



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s přenosy mykovirů václavek v poloprovozních podmínkách



Autoři:

**Mgr. Tomáš Tonka Ph.D., Ing. Lucie Walterová,
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

České Budějovice, 2021

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

**Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV QK1920412
“Mykoviry jako součást potenciálních biopreparátů v ochraně smrkových porostů proti
václavkám“**

**Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.
Ing. Lucie Walterová
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

České Budějovice, září 2021

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1920412 "Mykoviry jako součást potenciálních biopreparátů v ochraně smrkových porostů proti václavkám".

Autoři: Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D., Ing. Lucie Walterová, prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Oponenti:

Ing. Vlasta Knorová MZE, odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů Těšnov 65/17 110 00
Praha, vlasta.knorova@mze.cz

Ing. Pavel Hobza, LČR, s.p., Lesní závod Boubín, polesí Klet, Náměstí 7, 38203 Křemže,
pavel.hobza@lesycr.cz

Obrázek na titulní straně: smrková sazenice v pokusné nádobě

Text: ©2021 Tonka T., Walterová L., Čurn V.

Foto: ©2021 Tonka T.

Grafická úprava: ©2021 Tonka T.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN 978-80-7394-890-0



Obsah

1. Cíl metodiky	5
2. Úvod	6
3. Vlastní obsah metodiky	7
4. Srovnání novosti postupů	11
5. Uplatnění metodiky	11
6. Ekonomické aspekty	11
7. Seznam použité literatury	12

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je podat ucelený metodický návod pro zakládání a hodnocení pokusů s mykoviry václavek v poloprovozních podmínkách, v nádobových pokusech se sazenicemi smrku. Metodika zahrnuje postupy pro testování mykoviry infikovaných václavek, vliv infikovaných kmenů václavek na kmeny neinfikované, vyhodnocení účinnosti resp. vlivu mykoviru na rozvoj václavek.

Metodika byla vytvořena pro účely provádění experimentů nebo testů jejichž cílem je ověřit účinnost případného biopreparátu v ochraně smrkových prostů proti václavkám, nebo pro posouzení vlivu virem infikovaných hub na neinfikované houby a pro účely hodnocení vlivu aplikace biopreparátu na zakládané lesní porosty. Dále je metodika určena pro testování vlivu mykoviru na populace václavek v interakčním ekosystému smrk - václavka

2. Úvod

V České republice se vyskytuje 7 druhů václavek (václavka smrková, cibulkotřená, hlízovitá, severská, obecná, bezprstenná a bažiná), vyskytující se v celé řadě různých ekosystémů, kde napadají hostitelské dřeviny. Druhem, který způsobuje nejzávažnější škody v lesním hospodářství, je václavka smrková (*Armillaria ostoyae*), která napadá biotickými a abiotickými faktory oslabené stromy, které dále oslabuje, popř. způsobuje jejich úhyn (Holuša a kol., 2018). Ekologicky patří václavky mezi symbionty, nicméně v momentu, kdy dojde k oslabení hostitelského jedince, symbiotický vztah václavka - hostitel přechází ve vztah parazitický, a pro oslabeného hostitele může být dopad tohoto vztahu fatální.

Vzhledem k tomu, že václavky tvoří rozlehlá podzemní mycelia, a jejich působení na hostitele není provázeno viditelnými příznaky v symbiotické fázi, je pro lesní management problémem ochrana porostů proti této houbě. Doposud není znám žádný chemický, agrotechnický, popř. biologický přípravek, který by účinně zabránil houbové infekci a ochránil porosty hostitelských dřevin před napadením a poškozením.

Mykoviry jsou viry, které se vyskytují u hub (Ghabrial a kol., 2015). Doposud byla posána celá řada mykovirů, které více či méně ovlivňují své hostitele (Hillman a kol., 2018). V poslední době byly popsány i viry u václavek (Linnakoski a kol., 2021), které patří do skupiny ambi-like virů, ale o jejich vlivu na hostitele není doposud nic známo. Není znám ani mechanismus přenosu mezi jedinci populace václavek. V případě ambi-like mykovirů u václavek se jedná o ssRNA viry, které se mohou vyskytovat v podobě virových částic v cytoplazmě, ale doposud nebyly tyto částice v buňkách václavek pozorovány.

Od doby objevení mykovirů se uvažovalo o jejich zapojení do ochrany proti různým houbovým fytopatogenům (Xie a Jiang, 2014, Garcia-Pendrejas a kol., 2019). Některé mykoviry způsobují u svých hostitelů tzv. hypovirulenci. Jedná se o schopnost viru omezit infekční potenciál hostitelské houby (Nuss 2005). Mykoviry s touto schopností byly popsány např. u *Cryphonectria parasitica*, *Sclerotinia sclerotiorum* nebo *Alternaria alternata* (Ghabrial a Suzuki, 2009, Rigling a Prospero, 2018, Marzano a kol., 2016, Li a kol 2019).

Přenos mykovirů probíhá vegetativně splýváním (anastomózou) hyfálních vláken mezi kompatibilními jedinci (Liu a kol., 2003, Yaegashi a kol., 2013) nebo cestou přenosu nukleových kyselin. Extracelulární přenos virovými částicemi byl popsán u viru *S. sclerotiorum* (Yu a kol., 2013). Všechny výše uvedené viry jsou dsRNA viry. Nicméně přenos viru u bazidiomycet nebyl doposud popsán a také není jasné, jakým způsobem se přenáší studované mykoviry mezi václavkami, protože se jedná o ssRNA viry.

3. Vlastní obsah metodiky

Následující část metodiky podrobně popisuje přípravu pokusných stromků, houbového inokula, aplikaci václavek na porost a vyhodnocení výsledků poloprovozního pokusu. V současné době není v ČR dostupná metodika pro provádění pokusů s václavkami.

Princip testování

Testování přenosu viru mezi druhy václavek je dvoustupňový proces. První krokem je laboratorní testování přenosu viru (Tonka a kol., 2021). Ve druhé fázi je pak přenos viru mezi václavkami testován v nádobových pokusech. Tato fáze je náročná prostorově, ale zejména časově. Není jasné, kdy se může začít projevovat vliv viru na infekci václavkami v případě poloprovozního pokusu, nicméně vzhledem k možnému použití virem infikovaných kmenů václavek, resp. viru samotného v možné biologické ochraně, je nutné tento pokus provést a nastavit základní parametry pro hodnocení vlivu mykoviru na hostitelský organizmus.

Příprava k testu

1. Václavky

Izolace a kultivace václavek byla popsána v předešlé metodice (Čurn a kol., 2019). Kmeny václavek, izolované z rhizomorf nebo plodnic, byly kultivovány na ME agaru. Pro pokusy s infekcí byly použity výřezy mycelia na agaru. Takto byly kultivovány kmeny václavek bez virové infekce, stejně jako virem infikované václavky. Detekce viru probíhala molekulárními metodami dříve popsány (Tonka a kol., 2021).

2. Rostlinný materiál

Pro testování přenosu viru v in vivo podmínkách je nutné zajistit experimentální podmínky, simulující přirozené prostředí. Jako hostitelské rostliny byly použity prostokořenné smrkové sazenice o velikosti 25 cm z lesní školky.

1. Květináče 10 l (typ Classic, plastový, černý, obr. 1A) jsou naplněny výsevním substrátem (Substrát pro výsadbu Profimix 3 00942A (Agro CS) pro jehličnaté stromy, obr. 1B), obsahující 60 % rašeliny bílé, 20 % rašeliny černé, 20 % kompostu, pH (H₂O) 5,5 - 6,5.

2. Do takto připravené nádoby zasadíme smrkovou sazenici (obr. 2).

3. V celém průběhu pokusu nepoužíváme žádné chemické prostředky na ochranu rostlin.

4. V případě potřeby je možné doplnit nádoby výsevním substrátem.



Obr. 1. Květináč typ Classic (A). Výsadbový substrát pro jehličnany (B).

5. Popsaným způsobem připravíme potřebný počet osázených nádob pro účely optimálního statistického vyhodnocení pokusu. Pro každou variantu je potřeba minimálně 10 ks nádob se sazenicemi na jedno opakování. Na správně vyhodnocení pokusu a eliminaci statistické chyby pokusu je potřeba minimálně třech opakování. Z toho plyne, že pro jednu variantu potřebujeme minimálně 30 osázených nádob, při třech pokusných variantách/testovaných faktorech je pak třeba 90 nádob se sazenicemi. Je také dobré počítat se zásobou sazenic, které budou schopny doplňovat např. nezakořeněné jedince, popř. jinak nestandardně se chovající sazenice. Tato zásoba by měla být minimálně 20% z počtu potřebného pro jednu variantu - pro výše uvedený příklad je zásoba 6 stromků.

6. Pro podobné typy pokusů prováděných ve vnějších neřízených podmínkách platí, že může narůstat variabilita v rámci testovaných variant a pro dosažení lepších a přesnějších výsledků je potřeba více testovaných jedinců. Získané výsledky pak mohou mít dostatečnou vypovídající hodnotu. Současně s vyšším počtem osázených nádob je menší riziko znehodnocení celého pokusu.

7. Pokud není znám původ substrátu pro výsadbu, a mohl by např. obsahovat spory václavek, je vhodné substrát před pokusem otestovat, nejlépe molekulárními metodami (viz. Čurn a kol., 2019).



Obr. 2. Sazenice smrku připravená pro inokulaci václavkami

Vlastní test

Pokus je vhodné založit na jaře, i přesto, že václavky se v půdě vyvíjejí i během zimy, stejně jako se mohou smrkové sazenice sázet do nádob na podzim.

Nádobové testy se z hlediska interakce patogen - hostitel více podobají skutečnosti, než je testování využití viru v ochraně smrkových porostů v in vitro podmínkách. Přesto, že nádobové pokusy nesimulují reálné podmínky v lesních porostech, probíhá v nich infekce václavkou přes kořeny smrku.

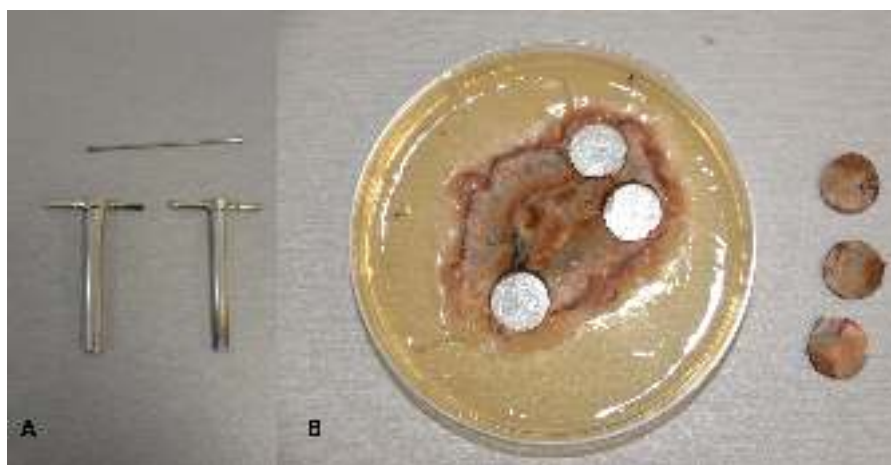
1. Pro testování přenosu viru a jeho vlivu mezi václavkami potřebujeme tři varianty smrkem osázených nádob - kontrolu bez václavky, kontrolu s václavkou neinfikovanou mykovirem a variantu václavka + václavka infikovaná virem. Minimálně 10 nádob pro každou z variant po 3 opakováních udává rozsah pokusu -> 90 nádob + 18 nádob jako zásoba.

2. Po zasazení smrkových sazenic, viz výše, necháme rostliny prokořenit a růst. Záleží na klimatických podmínkách, dostačující doba této přípravné fáze je jeden měsíc. Nádoby jsou na místě, kde bude probíhat pokus, udržují se ve stejných podmínkách.

3. Před vlastní infekcí se vyberou dobře rostoucí rostliny, bez viditelných příznaků poškození nebo fyziologických deficiencí apod. Pro každou variantu je vybráno nejméně 3 x 10 ks rostlin (30 celkem pro každou variantu, viz výše). Kontrolní variantu necháme bez ošetření.

4. Varianty s václavkou inokulujeme myceliem, narostlým na agaru. Korkovrtem o průměru 0,8 cm (obr. 3A) z připravených Petriho misek s kmenem václavky, neinfikovaným virem vykrajujeme výřezy (obr. 3B, které umísťujeme do hloubky cca 1 cm pod povrchem substrátu v pěstební nádobě. Ke každé smrkové sazenici dáme dva takto připravené agarové terčičky s myceliem václavky.

5. Takto nainokulované rostliny necháme růst další měsíc. Po měsíci do varianty václavky s virem nainokulujeme výřezy agaru s myceliem václavky, která je infikována virem. Postup je stejný jako v bodě 4.



Obr. 3. Korkovrty průměru 0.8 cm (vlevo) a 0.5 cm (vpravo- A). Výřezy v agaru s myceliem o průměru 0.8 cm (B).

6. Pokus by měl být dlouhodobější, protože infekce vácavkou a i přenos viru není možné realizovat během pár měsíců jednoho roku/sezóny. Během vegetačního období se provádí vizuální kontroly pokusu každý týden. Vyhodnocuje se vzhled jednotlivých rostlin, jejich fyziologický stav a také se sleduje vlhkost substrátu, protože, přesto, že se stimulují podmínky co nejvíce podobné podmínkám přírodním, nemělo by dojít k úhynu pokusných stromů v důsledku sucha.

7. Každý měsíc je odebírán kontrolní vzorek půdy z květináče a je provedena molekulární analýza na přítomnost václavek, popřípadě jiných houbových patogenů. Vzorky neodebíráme na stejných jedincích, protože opakované měření na stejném jedinci vede k pseudoreplikacím.

8. Výsledkem pokusu by mělo být jasné vizuální rozdělení na napadené a nenapadené stromy. Hodnotí se každý stromek zvlášť. Poškození testovaných stromů hodnotíme podle následující stupnice:

- 1 - zdravá rostlina bez viditelných znaků poškození
- 2 - mírné zaostávání v růstu
- 3 - mírné žloutnutí jehlic, přítomnost václavek v substrátu – molekulárními testy
- 4 - zežloutlé jehličí, v substrátu přítomnost václavek detekovaná molekulárními metodami
- 5 - uschlý strom v květináči, na kořenech rhizomorfy, popř. v půdě mycelium václavky

9. Po ukončení pokusu se vyhodnocuje i poškození kořenového systému a přítomnost václavek na kořenech smrkových sazenic, popř. přítomnost hub v kořenovém balu.

Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení testu je posledním krokem v pokusu a důležitým činitelem v hodnocení vlivu patogenů na hostitelskou rostlinu. Vyhodnocuje se většinou více veličin. Prvním krokem hodnocení je zpracování primárních dat z experimentu.

Vzhledem k tomu, že jsou pokusné nádoby rozdělené do 3 bloků, a v každém jsou tři varianty, jedná se ve statistické analýze o uspořádání v tzv. úplně znáhoděných blocích (randomized complete block design, Lacey and Kaya, 2007). Každý zásah (ošetření) do pokusných nádob je náhodný v každém bloku a tím se zvyšuje variabilita mezi jednotlivými bloky (opakováními). Takovýto typ pokusu se vyhodnocuje analýzou variance (ANOVA), kdy ošetření (kontrola, kontrola s václavkou, václavka s virem) a číslo bloku (opakování, 1 - 3) vstupují do modelu analýzy variance jako interakce a tím můžeme odhadnout podíl chyby měření, čili test se tím stává robustnějším a výsledky testu směrodatnějšími.

Statistické vyhodnocení, resp. pravděpodobnost je ale jedna věc. Druhá, a možná důležitější věc, je biologické vyhodnocení experimentu a biologická významnost dosažených výsledků. V testu schopnosti václavek s virem omezit nebo eliminovat přenosem viru schopnost virem neinfikovaných václavek infikovat smrkové sazenice je důležitým výsledkem přenos viru na nové houby a omezení působení infekčního tlaku na smrky.

4. Srovnání novosti postupů

Metodika popisuje test přenosu mykovirů mezi jednotlivými kmeny václavek v in vivo podmínkách. Dále popisuje testování vlivu mykovirem infikované václavky na neinfikovanou václavku. Tento test je důležitý z hlediska případné ochrany smrků proti václavkám, protože ochrana smrků proti václavkám a jejich poškozením nebyla doposud praktikována. Možnost přenosu mykoviru a jeho ovlivnění infekčnosti václavky v praktickém testu by mohlo tento nedostatek v ochraně odstranit. Toto hodnocení nebylo doposud v ČR prováděno. Vzhledem k předpokládanému vyššímu tlaku infekcí václavkou oslabených smrků může mít tato metodika případné ochrany do budoucna velký význam.

V metodice je popsán celý průběh testování přenosu mykoviru v poloprovozních podmínkách a metodika práce pro spolehlivý test přenosu viru in vivo. Novost postupu je zejména v tom, že podobný pokus s přenosem viru u václavek nebyl doposud proveden.

5. Uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika je určena pracovníkům v lesním hospodářství. Je zdrojem informací i pro pracovníky lesních školek, šlechtitelů a lesního managementu. V neposlední řadě jsou metodické postupy zde pospané vhodné i pro studenty a pedagogy středních a vysokých škol lesnického zaměření, a pro pracovníky v lesnickém výzkumu a podobných organizacích. Metodika je vydána i v elektronické podobě a bude volně k dispozici všem potenciálním zájemcům o danou problematiku na stránkách ZF JU v Českých Budějovicích.

6. Ekonomické aspekty

Václavky nepříznivě ovlivňují kvalitu smrkových porostů a dále oslabují jinými biotickými a abiotickými faktory oslabené stromy. Tím mají částečně vliv na snížení ekonomické hodnoty smrkového dřeva. Kromě ekonomického dopadu vlivu václavek na srkové porosty je zde i ekologický dopad, kdy oslabené stromy mohou snáze podléhat větrným a jiným disturbancím. V případě, že testování přenosu viru mezi václavkami alespoň částečně přispěje k omezení vlivu václavek na smrkové porosty, ekonomické přínosy by mohly být odhadnuty na milióny korun.

7. Seznam použité literatury

Čurn V., Tonka T., Křížová L., Jozová E. 2019. Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub. Zemědělská fak. JU v Č. Budějovicích. Listopad 2019.

García-Pedrajas M.D., Canizares M.C., Sarmiento-Villamil J.L., Jacquat A.G., Dambolena J.S. 2019: Mycoviruses in Biological Control: From Basic Research to Field Implementation. *Phytopathology*. Nov. 109(11): 1828-1839. doi: 10.1094/PHYTO-05-19-0166-RVW

Ghabrial, S. A., Suzuki, N. 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 353-384. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081932

Ghabrial S. A., Caston, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L. & Suzuki, N. 2015: 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479-480, 356-368. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.034

Hillman B. I., Aulia A. & Suzuki N. 2018: Viruses of plant-interacting fungi. *Adv. Virus Res.* 100, 99-116.

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 *For. Ecol. Manage.*, 427 (2018), pp. 434-445

Lacey, L. A. , Kaya H. K. 2007. Field manual of techniques in invertebrate pathology: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer, Dordrecht, 2nd edititon, 2007

Li H., Bian R., Liu Q., Yang L., Pang T., Salaipeh L., Andika I.B., Kondo H., Sun L. 2019. Identification of a Novel Hypovirulence-Inducing Hypovirus From *Alternaria alternata*. *Front Microbiol.* 2019 May 15;10:1076. doi: 10.3389/fmicb.2019.01076. PMID: 31156589; PMCID: PMC6530530.

Format:

Linnakoski R., Sutela S., Coetzee M.P.A. et al. 2021: *Armillaria* root rot fungi host single-stranded RNA viruses. *Sci. Rep.* Apr 1;11(1): 7336. doi: 10.1038/s41598-021-86343-7.

Liu, Y. C., Linder-Basso, D., Hillman, B. I., Kaneso, S., and Milgroom, M. G. 2003. Evidence for interspecies transmission of viruses in natural populations of filamentous fungi in the genus *Cryphonectria*. *Mol. Ecol.* 12, 1619-1628. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01847.x

Marzano, S. Y. L., Nelson, B. D., Ajayi-Oyetunde, O., Bradley, C. A., Hughes, T. J., Hartman, G. L., et al. 2016. Identification of diverse mycoviruses through metatranscriptomics characterization of the viromes of five major fungal plant pathogens. *J. Virol.* 90, 6846-6863. doi: 10.1128/JVI.00357-16

Nuss D. 2005: Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 632-642. doi: 10.1038/nrmicro1206

Rigling, D., Prospero, S. 2018. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control. *Mol. Plant Pathol.* 19, 7-20. doi: 10.1111/mpp.12542

Tonka T., Walterová L., Hejna O., Čurn V. 2021. Metodika identifikace, determinace a přenosu mykovirů u hub rodu *Armillaria*. Zemědělská fak. JU v Č. Budějovicích. Říjen 2021.

Xie J., Jiang D. 2014: New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 45-68. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-050222.

Yaegashi, H., Nakamura, H., Sawahata, T., Sasaki, A., Iwanami, Y., Ito, T., et al. 2013. Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 49-62. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01454.x

Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., Li, G., Yi, X., Jiang, D. 2013. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1452-1457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213755110>