popsáno ve čtvrté publikaci.

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*.

7 Publikace č. 1

Development of loop mediated isothermal amplification for rapid species detection of *Armillaria ostoyae* using assimilating probe

Autoři:

Tonka T., Stehlíková D., Walterová L., Čurn V.

Publikováno:

Journal of Forest Science; 2022; 68; 163-169

Development of loop mediated isothermal amplification for rapid species detection of *Armillaria ostoyae* using assimilating probe

TOMÁŠ TONKA*, DAGMAR STEHLÍKOVÁ, LUCIE WALTEROVÁ, VLADISLAV ČURN

Department of Plant Production, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic

*Corresponding author: ttonka@fzt.jcu.cz

Citation: 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: 163–169.

Abstract: We introduced here the first loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the identification of honey fungus, *Armillaria ostoyae*, a basidiomycote playing an important role in spruce declines in the Palaearctic region. In total, 101 isolates, representing three *Armillaria* species, were used to develop a new LAMP assay to determine species specific identification. We have here described LAMP primers enhanced with fluorescent dye that are able to amplify *A. ostoyae* DNA and detect fungi in a fast single step reaction. The detection limit of LAMP was 1 pg of genomic DNA per reaction. We optimized a new LAMP assay for the rapid detection of *A. ostoyae* using the translation elongation factor 1- α (*tef1*) marker and fluorescence labelled oligonucleotide assimilating probe. The LAMP assay does not require any specialized equipment, hence it can be used in the field for the rapid detection of *A. ostoyae* even using the portable and mobile device. The specificity of the assay was confirmed by the use of *A. ostoyae* strains and *Armillaria cepistipes* and *Armillaria gallica* strains, respectively. In conclusion, the assay could be a rapid, specific, sensitive and low-cost tool for identification of *A. ostoyae* as well as the first step for expansion of this method in practical applications.

Keywords: detection of fungi; molecular diagnosis; forest pathogen; root rot fungi; spruce decline

Fungal pathogens play an important role in forest ecosystems. The complex *Armillaria/Desarmillaria* comprises approximately 41 species (Klopfenstein et al. 2017; Koch et al. 2017; He et al. 2019b) which are well-known pathogens causing root diseases on trees worldwide resulting in huge economic losses (Baumgartner et al. 2011). Norway spruce (*Picea abies*) is an important host of *Armillaria* sp. (honey fungi) in the Palaearctic

region and has suffered a generalized decline enhanced by *Armillaria* in the last years (Cienciala et al. 2017; Holuša et al. 2018).

It is difficult to determine the abundance and species composition of honey fungus populations. Currently, with the progress in the development of molecular methods, *Armillaria* can be directly detected by PCR (Lochman et al. 2004; Antonín et al. 2009; Park et al. 2018). However, the use

of this assay in real-time surveillance is not practicable as it is not directly applicable in the field due to operational constraints, including time consumption and costs. Therefore, cost-effective rapid DNA amplification methods able to rapidly screen a large number of samples are needed.

Loop mediated isothermal assays may provide a solution to real-time inspection including field use. This method was first described by Notomi et al. (2000). Advantages of LAMP assays include improved sensitivity and specificity, as well as fast reaction times. Thus, it has also become popular for rapid identification of plant pathogens, including fungi (Sillo et al. 2018; Aglietti et al. 2019; He et al. 2019a; Stehlíková et al. 2020). As compared to PCR-based assays, LAMP methods are inexpensive, fast, sensitive and they can be performed in a minimally equipped laboratory (Ghosh et al. 2015).

As far as we know, no report about the LAMP-based method for rapid *Armillaria* species identification has been published to date. The LAMP method has widely been applied to soil, mycorrhizal, and pathogenic fungi, but not yet to *Armillaria* spp. (Ortega et al. 2018; King et al. 2019; Panek, Frac 2019). In the present work, we accomplished several goals: raising awareness of this method useful in the differentiation of *Armillaria* spp., using this method as a preventive technique in soil screening against *Armillaria* pathogens and utilizing this method in forest ecology in general.

MATERIAL AND METHODS

A collection of 100 samples from locations in the eastern part of the Czech Republic and one sample from CCBAS218 (*Armillaria gallica* - Culture Collection of Basidiomycetes, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Czech Republic, <http://www2.biomed.cas.cz/ccbas/fungi.htm>) were used to test the new LAMP assay (101 in total). The *Armillaria* rhizomorphs were collected from trees that were less than 50 years old. Parts of rhizomorphs were sampled in the basal part of the trunk, 5–15 cm below the soil and placed in separate plastic bags.

We have isolated DNA directly from collected rhizomorphs using the CTAB-PVP method (Porebski et al. 1997). The extracted DNA was suspended in 1X TE buffer and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further use. The DNA isolated directly from rhizomorphs was used for PCR and LAMP experiments.

The internal transcribed spacer (ITS) and the translation elongation factor 1- α (*tef1*) regions were amplified from extracted DNA using AR1/AR2 and EF595F/EF1160R primers to confirm the species identification (Kausrud, Schumacher 2001; Lochman et al. 2004). PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel in 1X Tris/borate/EDTA buffer and were visualized by ethidium bromide staining. Successfully amplified samples were sequenced at SEQme s.r.o (Dobříš, Czech Republic). The sequences were assembled and analyzed by the use of Geneious (Version 8.1.9, 2015). Each sequence was parsed into the primer specific regions (AR1/AR2 and EF595F/EF1160R, respectively) and was then separately used to perform a blastn query against the GenBank database using the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequence-based identities with a cutoff of $> 98\%$ were considered significant, i.e. belonging to the same species, and the best hit was defined as the sequence with the highest maximum identity to the query sequence.

A set of *Armillaria* *tef1* gene sequences of representatives of all major European species was obtained from the GenBank database and aligned to determine the pattern of sequence conservation. Sequences included those of target *A. ostoyae* (GenBank accession No. EU251401, MN580142, JN657489) and other related *Armillaria* species, including *A. cepistipes* (MN580151), *A. gallica* (EU251391), *A. ectypa* (EU251403) and *A. mellea* (EU251399). The sequences were imported into Geneious 8.1.9 and primers were determined based on *in silico* analysis using LAMP designer software (OptiGene Limited; Version 1.12, 2017) to design *A. ostoyae* specific primers.

Five *A. ostoyae* LAMP primers were proposed: outer primers F3 and B3, internal primers FIP (consisting of the F1c and F2 sequences) and BIP (B1c and B2), and one loop primer LB. Primer codes mentioned here have been used for convention since the development of LAMP, with primer codes Loop F and Loop B applied in later assays (Notomi et al. 2000). Additionally, we designed an assimilating probe labelled with the TAMRA fluorescent dye (5-carboxytetramethylrhodamin) at the 5' end. Primers, including the probe, were synthesized by Macrogen Inc. (South Korea) and their sequences are given in Table 1.

To determine a quick extraction method for LAMP assay, genomic DNA was extracted from

<https://doi.org/10.17221/161/2021-JFS>

Table 1. Designed LAMP primers and the assimilating probe for detection of *A. ostoyae*

Name of the primer	Sequence 5'–3'
F3	TACCTCCCAGGCTGATTG
B3	TCCACTGAGATAACAGTCAGA
FIP ^a	TCGAGTCTGGCCGTCCTTTGCCATTCTCATCATCGC
BIP ^b	TTGGTGTCAAGCAGCTCATCTAGATCTCGTACCTTGGTGG
LB ^c	TCGCCGTCAACAAGATGG
Probe_LF ^d	TAMRA ^e –ACGCTGAGGACCCGGATGCGAATGCGGATGCGGATGCCGA CTTCAAATTCACCAGTCCACC
Qstrand ^f	TCGGCATCCGCATCCGCATTTCGCATCCGGGTCCTCAGCGT – BHQ ^g

^abold sequence – F1c; underlined sequence – F2; ^bbold sequence – B1c; underlined sequence – B2; ^cLoop B primer; ^dfluorescence strand of assimilating probe (underlined fragment acts as Loop F); ^eTAMRA – 5-carboxytetramethylrhodamine; ^fquench strand of assimilating probe; ^gBHQ – Black Hole Quencher-1

mycelia using the Plant Material DNA extraction kit (OptiGene Limited, the United Kingdom). All fungal cultivations were performed at 25 °C in the dark. As a medium, we used malt extract agar (48 g·L⁻¹, ME agar, Merck). After three weeks of mycelium growth, DNA was extracted according to the manufacturer's instructions.

The LAMP amplification reaction contained 2.4 µL LAMP primer mixture (0.8 µM FIP and BIP, 0.2 µM F3 and B3 each, and 0.4 µM LB), 15 µL Isothermal Master Mix without intercalating dye (Optigene, Inc., the United Kingdom), 2 µL LAMP probe mixture (Probe_LF and Quench strand at a final concentration 0.3 µM and 0.5 µM, respectively) and 3 µL DNA template (final concentration 2.5 ng·µL⁻¹), filled with DEPC water. The reaction was performed in a 0.2 mL tube at a final volume of 25 µL. The reaction was incubated at 65 °C for 30 min and finally at 80 °C for 2 min to termination. Sterilized water was used as a no template control (NTC). All reactions were performed in triplicates. Real-time LAMP assays were carried out on a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and on a handheld device, Smart-DART (Diagenetix, USA).

To test the specificity, assays for *A. ostoyae* were initially tested using DNA samples from the isolates of *A. cepistipes* and *A. gallica*, respectively. To evaluate the sensitivity, the LAMP assays were performed using a 10-fold dilution series of genomic DNA from *A. ostoyae* ranging from 10 ng to 1 pg. Time to threshold (*T*) was calculated using manual baseline settings in QuantStudio Software (Version 1.3; 2015).

RESULTS

In total, 100 collected isolates and one *A. gallica* from CCBAS were tested to develop a new LAMP assay. Based on the ITS/*tef1* PCR amplification, 64 isolates of *A. ostoyae*, 33 isolates of *A. cepistipes* and three *A. gallica* strains were confirmed by the blast against the NCBI database. Together with CCBAS *A. gallica* was used in the LAMP assays.

The *tef1* *A. ostoyae* LAMP assays gave unambiguous positive results when tested against DNA from *A. ostoyae* isolates collected at different sites. They produced clear amplification curves (Figure 1). No signal was obtained using either assay when screening other *Armillaria* species (*A. cepistipes* and *A. gallica*, respectively) (Figure 1). The *tef1*-specific *A. ostoyae* primers gave positive results within 14:12–20:41 minutes. No template controls (NTC – water) included in each test ran tested negatively, that is, no amplification curves were observed for *A. cepistipes* or *A. gallica*. When screened against serial dilutions of *A. ostoyae* DNA, the *tef1* LAMP assay could consistently detect down to 1.0 pg (Figure 2). The testing method enabled the fast quantitative estimation of target *A. ostoyae* DNA present in samples. The detection limit of LAMP was 1.6 pg·µL⁻¹ of DNA per reaction (Figure 2). The detection limit of conventional PCR with F3/B3 primers was 0.1 ng·µL⁻¹ (data not shown). As shown in Figure 1, the results indicated that a positive LAMP reaction occurred only in *A. ostoyae*, while the other species were negative.

This study also employed the handheld device Smart-DART for fast and clear low-cost detection

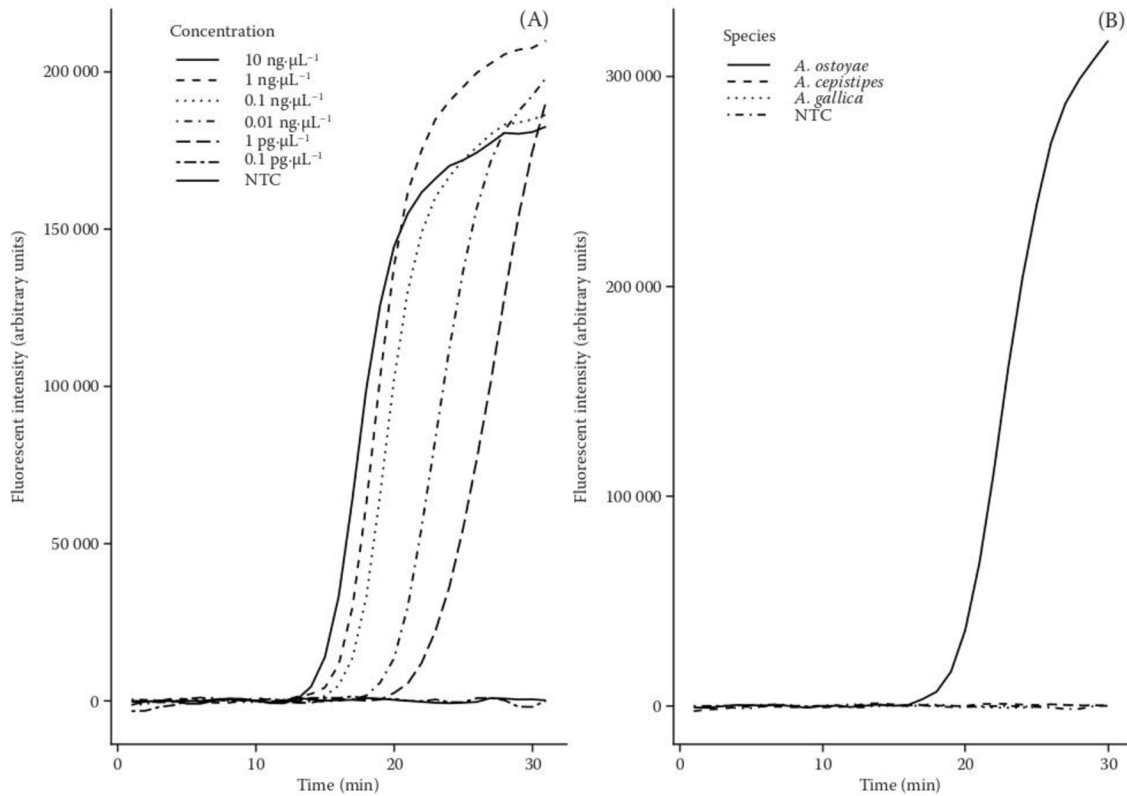


Figure 1. Representative results from screening of *A. ostoyae* with new LAMP primers (each dilution was run in three replicates); (A) specific LAMP amplification curves for serial dilutions of DNA extracted from *A. ostoyae* using the LAMP primers designed for this study for the *tef1* marker of *A. ostoyae*; (B) results of the specificity test of three different *Armillaria* spp. NTC – no template control

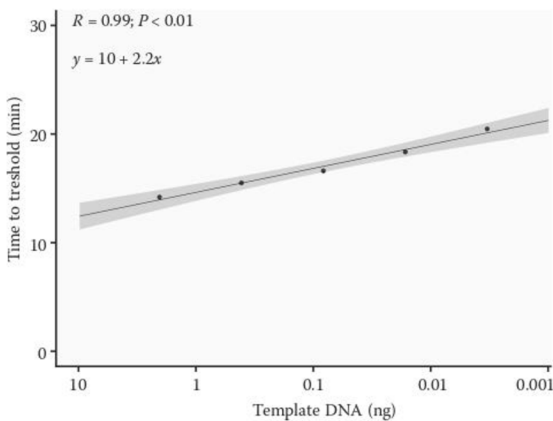


Figure 2. Sensitivity testing of EF1 – α LAMP primers developed in this study; screening against different amounts of *A. ostoyae* DNA [curve was generated by linear regression analysis, plotting the T_t (time to threshold) value in the y-axis vs. the logarithm of the starting DNA dilutions in the x-axis]

of amplified DNA. The results obtained by this system were consistent with those obtained by the Quant Real Studio. Since the detection can be accomplished in a closed system between mobile device and handheld equipment, there is no risk of contamination and this system can be used easily in field conditions.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first report on the application of the LAMP assay for the detection of *A. ostoyae*. Relative to conventional PCR, the LAMP assay reported here is easier to perform, more rapid, and the results are easier to evaluate. The sensitivity advantage of the LAMP over conventional PCR is 10–100 times greater (Wang et al. 2015). Our results showed that the detection limits could be at the pg level for *A. ostoyae*

<https://doi.org/10.17221/161/2021-JFS>

genomic DNA. Compared to conventional PCR, the LAMP detection assay was more rapid and simple. The speed of the reaction was enhanced by the use of fluorescent dye in the assimilating probe. Additionally, the use of an assimilating probe with the LAMP assays allows sequence specific detection and it also allows detection in real-time (Kouguchi et al. 2010; Tanner et al. 2012).

Besides PCR and LAMP, quantitative real-time PCR (qPCR) is another molecular technique implemented to identify and quantify fungi (Aslam et al. 2017). This method allows detection and quantification of DNA sequences and is mostly used to detect phytopathogenic fungi in infected plant tissues (Hariharan, Prasannath, 2021). The real-time detection based on species-specific primers and fluorescent dyes is used to scan the reaction steps. Similar to our LAMP experiment with *tef1* primers the quantitative PCR was reported to amplify *tef1* sequences from *Armillaria* species in the northern hemisphere (Baumgartner et al. 2010). Nevertheless, qPCR is a tool for the quantification of nucleic acid in biological samples and is not widely used for the species identification from isolated DNA. For qPCR-based analysis a well-equipped laboratory with fluorescence detection modules is needed. However, in this work the newly developed LAMP assay was reported to identify *Armillaria* species from isolated DNA by the handheld device that can be used in the field.

PCR amplification and sequencing of the *tef1* gene requires an expensive instrument for the thermal reaction, extra time and cost for gel electrophoresis; the species identification period using sequencing of *tef1* usually takes several days and additional cost is needed. For LAMP, the identification only requires a water bath, and the detection can be completed and judged by a pending handheld device, connected to a mobile phone within several hours (Jenkins et al. 2011). Therefore, LAMP detection is faster and requires a lower cost than PCR (He et al. 2019a).

Several publications reported the detection of *Armillaria* fungi using specific primers including the IGS-1 or ITS1/ITS2 regions (Anderson, Stasovski 1992; Chillali et al. 1998). Although these gene regions were successfully used in various phylogenetic studies (Keča et al. 2006; Antonín et al. 2009; Klopfenstein et al. 2017), it was recognized that some of these primer pairs failed to differentiate among *Armillaria* species (Sicoli et al. 2003). Lat-

er on, several studies have shown that alternative loci should be considered to distinguish different *Armillaria* species, including these *tef1*, β -*tubulin* or *rpb2* genes (RNA polymerase) (Matheny et al. 2007; Guo et al. 2016; Koch et al. 2017). Therefore for a primer and probe design, we used the *tef1* gene because it provides sufficient species resolution and differentiates *Armillaria* species (Maphosa et al. 2006; Mulholland et al. 2012; Coetzee et al. 2018). However, with PCR amplification, *A. ostoyae* and other related *Armillaria* species are nearly indistinguishable on agarose gels. Their differentiation is complicated and direct sequencing of PCR products takes a long time (Lochman et al. 2004; Kim et al. 2006). Using the LAMP assays with fluorescent probe we were able to differentiate *A. ostoyae* from other species within 14 minutes.

Using the assimilating probe in LAMP reaction was described on different isolates of the pathogen *Ralstonia solanacearum* (Kubota et al. 2011), which enhanced the specificity and speed of LAMP reaction. The LAMP reaction might be facilitated by the addition of assimilating probes to the primers. In the present study, we used LAMP primers together with primers carrying a fluorescent marked probe (Table 1). This improved the reaction time and efficiency.

The results presented in this study demonstrated the use of LAMP to rapidly detect *A. ostoyae* using genomic DNA under controlled *in vitro* conditions, as was described previously for *A. cepistipes* (Stehlíková et al. 2019). Further steps should include testing the specificity of the method described here under more challenging conditions of soil and root material from the environment.

CONCLUSION

In conclusion, we have found that a LAMP assay combined with assimilating probe is simple, rapid, sensitive and specific. Because our LAMP assay does not require any specialized equipment, it can be used in the field for the rapid detection of *A. ostoyae* in connection with mobile device and handheld Android-based equipment. This is the first report on the use of LAMP assay for the detection of *A. ostoyae*. It is a promising assay for the rapid diagnosis of honey fungus infection in the laboratory and it will be very useful for monitoring the *Armillaria* complex in the field prior to suggesting management strategies.

<https://doi.org/10.17221/161/2021-JFS>

Acknowledgement: We would like to thank MSc. Baveesh Pudhuvai for critical reading and helpful comments for manuscript revision.

REFERENCES

- Aglietti C., Luchi N., Pepori A.L., Bartolini P., Pecori F., Raio A., Capretti P., Santini A. (2019): Real-time loop-mediated isothermal amplification: An early-warning tool for quarantine plant pathogen detection. *AMB Express*, 9: 50.
- Anderson J.B., Stasovski E. (1992): Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*, 84: 505–516.
- Antonín V., Tomšovský M., Sedlák P., Májek T., Jankovský L. (2009): Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes* – *A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia. *Mycological Progress*, 8: 259–271.
- 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.
- Baumgartner K., Bhat R., Fujiyoshi P. (2010): A rapid infection assay for *Armillaria* and real-time PCR quantitation of the fungal biomass in planta. *Fungal Biology*, 114: 107–119.
- Baumgartner K., Coetzee M.P., Hoffmeister D. (2011): Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology*, 12: 515–534.
- Chillali M., Wipf D., Guillaumin J.J., Mohammed C., Botton B. (1998): Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. *The New Phytologist*, 138: 553–561.
- Cienciala E., Tumajer J., Zatloukal V., Beranová J., Holá Š., Hůnová I., Russ R. (2017): Recent spruce decline with biotic pathogen infestation as a result of interacting climate, deposition and soil variables. *European Journal of Forest Research*, 136: 307–317.
- Coetzee M., Wingfield B.D., Wingfield M.J. (2018): *Armillaria* root-rot pathogens: Species boundaries and global distribution. *Pathogens*, 7: 83.
- Ghosh R., Nagavardhini A., Sengupta A., Sharma M. (2015): Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* – Wilt pathogen of chickpea. *BMC Research Notes*, 8: 40.
- Guo T., Wang H.C., Xue W.Q., Zhao J., Yang Z.L. (2016): Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLoS ONE*, 11: e0154794.
- 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.
- He Z., Su Y., Li S., Long P., Zhang P., Chen Z. (2019a): Development and evaluation of isothermal amplification methods for rapid detection of lethal *Amanita* species. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1523.
- He M.Q., Zhao R.L., Hyde K.D., Begerow D., Kemler M. et al. (2019b): Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 99: 105–367.
- Holuša J., Lubojacký J., Čurn V., Tonka T., Lukášová K., Horák J. (2018): Combined effects of drought stress and *Armillaria* infection on tree mortality in Norway spruce plantations. *Forest Ecology and Management*, 427: 434–445.
- Jenkins D.M., Kubota R., Dong J., Li Y., Higashiguchi D. (2011): Handheld device for real-time, quantitative, LAMP-based detection of *Salmonella enterica* using assimilating probes. *Biosensors and Bioelectronics*, 30: 255–260.
- Kausarud H., Schumacher T. (2001): Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). *Mycological Research*, 105: 676–683.
- Keča N., Bodels W.J.A., Woodward S., Karadžić D., Bojović S. (2006): Molecular-based identification and phylogeny of *Armillaria* species from Serbia and Montenegro. *Forest Pathology*, 36: 41–57.
- King K.M., Hawkins N.J., Atkins S., Dyer P.S., West J.S., Fraaije B.A. (2019): First application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid identification of mating type in the heterothallic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*, 62: 812–817.
- Kim M.S., Klopfenstein N.B., Hanna J.W., McDonald G.I. (2006): Characterization of North American *Armillaria* species: Genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology*, 36: 145–164.
- Klopfenstein N.B., Stewart J.E., Ota Y., Hanna J.W., Richardson B.A., et al. (2017): Insights into the phylogeny of northern hemisphere *Armillaria*: Neighbor-net and Bayesian analyses of translation elongation factor 1- α gene sequences. *Mycologia*, 109: 75–91.
- Koch R.A., Wilson A.W., Séné O., Henkel T.W., Aime M.C. (2017): Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyana-gaster*. *BMC Evolutionary Biology*, 17: 33.
- Kouguchi Y., Fujiwara T., Teramoto M., Kuramoto M. (2010): Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolates. *Molecular and Cellular Probes*, 24: 190–195.
- Kubota R., Alvarez A.M., Su W.W., Jenkins D.M. (2011): FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biological Engineering Transactions*, 4: 81–100.

<https://doi.org/10.17221/161/2021-JFS>

- Lochman J., Sery O., Mikeš V. (2004): The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. *FEMS Microbiological Letters*, 237: 105–110.
- Maphosa L., Wingfield B.D., Coetzee M.P.A., Mwenje E., Wingfield M.J. (2006): Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australasian Plant Pathology*, 35: 513–520.
- Matheny P.B., Wang Z., Binder M., Curtis J.M., Lim Y.W., Nilsson R.H., Hughes K.W., Hofstetter V., Ammirati J.F., Schoch C.L., Langer E., Langer G., McLaughlin D.J., Wilson A.W., Frøslev T., Ge Z.W., Kerrigan R.W., Slot J.C., Yang Z.L., Baroni T.J., Fischer M., Hosaka K., Matsuura K., Seidl M.T., Vauras J., Hibbett D.S. (2007): Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 43: 430–451.
- Mulholland V., MacAskill G.A., Laue B.E., Steele H., Kenyon D., Green, S. (2012): Development and verification of a diagnostic assay based on EF-1 α for the identification of *Armillaria* species in Northern Europe. *Forest Pathology*, 42: 229–238.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. (2000): Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- Ortega S.F., Tomlinson J., Hodgetts J., Spadaro D., Gullino M.L., Boonham N. (2018): Development of loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of seedborne fungal pathogens *Fusarium fujikuroi* and *Magnaporthe oryzae* in rice seed. *Plant Disease*, 102: 1549–1558.
- Panek J., Frac M. (2019): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) approach for detection of heat-resistant *Talaromyces flavus* species. *Scientific Reports*, 9: 5846.
- Park K.H., Oh S.Y., Park M.S., Kim M.S., Klopfenstein N.B., Kim N.K., Park J.Y., Kim J.J., Han S.K., Lee J.K., Lim Y.W. (2018): Re-evaluation of *Armillaria* and *Desarmillaria* in South Korea based on ITS/*tef1* sequences and morphological characteristics. *Forest Pathology*, 48: e12447.
- Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. (1997): Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Report*, 15: 8–15.
- Sillo F., Giordano L., Gonthier P. (2018): Fast and specific detection of the invasive forest pathogen *Heterobasidion irregulare* through a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Forest Pathology*, 48: e12396.
- Sicoli G., Fatehi J., Stenlid J. (2003): Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology*, 33: 287–297.
- 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. (in Czech)
- Stehlíková D., Luchi N., Aglietti C., Pepori A.L., Diez J.J., Santini A. (2020): Real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium circinatum*. *Biotechniques*, 69: 11–17.
- Tanner N.A., Zhang Y., Evans Jr. T.C. (2012): Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*, 53: 81–89.
- Wang X.R., Wu L.F., Wang Y., Ma Y.Y., Chen F.H., Ou H.L. (2015): Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 882–891.

Received: December 31, 2021

Accepted: May 6, 2022

Published online: May 19, 2022

8 Publikace č. 2

Molecular characterization of a ssRNA mycovirus isolated from the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*.

Autoři:

Tonka T., Walterová L., Hejna O., Čurn V.

Publikováno:

Acta Virologica; 2022; 66; 290-294

LETTER TO THE EDITOR

Molecular characterization of a ssRNA mycovirus isolated from the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*

Tomáš Tonka, Lucie Walterová, Ondřej Hejna, Vladislav Čurn

University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture and Technology, Na Sádkách 1780,
370 05 České Budějovice, Czech Republic

Received December 22, 2021; revised May 26, 2022; accepted May 30, 2022

Keywords: mycovirus; ambi-like virus; ssRNA virus; *Armillaria ostoyae*; honey fungus

Species of the genus *Armillaria* are members of the soil-borne fungal community that induce root rot and are contributing to the decline of Norway spruce and other coniferous stands in the northern hemisphere (1). Fungi of *Armillaria* spp. are highly destructive forest pathogens that infect economically important conifers and cause huge economic losses. Since the first description of fungal virus in cultivated mushrooms (2), dozens of new mycoviruses were identified and placed into a taxonomic system of viruses (3). Mycovirus infections are symptomless and persist inside their host for decades (4). However, instead of classical molecular methods for the identification of mycoviruses in fungal genomes, the transcriptome approaches have become more popular. Using the HTS, several mycoviruses with ambisense genome were described recently in *Armillaria* spp. from Finland, Russia and South Africa (5). Together with *Cryphonectria parasitica* ambivirus, *Rhizoctonia solani* ambiviruses (6), *Tulasnella* ambiviruses and *Ceratobasidium* ambivirus they established a new group of viruses temporarily named ambiviruses (7).

E-mail: ttonka@fzt.jcu.cz; phone +420 387772940.

Abbreviations: aa = amino acids; AIV = ambi-like virus; Ab-AIV2 = *Armillaria borealis* ambi-like virus 2; AAIIV3 = *Armillaria* ambi-like virus 3; AoAIV = *Armillaria ostoyae* ambi-like virus; CDD = Conserved domain database; HTS = high throughput sequencing; nt = nucleotides; ORF = open reading frame; RdRP = RNA dependent RNA polymerase; RT-PCR = reverse transcription PCR

In the present study, we describe a new strain of the fungal virus with ambisense genome isolated from *Armillaria ostoyae* and, to our knowledge, this is the first report of ssRNA mycovirus found in this species of serious forest pathogen.

Strains/species of *Armillaria* spp. were isolated from rhizomorphs (mycelial cords) collected at different locations in the Czech Republic. Fungal mycelia were cultivated on malt extract agar (ME agar). Total RNA was isolated using PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's procedures. Pooled total RNA sample of 13 *Armillaria* strains/species (10 *A. ostoyae*, 2 *Armillaria gallica* and 1 *Armillaria cepistipes*) was delivered to SEQme (Dobříš, Czech Republic) for further processing of the sample, including RNA quality control and library preparation (NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina, NEB Inc.). The host rRNA was depleted from the pooled sample using NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (NEB Inc.). An Illumina platform Novaseq 6000 was used to generate 150 bp paired-end reads. After quality trimming, reads were assembled *de novo* with SPAdes. The assembled contigs longer than 1 kb were compared (yielding e-values $\leq 1e^{-5}$) with the NCBI virus database, and with the RefSeq non-redundant database using blastn and blastx, respectively. A sample of each total RNA included in the pool was converted to cDNA using LunaScript RT SuperMix Kit (NEB Inc.) according to the manufacturer's instructions. Identification of virus-host sample was performed using RT-PCR with virus-specific

primers based on the ORFs found in assembled virus contig (Table 1).

Thirteen *Armillaria* strains from the Czech Republic representing three species (*A. ostoyae*, *A. gallica* and *A. cepistipes*) were included in the HTS analysis. The RNA-Seq library comprised ~113 millions paired-end reads. After quality trimming and *de novo* assembly, we obtained 8809 contigs longer than 1 kb. Among viral contigs, we found one sequence that resembled the ambi-like virus strain 3 described from *Armillaria borealis* and *A. cepistipes*, respectively. RT-PCR analysis of cDNA performed on each of the strains included in the pooled sample revealed that ambi-like virus was found only in the isolate representing *A. ostoyae* strain Harta. The complete sequence comprises 4523 nt, encoding three ORFs (Fig. 1). The ORF1 and ORF2 are overlapped in 2 nucleotides. A blastp search of predicted proteins against a non-redundant database confirmed strong sequence similarity to ORFs of previously described ambi-like viruses deposited in the GenBank database. The ORF1 was predicted to encode a putative protein of 712 amino acids (2139 nt). Blastp analysis showed that ORF1 had a high amino acid similarity to the hypothetical proteins of AAIV3 (94.20–98.46%) and AbAIV2 (71.59–73.19%). Notably, the GDD triad is included in all these longest ORFs, which is considered to be a mark of the RdRP (Fig. 2).

The smallest ORF2 encoded sequence of 217 aa (654 nt) and shared at least 62% similarity with hypothetical protein of AbAIV2, and between 94.47 and 99.08% with hypothetical proteins of AAIV3. The ORF3 was 407 aa (1224 nt) long and shared 96.42–98.53% similarity with the hypothetical proteins of AAIV3 and at least 62% with predicted ORF3 of AbAIV2. Both, ORF2 and ORF3, separated by an intergenic region of 33 nt in length, are read in the opposite direction of the ORF1.

To define the relationships within the group of ambiviruses, a phylogenetic tree was derived based on the nucleotide sequences of previously described ambiviruses and ambi-like viruses. Three distant main clades, ambi-like virus 1, 2 and 3, separated from ambivirus sequences were detected. The results showed that AoAIV formed a clade with a bootstrap value of 100% with other AAIVs3, and ambi-like virus 1 and 2 made individual clusters with highly supported bootstrap values (Fig. 3). The sequenced

Table 1. Primer sets of AoAIV partial ORFs

Primer name	Primer sequence 5'-3'	Position (nt)
AoA1F	GCTATGGCTGACTCTTCATC	1025–1080
AoA1R	ACAGGGCATTTCATTGGAGGG	
AoA2F	CTTCTCTCCCCGCGTATGAC	2625–3240
AoA2R	CGCATGTGCCATATATCGCG	

genome of the virus infecting *A. ostoyae* was deposited in the NCBI GenBank database (Accession no. OL863120). Based on the similarity with up-to-date described ambi-like viruses of several *Armillaria* spp. we designated this virus as *Armillaria ostoyae* ambi-like virus.

A new group tentatively named ambiviruses comprises new putative viruses recently described in mycorrhizal fungi using HTS (7). Similar viruses were also found to infect *C. parasitica* and *R. solani* (6). Though viruses from this group seem to be very common in basidiomycetes, there are no data on their biological or population structure. There is nothing known about the relationship between virus and host as well as virus-virus interaction even though many descriptions of new viruses were reported to infect forest fungal pathogens in recent years (4; 8; 9). The ambi-like viruses were described to infect members of the genus *Armillaria* worldwide but not *A. ostoyae*. These mycoviruses seem to be abundant and are distributed throughout the area where *Armillaria* fungi are found (5). All these ambi-like viruses remain unclassified and are not included in the virus taxonomy. Last year, many viruses with ambisense genome have been described to infect the pathogenic fungi (5, 6). The ambi-like virus strain delimitation is based on the nucleotide and amino acid sequence identities (5). Although no other criteria are available for this new group of viruses, similarity in sequences revealed that AoAIV shared homology with the ambi-like virus 3, which is strongly supported with the phylogenetic analysis based on multiple alignment of the nucleotide sequences of ambi-like viruses.

Although the GDD motif is present in aa sequence of the ORF1, no conserved domains have been detected in AoAIV. The GDD motif is considered as a marker of RdRP but this gene has not been described either in ambi-like



Fig. 1

Schematic representation of the *Armillaria ostoyae* ambi-like virus genome organization

Three ORFs encoding three hypothetical proteins are depicted. Note the orientation of the ORF1, ORF2 and 3, respectively. A black line illustrates the genome. Numbers represent position of ORFs.

	1	10	20	30	40	50	60
Consensus	MIFWGV	CVAR	SILLLEIPEH	SQVLLRRAE	ERMHTRTDLK	ELFSLVPEY	RTVIRTL SRL
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIV
Consensus	PLSARNLLIK	XCQAQSWXP	DSFSTLRZMI	EQHPDXYXHD	PYPXII XFSN	FAPXFNLRLH	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2	A.....A.....E.....V.V.....D..K.....Y.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3	S.....S.....Q.....V.I.....E..P.....H.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3	S.....R.....Q.....V.V.....E..P.....H.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3	S.....R.....Q.....V.V.....E..P.....H.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIV	S.....R.....Q.....I.V.....E..P.....H.....	
Consensus	DPLESAILLD	IARGJPLPSI	YDVXEAQSAS	WSKEIRLXHG	VKREAAVNWD	VFFXEGCQHL	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2L.....L.....V.....V.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3I.....L.....L.....V.....V.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3I.....L.....L.....V.....V.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3I.....L.....L.....V.....V.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVI.....L.....L.....V.....V.....	
Consensus	XIADGVXPNP	QMARRIHHQL	XXFREXXRGX	RFXPRATHKN	MSRXTRRDFE	RQTGXSLXIX	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2	P.....D.....	KR..KI..K	..Y.....G.....L...E.	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3	P.....E.....	RR..SI..R	..F.....S.....Q...G.	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3	P.....D.....	KR..SV..R	..F.....S.....H...G.	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3	P.....D.....	KR..SI..R	..F.....S.....H...G.	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIV	S.....D.....	KK..SI..R	..F.....S.....H...G.	
Consensus	PIFGQDNWGA	HYHKTGXKLG	GXSEMQRQWY	HXGAKPRTYF	AMGGEAYEXC	RFLQDFFTXJ	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2V.....P.....S.....G.....EL.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3V.....S.....H.....A.....EI.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3K.....S.....H.....A.....DI.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3K.....S.....H.....A.....DI.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVK.....S.....H.....A.....DI.....	
Consensus	VDFMPTNHK	TRLQPDRLF	SSXYDKEDPH	FRIYDLSNFT	SNMSEQSRCL	XGLXXFMGEV	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2R.....	R..TK.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3R.....	K..ER.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3K.....	K..EK.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3R.....	K..EK.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVK.....	K..EK.....	
Consensus	EVEXVDERXG	PXXXTMDXLL	XXYQESCVER	PXVSLERYXG	XDTSEGDXHD	SIPHMVASLL	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2Y...F...VAT...M...S...G.....P.....K...T.....L.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3I...F...ITI...V...SD...S.....S.....K...V.....F.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3I...Y...LMV...M...GE...S.....S.....R...I.....F.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3I...Y...LMV...M...GD...S.....S.....R...I.....F.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVI...Y...LMV...M...GD...S.....S.....R...I.....F.....	
Consensus	GIFGNLMSCT	XAHYLVXSPV	VRDEEEVNVA	GDDGILPEDA	XNPXPVXRVI	DLVGSAMEK	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2F...M...I.....T...E...R...	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3L...I...I.....S...E...R...	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3L...I...I.....C...D...K...	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3L...I...I.....D...D...K...	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVL...I...I.....S...D...R...	
Consensus	TFRSDEESAI	ALKRPIWEDL	PHLHTXXNII	PPSVVRCVQS	ICSXFXDFRY	PPLPEPYTLN	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2SF.....T...Q.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3MY.....T...K.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3TY.....S...K.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3MY.....S...K.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVTY.....S...K.....	
Consensus	EGLNXVGVKDL	LRLFLRSAYLR	RXXDVXRLXX	VIXGYELVXX	XJSRXXPPXP	TGKTQGYTWP	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2V.....FY...D...GM...D...R...NRI...VT...K...	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3I.....YQ...E...SE...S...K...KTL...VR...S...R...T...K...	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3I.....YQ...E...SE...S...K...KTI...VR...T...	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3I.....YQ...E...SE...S...K...KTL...VK...T...	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVI.....YQ...E...SE...S...K...KTI...IK...T...	
Consensus	XXPXXYDFLD	APPLTVLSIX	FAPKXLWTAK	LEXRPVYXXX	DLYXGLXFES	NSXPCLKMLE	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2VN..LA.....H.....L.....K...IDT...A...E...N.....	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3MR..EG.....N.....R.....K...RET...C...S...S.....	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3VK..EG.....N.....R.....R...QES...A...S...S.....	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3MR..EG.....N.....R.....R...RES...T...S...S.....	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIVMR..EG.....N.....R.....R...RES...A...S...S.....	
Consensus	XYGYXEKEEV	XXLLDXDXVL	XFXXXXXXPX	HIPXVYXYSV	VRDVPXFXQ	WV	
DAD54839 <i>Armillaria mellea</i> AIV2	S...L.....	KV..K..YE..	D..LGMLAA..I	..V...T...A...	
QUD20382 <i>Armillaria</i> AIV3	A...V.....	ME..E..FR..	G..PRNVSC..C	
QUD20376 <i>Armillaria</i> AIV3	A...V.....	ME..E..FR..	D..LGMLAA..V	..I...S...T...	
QUD20379 <i>Armillaria</i> AIV3	A...V.....	ME..E..FR..	D..LGMLAA..V	..I...S...A...	
OL863120 <i>Armillaria ostoyae</i> AIV	A...V.....	ME..E..FR..	D..LGMLAA..V	..V...S...A...	

Fig. 2

Alignment representing amino acids encoded by ORF1 of representative ambi-like viruses of strains 2 and 3. Highlighted is GDD motif, which is a hallmark of RdRP. Points indicate identical sites. Letters reveal differences in aa sequence. AmAIV2 = *Armillaria mellea* ambi-like virus 2, AIV3 = ambi-like virus 3, *Armillaria ostoyae* AIV = *Armillaria ostoyae* ambi-like virus.

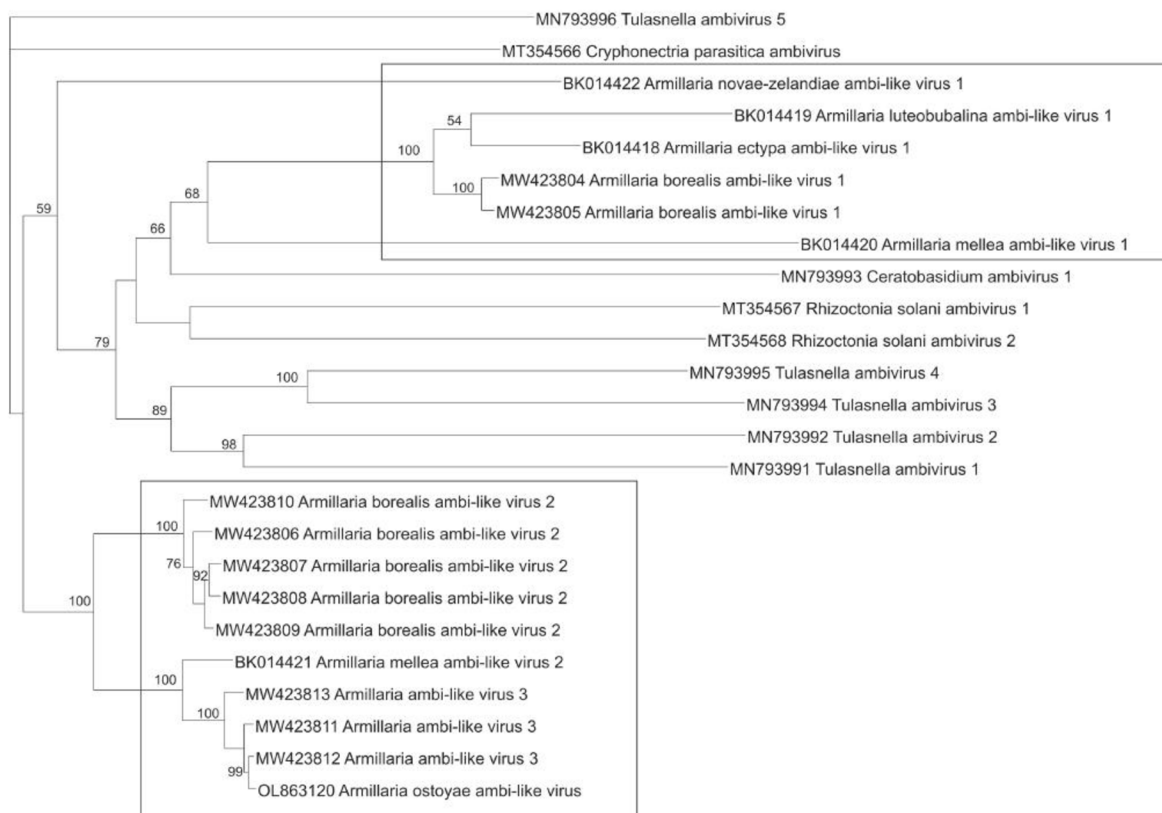


Fig. 3

Phylogenetic tree of a putative group of ambiviruses inferred using maximum likelihood method

The complete nt sequences were aligned in Geneious 8.1.9 with MUSCLE and the tree was constructed using GTR+I+G4 model (best-fit model according to ModelFinder) and 1000 bootstrap repetitions. The bootstrap values are shown on the branches. The ambi-like viruses, including AoAIV OL863120, are highlighted.

viruses nor ambiviruses infecting *C. parasitica* or other macrofungi (4, 5, 6).

Based on genomic analysis, phylogenetic relationships, similarity of nucleotide sequences, amino acid translation and host properties, this is a first report of the complete sequence of ambi-like virus isolated from *A. ostoyae* as well as the Czech Republic. The rod-shaped virus-like particles have been described in *Armillaria mellea* 50 years ago (10). However, this description of virus cannot be verified as it is unclear whether observed particles represent known viruses or not. Further research on the dsRNA viruses in *Armillaria* spp. proceeded in the Czech Republic with no success (11) and that is in agreement with later studies showing that viruses infecting *Armillaria* belong to the ssRNA viruses (4, 5).

In conclusion, our study describes virus with ssRNA genome that can be classified in the tentative group of

ambi-like viruses. Members of this group share highly similar single-stranded genome encoding 2-3 ORFs in ambisense orientation. They also share a similar host range. To date, in addition to AoAIV, only fifteen other ambi-like viruses have been identified, infecting exclusively fungi of the genus *Armillaria* and also *Heterobasidion parviporum*. Thus, these results together with previously discovered viruses indicate that there is huge undescribed diversity of fungal viruses in forest macrofungi. Moreover, as ambi-like viruses seem to be hosted by *Armillaria* fungi and other serious fungal pathogens, it will be important to determine biological and ecological properties of these emerging viruses in more detail. The effect of these viruses on *Armillaria* spp. or their hosts in general remains unknown and needs to be investigated in further research.

Here, the sequencing results revealed a virus with an ambisense genome infecting *A. ostoyae* and we named it *Armi-*

Ilaria ostoyae ambi-like virus. In the future, biological function of AoAlV will be under investigation due to the possible biological control of honeyfungus and further research also can expand our knowledge of the diversity and taxonomy of these mycoviruses as well as the host virus relationships. Description of the new virus may provide new insights into the taxonomy of fungal viruses. To our knowledge, this is the first report of the naturally mycovirus-infected fungal species *A. ostoyae*, the major and serious pathogen of the coniferous stands in Palearctic region.

Acknowledgments. This research was financially supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (QK1920412). Computational resources were supplied by the project "e-Infrastruktura CZ"(e-INFRA CZLM2018140) supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

References

- Holuša J, Lubojacký J, Čurn V, Tonka T, Resnerová K, Horák J., For. Ecol. Manage. 427, 434–445, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.031>
- Hollings M., Nature 196, 962–965, 1962. <https://doi.org/10.1038/196962a0>
- Ghabrial SA, Castón JR, Jiang D, Nibert ML, Suzuki N., Virology 479, 356–368, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- Sutela S, Piri T, Vainio E.J., Front. Microbiol. 12, 3337, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.770787>
- Linnakoski R, Sutela S, Coetzee MPA et al, Sci. Rep. 11, 7336, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86343-7>
- Forgia M, Isgandarli E, Aghayeva DN, Huseynova I, Turina M., Virology 553, 51–61, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.10.008>
- Sutela S, Forgia M, Vainio EJ, Chiapello M, Daghino S et al., Virus Evol. 6, veaa076, 2020. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa076>
- Kashif M, Jurvansuu J, Vainio EJ, Hantula J., Front. Cell. Infect. Microbiol. 9, 64, 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00064>
- Vainio EJ, Sutela S., Virus Res. 286, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198079>
- Blattný C, Králík O, Veselský J, Kasala B, Herzová H., Česká Mykologie 27, 1–5, 1973.
- Dvořák J., Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Diploma Thesis, 2008 (in Czech).

9 Publikace č. 3

Development of RT-PCR for rapid detection of ssRNA ambi-like mycovirus in a root rot fungi (*Armillaria* spp.).

Autoři:

Tonka T., Walterová L., Čurn V.

Publikováno:

Acta Virologica; 2022; 66; 287-289

LETTER TO THE EDITOR

Development of RT-PCR for rapid detection of ssRNA ambi-like mycovirus in a root rot fungi (*Armillaria* spp.)

Tomáš Tonka, Lucie Walterová, Vladislav Čurn

University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture and Technology, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Received December 22, 2021; revised May 19, 2022; accepted May 20, 2022

Keywords: mycovirus; molecular detection; RT-PCR; reverse transcription; identification; *Armillaria*

Mycoviruses are viruses that infect fungi mainly from hosts in phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota*. Although the majority of mycovirus infections appear to be cryptic or symptomless, some viruses affect fungal growth or reduce the virulence of their hosts (1). These days, mycoviruses are intensively studied because of their possible use in biological control against serious fungal diseases (2). Though mycoviruses are widely distributed throughout the fungal kingdom, until recently there was only one report describing mycoviruses infecting fungi of the genus *Armillaria* (3). Fungal viruses with ambisense genome described in several pathogenic fungi including *Armillaria* spp. form the virus group temporarily named ambiviruses (4, 5).

Fungi in the genus *Armillaria* are known as important pathogens of forest trees. *Armillaria ostoyae* is a highly pathogenic parasite of coniferous stands in the Palearctic region (6). An extensive survey of *Armillaria* viruses in the Czech Republic was carried out in 2019–2020 using the bioinformatic approach. However, analyses of virus sequences using NGS methods are time-consuming and costly. Therefore, the aim of this work was to develop a specific RT-PCR assay for easy identification of these

mycoviruses and to speed up the detection of ambi-like viruses (AIVs), which seem to be abundant in *Armillaria* spp.

The *Armillaria* strains were collected from different places in the Czech Republic. They were cultivated on malt extract agar and growing mycelium was used for RNA isolation. In this experiment we analyzed 9 samples/strains collected in nature (7 *A. ostoyae*, 1 *A. gallica* and 1 *A. cepistipes*) and three fungal cultures obtained from CCBAS – *A. tabescens* CCBAS213, *A. ostoyae* CCBAS215 and CCBAS325, respectively. The specific virus primers AmbiF (5'-GCTATGGCTGACTCCTCGTC-3') and AmbiR (5'-ACAGGGCAATCATTGGAGGG-3') were designed based on the assembled contigs. This primer pair has been able to detect the major ORF region, corresponding to the hypothetical protein ORFA of the AIVs, deposited in the NCBI GenBank database.

Total RNA was isolated using SPLIT RNA Extraction Kit (Lexogen GmbH, Vienna, Austria) and used as a template for RT-PCR. The complementary DNA (cDNA) was synthesized using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's protocol. The AmbiF/AmbiR primers (0.5 µl each) were mixed with 3 µl of isolated RNA, filled to 5 µl with water, incubated for 5 min at 70 °C and then cooled on ice for 5 min. After a short centrifugation, 15 µl reverse transcription reaction mix containing 4 µl reverse transcriptase buffer, 1 µl dNTP mix (0.5 mM), 0.5 µl RNase inhibitor, 4.8 µl of MgCl₂, 1 µl InProm-II RT (reverse transcriptase) was added and subsequently incubated at 25 °C for 5 min, at 42 °C for 1 h, and at 70 °C for 15 min. The PCR reaction mixture (20 µl

E-mail: ttonka@fzt.jcu.cz; phone +420 387772940.

Abbreviations: AIV(s) = ambi-like virus(es); AIV2 = ambi-like virus strain 2; AIV3 = ambi-like virus strain 3; CCBAS = Culture Collection of Basidiomycetes (Prague, Czech Republic); NGS = next generation sequencing; RT-PCR = reverse transcription PCR



Fig. 1

A neighbor-joining tree of the ALVs was generated from sequences of the hypothetical protein encoded by the ORFA aligned with MUSCLE

The tree was inferred with *Rhizoctonia solani* ambivirus 1 as an outgroup. Bootstrap values above 50% from 1000 replicates are indicated for the corresponding branches. The length of branches is proportional to the number of base changes indicated by the scale.

total volume) containing 10 µl of PPP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic), 1 µl of each primer (AmbiF/R) and 4 µl of the water was supplemented with 4 µl of cDNA. PCR reaction consisted of denaturation at 94°C for 2 min., followed by 25 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min. Final PCR products were analyzed by gel electrophoresis and positive samples were sequenced in an external laboratory (SEQme, Czech Republic).

The isolated RNA from fungal mycelium was subjected to RT-PCR assay to investigate AIV sequences in different *Armillaria* strains/species. Two positive samples, both isolated from *A. ostoyae*, marked as 411 and CCBAS325 and producing 776 bp amplicon, were sequenced and blasted against the NCBI nucleotide database. The results indicated that CCBAS325 shared 81.97% sequence identity with the AIV2 (BK014421) and sequence identity between 89.4–96.31% with AIV3 (MW423811, MW423812, MW423813). The amplicon of sample 411 shared 83.04% sequence identity with AIV2 (BK014421) and between 84.58 and 85.35 % sequence identity with strain 3 (MW423812, MW423813) at the nucleotide level. Thus, AIV sequences amplified with our designed primers were detected in the mycelium of both *A. ostoyae* samples. The sample 411 was collected in a spruce stand in 2019 and is cultivated in the laboratory. The CCBAS325 strain was isolated and deposited in culture collection in 1964 and is maintained there since then, obviously infected with the ambi-like virus for decades.

The positive nucleotide sequences were then searched against NCBI non-redundant database using blastx. The results showed that the amino acid identity of the

CCBAS325 and *Armillaria* AIV3 hypothetical protein (ORFA) was greater than 94%, while the identity of the hypothetical protein (ORFA) of sample 411 and ORFA of *Armillaria* AIV3 was below 91%. The amino acid sequences of both samples had identity below 91% (75–90%) with hypothetical proteins (ORFA) encoded in AIV genomes of *A. borealis* (Fig. 1).

We acknowledge that little is currently known about the ecology and/or host interactions of the AIVs. Despite the fact that there is also little known about the molecular and biological properties of this new putative group of viruses, our assay can now be used as a simple and fast RT-PCR test that will encourage the study of these fungal viruses. The RT-PCR method described here is rapid, reliable, and cost-effective for screening for AIV infection in *Armillaria* fungi. This method provides a useful tool for the investigation of mycoviruses within a host fungus. It is likely that with the specific detection of the AIV developed in the present work, a greater opportunity to study this group of mycoviruses will emerge.

In conclusion, we demonstrated a novel detection method for AIVs using specific RT-PCR amplification. We have verified our method through successful detection of the *Armillaria* AIV sequences from growing mycelium. This work includes only preliminary results, which can prompt studies to examine the presence of AIVs in *Armillaria* spp., to investigate the specific host-virus or virus-virus interactions as well as to further the description of incredible virus diversity.

Acknowledgment. This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic with the project QK1920412.

References

1. Xie J, Jiang D., *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 45–68, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050222>
2. García-Pedrajas MD, Cañizares MC, Sarmiento-Villamil JL et al., *Phytopathology* 109, 1828–1839, 2019. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0166-RVW>
3. Linnakoski R, Sutela S, Coetzee MPA et al., *Sci Rep* 11, 7336, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86343-7>
4. Forgia M, Isgandarli E, Aghayeva DN, Huseynova I, Turina M., *Virology* 553, 51–61, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.10.008>
5. Sutela S, Forgia M, Vainio EJ, Chiapello M et al., *Virus Evolution*, 6, veaa076, 2020. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa076>
6. Holuša J, Lubojacký J, Čurn V, Tonka T, Resnerová K, Horák J., *Forest Ecology and Management* 427, 434–445, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.01.031>

10 Publikace č. 4

Characterization of mycoviruses in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes* in the Czech Republic

Autoři:

Walterová L., Botella L., Hejna O., de la Peña M., Tonka T., Čurn V.

Publikováno:

Viruses; 2024; 16(4); 610

Brief Report

Characterization of Mycoviruses in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes* in the Czech Republic

Lucie Walterová ^{1,*}, Leticia Botella ², Ondřej Hejna ¹, Marcos de la Peña ³, Tomáš Tonka ¹ and Vladislav Čurn ¹

¹ Department of Genetics and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; hejna@fzt.jcu.cz (O.H.); ttonka@fzt.jcu.cz (T.T.); cum@fzt.jcu.cz (V.Č.)

² Department of Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic; leticia.sanchez@mendelu.cz

³ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-CSIC, 46022 Valencia, Spain; rivero@ibmcp.upv.es

* Correspondence: krizol05@jcu.cz

Abstract: Members of the genus *Armillaria* are widespread forest pathogens against which effective protection has not yet been developed. Due to their longevity and the creation of large-scale cloning of *Armillaria* individuals, the use of mycoviruses as biocontrol agents (BCAs) against these pathogens could be an effective alternative. This work describes the detection and characterization of viruses in *Armillaria* spp. collected in the Czech Republic through the application of stranded total RNA sequencing. A total of five single-stranded RNA viruses were detected in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes*, including viruses of the family *Tymoviridae* and four viruses belonging to the recently described “ambivirus” group with a circular ambisense genome arrangement. Both hammerhead (HHRz) and hairpin (HpRz) ribozymes were detected in all the ambiviricot sequences. *Armillaria* viruses were compared through phylogenetic analysis and confirmed their specific host by direct RT-PCR. One virus appears to infect both *Armillaria* species, suggesting the occurrence of interspecies transmission in nature.

Keywords: root rot; viruses; circular genetic elements; ambivirus; tymovirus; biological control



Citation: Walterová, L.; Botella, L.; Hejna, O.; de la Peña, M.; Tonka, T.; Čurn, V. Characterization of Mycoviruses in *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes* in the Czech Republic. *Viruses* **2024**, *16*, 610. <https://doi.org/10.3390/v16040610>

Academic Editor: Ioly Kotta-Loizou

Received: 18 March 2024

Revised: 8 April 2024

Accepted: 11 April 2024

Published: 15 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fungal pathogens are important members in forest ecosystems. They affect the diversity, structure and dynamics of forest communities substantially [1,2]. The fungal genus *Armillaria* includes more than 40 described species [3], which are causal agents of root rot in a wide variety of trees, shrubs and some herbs [4], including economically important conifers (e.g., *Abies*, *Picea*, *Pinus*) and agricultural crops (e.g., *Citrus*, *Juglans*, *Malus*, *Prunus*, *Vitis*) [5]. Norway spruce (*Picea abies*) is a major host of *Armillaria* in the Czech Republic. Over the last few years, Czech forests of Norway spruce seem to be suffering a generalized decline [6,7], which is enhanced by pathogenic fungi like *Armillaria* [8,9]. The decline is often caused by a combination of abiotic and biotic factors that limit tree growth, reduce foliage quality, and weaken root systems. These interactions can kill individual trees and entire stands [10,11]. Although there are relatively efficient methods for the protection of agricultural crops against *Armillaria* root rot, none of the established methods can completely eliminate the mycelium from the contaminated site [12,13]. Therefore, other strategies have to be pushed towards the development of environmentally friendly control approaches [14].

Fungal viruses (mycoviruses) of plant-interacting fungi are particularly significant for crop protection because they can influence the phenotype of their host. An increasing number of mycoviruses with the ability to induce hypovirulence in their host have been

reported [15–17]. There are important forest pathogenic fungi, such as *Cryphonectria parasitica*, *Phytophthora* spp., *Ophiostoma* spp., *Gremmeniella abietina*, *Hymenoscyphus fraxineus*, *Heterobasidion annosum* and *Armillaria* spp., which host mycoviruses with diverse fungus-virus relationships [18–20]. In *Armillaria*, early studies by Blattny (1973) [21] and Reaves et al. (1988) [22] described the presence of virus-like particles in *A. mellea* and *A. ostoyae*, but it was not until 2021 that viruses were confirmed by molecular characterization [13,23,24].

Previous research on *Armillaria* root rot fungi has identified several RNA viruses. These studies have primarily aimed to understand the diversity and impact of these viruses on *Armillaria* species, focusing on their ecological roles and potential effects on fungal virulence. To date, the virome of the genus *Armillaria* has been molecularly investigated in samples from Finland, Russia (Siberia), South Africa and Switzerland. Several positive- and negative-stranded ssRNA viruses and even two dsRNA mycoviruses have been described. Mitoviruses, oormia-like viruses, tymoviruses, phlegiviruses, ambi-like viruses, several previously unclassified (+)ssRNA and two unclassified dsRNA viruses have been described in five different *Armillaria* species (*A. mellea*, *A. borealis*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae*, *A. gallica*) [13,23,24].

The main objectives of this study were (i) to confirm the occurrence of mycoviruses in a collection of isolates of the genus *Armillaria* in Central Europe, and (ii) to describe their genomic features and phylogenetic relationships.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Armillaria isolates were collected in the years 2019–2020 in the Czech Republic, mainly in northeastern Moravia, the Moravian Karst and southeastern Bohemia (Table 1). Spores from fruiting bodies or rhizomorphs were transferred and cultured on ME agar (7.5 g bacteriological agar, 3.5 g corn agar, 10 g malt extract, 10 g glucose/0.5 L; pH 5.5) at 25 °C for approximately four weeks before being harvested. Subsequently, samples on the same ME agar were stored at 4 °C. A total of 13 samples, including *Armillaria ostoyae* and *A. cepistipes*, were cultivated and analyzed.

Table 1. Data collection of the examined *Armillaria* isolates in this study.

Isolate Code	Fungal Species	Site Coordinates	Country	Tree Host	Fungal Material	Collection Date (Day.Month.Year)
1	<i>A. cepistipes</i>	49.5147885 N, 17.5546327 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Rhizomorphs	29.9.2020
2	<i>A. ostoyae</i>	48.9813906 N, 14.4205031 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	31.10.2019
3	<i>A. ostoyae</i>	49.81582 N, 17.34951 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	27.10.2019
4	<i>A. ostoyae</i>	48.6232622 N, 14.6442581 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	16.10.2019
5	<i>A. ostoyae</i>	50.10238 N, 16.0683 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	23.10.2019
6	<i>A. ostoyae</i>	49.5226228 N, 17.5717912 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Rhizomorphs	5.9.2019
7	<i>A. ostoyae</i>	49.8084936 N, 17.4939458 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Rhizomorphs	4.8.2020
8	<i>A. ostoyae</i>	49.31372 N, 16.77221 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	23.10.2019
9	<i>A. ostoyae</i>	48.6078636 N, 14.6688486 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	21.10.2019
10	<i>A. ostoyae</i>	49.8084936 N, 17.4939458 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Rhizomorphs	4.8.2020
11	<i>A. ostoyae</i>	49.32247 N, 16.78645 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	23.10.2019
12	<i>A. ostoyae</i>	48.9815597 N, 14.4162544 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Fruiting body	4.11.2020
13	<i>A. ostoyae</i>	49.5419285 N, 17.3919515 E	Czech Republic	<i>Picea abies</i>	Rhizomorphs	14.8.2019

2.2. Isolation of Double-Stranded (ds) RNA

The samples were first examined for the presence of potential viral dsRNA molecules. Mycelium from one Petri dish was lyophilized and collected in a 50 mL Falcon tube.

Two stainless steel beads with a diameter of 10 mm and liquid nitrogen were added to the Falcon tube and mycelium was homogenized by vortexing at maximum speed (3400 RPM/approx. 2 min). After homogenization, dsRNA was extracted using protocol Morris and Dodds (1979) [25] with some modifications, as described in the work of Tonka et al. (2021) [26]. Previously confirmed dsRNA-hosting isolates of *Gremmeniella* [27] and *Phytophthora* [28] were used as the positive control of each isolation.

2.3. Isolation of Total RNA

Thirteen samples were selected for stranded total RNA sequencing analysis (Table 1). Approximately 50–100 mg of fresh mycelium was collected from the agar of each sample and transferred to the 2 mL tubes with steel beads. The tubes were immersed in liquid nitrogen and vortexed (using Labnet vortex mixer VX-200, Labnet, Edion, NJ, USA) until the mycelium was ground to a fine powder. Isolation of total RNA was performed using a SPLIT RNA Extraction Kit (Lexogen, Vienna, Austria) following the protocol provided by the manufacturer, eluted in 30 µL of EB buffer. Total RNA was visualized on an agarose gel and stored at -80°C .

2.4. Stranded Total RNA Sequencing

The isolated total RNA of 13 *Armillaria* samples was pooled into one mixed sample and treated with TURBO DNA-free TM Kit (InvitrogenTM (Waltham, MA, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)). RNA quantity was measured by Qubit[®] Fluorometer (Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Thermo Fisher Scientific). Total RNA was sent to SEQme s.r.o. (Dobris, Czech Republic) for RNA library construction and RNA sequencing. Prior to the library preparation, ribosomal RNA (rRNA) was depleted using the NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat). The library was prepared using an NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina. The quality of the prepared library was checked using an Agilent Bioanalyzer 2100 High sensitivity DNA Kit, Invitrogen Collibri Library Quantification Kit and Qubit 1X dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. A KAPA Library Quantification Kit for Illumina platform was used for absolute qPCR-based quantification of the Illumina libraries flanked by the P5 and P7 flow cell oligo sequences. Libraries underwent paired-end (PE) (2×150 nt) sequencing on a NovaSeq6000 (DS-150) (Illumina, San Diego, CA, USA) using a NovaSeq S4 v1.5 reagent kit. An “in-lane” PhiX control spike was included in each lane of the flow cell.

2.5. Bioinformatics

2.5.1. Data Preprocessing

The raw sequencing data were downloaded from the data repository of the sequencing company SEQme s. r. o. (Dobris, Czech Republic). The processing was carried out on the local server of the University of South Bohemia. In the first step, data quality was assessed using the FASTQC v.0.11.9 program [29]. This control step revealed the presence of a small number of adapter sequences. The nucleotide sequences of adapters were obtained according to the used library kit and sequencer machine mentioned earlier [30]. Adapter and quality trimming were performed using the program Cutadapt v3.4 [31] with requirements for a Phred score higher than 30 and a minimum length of the truncated sequence of 50 bases. The software is available at the code depository GitHub [32]. Subsequently, data quality of trimmed reads was again assessed in FASTQC program mentioned previously.

2.5.2. Host Reads' Removal

After preprocessing the data, it was necessary to remove reads belonging to host fungi. The STAR v2.7.9a program was used for this purpose [33]. Assembly GCA_900157425.1 version 2 of strain C18/9 of *A. ostoyae* was used as a reference sequence. After mapping the reads to the *Armillaria* genome, only unmapped reads were left for further processing.

2.5.3. Discovery of Known Virus

To reveal already known viruses, the Viral NCBI database [34] was used for this purpose. We downloaded only complete viral RefSeq nucleotide sequences. Our reads were aligned to this reference database by BWA v0.7.17.-r1188 program package [35]. In the next step, we calculated the coverage for each viral genome using Samtools kit v1.16.1 [32]. If the coverage was higher than 80 percent, we visualized the alignment for particular viral genome with IGV program v2.16.1 [36] and manually confirmed or denied the presence of the published virus.

2.5.4. Discovery of Novel Viruses

In the first step, de novo assembly was performed with unmapped reads from STAR aligner. The toolkit SPAdes version 3.15.3 [37] with default settings for metagenomics was used for this purpose. Assembled contigs shorter than 1000 bp were discarded. In the next step, the rest of contigs were compared to several databases: Viral UniProt KB [38], Viral NCBI [34], RVDB [39], Virus-Host DB [40]. Each of the databases was downloaded to a local server and was used to search for similarities between database sequences and assembled contigs. For this purpose, the program BLASTx and BLASTn v2.12.0+ was used. The threshold for the E-value was set to 1×10^{-3} . All contigs with at least one hit were further used to search for similarity with the NCBI database nr (RefSeq non-redundant proteins) or nt (RefSeq Nucleotide) specifying the *Armillaria* taxon. If a positive hit was found, the E-value values were subsequently compared. If this value was higher for the results from viral databases, the contig was removed. In the last step, the remaining contigs were searched with the entire nr and nt databases and the threshold for the E-value was set as 1×10^{-5} .

Potential protein-encoding segments were detected with a coding open reading frame (ORF) finder using Geneious® v.-8.1.9. Depth of coverage: for the calculation of the coverage depth, we used the following formula: (Total reads mapped to the final identified virus * average read length)/virus genome or contig length.

2.5.5. Ribozymes' Detection

The identification of potential ribozymes followed a customized protocol adapted from the viroid-like sequence search pipeline outlined by Lee et al. in 2023 [41]. The process began with the recognition of covalently closed circular RNAs (cccRNAs) using a modified version of the reference-free CIRIT algorithm, as introduced by Qin et al. in 2020 [42]. This algorithm entails the exploration of overlapping regions between the starting and ending points of contigs to pinpoint cccRNAs. Unlike the original algorithm, our modified version repeatedly attempted to dissect potential cccRNAs into individual units, with the condition of maintaining a minimum 95% similarity within repeated regions. Subsequently, the identified cccRNAs underwent a search for known self-cleaving ribozymes, employing Infernal, a tool introduced by Nawrocki and Eddy in 2013 [43]. Ribozymes surpassing Rfam's curated gathering threshold or exhibiting E-values below 0.1 were identified in each polarity. In addition to this, a subset of sequences underwent further scrutiny using an RNA motif, a tool developed by Macke et al. in 2001 [44]. This supplementary analysis aimed to uncover more diverse ribozymes that may not have been initially detected by Infernal.

2.6. Retro Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Sanger Sequencing

Approximately 50–100 mg of fresh mycelium was collected and crushed in a mortar. Crushed mycelium was mixed with 600 µL of lysis buffer (LB; included in the PureLink™ RNA Mini Kit) and 6 µL 2-mercaptoethanol and transferred to the 1.5 mL sterile tube. Isolation of total RNA was carried out using PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA). The RNA was eluted in 30 µL of elution buffer and 1 µL of RNase inhibitor was added. The quality of total RNA was assessed by gel electrophoresis in 1.5% agarose gel and total RNA was stored at -80°C . LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Hitchin, UK) was used for the synthesis of cDNA, as reported by Tonka (2022) [45]. The success of cDNA

synthesis was verified by amplification of the eukaryotic region translation elongation factor 1-alpha-eEF1A (tefa) and checked by gel electrophoresis in 1.5% agarose gel [46]. If the amplification was successful, the cDNA was used in a PCR reaction with virus-specific primers. The virus-specific primers were designed to partially amplify the ORFs of putative viruses based on sequencing data from RNA sequencing using program Geneious v.-8.1.9. PCR amplification was performed with 12 µL PPP Master Mix (Top-Bio, Vestec, Czech Republic) 1 µL of each 10 mM primer (Table S1), 4 µL of cDNA and PCR-grade water in a total volume of 25 µL. PCR conditions were as follows: 94 °C 2 min, 25 × (94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min) 72 °C 5 min. Due to the low concentration of putative viruses, the PCR amplification was repeated with fresh chemicals and 4 µL of resulting product from the first PCR amplification was used as a template; then, PCR products were visualized by gel electrophoresis in 1.5% agarose gel. All resulting fragments with the appropriate size were cut from the gel, cleaned using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit-Macherey-Nagel (BioTech a.s, Prague, Czech Republic), and ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), and then fragments were sent to SEQme (Dobříš, Czech Republic) for Sanger sequencing.

2.7. Conserved Domains

NCBI CD-search tool [47] was used to search for putative conserved domains in predicted amino acid (aa) sequences. All sequences were then aligned to aa sequences of related viruses retrieved from the GenBank using MUSCLE v3.8.425 in Geneious v.-8.1.9.

2.8. Phylogenetic Analyses

Amino acid (aa) sequences of RdRP regions of each virus were included in phylogenetic analyses. Sequences were aligned in Geneious v. 8.1.9 by MUSCLE v3.8.425 [48] together with known aa sequences of viruses considered to be related. Phylogenetic trees were built using the maximum likelihood method [49] in RAxML-HPC v.8 on XSEDE running in the CIPRES Science Gateway web portal [50]. Bootstrapping was performed by using the recommended parameters provided by the CIPRES Science Gateway portal. The trees were visualized in FIGTREE (V1.4.4).

3. Results and Discussion

In this study, we described the genomes of five putative single-stranded (ss) RNA viruses hosted by pathogenic fungi belonging to the genus *Armillaria* (specifically *A. ostoyae* and *A. cepistipes*) from the Czech Republic. These new viruses include a member of the family *Tymoviridae* and members of recently described virus group, tentatively named “Ambiviruses” [51–54].

3.1. dsRNA Screening

No dsRNA elements were detected in Czech isolates of *Armillaria* spp. As later demonstrated by high-throughput sequencing (HTS) of total RNA, no dsRNA viruses appear to occur in our collection of isolates. Some ssRNA viruses can produce dsRNA intermediates during their replication. However, not all ssRNA viruses generate dsRNA, and the amount produced varies among viral species. While dsRNA extraction methods can capture dsRNA, they may not effectively detect all ssRNA viruses, especially those with low dsRNA abundance. Our result agrees with that of the study of Linnakoski et al. (2021) [13], which dealt with the detection of mycoviruses in isolates of fungi of the genus *Armillaria* from Finland, Russia, and North Africa, and it also corresponds to the results of Dvořák’s work (2008) [55], which did not detect dsRNA viruses in *Armillaria* from the Czech Republic. However, Shamsi et al. (2004), in their work, report two detected mycoviruses with a dsRNA genome (a partitivirus and a phlegivirus) in samples originating from Switzerland [24]. Dvořák, in 2008 [55], and Blatný et al., in 1973 [21], studied the *Armillaria* fungi virome from the Czech Republic in their works. In his research, Dvořák (2008) [55] detected possible double-stranded molecules in forty samples from the Czech Republic, but they

were not confirmed to be viral, which coincides with the results of this study. Likewise, Blatný et al. (1973) [21] and Reaves et al. (1988) [22] detected virus-like particles in their works on *Armillaria mellea* and *Armillaria ostoyae*, but they were not further verified molecularly. Blatný et al. (1973) [21] described these particles as rod-shaped (22–28 × 119 nm) or isometric (30 nm).

3.2. Identification of ssRNA Viruses

Total RNA sequencing generated 113 million paired-end (PE) reads. After quality trimming and de novo assembly, a total of 8809 contigs longer than 1 kb were obtained. BLASTX comparison of the contigs revealed four viral contigs with sequence similarities to members of the recently described circular RNA virus group “Ambiviruses” and one related to the members of the order *Tymovirales*, in particular, the family *Tymoviridae* (Table 2).

Table 2. Mycoviruses detected in *Armillaria* samples in this study.

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

^a Accession number in GenBank. ^b Most similar viruses in GenBank (BLASTX) accession numbers: MW423812.1 (*Armillaria ambi-like virus 3*), MZ448625.1 (*Phlebiopsis gigantea ambi-like virus 2*), BK014421.1 (*Armillaria mellea ambi-like virus 2*), MW423813.1 (*Armillaria ambi-like virus 3*), MN744726.1 (*Lentinula edodes tymo-like virus 1*); Q, query cover; I, Identity; L, virus sequence length; depth of coverage was calculated by following formula: (Total reads mapped to the final identified virus * average read length)/virus genome or contig length.

Regarding ambi-like viruses, Sutela et al.’s work in 2020 [51] was the first study to describe “ambiviruses” in the endomycorrhizal fungi *Ceratobasidium* sp. and *Tulasnella* sp. Then, they were discovered in *Cryphonectria parasitica* [52] and many agaricomycetes including *Armillaria* spp. [13,24], *Heterobasidion* spp. [20], *Rhizoctonia* spp. [13], and *Phlebiopsis gigantea* [56]. As in these studies, the genomic sequences of the putative ambi-like viruses detected in Czech isolates of *Armillaria* spp. were approx. 4.5 kb long and contained typical RdRP conserved domains including the GDD motif (Figure S1A). Based on the pairwise sequence comparison (PASC) percentages (Table S2A,B), four different viruses were identified and considered different species following the same criteria as those of Sutela et al. in 2020 [51], Forgia et al. in 2021 [52] and Turina et al. in 2023 [53]

They were tentatively named considering their host identity (Table 2). AALV1, AoALV2 and AoALV3 contained two and AoALV4 contained three non-overlapping ambisense ORFs. AALV1 encodes a first positive (+) sense ORF (ORF A) corresponding to the RdRP (713 aa long) and a second negative (−) sense ORF (ORF B) corresponding to a hypothetical protein (HP) 410 aa long. AoALV2 encodes the (−) sense ORF B-HP 655 aa long, and the (+) sense ORF A-RdRP 710 aa long. AoALV3 contains first (+) sense ORF corresponding to a hypothetical protein (ORF B) 400 aa long and a second negative sense ORF (ORF A) corresponding to RdRP 682 aa long. This arrangement shows that the contig was assembled in the 3′ to 5′ orientation. AoALV4 encodes a first (−) sense ORF B-HP 405 aa long, a second negative ORF 220 aa long, and a third (+) sense ORF A-RdRP 713 aa long.

Ambivirus genomes have the unique feature of having circular genomes encoding RdRP and divergent ribozymes in various combinations in both sense and antisense orientations [54]. In our analyses, several hammerhead (HHRz) and hairpin (HpRz) ribozymes were detected. This is in agreement with the findings of Forgia et al. (2023) [54], who describe the HHRz and HpRz motifs and predicted cleavage sites in both known fungal ambiviruses and ambiviricot RdRP palmprints of 439 distinct species-like operational taxonomic units (sOTUs) found in GenBank. Although HHRz typically consists of 30 to 40 nucleotides (nts), in *Armillaria* ambiviruses, some of them seem to be slightly longer, ranging from 55 to 78 nts. The representation of *Armillaria* ambiviruses and their ribozymes is illustrated in Figure 1A–D, and the positions in the particular ambivirus contigs are shown in Supplementary Table S3.

The phylogenetic relationships of Czech *A. ostoyae* ambiviruses with other “ambiviruses” (Figure 2) show that they group in two separated virus clusters, both of them including viruses from *A. mellea* and *A. borealis*. This result suggests a monophyletic origin of the ambiviricot sequences in *Armillaria* spp.

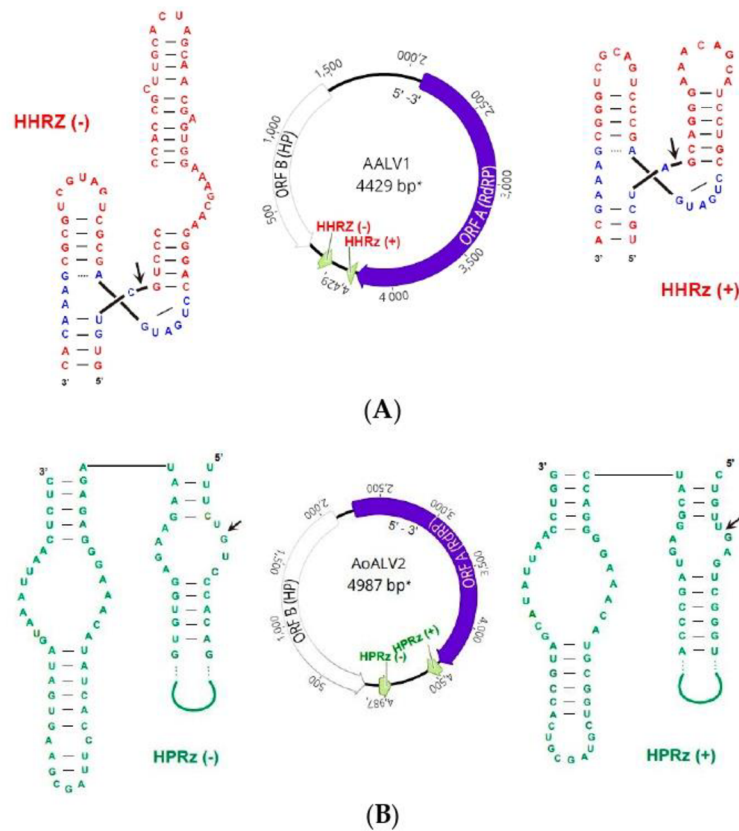


Figure 1. Cont.

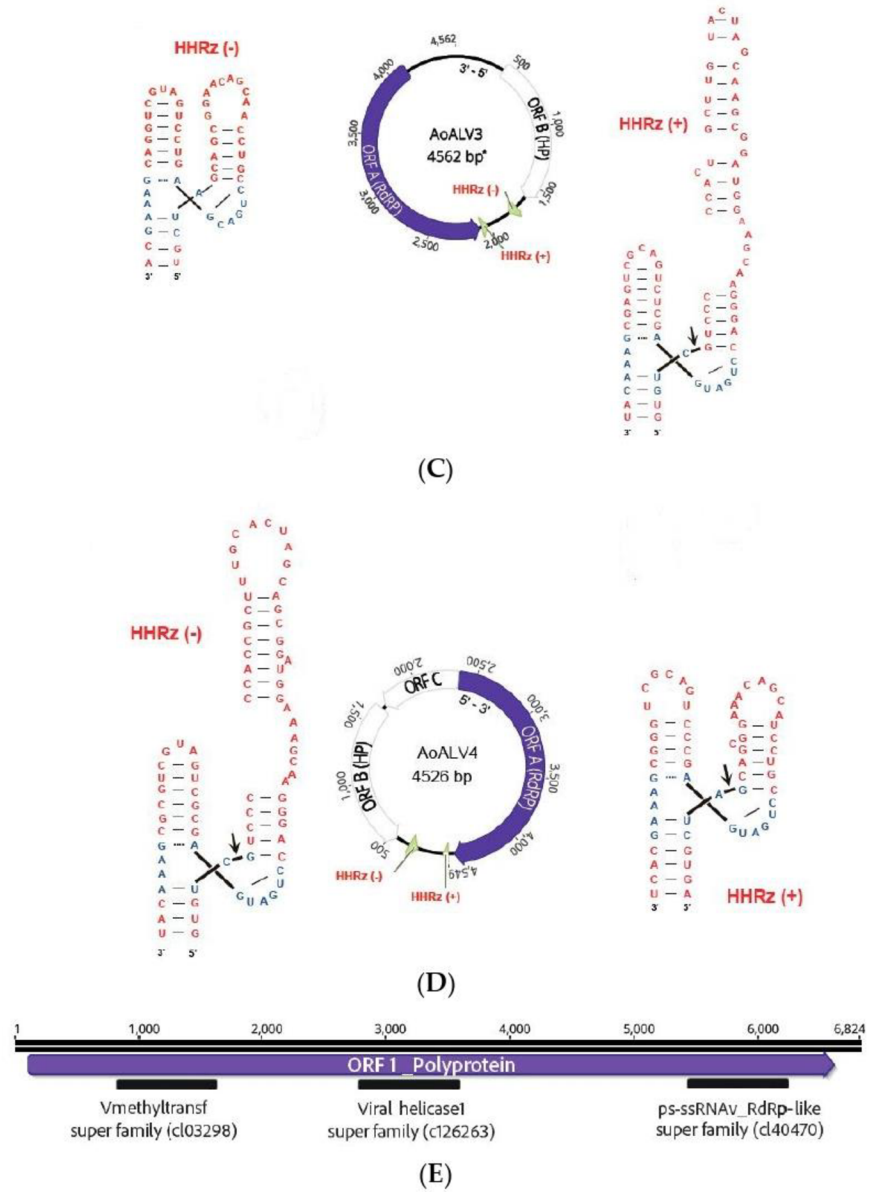


Figure 1. Schematic presentation of AALV1 (A), AoALV2 (B), AoALV3 (C) and AoALV4 (D) genomes with predicted ORFs and ribozymes (rbz) secondary structures drawn as inset; black arrows show the potential self-cleavage site at the predicted HHRz and HPRz motifs. Conserved residues are highlighted in blue; (E) schematic representation of AoTV1 genome with predicted ORF and its conserved motifs. The rbz (+) polarity is defined as the RNA strand coding for the polymerase (ORF A). * nt positions of the region spanning the ribozyme in the original virus contig. For more information of the rbz position refer to Table S3.

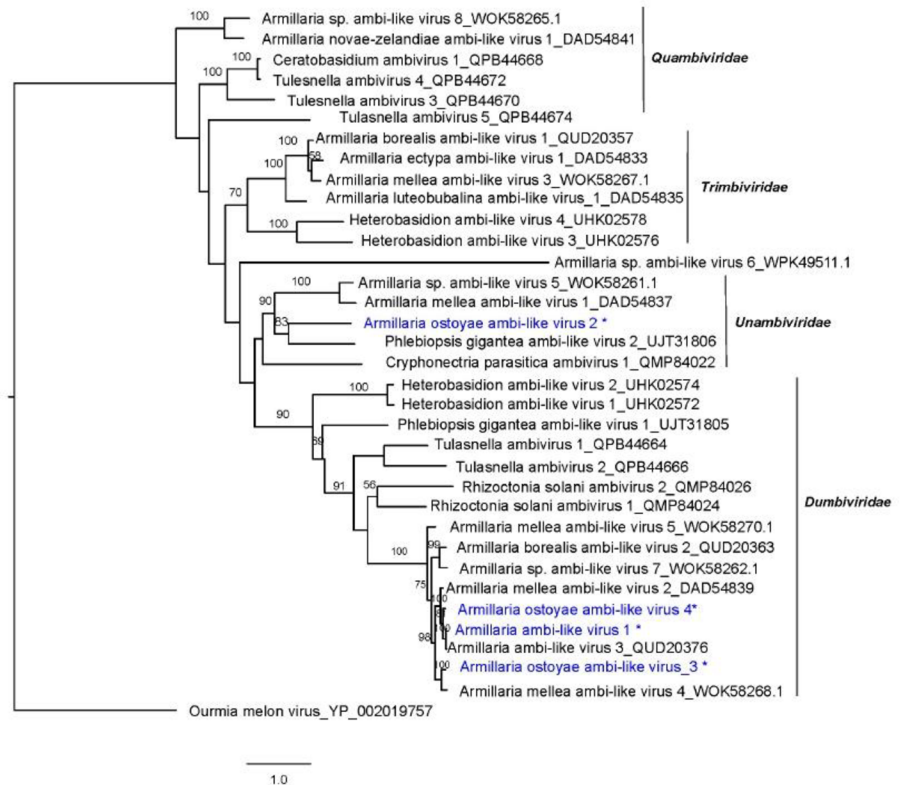


Figure 2. RAxML phylogenetic tree based on the predicted RdRp of representative ambiviruses. Nodes are labeled with bootstrap support values $\geq 50\%$. Branch lengths are scaled to the expected underlying number of amino acid substitutions per site. Tree is rooted in the midpoint and uses *Ourmia melon virus* as an outgroup. Czech *Armillaria* viruses are written in blue and indicated with an asterisk.

An *Armillaria* tymovirus 1. A viral contig resembling features of those from the genus *Tymoviridae* was detected in *Armillaria ostoyae*. *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 is approximately 6.8 kb length and encodes one (+) sense ORF with 2172 aa (Figure 1E). Based on the sequence analysis of tymoviruses, conserved sequences were revealed (Figure S1B), including conserved regions belonging to [pfam01660](#) super family Vmethyltransf [c103298](#) in region 143–314 (E-value 6.72×10^{-9}). This methyltransferase domain has been detected in a wide range of viruses and is involved in mRNA capping. Furthermore, conserved sequences were detected belonging to [pfam01443](#) superfamily Viral_helicase1 [c126263](#) located 1113–1322 (E-value 2.66×10^{-14}) and ps-ssRNAv_RdRp-like super family [c140470](#) located 1600–1799 (E-value 2.73×10^{-25}) [57].

The order *Tymovirales* was first described in 2004 and currently comprises five families: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Deltaflexiviridae*, and *Tymoviridae* [58]. Members of the order *Tymovirales* have a 5.9 to 9.0 kb (+) ssRNA genome that is often polyadenylated. The largest protein, the replication-associated polyprotein (RP), is encoded by all members of the *Tymovirales* order. *Tymovirales* RP usually contains sets of conserved functional domains [59].

Viruses belonging to this order usually have a wide range of host organisms. *Betaflexiviridae* and *Tymoviridae* are usually considered plant viruses [59], a single member of *Gammaflexiviridae* has been detected in a filamentous fungus [58,60], and *Alphaflexiviridae* have been detected both in plants and fungi [61]. Although most viruses in the order *Tymovirales* are plant viruses, several members of this order are known to infect plant pathogenic

fungi, including *Botrytis cinerea*, *Fusarium boothii*, *Fusarium graminearum*, *R. solani*, and *S. sclerotiorum* [62–66]. *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 is the second tymovirus described within the genus *Armillaria* after the study of Shami et al. (2004) [24].

The phylogenetic relationships with other members from the order *Tymovirales* from GenBank are shown in Figure 3. The phylogenetically closest virus to the virus AoTV1 is *Lentinula edodes* tymo-like virus 1, which was detected in a Chinese sample of the fungus *Lentinula edodes*.

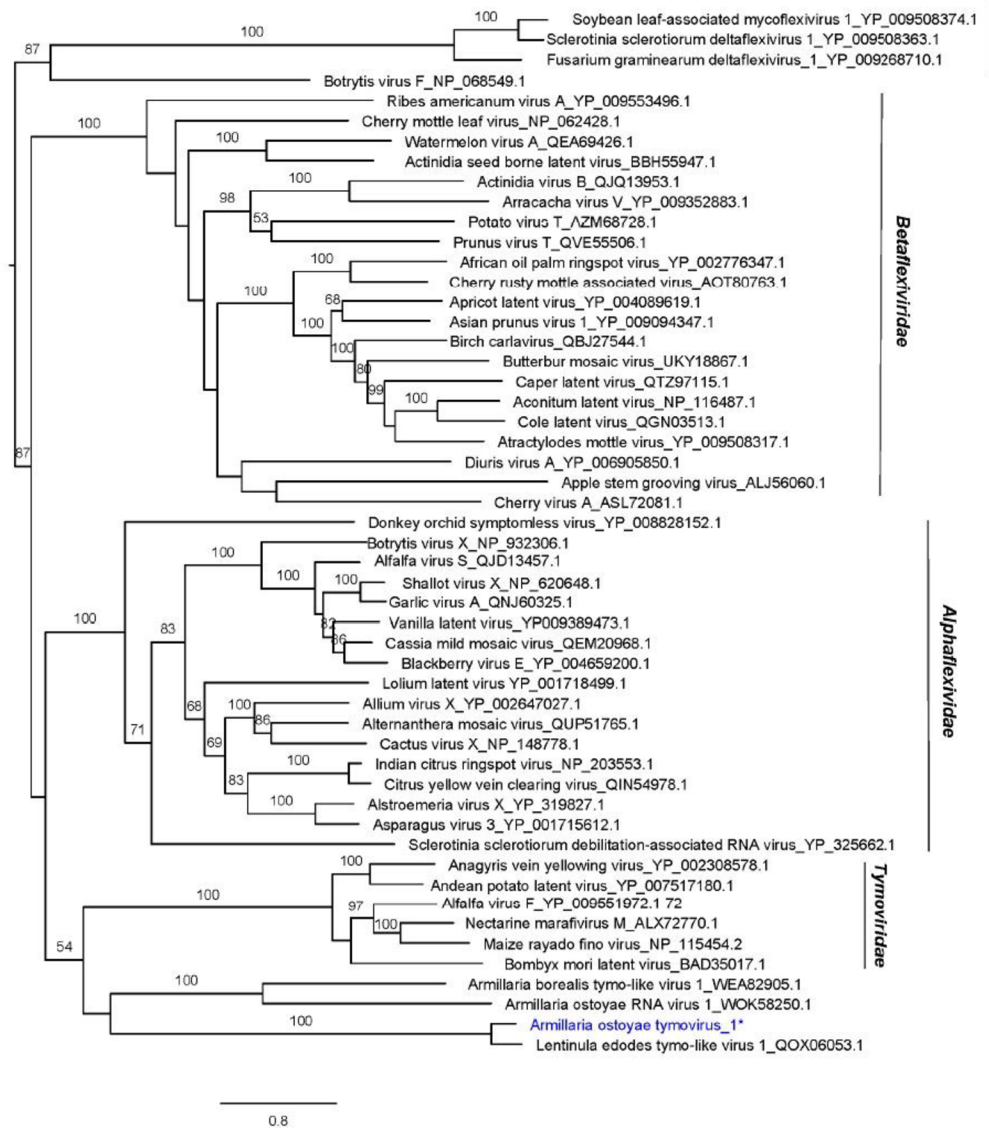


Figure 3. RAXML phylogenetic tree based on the predicted RdRP of *Armillaria ostoyae* tymovirus 1 (blue letters and *) and other members of the order *Tymovirales*. Nodes are labeled with bootstrap support values $\geq 50\%$. Branch lengths are scaled to the expected underlying number of amino acid substitutions per site.

3.3. RT-PCR Screening

Some of the viruses described in Czech isolates of *Armillaria* (Figure 1) are hosted by more than one isolate, and even by different species, suggesting interspecies transmission. AALV1 is present in isolate 1 (*Armillaria cepistipes*) and in isolate 7 (*A. ostoyae*), AoALV2 was detected just in isolate 7 (*A. ostoyae*), AoALV3 is present in isolates 7 and 13 (*A. ostoyae*), AoALV4 in isolates 6, 7, 8 and 13 (*A. ostoyae*), and AoTV1 was detected just in isolate 13 (*A. ostoyae*; Figure S2). Interestingly, isolates 1 and 7, between which virus interspecies transmission has occurred, were collected at localities approximately 50 km apart. These results suggest that ambiviruses are transmitted efficiently in *Armillaria* in the Czech Republic, as seems to happen in other regions of the Northern hemisphere [13,24], where ambi-like viruses have been found to be very common in *Armillaria* isolates and occur often in *A. borealis* and *A. mellea* from Finland, Siberia, and Switzerland. This efficiency could also be related to the fact that members of the genus *Armillaria*, as well as other fungi causing tree root rot, such as *Heterobasidion* spp. or *Rosellinia necatrix*, usually form large clonal individuals that grow for decades. It can therefore be considered that virus accumulation and interspecies transmission of mycoviruses are considered rather rare. However, laboratory experiments have shown that these are possible within the fungal genera *Aspergillus* [67], *Sclerotinia* [68] and *Cryphonectria* [69]. In vitro studies have shown mycovirus transmissions between somatically incompatible fungal strains of *Heterobasidion* [70–72], being relatively common in both the laboratory and in nature.

4. Conclusions

Our study confirms the presence of one tymovirus and five “ambiviruses” infecting Czech populations of *A. ostoyae* and *A. cepistipes*. Their potential effect on infected *Armillaria* hosts and their ability to be transmitted intra- and interspecies should be further investigated.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v16040610/s1>, Figure S1. A, Amino acid alignment of ambi-like viruses described in this study and related members. B, Amino acid alignment of *Armillaria* tymovirus described in this study and related members. Figure S2. Resulting RT-PCR gels. Table S1: List of primers used for direct virus RT-PCR detection. Table S2. A, pairwise sequence comparison (PASC) percentages (%) based on nucleotide sequence of ambi-like viruses hosted by *Armillaria cepistipes* and *A. ostoyae*. B, PASC % based on RdRP amino acid (aa) sequence of ambi-like viruses hosted by *Armillaria cepistipes* and *A. ostoyae*. Table S3: Types and genomic position of the ribozymes detected in *Armillaria* ambiviruses.

Author Contributions: Conceptualization, L.B. and T.T.; methodology, L.W., L.B. and T.T.; software, O.H.; validation and analysis, L.B., T.T., L.W. and M.d.l.P.; writing and editing, L.W., L.B., O.H. and T.T.; visualization, L.B., L.W. and M.d.l.P.; project administration, T.T.; funding acquisition, L.B., T.T., V.Č. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, project QK1920412 and University of South Bohemia, project GAJU 080/2022/Z.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its Supplementary Information files.

Acknowledgments: This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic with the project QK1920412. Computational resources were supplied by the project “e-InfrastrukturaCZ” (e-INFRA CZ LM2018140) supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

- Hansen, E.M.; Goheen, E.M. *Phellinus weirii* and other native root pathogens as determinants of forest structure and process in Western North America. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2000**, *38*, 515–539. [CrossRef] [PubMed]
- Gilbert, G.S. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2002**, *40*, 13–43. [CrossRef] [PubMed]
- Coetzee, M.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. Armillaria root-rot pathogens: Species boundaries and global distribution. *Pathogens* **2018**, *7*, 83. [CrossRef] [PubMed]
- Williams, R.E.; Shaw, C.G.; Wargo, P.M.; Sites, W.H. Armillaria Root Disease. In *Forest Insect and Disease Leaflet 78*; U.S. Department of Agriculture Forest Service: Radnor, PA, USA, 1986.
- Baumgartner, K.; Coetzee, M.; Hoffmeister, D. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Mol. Plant Pathol.* **2011**, *12*, 515–534. [CrossRef] [PubMed]
- Holuša, J.; Lubojacký, J.; Čurn, V.; Tonka, T.; Resnerová, K.; Horák, J. Combined effects of drought stress and *Armillaria* infection on tree mortality in Norway spruce plantations. *For. Ecol. Manag.* **2018**, *427*, 434–445. [CrossRef]
- Cienciala, E.; Tumaier, J.; Zatloukal, V.; Beranová, J.; Holá, Š.; Hůnová, L.; Russ, R. Recent spruce decline with biotic pathogen infestation as a result of interacting climate, deposition and soil variables. *Eur. J. Forest. Res.* **2017**, *136*, 307–317. [CrossRef]
- Turčáni, M. Podiel podkorneho hmyzu na hynutí smrekových porastov postihnutých žltnutím. In *Aktuálne Problémy v Ochrane Lesa*; Zúbrik, M., Ed.; Lesnícký Výskumný Ústav: Banská Štiavnica, Slovakia, 2001; pp. 56–60.
- Jankovský, L. Role houbových patogenů v chřadnutí smrku. In *Collection of Lectures of the Professional Seminar Budišov Nad Budišovkou*; Research Institute of Forestry and Hunting: Budišov and Budišovkou, Czech Republic, 2014; pp. 20–30.
- Garcia, O. A simple and effective forest stand mortality model. *Math. Comput. For. Nat.-Resour. Sci.* **2009**, *1*, 1–9.
- Van Mantgem, P.J.; Stephenson, N.L.; Byrne, J.C.; Daniels, L.D.; Franklin, J.F.; Fulé, P.Z.; Harmon, M.E.; Larson, A.J.; Smith, J.M.; Taylor, A.H.; et al. Widespread increase of tree mortality rates in the western United States. *Science* **2009**, *323*, 521–524. [CrossRef] [PubMed]
- Cleary, M.R.; Arhipova, N.; Morrison, D.J.; Thomsen, I.M.; Sturrock, R.N.; Vasaitis, R.; Gaitnieks, T.; Stenlid, J. Stump removal to control root disease in Canada and Scandinavia: A synthesis of results from long-term trial. *For. Ecol. Manag.* **2013**, *290*, 5–14. [CrossRef]
- Linnakoski, R.; Sutela, S.; Coetzee, M.P.A.; Duong, T.A.; Pavlov, I.N.; Litovka, Y.A. Armillaria root rot fungi host single-stranded RNA viruses. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7336. [CrossRef]
- Prospero, S.; Botella, L.; Santini, A.; Robin, C. Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality? *For. Ecol. Manag.* **2021**, *496*, 119377. [CrossRef]
- Nuss, D.L. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 632–642. [CrossRef] [PubMed]
- García-Pedrajas, M.D.; Cañizares, M.C.; Sarmiento-Villamil, J.L.; Jacquat, A.G.; Dambolena, J.S. Mycoviruses in Biological Control: From Basic Research to Field Implementation. *Phytopathology* **2019**, *109*, 1828–1839. [CrossRef]
- Tonka, T.; Walterová, L.; Čurn, V. Biological control of pathogenic fungi: Can mycoviruses play an important role? *J. Cent. Eur. Agric.* **2022**, *23*, 540–551. [CrossRef]
- Muñoz-Adalia, E.J.; Fernández, M.M.; Diez, J.J. The use of mycoviruses in the control of forest diseases. *Biocontrol Sci. Technol.* **2016**, *26*, 577–604. [CrossRef]
- Vainio, E.J.; Jurvansuu, J.; Hyder, R.; Kashif, M.; Piri, T.; Tuomivirta, T.; Poimala, A.; Xu, P.; Mäkelä, S.; Nitisa, D.; et al. Heterobasidion partitivirus 13 mediates severe growth debilitation and major alterations in the gene expression of a fungal forest pathogen. *J. Virol.* **2018**, *92*, 1744. [CrossRef]
- Sutela, S.; Piri, T.; Vainio, E.J. Discovery and community dynamics of novel ssRNA mycoviruses in the conifer pathogen *Heterobasidion parviporum*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 770787. [CrossRef] [PubMed]
- Blattny, C.; Kralik, O.; Veselsky, J.; Kasala, B.; Herzova, H. Particles resembling virions accompanying the proliferation of Agaric mushrooms. *Česká Mykol.* **1973**, *27*, 1–5.
- Reaves, J.L.; Allen, T.C.; Shaw, C.G.; Dashek, W.V.; Mayfield, J.E. Occurrence of virus like particles in isolates of *Armillaria*. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **1988**, *98*, 217–221. [CrossRef]
- Tonka, T.; Walterová, L.; Hejna, O.; Čurn, V. Molecular characterization of a ssRNA mycovirus isolated from the forest pathogenic fungus *Armillaria ostoyae*. *Acta Virol.* **2022**, *66*, 290–294. [CrossRef]
- Shamsi, W.; Heinzelmann, R.; Ulrich, S.; Kondo, H.; Cornejo, C. Decoding the RNA virome of the tree parasite *Armillaria* provides new insights into the viral community of soil-borne fungi. *Environ. Microbiol.* **2024**, *26*, e16583. [CrossRef] [PubMed]
- Morris, T.J.; Dodds, J.A. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* **1979**, *69*, 854. [CrossRef]
- Tonka, T.; Walterová, L.; Hejna, O.; Čurn, V. *Metodika Identifikace, Determinace a Přenosu Mykovirů u Hub Rodu Armillaria*; University of South Bohemia in České Budějovice: České Budějovice, Czech Republic, 2021; ISBN 978-80-7394-891-7.
- Botella, L.; Dvořák, M.; Capretti, P.; Luchi, N. Effect of temperature on GaRV6 accumulation and its fungal host, the conifer pathogen *Gremmeniella abietina*. *For. Pathol.* **2017**, *47*, 12291. [CrossRef]
- Botella, L.; Jung, T. Multiple viral infections detected in *Phytophthora condilina* by total and small RNA sequencing. *Viruses* **2021**, *13*, 620. [CrossRef] [PubMed]
- Andrews, S. Babraham Bioinformatics—FastQC. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. *Soil.* **2010**. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (accessed on 26 May 2023).

30. Illumina Adapter Sequences. Available online: <https://emea.support.illumina.com/downloads/illumina-adapter-sequences-document-100000002694.html> (accessed on 26 May 2023).
31. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. 2012. Available online: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable> (accessed on 26 May 2023).
32. GitHub. Available online: <https://github.com/marcelm/cutadapt> (accessed on 27 May 2023).
33. Dobin, A.; Davies, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Sonali, J.; Philippe, B.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Viral NCBI. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/> (accessed on 29 May 2023).
35. Burrows-Wheeler Aligner. Available online: <https://bio-bwa.sourceforge.net/> (accessed on 27 May 2023).
36. IGV. Available online: <https://software.broadinstitute.org/software/igv/> (accessed on 27 May 2023).
37. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Pribelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Viral UniProtKB. Available online: <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=10239> (accessed on 29 May 2023).
39. RVDDB. Available online: <https://rvdb.dbi.udel.edu/> (accessed on 29 May 2023).
40. Virus-Host DB. Available online: <https://www.genome.jp/virushostdb/> (accessed on 29 May 2023).
41. Lee, B.D.; Neri, U.; Roux, S.; Wolf, Y.I.; Camargo, A.P.; Krupovic, M.; Simmonds, P.; Kyrpides, N.; Gophna, U.; Dolja, V.V.; et al. Mining metatranscriptomes reveals a vast world of viroid-like circular RNAs. *Cell* **2023**, *186*, 646–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Qin, Y.; Xu, T.; Lin, W.; Jia, Q.; He, Q.; Liu, K.; Du, J.; Chen, L.; Yang, X.; Du, F.; et al. Reference-free and de novo Identification of Circular RNAs. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
43. Nawrocki, E.P.; Eddy, S.R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 2933–2935. [[CrossRef](#)]
44. Macke, T.J.; Ecker, D.J.; Gutell, R.R.; Gautheret, D.; Case, D.A.; Sampath, R. RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 4724–4735. [[CrossRef](#)]
45. Tonka, T.; Walterová, L.; Čurn, V. Development of RT-PCR for rapid detection of ssRNA ambi-like mycovirus in a root rot fungi (*Armillaria* spp.). *Acta Virol.* **2022**, *66*, 287–289. [[CrossRef](#)]
46. Čurn, V.; Tonka, T.; Křížová, L.; Jozová, E. *Metodika Izolace DNA Analýzy Molekulárních Markerů u Hub*; University of South Bohemia in České Budějovice: České Budějovice, Czech Republic, 2019; ISBN 978-80-7394-781-1.
47. NCBI CD-Search Tool. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (accessed on 27 May 2023).
48. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Stamatakis, A.; Hoover, P.; Rougemont, J.; Diego, S.; Jolla, L. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* **2008**, *57*, 758–771. [[CrossRef](#)]
50. Miller, M.A.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the 2010 Gateway Computing Environments Workshop, New Orleans, LA, USA, 14 November 2010. [[CrossRef](#)]
51. Sutela, S.; Forgia, M.; Vainio, E.J.; Chiapello, M.; Daghino, S.; Vallino, M.; Martino, E.; Girlanda, M.; Perotto, S.; Turina, M. The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. *Virus Evol.* **2020**, *6*, 76. [[CrossRef](#)]
52. Forgia, M.; Isgandarli, E.; Aghayeva, D.N.; Huseynova, I.; Turina, M. Virome characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates from Azerbaijan unveiled a new myonavirus and a putative new RNA virus unrelated to described viral sequences. *Virology* **2021**, *553*, 51–61. [[CrossRef](#)]
53. Turina, M.; Lee, B.D.; Sabanadzovic, S.; Vainio, E.J.; Navarro, B.; Simmonds, P. 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*). ICTV TaxoProp 2023.007F. 2023. Available online: <https://ictv.global/files/proposals/pending?fid=11741#block-teamplus-page-title> (accessed on 27 May 2023).
54. Forgia, M.; Navarro, B.; Daghino, S.; Cervera, A.; Gisel, A.; Perotto, S.; Aghayeva, D.N.; Akinyuwa, M.F.; Gobbi, E.; Zheludev, I.N.; et al. Hybrids of RNA viruses and viroid-like elements replicate in fungi. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 2591. [[CrossRef](#)]
55. Dvořák, J. Výskyt RNA Elementů u Rodu *Armillaria*. Master’s Thesis, Charles University, Prague, Czech Republic, 2008.
56. Drenkhan, T.; Sutela, S.; Veeväli, V.; Vainio, E.J. Phlebiopsis gigantea strains from Estonia show potential as native biocontrol agents against *Heterobasidion* root rot and contain diverse dsRNA and ssRNA viruses. *Biol. Control* **2022**, *167*, 104837. [[CrossRef](#)]
57. 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.; et al. CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D265–D268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Adams, M.J.; Kreuze, J.F.; Martelli, G.P. Tymovirales. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*; Elsevier: Waltham, MA, USA, 2011; pp. 901–903.
59. King, A.M.Q.; Michael, J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*; American Press/Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012.
60. Howitt, R.L.; Beever, R.E.; Pearson, M.N.; Forster, R.L. Genome characterization of botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant ‘potex-like’ viruses. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 67–78. [[CrossRef](#)]

61. Adams, M.J.; Candresse, T.; Hammond, J.; Kreuze, J.F.; Martelli, G.P.; Mamba, S.; Pearson, M.N.; Ryu, K.H.; Vaira, A.M. Alphaflexiviridae. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*; Elsevier: Waltham, MA, USA, 2011; pp. 904–919. [[CrossRef](#)]
62. Howitt, R.L.; Beever, R.E.; Pearson, M.N.; Forster, R.L. Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, botrytis virus X, reveals high amino acid identity to genes from plant ‘potex-like’ viruses. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 563–579. [[CrossRef](#)]
63. Li, K.; Zheng, D.; Cheng, J.; Chen, T.; Fu, Y.; Jiang, D.; Xie, J. Characterization of a novel *Sclerotinia sclerotiorum* RNA virus as the prototype of a new proposed family within the order *Tymovirales*. *Virus Res.* **2016**, *219*, 92–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Li, P.; Lin, Y.; Zhang, H.; Wang, S.; Qiu, D.; Guo, L. Molecular characterization of a novel mycovirus of the family *Tymoviridae* isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* **2016**, *489*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bartholomaeus, A.; Wibberg, D.; Winkler, A.; Puhler, A.; Schluter, A.; Varrelmann, M. Identification of a novel mycovirus isolated from *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IV) provides further information about genome plasticity within the order *Tymovirales*. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 555–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Mizutani, Y.; Abraham, A.; Uesaka, K.; Kondo, H.; Suga, H.; Suzuki, N.; Chiba, S. Novel mitoviruses and a unique tymo-like virus in hypovirulent and virulent strains of the *Fusarium* head blight fungus, *Fusarium boothii*. *Viruses* **2018**, *10*, 584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Coenen, A.; Kevei, F.; Hoekstra, R.F. Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* **1997**, *69*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Melzer, M.S.; Ikeda, S.S.; Boland, G.J. Interspecific transmission of double-stranded RNA and hypovirulence from *Sclerotinia sclerotiorum* to *S. minor*. *Phytopathology* **2002**, *92*, 780–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Liu, Y.; Linder-Basso, D.; Hillman, B.; Kaneko, S.; Milgroom, M.G. Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. *Mol. Ecol.* **2003**, *12*, 1619–1628. [[CrossRef](#)]
70. Ihrmark, K.; Johannesson, H.; Stenström, E.; Stenlid, J. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genet. Biol.* **2002**, *36*, 147–154. [[CrossRef](#)]
71. Vainio, E.J.; Korhonen, K.; Tuomivirta, T.T.; Hantula, J. A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. *Fungal Biol.* **2010**, *114*, 955–965. [[CrossRef](#)]
72. Vainio, E.J.; Hakanpää, J.; Dai, Y.C.; Hansen, E.; Korhonen, K.; Hantula, J. Species of *Heterobasidion* host a diverse pool of partitiviruses with global distribution and interspecies transmission. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 1234–1243. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

11 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 popsány mi 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 václavek 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.

12 Seznam použité literatury:

- Anagnostakis, S. L. (2016). *Cryphonectria parasitica*. Genetics of Plant Pathogenic Fungi, 123.
- Anderson, J.B. a Stasovski, E. (1992). Molecular Phylogeny of Northern Hemisphere Species of *Armillaria*. Mycologia, 84(4):505-516.
- 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>.
- Antonín, V. a Bieberová, Z. (1995). Chráněné houby ČR. První vydání. MŽP ČR a Agentura OPK ČR, Praha. ISBN 80-85368-77-3.
- Antonín, V., Tomšovský, M., Sedlák, P., Májek, T., Jankovský, L. (2009). Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes*–*A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia. Mycological Progress, 8, 259-271.
- Antonín, V. a Tomšovský, M. (2010). Václavky – známé neznámé houby. Živa, 6, 254-255.
- 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., Pribelski, 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>.
- Baumgartner, K., Coetzee, M. P., Hoffmeister, D. (2011). Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. Molecular Plant Pathology, 12(6), 515-534.
- 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.
- Boland, G. J. (1992). Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia sclerotiorum*, Canadian Journal of Plant Pathology, 14 (1), 10-17.
- Bozarth, R.F. (1972). Mycoviruses: A new dimension in microbiology. Environmental Health Perspectives. Washington D.C.: United States Department of Health, Education and Welfare, 23-39
- Bozarth, R.F. (1979). The physicochemical properties of mycoviruses. Viruses and Plasmids in Fungi, 43-91.
- Castro, M., Kramer, K., Valdivia, L., Ortiz, S., Castillo, A. (2003). A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters, 228(1), 87-91.

- Cienciala, E., Tumajer, J., Zatloukal, V., Beranová, J., Holá, Š., Hůnová, I., Russ, R. (2017). Recent spruce decline with biotic pathogen infestation as a result of interacting climate, deposition and soil variables. *European Journal of Forest Research*, 136, 307-317.
- Cleary, M. R., Arhipova, N., Morrison, D. J., Thomsen, I. M., Sturrock, R. N., Vasaitis, R., a kol. (2013). Stump removal to control root disease in Canada and Scandinavia: A synthesis of results from long-term trials. *Forest Ecology and Management*, 290, 5-14.
- Coetzee, M. P., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. (2018). *Armillaria* root-rot pathogens: species boundaries and global distribution. *Pathogens*, 7(4), 83.
- Cox, K. D., Scherm, H. A. R. A. L. D., Beckman, T. G. (2004). *Armillaria* root and crown rot. *Southeastern Peach Growers Handbook*, Cooperative Extension Service, University of Georgia. Athens, Georgia, US, 162-166.
- Čurn V., Tonka T., Křížová L., Jozová E. (2019): Metodika izolace a DNA analýzy molekulárních markerů u hub, České Budějovice
- Darissa, O., Adam, G., Schäfer, W. (2012). A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. *European journal of plant pathology*, 134, 181-189.
- Dawe, A. L., a Nuss, D. L. (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual review of genetics*, 35(1), 1-29.
- Deakin, G., Dobbs, E., Bennett, J. M., Jones, I. M., Grogan, H. M., a Burton, K. S. (2017). Multiple viral infections in *Agaricus bisporus*-Characterisation of 18 unique RNA viruses and 8 ORFans identified by deep sequencing. *Scientific Reports*, 7(1), 2469.
- 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. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- Domingo, E. J. J. H., a Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology*, 51(1), 151-178.
- Djernæs, M., a Damgaard, J. (2006). Exon-intron structure, paralogy and sequenced regions of elongation factor-1 alpha in Hexapoda. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 64(1), 45-52.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., a Ball, L. A. (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.

- Forgia, M., Isgandarli, E., Aghayeva, D. N., Huseynova, I., a Turina, M. (2021). Virome characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates from Azerbaijan unveiled a new mymovirus 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., a kol. (2022). Extant hybrids of RNA viruses and viroid-like elements. *bioRxiv*, 2022-08.
- Gao, L. W., Li, W. Y., Zhao, Y. L., a Wang, J. W. (2009). The cultivation, bioactive components and pharmacological effects of *Armillaria mellea*. *African journal of biotechnology*, 8(25).
- García-Arenal, F., Fraile, A., a Malpica, J. M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 157-186.
- García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., a Dambo-lena, J. S. (2019). Mycoviruses in biological control: From basic research to field implementation. *Phytopathology*, 109(11), 1828-1839.
- Geiser, D. M., Pitt, J. I., a Taylor, J. W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 388-393.
- Gezahgne, A., Coetzee, M. P. A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., a Roux, J. (2004). Identification of the *Armillaria* root rot pathogen in Ethiopian plantations. *Forest Pathology*, 34(3), 133-145.
- Ghabrial, S. A. (1980). Effects of fungal viruses on their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 441-461.
- Ghabrial, S.A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*. 16(1):119–131.
- Ghabrial, S. A., a Suzuki, N. (2008). Fungal viruses. In *Encyclopedia of virology*. 284-291.
- Ghabrial, S. A., a Suzuki, N. (2009). Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 47, 353-384.
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., a Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 479, 356-368.
- Gillings, M. R., Tesoriero, L. A., a Gunn, L. V. (1993). Detection of double-stranded RNA and virus-like particles in Australian isolates of *Pythium irregulare*. *Plant Pathology*, 42(1), 6-15.
- Göker, M., Scheuner, C., Klenk, H. P., Stielow, J. B., a Menzel, W. (2011). Codivergence of mycoviruses with their hosts. *PLoS One*, 6(7).
- Goswami, R. S., a Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 5(6), 515-525.

- Guo, T., Wang, H. C., Xue, W. Q., Zhao, J., a Yang, Z. L. (2016). Phylogenetic analyses of *Armillaria* reveal at least 15 phylogenetic lineages in China, seven of which are associated with cultivated *Gastrodia elata*. *PLoS One*, 11(5).
- Hacker, C. V., Brasier, C. M., a Buck, K. W. (2005). A double-stranded RNA from a *Phytophthora* species is related to the plant endornaviruses and contains a putative UDP glycosyltransferase gene. *Journal of general virology*, 86(5), 1561-1570.
- Hadibarata, T., a Kristanti, R. A. (2015). Biotransformation studies on fluoranthene, a four-ring polycyclic aromatic hydrocarbon, by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 3, 45-50.
- Hansen, E. M., a Goheen, E. M. (2000). *Phellinus weirii* and other native root pathogens as determinants of forest structure and process in western North America. *Annual review of phytopathology*, 38(1), 515-539.
- 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.
- Heffer Link, V., a Johnson, K. B. (2007). White mold. The plant health instructor. doi: 10.1094.
- Heiniger, U., a Rigling, D. (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 581-599.
- Herrero, N., Sánchez Márquez, S., Zabalgoceazcoa, I. (2009) Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. *Archives of Virology*, 154, 327–330.
- Herrero, N., Dueñas, E., Quesada-Moraga, E., Zabalgoceazcoa, I. (2012). Prevalence and diversity of viruses in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and environmental microbiology*, 78 (24), 8523–8530.
- Herrero, N. A., Sánchez Márquez, S., Zabalgoceazcoa, I. (2013) Mycovirus effect on the endophytic establishment of the entomopathogenic fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in tomato and bean plants. *Biocontrol*, 58, 225–232.
- Holec, J. a Beran, M. (2006). Červený seznam hub (makromycetů) České republiky. 24. vydání. Příroda, Praha. ISBN 80-87051-02-5.
- Hollings, M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature*, 196(4858), 962-965.
- Holuša, J., Lubojacký, J., Čurn, V., Tonka, T., Lukášová, K., & Horák, J. (2018). Combined effects of drought stress and *Armillaria* infection on tree mortality in Norway spruce plantations. *Forest Ecology and Management*, 427, 434-445.

- Hillman, B. I., Supyani, S., Kondo, H., Suzuki, N. (2004) A reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the coltivirus genus of animal pathogens. *Journal of Virology*, 78 (2), 892-898.
- Hillman, B. I., Annisa, A., Suzuki, N. (2018) Viruses of Plant-Interacting Fungi. *Advances in Virus Research*, 100, 99-116.
- Howitt, R. L., Beever, R. E., Pearson, M. N., a Forster, R. L. (2001). Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like'viruses. *Journal of General Virology*, 82(1), 67-78.
- Howitt, R. L. J., Beever, R. E., Pearson, M. N., a Forster, R. L. S. (2006). Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, Botrytis virus X, reveals high amino acid identity to genes from plant 'potex-like'viruses. *Archives of virology*, 151, 563-579.
- Charles, G., Shaw, C. G., a Kile, G. A. (1991). *Armillaria* root disease (No. 691). Forest Service, US Department of Agriculture.
- Chiba, S. a kol. (2009). A novel bipartite double-stranded RNA Mycovirus from the white root rot Fungus *Rosellinia necatrix*: molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. *Journal of Virology*, 83 (24), 12801-12812.
- Chong, L. C., a Lauber, C. (2023). Viroid-like RNA-dependent RNA polymerase-encoding ambiviruses are abundant in complex fungi. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1144003.
- Ihrmark, K., Stenström, E., a Stenlid, J. (2004). Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*, 108(2), 149-153.
- Jančařík, V., a Jankovský, L. (1999). Václavka stále aktuální. *Lesnická práce*, 78(9), 25-31.
- Jankovský, L. (1997). Biology of *Armillaria* sp.: Ecology and phytopathology of *Armillaria* species. Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta.
- Jankovský, L. a Scháněl, L. (1997). Význam a možnosti využití dřevokazných hub při biologickém odbourávání látek v lese. Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta.
- Jankovsky, L. (2003). Distribution and ecology of *Armillaria* species in some habitats of southern Moravia, Czech Republic. *Czech Mycology*, 55, 173-186.
- Jankovský, L. (2014). Role houbových patogenů v chřadnutí smrku. Chřadnutí smrku v oblasti severní a střední Moravy. Sborník přednášek odborného semináře, Budišov nad Budišovkou, 14(2014), 20-30.
- Jillian, M. a kol. (2022). Mycoviruses. *Current Biology*, 32, 141–157.
- Jiang, D., Fu, Y., Guoqing, L., Ghabrial, S. A. (2013) Viruses of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Advances in Virus Research*, 86, 215-248.

- Kausserud, H. a Schumacher, T. (2003). Ribosomal DNA variation, recombination and inheritance in the basidiomycete *Trichaptum abietinum*: implications for reticulate evolution. *Heredity*, 91:163-172.
- Kim, M. S., Klopfenstein, N. B., Hanna, J. W., a McDonald, G. I. (2006). Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. *Forest Pathology*, 36(3), 145-164.
- Kim, M. S., Hanna, J. W., McDonald, G. I., a Klopfenstein, N. B. (2023). *Armillaria altimontana* in North America: Biology and Ecology. *Journal of Fungi*, 9(9), 904.
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., a Carstens, E. B. (Eds.). (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Vol. 9)*. Elsevier.
- Klán (1989). *Co víme o houbách*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Knižnice mládeže (SPN). ISBN 80-04-21143-7.
- Knížek, M. a Liška, J. (2020). Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2019 a jejich očekávaný stav v roce 2020. *Zpravodaj ochrany lesa Supplementum*, 4, 51-61.
- Knížek, M. a Liška, J. (2021). Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2020 a jejich očekávaný stav v roce 2021. *Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti. Zpravodaj ochrany lesa Supplementum 2021*, 76.
- Koch, R. A., a Herr, J. R. (2021). Global distribution and richness of *Armillaria* and related species inferred from public databases and amplicon sequencing datasets. *Frontiers in Microbiology*, 12, 733159.
- Kondo, H., Botella, L., a Suzuki, N. (2022). Mycovirus diversity and evolution revealed/inferred from recent studies. *Annual Review of Phytopathology*, 60, 307-336.
- Kotta-Loizou, I., Coutts, R. H. A. (2017) Mycoviruses in *Aspergilli*: A Comprehensive Review. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1699.
- Kotta-Loizou, I. (2021). Mycoviruses and their role in fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 63, 10-18.
- Křístek, J. a Urban, J. (2013). *Lesnická entomologie*, Academia, Praha. ISBN 978-80-200-2237-0.
- Kyrychenko, A., Tsyganenko, K., Olishevskaya, S. (2018) Hypovirulence of mycoviruses as a tool for biotechnological control of phytopathogenic fungi. *Cytology and Genetics*, 52, 374-384.
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., Smith, D. B. (2018) *Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. *Nucleic Acids Research*, 46, D708-D717.

- Lemke, P.A. (1979). Coevolution of fungi and their viruses. *Molitoris HP, Hollings M, Wood HA, Fungal Viruses* 2–7.
- Li, P., Lin, Y., Zhang, H., Wang, S., Qiu, D., a Guo, L. (2016). Molecular characterization of a novel mycovirus of the family Tymoviridae isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology*, 489, 86-94.
- Li, P., Bhattacharjee, P., Wang, S., Zhang, L., Ahmed, I., a Guo, L. (2019). Mycoviruses in *Fusarium* species: An update. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 257.
- 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, S., Xie, J., Cheng, J., Li, B., Chen, T., Fu, Y., a kol. (2016). Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), 12803-12808.
- 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.
- Lubojacký, J., Lorenc, F., Samek, M., Knížek, M., a Liška, J. (2022). Hlavní problémy v ochraně lesa v Česku v roce 2021 a prognóza na rok 2022. Škodliví činitelé v lesích Česka 2021/2022–Škody zvěří. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí. Průhonice, 17-26.
- Lubojacký, J., Lorenc, F., Samek, M., Knížek, M., a Liška, J. (2023). Hlavní problémy v ochraně lesa v Česku v roce 2022 a prognóza na rok 2023. Škodliví činitelé v lesích Česka 2022/2023–Škody zvěří. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí. 26, 18-25.
- Martelli, G. P., Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem Sabanadzovic, N., Edwards, M. C., a Dreher, T. (2002). The family tymoviridae. *Archives of virology*, 147, 1837-1846.
- Martin, M. (2012). Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. Available online: <https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable>.
- Milgroom, M. G., a Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42, 311-338.
- Milgroom, M. G., Hillman, B. J. (2011). The ecology and evolution of fungal viruses. In: Hurst, D.J., ed. *Studies in viral ecology: microbial and botanical host systems* New Jersey: Wiley-Blackwell. 9 (1), 217-253.
- 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. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>.
- 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.
- Morrison, D. J. (2004). Rhizomorph growth habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species. *Forest Pathology*, 34(1), 15-26.

- Myllys, L., Lohtander, K., a Tehler, A. (2001). β -tubulin, ITS and group I intron sequences challenge the species pair concept in *Physcia aipolia* and *P. caesia*. *Mycologia*, 93(2), 335-343.
- 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.
- Muszynska, B., Sulkowska-Ziaja, K., Wolkowska, M., a Ekiert, H. (2011). Chemical, pharmacological, and biological characterization of the culinary-medicinal honey mushroom, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.(Agaricomycetideae): a review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(2).
- Nash, C. H., Douthart, R. J., Ellis, L. F., Frank, R. V., Burnett, J. P., a Lemke, P. A. (1973). On the mycophage of *Penicillium chrysogenum*. *Canadian journal of microbiology*, 19(1), 97-103.
- Nerva, L., Turina, M., Zanzotto, A., Gardiman, M., Gaiotti, F., Gambino, G., a Chitarra, W. (2019). Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. *Environmental microbiology*, 21(8), 2886-2904.
- Nerva, L., Chitarra, W., Siciliano, I., Gaiotti, F., Ciuffo, M., Forgia, M., a kol. (2019). Mycoviruses mediate mycotoxin regulation in *Aspergillus ochraceus*. *Environmental microbiology*, 21(6), 1957-1968.
- Ninomiya, A., Urayama, S. I., Suo, R., Itoi, S., Fuji, S. I., Moriyama, H., a Hagiwara, D. (2020). Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1641.
- Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 632-642.
- Nuss, D. L. (2011). Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. In *Advances in virus research*. 80, 25-48.
- Nuss, D. L., Hillman, B. I. (2011) Hypoviridae. In: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. eds. *Virus Taxonomy*. Oxford, UK: Elsevier, 1029-1034.
- Ogura-Tsujita, Y., Yukawa, T., a Kinoshita, A. (2021). Evolutionary histories and mycorrhizal associations of mycoheterotrophic plants dependent on saprotrophic fungi. *Journal of plant research*, 134, 19-41.
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., a Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular plant pathology*, 10(1), 115-128.
- Pearson, M. N., a Bailey, A. M. (2013). Viruses of botrytis. *Advances in virus research*, 86, 249-272.

- Petrzik, K., Sarkisova, T., Starý, J., Koloniuk, I., Hrabáková, L., a Kubešová, O. (2016). Molecular characterization of a new monopartite dsRNA mycovirus from mycorrhizal *Thelephora terrestris* (Ehrh.) and its detection in soil oribatid mites (Acari: Oribatida). *Virology*, 489, 12-19.
- Pešková, V., a Soukup, F. (2013). Škody působené václavkou v smrkových porostech severní Moravy a Slezska. *Lesnická práce*, 92(6), 368-369.
- Picarelli, M. A. S., Forgia, M., Rivas, E. B., Nerva, L., Chiapello, M., Turina, M., a Colariccio, A. (2019). Extreme diversity of mycoviruses present in isolates of *Rhizoctonia solani* AG2-2 LP from *Zoysia japonica* from Brazil. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 244.
- Rigling, D., Prospero, S. (2018) *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Molecular Plant Pathology*, 19 (1), 7–20.
- 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.
- van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., Bishop, D. H., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., a kol. (2000). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
- Revell, P. A., Davidson, A. D., a Wright, P. J. (1999). Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus. *Virology*, 260(2), 273-276.
- 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.
- Sato, Y., a Suzuki, N. (2023). Continued mycovirus discovery expanding our understanding of virus lifestyles, symptom expression, and host defense. *Current Opinion in Microbiology*, 75, 102337.
- 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).
- Schneider, W. L., a Roossinck, M. J. (2001). Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of virology*, 75(14), 6566-6571.
- Schulze, S., Bahnweg, G., Möller, E. M., a Sandermann Jr, H. (1997). Identification of the genus *Armillaria* by specific amplification of an rDNA-ITS fragment and evaluation of genetic variation within *A. ostoyae* by rDNA-RFLP and RAPD analysis. *European Journal of Forest Pathology*, 27(4), 225-239.

- Schwarze, F. W., Engels, J., a Mattheck, C. (2000). Fungal strategies of wood decay in trees. Springer Science & Business Media.
- Sierota, Z., a Grodzki, W. (2020). *Picea abies*–*Armillaria*–*Ips*: A strategy or coincidence?. *Forests*, 11(9), 1023.
- Sipos, G., Anderson, J. B., a Nagy, L. G. (2018). *Armillaria*. *Current Biology*, 28(7), R297-R298.
- Smith, M. L., Bruhn, J. N., a Anderson, J. B. (1992). The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, 356(6368), 428-431.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. M., a Dijst, G. (2013). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Springer Science & Business Media.
- Sochor, M., a Egertová, Z. (2015). Bioluminescence hub–odvěký a stále záhadný fenomén. *Živa*, 6, 282-284.
- 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. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>.
- Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., a Spatafora, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular phylogenetics and evolution*, 44(3), 1204-1223.
- Sutela, S., Poimala, A., a Vainio, E. J. (2019). Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(9), fiz119.
- Sutela, S., Forgia, M., Vainio, E. J., Chiapello, M., Daghino, S., Vallino, M., a kol. (2020). The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. *Virus Evolution*, 6(2), veaa076.
- 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.
- Tsykun, T., Rigling, D., a Prospero, S. (2013). A new multilocus approach for a reliable DNA-based identification of *Armillaria* species. *Mycologia*, 105(4), 1059-1076.

- Turchetti, T., a Maresi, G. (1993). Natural spread and dsRNA of some hypovirulent Italian strains of *Cryphonectria parasitica*. In Proceedings of the International Congress on Chestnut. 20-23.
- Van Regenmortel, M. H. V. (2007). Virus species and virus identification: past and current controversies. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(1), 133-144.
- 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.
- Vasaitis, R., Stenlid, J., Thomsen, I. M., Barklund, P., a Dahlberg, A. (2008). Stump removal to control root rot in forest stands. A literature study. *Silva Fennica*, 42(3), 457.
- Villan Larios, D. C., Diaz Reyes, B. M., Pirovani, C. P., Loguercio, L. L., Santos, V. C., Góes-Neto, A., a kol. (2023). Exploring the Mycovirus Universe: Identification, Diversity, and Biotechnological Applications. *Journal of Fungi*, 9(3), 361.
- Villarreal, L. P. (2008). The widespread evolutionary significance of viruses. *Origin and Evolution of Viruses*, 477-516.
- 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.
- White, E. E., Dubetz, C. P., Cruickshank, M. G., a Morrison, D. J. (1998). DNA diagnostic for *Armillaria* species in British Columbia: within and between species variation in the IGS-1 and IGS-2 regions. *Mycologia*, 90(1), 125-131.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., a Van Kan, J. A. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Wu, S., Cheng, J., Fu, Y., Chen, T., Jiang, D., Ghabrial, S. A., a Xie, J. (2017). Virus-mediated suppression of host non-self recognition facilitates horizontal transmission of heterologous viruses. *PLoS Pathogens*, 13(3), e1006234.
- Xie, J., Wei, D., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Ghabrial, S., a Peng, Y. (2006). Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of General Virology*, 87(1), 241-249.
- Yaegashi, H., Kanematsu, S., a Ito, T. (2012). Molecular characterization of a new hypovirus infecting a phytopathogenic fungus, *Valsa ceratosperma*. *Virus Research*, 165(2), 143-150.
- Yaegashi, H., Nakamura, H., Sawahata, T., Sasaki, A., Iwanami, Y., Ito, T., a Kanematsu, S. (2013). Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 49-62.

Yokoi, T., Takemoto, Y., Suzuki, M., Yamashita, S., a Hibi, T. (1999). The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* virus B. *Virology*, 264(2), 344-349.

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., a kol. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1452-1457.

Yu, L., Sang, W., Wu, M. D., Zhang, J., Yang, L., Zhou, Y. J., a kol. (2015). Novel hypovirulence-associated RNA mycovirus in the plant-pathogenic fungus *Botrytis cinerea*: Molecular and biological characterization. *Applied and environmental microbiology*, 81(7), 2299-2310.

Zhang, D. X., Spiering, M. J., Dawe, A. L., a Nuss, D. L. (2014). Vegetative incompatibility loci with dedicated roles in allorecognition restrict mycovirus transmission in chestnut blight fungus. *Genetics*, 197(2), 701-714.

Zhang, H., Xie, J., Fu, Y., Cheng, J., Qu, Z., Zhao, Z., a kol. (2020). A 2-kb mycovirus converts a pathogenic fungus into a beneficial endophyte for Brassica protection and yield enhancement. *Molecular plant*, 13(10), 1420-1433.

13 Publikace a metodiky

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 václavků v poloprovozních podmínkách. ZF JU v Českých Budějovicích, Certifikovaná metodika.