

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Morfologická a genetická determinácia obligátne
biotrofných parazitov z radu múčnatkotvaré
na zástupcoch rodu šalát

Agáta Čurná

Bakalárska práca

predložená
na Katedre ekológie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

ako súčasť požiadaviek
na získanie titulu Bc. v odbore
Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedúci práce: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Olomouc 2023

Čurná A. 2023. Morfológická a genetická determinácia obligátne biotrofných parazitov z radu múčnatkotvaré na zástupcoch rodu šalát [bakalárska práca]. Olomouc: Katedra ekológie a ŽP PpF UP v Olomouci. 83 s. 0 príloh, slovensky.

Abstrakt

Rod *Lactuca* zahŕňa ekonomicky významné plodiny (napr. šalát siaty), ktoré sú často infikované rodmi *Podosphaera*, *Leveillula* a *Golovinomyces* patriace do radu múčnatkotvaré (*Erysiphales*). Cieľom predkladanej práce je identifikovať druhy z tohto radu vyskytujúce sa na zástupcoch rodu *Lactuca*, overiť či existuje druhová špecifikácia patosystému *Lactuca* – múčnatkotvaré a určiť resp. vyvrátiť existenciu vnútrodruhej variability. Z výsledkov analýz vyplýva, že bolo identifikovaných 20 vzoriek s druhom *Golovinomyces bolayi*, 3 s *Podosphaera xanthii* a 0 vzoriek z rodu *Leveillula*. Priemerná dĺžka konídií druhu *Golovinomyces bolayi* dosahovala $28,65 \mu\text{m} \pm 2,953 \mu\text{m}$, priemerná šírka hodnotu $13,72 \mu\text{m} \pm 1,464 \mu\text{m}$. Priemerná dĺžka konídií druhu *Podosphaera xanthii* bola $27,71 \mu\text{m} \pm 3,200 \mu\text{m}$, priemerná šírka $16,22 \mu\text{m} \pm 1,700 \mu\text{m}$. Vypočítaná priemerná hodnota indexu tvaru konídií dosahovala pri druhu *Golovinomyces bolayi* 2,15; pri druhu *Podosphaera xanthii* 1,71. Dĺžka konidioforov druhu *G. bolayi* mala hodnotu $114,45 \mu\text{m} \pm 30,961 \mu\text{m}$ s dĺžkou foot-cell $44,60 \mu\text{m} \pm 15,771 \mu\text{m}$ a počtom distálnych buniek $4,55 \pm 1,413$. Priemerná dĺžka konidioforov druhu *P. xanthii* bola $114,5 \mu\text{m} \pm 22,700 \mu\text{m}$ s priemernou dĺžkou foot-cell $35,57 \mu\text{m} \pm 6,740 \mu\text{m}$. Sledovanie genetickej variability potvrdilo, že druhy *G. bolayi* a *P. xanthii* sa od seba líšia nukleotidovými sekvenciami. Boli pozorované rozdiely v dĺžke ich ITS oblasti, kedy mal druh *G. bolayi* o 29 párov báz viac ako druh *P. xanthii*. Rozdiely boli aj v ribotypoch kedy bola okrem medzidruhej variability pozorovaná aj vnútrodruhá variabilita druhu *G. bolayi*. Tvorba fylogenetického stromu potvrdila príbuznosť samostatne vyčlenených vetví s rodmi *Leveillula*, *Podosphaera* a *Golovinomyces*. Štúdium týchto rodov je veľmi dôležité, nakoľko sa jedná o patogény, ktoré môžu ovplyvňovať poľnohospodárske výnosy, a tým aj človeka. Ďalšie výskumy sú dôležité pre porozumenie životných cyklov, stratégií prežívania či rozšírenia tohto ochorenia a následne k jeho obmedzeniu.

Kľúčové slová: *Golovinomyces bolayi*, ITS región, konidiofor, konídiá, *Podosphaera xanthii*

Čurná A. 2023. Morphological and genetic determination of Powdery mildews on Lettuce [bachelor's thesis]. Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University of Olomouc. 83 pp. 0 Appendices. Slovak.

Abstract

The genus *Lactuca* includes economically important crops (e.g., lettuce) that are often infected by the genera *Podosphaera*, *Leveillula* and *Golovinomyces* belonging to the order Erysiphales (powdery mildews). The aim of the presented work is to identify the species from this order occurring on representatives of the *Lactuca* genus, to verify whether there is a species specification of the *Lactuca* pathosystem - powdery mildews and to determine or disprove the existence of intraspecific variability. The results of the analysis show that 20 samples were identified with the species *Golovinomyces bolayi*, 3 with *Podosphaera xanthii* and 0 representatives from the genus *Leveillula*. The average length of conidia of *G. bolayi* was $28.65 \mu\text{m} \pm 2.953 \mu\text{m}$, the average width was $13.72 \mu\text{m} \pm 1.464 \mu\text{m}$. The average length of the conidia of *P. xanthii* was $27.71 \mu\text{m} \pm 3.200 \mu\text{m}$, the average width was $16.22 \mu\text{m} \pm 1.700 \mu\text{m}$. The calculated average value of the conidia shape index was 2.15 for the species *G. bolayi*; for *P. xanthii* 1.71. The length of the conidiophores of *G. bolayi* was $114.45 \mu\text{m} \pm 30.961 \mu\text{m}$ with a foot-cell length of $44.60 \mu\text{m} \pm 15.771 \mu\text{m}$ and the number of distal cells 4.55 ± 1.413 . The average length of conidiophores of *P. xanthii* was $114.5 \mu\text{m} \pm 22.700 \mu\text{m}$ with an average foot-cell length of $35.57 \mu\text{m} \pm 6.740 \mu\text{m}$. Monitoring of genetic variability confirmed that the species *G. bolayi* and *P. xanthii* differ in nucleotide sequences. Differences were observed in the length of their ITS region, where the species *G. bolayi* had 29 base pairs more than the species *P. xanthii*. There were also differences in ribotypes when, in addition to interspecific variability, intraspecific variability of the *G. bolayi* species was also observed. The creation of a phylogenetic tree confirmed the relatedness of separately isolated branches to the genera *Leveillula*, *Podosphaera* and *Golovinomyces*. The study of these genera is very important, as they are pathogens that can affect agricultural yields, and thus humans. Further research is important for understanding the life cycles, strategies for survival or spread of this disease and consequently for its limitation.

Key words: conidia, conidiophore, *Golovinomyces bolayi*, ITS region, *Podosphaera xanthii*

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Miloslava Kitnera, Ph.D. a iba s použitím citovaných literárnych prameňov.

V Olomouci, 24. apríla 2023

Obsah

Zoznam tabuliek	viii
Zoznam obrázkov	ix
Zoznam grafov	xi
Zoznam symbolov a skratiek	xii
Úvod.....	1
1 Ciele práce.....	2
2 Literárny prehľad	3
2.1 Charakteristika radu múčnatkotvaré.....	3
2.2 Slovenské názvoslovie.....	4
2.3 Taxonómia.....	5
2.4 Aktuálne metódy štúdia radu múčnatkotvaré	8
2.5 Životný cyklus.....	11
2.5.1 Infekcia.....	13
2.5.2 Anamorfné štádium	14
2.5.3 Teleomorfné štádium.....	15
2.6 Prežívanie nepriaznivých podmienok.....	17
2.7 Hyperparaziti múčnatkotvarých.....	17
2.8 Geografické rozšírenie	18
2.8.1 Evolúcia radu múčnatkotvaré.....	20
2.9 Rody múčnatkotvarých parazitujúcich na zástupcoch rodu <i>Lactuca</i>.....	21
2.9.1 Rod <i>Golovinomyces</i>	21
2.9.2 Rod <i>Podosphaera</i>	24
2.9.3 Rod <i>Leveillula</i>	25
2.10 Rod <i>Lactuca</i>.....	28
3 Materiál a metódy	30
3.1 Zber a spracovanie vzoriek.....	30

3.2	Použité chemikálie pre mikroskopickú a molekulárnu determináciu	33
3.3	Popis zloženia použitých roztokov	33
3.4	Prístroje	34
3.5	Mikroskopická determinácia.....	35
3.5.1	Morfologická determinácia pomocou 3% roztoku KOH.....	35
3.5.2	Meranie morfologických charakteristík anamorfného štádia	35
3.6	Molekulárna determinácia.....	36
3.6.1	Extrakcia DNA pomocou SDS metódy	36
3.6.2	Nested PCR	37
3.6.3	Gélová elektroforéza	39
3.6.4	Príprava vzoriek pre sekvenčné laboratórium	39
3.6.5	Postup spracovania sekvenčných dát.....	40
4	Výsledky	42
4.1	Mikroskopická determinácia.....	42
4.1.1	Variabilita patogénnych druhov vo vzorkách.....	42
4.1.2	Morfologická variabilita anamorfných štádií	42
4.2	Molekulárna determinácia.....	60
4.2.1	Vyhodnotenie sekvenčných dát.....	60
4.2.2	Fylogenetická rekonštrukcia.....	66
5	Diskusia	68
6	Záver.....	73
7	Zoznam použitej literatúry.....	74

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Kompletný zoznam 33 skúmaných vzoriek s informáciami o jednotlivých zberoch.	31
Tabuľka 2 Primery použité v tejto bakalárskej práci.	37
Tabuľka 3 Zloženie PCR reakčnej zmesi.	38
Tabuľka 4 Teplotné a časové podmienky PCR reakcií (Ta (annealingová teplota) je uvedená v texte).	38
Tabuľka 5 Zloženie roztoku pre enzymatické prečistenie PCR produktov.	40
Tabuľka 6 Program na prečistenie vzoriek.	40
Tabuľka 7 Dĺžka a šírka konidií pri druhu <i>Golovinomyces bolayi</i> (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = <i>Lactuca</i> , NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).	45
Tabuľka 8 Dĺžka a šírka konidií pri druhu <i>Podosphaera xanthii</i> (JP = Japonsko).	48
Tabuľka 9 Dĺžka konidioforov, foot-cell, počet distálnych buniek konidioforov pri druhu <i>Golovinomyces bolayi</i> (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = <i>Lactuca</i> , NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).	51
Tabuľka 10 Dĺžka konidioforov, foot-cell, počet distálnych buniek konidioforov pri druhu <i>Podosphaera xanthii</i> (JP = Japonsko).	54
Tabuľka 11 Výsledky molekulárnej determinácie vzoriek PM na zástupcoch rodu <i>Lactuca</i> (AT = Rakúsko, Aq = <i>Ampelomyces quisqualis</i> , BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, Gb = <i>Golovinomyces bolayi</i> , HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, L. = <i>Lactuca</i> , NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).	63

Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Makroskopicky viditeľné príznaky infekcie múčnatkotvarými na <i>L. serriola</i> L. Foto: Kitner, M.	4
Obrázok 2 Chasmothécia druhu <i>G. bolayi</i> na <i>L. serriola</i> (Mieslerová et al., 2020b).	6
Obrázok 3 Skupiny rodov múčnatkotvarých na základe typu genézy konidioforov (Takamatsu, 2013b).....	6
Obrázok 4 Fylogenetické vzťahy jednotlivých skupín múčnatkotvarých (Trojanová, 2017).8	
Obrázok 5 Mapa primerov použitých pre amplifikáciu a sekvenovanie (ITS1-F/ITS4) jadrového ITS regiónu pri múčnatkotvarých. Kresba: Čurná, A.	11
Obrázok 6 Životný cyklus múčnatkotvarých (<i>Erysiphales</i>), a = vrečko, asp = askospory, c = konídie, cg = klíčiace konídie, ch = chasmothécium, cph = konidiofor, h = hýfy (Braun a Cook, 2012).	12
Obrázok 7 Pyknidy hyperparazita <i>Ampelomyces quisqualis</i> pod mikroskopom pri zväčšení 400x. Foto: Čurná, A.	18
Obrázok 8 Infekcia <i>G. bolayi</i> na <i>L. serriola</i> , a = chasmothécia, b = vrecká, c = apresória hýf, d = konidiofory, e = konídie, f = klíčiace konídie (Braun et al., 2019).	23
Obrázok 9 <i>P. xanthii</i> , a = vrecká, appr = apresória, c = konídie, cg = klíčiace konídie, cph = konidiofor, ch = chasmothécia (Braun a Cook, 2012).	25
Obrázok 10 <i>Leveillula lactucae-serriolae</i> ; prc = primárne konídie, sc = sekundárne konídie, a = vrecká, ch = chasmothécium (Braun a Cook, 2012).	27
Obrázok 11 Mikroskopická fotografia konídií a konidioforov druhu <i>G. bolayi</i> . Foto: Čurná, A.	43
Obrázok 12 Mikroskopická fotografia konídií a konidioforov druhu <i>P. xanthii</i> . Foto: Čurná, A.	44
Obrázok 13 Výsledok elektroforézy. Čísla v hornej časti obrázku predstavujú čísla vzoriek, písmena A a B označujú repliky danej vzorky, M predstavuje DNA štandard, šípka označuje pozíciu výsledných PCR produktov (600-700bp).	60
Obrázok 14 Ukážka výsledného elektroforogramu ITS regiónu vzorky 33 – printscreen z programu Geneious.	61
Obrázok 15 Rozdiely v oblasti ITS regiónov medzi vzorkami <i>G. bolayi</i> a <i>P. xanthii</i> zvýraznené farebnými pruhmi (SNP) alebo vynechaním miest (delécie). Jednotlivé ribotypy sú vyznačené na pravej strane obrázku (Gb_1-3, Px_1).	64

Obrázok 16 Fylogenetický strom prezentujúci taxonomické postavenie študovaných vzoriek s vybranými taxónmi čeľade *Eysiphaceae*. 67

Zoznam grafov

Graf 1 Dĺžka konídií druhov <i>G. bolayi</i> a <i>P. xanthii</i>	56
Graf 2 Šírka konídií druhov <i>G. bolayi</i> a <i>P. xanthii</i>	56
Graf 3 Index tvaru konídií druhov <i>G. bolayi</i> a <i>P. xanthii</i>	57
Graf 4 Dĺžka konidioforov druhov <i>G. bolayi</i> a <i>P. xanthii</i>	57
Graf 5 Dĺžka foot-cell druhov <i>G. bolayi</i> a <i>P. xanthii</i>	58
Graf 6 Počet distálnych buniek druhu <i>G. bolayi</i> . Pri druhu <i>P. xanthii</i> nebolo možné distálne bunky spočítať.....	58
Graf 7 Zrovnanie priemerných hodnôt variability anamorfných štádií druhu <i>G. bolayi</i> vzhľadom na hostiteľský druh.....	59

Zoznam symbolov a skratiek

18S rRNA	úsek jadrovej DNA kódujúci časť malej ribozomálnej podjednotky ribozómu
28S rRNA	úsek jadrovej DNA kódujúci časť veľkej podjednotky ribozómu
°C	stupeň Celzia
μl	mikroliter
μm	mikrometer
AP	aritmetický priemer
Aq	<i>Ampelomyces quisqualis</i>
AT	Rakúsko
BE	Belgicko
Bp	pár báz (Base pair)
cm	centimeter
CNI	Close Neighbour Interchange
CO ₂	Oxid uhličitý
CZ	Česká republika
č.	číslo
DE	Nemecko
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
Epp	plastová skúmavka typu Eppendorf
ES	Španielsko
et al.	a iný (et alii)
EtOH	etanol
F primer	priamy primer (forward primer)
FR	Francúzsko
g	gram
Gb	<i>Golovinomyces bolayi</i>
HR	Chorvátsko
HU	Maďarsko
ITS	Internal Transcribed Spacer
JP	Japonsko
KOH	hydroxid draselný

ks	kus
<i>L.</i>	<i>Lactuca</i>
LSU	veľká ribozomálna podjednotka
Ma	jeden milión rokov (mega annum)
max.	maximum
ME	minimálna evolúcia (Minimum Evolution)
min	minúta
min.	minimum
ml	mililiter
mRNA	messengerová/mediátorová RNA
napr.	napríklad
NCBI	Národné centrum pre biotechnologické informácie (National Center for Biotechnology Information)
ng	nanogram
nrDNA	jadrová ribozomálna deoxyribonukleová kyselina (nuclear ribosomal DNA)
NL	Holandsko
Obr.	obrázok
PCR	Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)
PM	múčnatkotvaré (Powdery mildew)
PL	Poľská republika
PT	Portugalsko
Px	<i>Podosphaera xanthii</i>
R primer	spätný primer (reverse primer)
rDNA	ribozomálna deoxyribonukleová kyselina
resp.	respektíve
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minútu (revolutions per minute)
rRNA	ribosomálna RNA
s. lat.	v širšom slova zmysle (sensu lato)
s. str.	v užšom slova zmysle (sensu stricto)
SD	smerodajná odchýlka
SDS	sodium dodecyl sulfát

SK	Slovenská republika
SNP	polymorfizmus v jednom nukleotide (single nucleotide polymorphism)
sp.	druh
spp.	druhy (species)
STM	stereoskopický mikroskop
Tab.	tabuľka
TBE	TBE pufr (složení TRIS, kyselina boritá, EDTA)
tzn.	to znamená
tzv.	takzvaný
US/USA	Spojené štáty americké
UV	ultrafialové žiarenie
V	volt
v.	odroda (varietas)

Pod'akovanie

Rada by som pod'akovala predovšetkým vedúcemu záverečnej práce pánovi RNDr. Miloslavovi Kitnerovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie a cenné rady, ktoré mi poskytoval pri vypracovávaní bakalárskej práce. Takisto patrí veľké ďakujem aj prof. Ing. Alešovi Lebedovi, DrSc a Mgr. Tereze Křivánkovej za odborné rady a poskytnuté informácie ohľadom determinácií a rodine za podporu a trpezlivosť.

V Olomouci, 24. apríla 2023

Úvod

Lactuca sativa L., známy ako šalát siaty, je ekonomicky najdôležitejšou plodinou tribusu Cichorieae. Šalát je nositeľom názvu celého rodu s približne 270 druhmi, ktorého členov spája prítomnosť latexu a 5 korunných lístkov. Druhy z tohto rodu sú často infikované fytopatogénnymi mikromycétami zo skupiny vrekatých húb (Ascomycetes), z ríše húb (*Fungi*). Jedná sa o biotrofných parazitov z radu múčnatkotvaré, predovšetkým o zástupcov rodov *Podosphaera*, *Leveillula* a *Golovinomyces*. Tieto obligátne biotrofné parazity na mnohých druhoch divorastúcich či kultúrnych rastlinách majú kosmopolitné rozšírenie, pričom častokrát spôsobujú významné hospodárske škody.

Potom, čo organizmus infikuje hostiteľa môže v priebehu životného cyklu podstúpiť pohlavnú a nepohlavnú fázu rozmnožovania. Výskyt pohlavného a nepohlavného štádia životného cyklu závisí od konkrétneho druhu ale aj od zemepisnej šírky a dĺžky, v ktorej sa jedinec vyskytuje. Následne sa na hostiteľovi vytvorí napadnutie viditeľné a rozoznateľné na prvý pohľad. Ide o typické kruhové, biele, práškové mycélium na listoch, neskôr na stonkách či na kvetoch infikovaných rastlín.

Fytopatogénne mikromycéty z radu múčnatkotvaré svojou prítomnosťou negatívne ovplyvňujú, znehodnocujú hostiteľský organizmus, pričom majú vplyv aj na jeho fyziologické procesy ako je napríklad transport vody. Spôsobujú nekrotizáciu a zasychanie pletív, čo môže viesť k úplnej smrti hostiteľského organizmu.

1 Ciele práce

Hlavným cieľom predkladanej bakalárskej práce je určiť, ktoré druhy z radu múčnatkotvaré (PM, powdery mildews) sa vyskytujú na súbore herbalizovaných položiek hostiteľských rastlín predstavujúcich rôznych zástupcov rodu *Lactuca*. Sú použité dva metodické nástroje, a to mikroskopická determinácia (meranie dĺžky konidioforov, dĺžky a šírky konídií, dĺžky foot-cell) a molekulárna determinácia (izolácia DNA, PCR amplifikácia ITS regiónu, porovnanie získaných sekvencií so záznamami v nukleotidových databázach).

Ďalším cieľom je zistiť či existuje druhová špecifikácia patosystému *Lactuca* – múčnatkotvaré a to, či sú niektoré druhy múčnatkotvarých (ďalej tiež PM) špecializované na iba konkrétne druhy zástupcov rodu *Lactuca*.

Posledným z cieľov je určiť alebo vylúčiť existenciu vnútrodruhovej (morfologickej/genetickej) variability PM. Výsledkom je zistiť, či existujú rozdiely medzi vzorkami infikujúcimi rôznych hostiteľov, poprípade či môžeme dať tieto rozdiely do súvislosti s geografickým pôvodom, respektíve rozšírením PM.

2 Literárny prehľad

2.1 Charakteristika radu múčnatkotvaré

Rad múčnatkotvaré (latinsky „*Erysiphales*“, česky „padlí“, nemecky „Echte Mehltau“, anglicky „powdery mildews“ a tiež „PM“) zahŕňa jedny z najčastejšie sa vyskytujúcich fytopatogénnych mikromycét kozmopolitného rozšírenia (Paulech, 1995; Lebeda et al., 2017). Jedná sa o vysoko špecializovaných obligátne biotrofných parazitov, z oddelenia vreckovýtrusých húb (*Ascomycota*), infikujúcich približne 10 000 druhov krytosemenných rastlín (*Angiospermae*) predovšetkým v miernych a subtropických pásmach (Braun a Cook, 2012; Mieslerová et al., 2022).

Pod biotrofnými patogénmi rozumieme organizmy tvoriace potravný vzťah so živými bunkami hostiteľov bez toho, aby ich prioritne usmrcovali. V širokej konkurencii mikroorganizmov získali výhodu tie, ktoré si počas evolúcie vytvorili mechanizmy k preniknutiu do hostiteľských pletív a buniek. Vďaka nim môžu čerpať živiny od svojho hostiteľa stabilne v čase (Sedlářová et al., 2021).

Medzi najpočetnejšie rody múčnatkotvarých patria tie, ktoré sú špecializované na hostiteľskú rastlinu jedného druhu (Lebeda et al., 2017). Tieto druhy nazývame monofágne. Príkladom je *Phyllactinia liriiodendri* parazitujúca na ľaliovníku tulipánokvetom (*Liriodendron tulipifera*). Druhy parazitujúce v rámci jednej čeľade na rôznych rodoch a druhoch sa označujú ako oligofágne, napríklad *Blumeria graminis*. Druhy parazitujúce v rámci rôznych čeľadí sa označujú ako polyfágne, napríklad *Golovinomyces bolayi* (Sedlářová et al., 2021).

Výskyt patogénu sa na rastlinnom tele prejavuje tvorbou bieleho práškovitého mycélia usporiadaného do kruhových útvarov. Mycélium sa postupne rozrastá až pokryje celý povrch rastlinných orgánov. Zmeny možno zaznamenať na úrovni celých rastlín, orgánov, pletív, a taktiež na bunkovej a subcelulárnej úrovni. Od začiatku infekčného procesu rastliny zvyšujú intenzitu respirácie napadnutých pletív. Tá začne klesať s nástupom nekróz a odumierania pletív. V infikovaných rastlinách dochádza k zhoršeniu vodného režimu znížením regulačnej schopnosti prieduchov a k oslabeniu intenzity fotosyntézy (Paulech, 1995).



Obrázok 1 Makroskopicky viditeľné príznaky infekcie múčnatkotvarými na *L. serriola* L. Foto: Kitner, M.

Ekonomický dopad týchto obligátnych biotrofných parazitov je v rastlinolekárstve a v ochrane rastlín veľký nakoľko znehodnocujú hospodársky významné plodiny, okrasné rastliny či plano rastúce rastliny (Braun a Cook, 2012).

Celkovo brzdia rast a vývoj rastlín a môžu spôsobiť opadávanie listov, čím ovplyvňujú úrodu. Hostiteľov však primárne neusmrcajú a sú teda niekedy označované ako oslabovače (debilitátory) svojich hostiteľov (Sedlářová et al., 2021). Ako uvádza Glawe (2008) *Erysiphales* sú jedny z najznámejších, pritom zatiaľ málo preskúmaných, rastlinných patogénov na svete.

2.2 Slovenské názvoslovie

Platne publikované slovenské názvy húb sú obsiahnuté v knižnej publikácii *Flóra Slovenska X/1 Huby Múčnatkotvaré (Erysiphales)* z roku 1995, ktorej autorom je Cyprián Paulech a súčasne v knižnej publikácii *Zoznam nižších a vyšších rastlín Slovenska* z roku 1998, ktorej autormi sú Karol Marhold a František Hindák (Lebeda et al., 2017).

Ako uvádza Paulech (1995) v knižnej publikácii *Flóra Slovenska X/1 Huby Múčnatkotvaré (Erysiphales)* pre fytopatogénne mykromycéty rádu *Erysiphales* neexistujú v slovenskom jazyku ustálené názvy. Na odlíšenie rodov a druhov sa používajú latinské názvy. V súlade s botanicou nomenklatúrou je aktuálne zaužívaný preklad názvu rádu *Erysiphales* ako múčnatkotvaré a preklad názvu čeľade *Erysiphaceae* ako múčnatkovité.

Paulech (1995) navrhuje ponechať v slovenčine názov múčnatka pre rod *Erysiphe*. Tento rod dnes zahŕňa aj bývalé samostatné rody – okrem iných napr. rody *Microsphaera* (drobnomúčka) či *Uncinula* (špirálovka) (Paulech, 1995; Braun a Cook, 2012). Pre rody

Blumeria, *Leveillula* a *Sawadaea* odporúča Paulech (1995) používať názvy *blumeria*, *sawadea* a *leveilula*. Pre rod *Arthrocladiella* navrhuje názov *kustovnicomúčka* a pre rod *Phyllactinia* *veľkomúčka*. Rod *Podosphaera* odporúča pomenovať *podomúčka* (Paulech, 1995).

Pre choroby rastlín spôsobené fytopatogénmi z radu *Erysiphales* navrhuje Paulech (1995) ponechať zaužívaný názov *múčnatka*, s uvedením rodového názvu infikovanej rastliny, napr. *múčnatka viničová*.

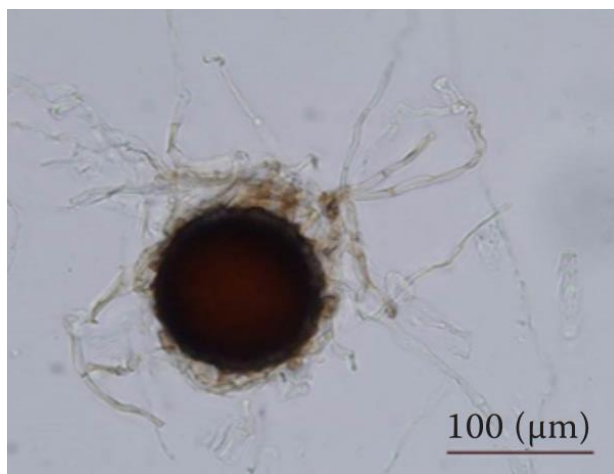
Písanie kurzívy v slovenskom botanickom názvosloví je stanovené pri latinských názvoch druhov, rodov, čeľadí, radov, tried, oddelení, podriš a ríš. Pričom sa latinské názvy od názvu rodu vyššie píšu s veľkým začiatočným písmenom. Všetky slovenské taxonomické názvy sa píšu s malým začiatočným písmenom (Úrad pre vydávanie publikácií Európskej únie, 2022).

2.3 Taxonómia

Štúdium systému múčnatkotvarých prináša nové poznania tejto skupiny húb. Každý stupeň poznania umožňuje vytvoriť a použiť iné klasifikačné systémy a s tým spojenú nomenklatúru, zmenu pôvodného názvoslovia (Paulech, 1995; Petřeková, 2018).

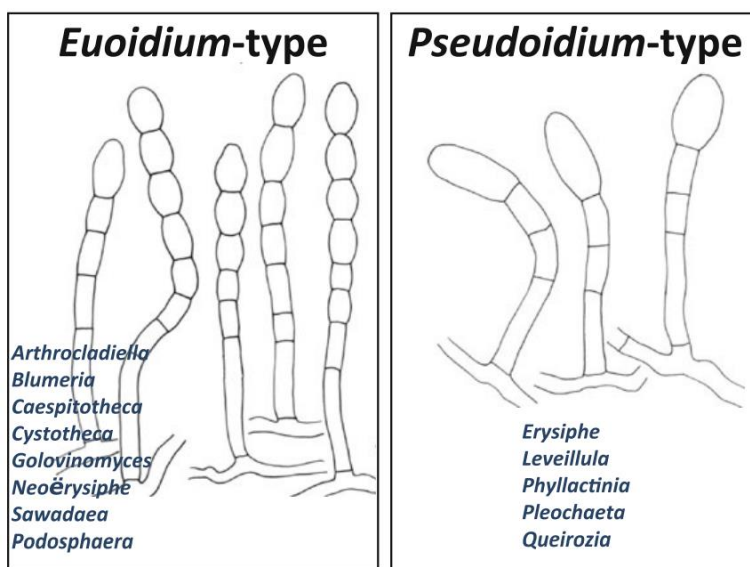
Už od úplných začiatkov vedeckej mykológie, približne pred 200 rokmi, priťahovali múčnatkotvaré pozornosť botanikov a mykológov (Braun a Cook, 2012). Ako prvý zmienku o múčnatkotvarých uviedol v roku 1753 Linnaeus, keď opísal druh *Mucor erysiphe* (Bradshaw et al., 2022). Dnes je tento organizmus známy pod menom *Phyllactinia guttata* (Braun a Cook, 2012).

Taxonómia múčnatkotvarých bola pôvodne postavená na štúdiu teleomorfných znakov, predovšetkým na pozorovaní chasmothécií (Obr. 1). Apendixy chasmothécií boli dlho považované za podstatné morfológické rozoznávacie znaky. Anamorfné štádia boli mnohými autormi zanedbávané a zahrnuté do poznatkov boli až neskôr (Braun a Cook, 2012; Bradshaw et al., 2022). Aktuálne platná taxonómia vznikla vďaka použitiu elektrónových mikroskopov a využitiu metód z molekulárnej biológie, ktoré priniesli nové vedecké poznatky (Braun a Cook, 2012).



Obrázok 2 Chasmothécia druhu *G. bolayi* na *L. serriola* (Mieslerová et al., 2020b).

Molekulárne metódy preukázali, že skupiny s nekomplikovanými mycelioidnými apendixami vznikli v dôsledku niekoľkonásobnej konvergencie v priebehu evolúcie a sú polyfyletické. V determinácií sa preto viac uplatňujú anamorfné štádia a to konkrétne morfológia konidioforov s konídiami. Študuje sa tiež spôsob produkcie konídií, ktoré môžu vznikáť jednotlivo (typ *Pseudoidium*) či v retiazke (typ *Euoidium*) (Sedlářová et al., 2021).

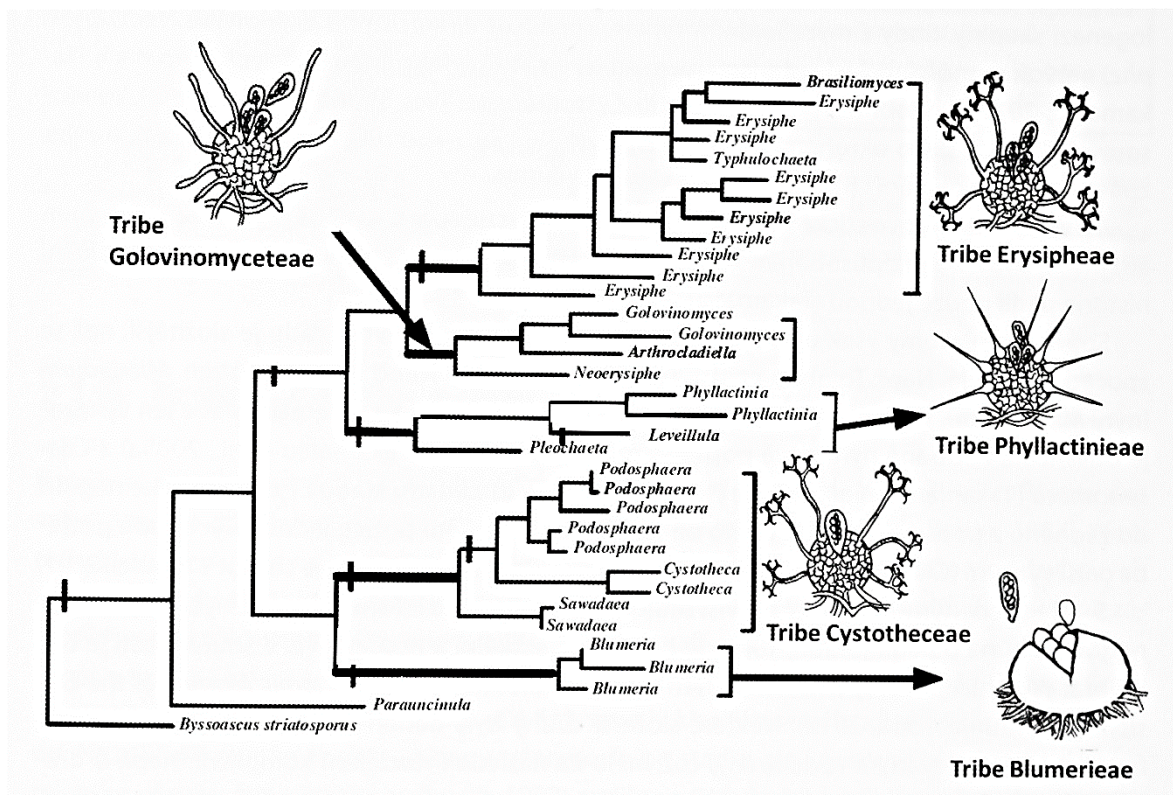


Obrázok 3 Skupiny rodov múčnatkotvarých na základe typu genézy konidioforov (Takamatsu, 2013b).

Vďaka najnovším taxonomickým poznatkom zhrnutým v monografii *Taxonomic manual of the Erysiphales* od Brauna a Cooka (2012) získaných na základe rDNA analýz bola čeľaď *Erysiphaceae* (Tul. a C. Tul.) rozdelená do 5 hlavných skupín (tribusov) (Lebeda et al., 2017). Jedná sa o tribusy Erysipheae, Golovinomyceteae, Cystotheceae, Phyllactinieae a Blumerieae (Petřeková, 2018).

Tribusy Erysipheae, Cystotheceae a Phyllactinieae pozostávajú zo zástupcov parazitujúcich na stromoch aj na bylinách, kým zvyšné 2 tribusy pozostávajú z čisto bylenných parazitov (Takamatsu et al., 2015). Druhy parazitujúce na drevinách (napríklad *Parauncinula*, *Caespitotheca*) sú považované za fylogeneticky staršie. Je teda pravdepodobné, že prvými hosťiteľmi múčnatkotvarých boli dreviny (Takamatsu et al., 2010).

Do 1. tribusu Erysipheae radíme jediný rod *Erysiphe*. Do 2. tribusu Golovinomyceteae (U. Braun) U. Braun a S. Takamatsu (2000) patria 3 subtribusy a to subtribus Neoerysiphinae (U. Braun) U. Braun a S. Takamatsu (2000) s rodom *Neoerysiphe*, subtribus Golovinomycetinae s rodom *Golovinomyces* a subtribus Arthrocladiellinae (R.T.A. Cook et al.) U. Braun a S. Takamatsu (2000) s rodom *Arthrocladiella*. Tribus číslo 3, Cystotheceae (Katumoto) (Braun a Cook, 2012) zahŕňa subtribus Cystothecinae s rodmi *Cystotheca* a *Podosphaera* emend. a subtribus Sawadaeinae (U. Braun) U. Braun a S. Takamatsu (2000) s rodom *Sawadaea*. Phyllactinieae (Palla) R.T.A. Cook et al., in Braun (1999), 4. tribus, pozostáva zo 4 rodov: *Leveillula*, *Phyllactinia*, *Pleochaeta* a *Queirozia*. Predposledný 5. tribus *Blumerieae* zahŕňa rod *Blumeria*. A posledný 6. tribus Unnamed zahŕňa anamorfný rod *Oidium* subgen. *Microidium* (Braun a Cook, 2012). Prehľadnú názornosť vzájomných vzťahov medzi jednotlivými skupinami zobrazuje Obrázok 4.



Obrázok 4 Fylogenetické vzťahy jednotlivých skupín múčnatkotvarých (Trojanová, 2017).

2.4 Aktuálne metódy štúdia radu múčnatkotvaré

Erysiphales zahŕňajú taxonomicky variabilnú skupinu rastlinných patogénov (Braun a Cook, 2012). Ide o organizmy s množstvom genotypových a fenotypových variácií. Je známe, že rôzni zástupcovia z radu múčnatkotvaré, môžu súčasne infikovať rovnakú hostiteľskú rastlinu, čím sa zvyšuje pravdepodobnosť prehliadnutia nového druhu (Glawe, 2008).

Na získanie moderných taxonomických a fylogenetických poznatkov je nevyhnutný polyfázický prístup výskumu. Jedná sa o štúdium morfológie (anamorfných aj teleomorfných štádií), ultraštruktúry, genómu, životných cyklov, ekologických vzťahov, geografickej distribúcie, hostiteľských organizmov a ich symptómov. Logicky sa jedná o dlhodobý proces založený na veľkom množstve zozbieraných vzoriek (Braun a Cook, 2012; Sedlářová et al., 2021).

Pomerne jednoduchou determináciou, ktorá vedie k určeniu patogénu do radu je rozpoznanie morfológických symptómov na hostiteľskej rastline. Ďaleko náročnejšie je zaradenie organizmu do druhu (Braun a Cook, 2012; Sedlářová et al., 2021), pre ktoré je nevyhnutné vzorku podrobne skúmať pod mikroskopom. Počas mikroskopickej determinácie

sa zameriavame na pozorovanie nepohlavných znakov ako sú usporiadanie konídií na konidioforoch, prítomnosť či absencia fibrozínových teliesok v konídiách, spôsob klíčenia konídií, rozmery konidioforov a tvar bazálnej bunky (Sedlářová et al., 2021). Pozorujeme tiež pohlavné morfológické znaky – počet, veľkosť a tvar apendixov, veľkosť a tvar chasmothécií, počet a tvar vreciek a veľkosť, tvar a počet askospór vo vrecku (Glawe, 2008; Braun a Cook, 2012).

Ako uvádza Glawe (2008) informácie o nepohlavných štádiách múčnatkotvarých chýbajú približne pri 75% druhoch. Vzhľadom na to, že konídie mnohých druhov sú veľkosťou a tvarom medzi sebou podobné, je použitie výhradne morfológických znakov na určenie jedincov do druhov často problematické (Glawe, 2008).

Význam ITS nrDNA regiónov pri identifikácii hubových organizmov

Molekulárne metódy slúžia k študovaniu najrôznejších aspektov variability múčnatkotvarých. Vďaka sekvenovaniu DNA vieme určiť presné poradie nukleotidov a získať tak detailnú informáciu o jej najzákladnejšej štruktúre (Kitner a Michalcová, 2017).

Prepisom génov oblasti eukaryotickej jadrovej ribozomálnej DNA (nrDNA) vzniká pre-rRNA, ktorá prechádza posttranskripčným procesom. Výsledkom sú rôzne dlhé molekuly rRNA, ktoré sa skladajú do funkčných ribozómov.

Funkčný ribozóm tvorí malá (18S rRNA) a veľká (5.8S a 28S rRNA) podjednotka (Prahl et al., 2021). Gény kódujúce vysoko konzervatívne ribozomálne podjednotky 18S, 5.8S a 28S RNA oddeľujú dva interné transkribované spacery (medzerníky) – ITS1 a ITS2 (Kitner a Michalcová, 2017). Spacer ITS1 tvorí oblasť medzi génmi 18S a 5.8S., zatiaľ čo spacer ITS2 sa nachádza v oblasti medzi génmi 5.8S a 28S (Prahl et al., 2021).

Vysoká evolučná rýchlosť vnútorných transkribovaných spacerov (ITS1 a ITS2) vedie k ich používaniu pri determinácii druhov už viac ako 30 rokov (Bradshaw a Tobin, 2020). Ide o oblasti, ktoré sú variabilné v nukleotidových sekvenciách a druhovo špecifické. Vďaka tomu sa stali štandardným jadrovým DNA barcodingovým markerom pre identifikáciu organizmov v ríši húb, a vhodným nástrojom pre štúdium taxonómie a vnútrodruhej variability blízko príbuzných druhov (Schoch et al., 2012). Pre fylogenetické analýzy múčnatkotvarých sa využívajú takisto sekvenované informácie genómovej oblasti 28S veľkej podjednotky ribozóm z domén LSU, prípadne z domén D1 a D2 na 5' konci rDNA (Kitner a Michalcová, 2017; Bradshaw a Tobin, 2020). Gén SSU

z oblasti 18S rRNA sa vo fylogénéze takisto používa, ale je typickejší pre rozdelenie druhov baktérií, nakoľko je menej hypervariabilný (Schoch et al., 2012).

Identifikácia niektorých skupín húb, na základe DNA, nie je jednoduchá a to dôsledkom toho, že niektoré taxonomické a fylogenetické skupiny húb nie sú kultivovateľné. To súvisí s ďalšou komplikáciou, a to kontamináciou DNA patogénu s rastlinnou a/alebo hubovou DNA (Bradshaw a Tobin, 2020). V tomto prípade sa stielka patogénu získava napríklad zoškrabovaním mycélia z povrchu hostiteľa alebo je pre extrakciu DNA použitá malá časť infikovaného listu (Kitner a Michalcová, 2017). Navyše, niektoré skupiny húb vyžadujú pre amplifikáciu špecifické primery (Prahl et al., 2021). Sekvenovanie múčnatkotvarých sa často uskutočňuje pomocou primerov umiestnených v konzervatívnych génoch 18S a LSU. Primery musia byť dostatočne dlhé, aby sa zhodovali s väčšou časťou DNA múčnatkotvarých a zároveň dostatočne špecifické, aby sa nezhodovali s inými organizmami (Bradshaw a Tobin, 2020).

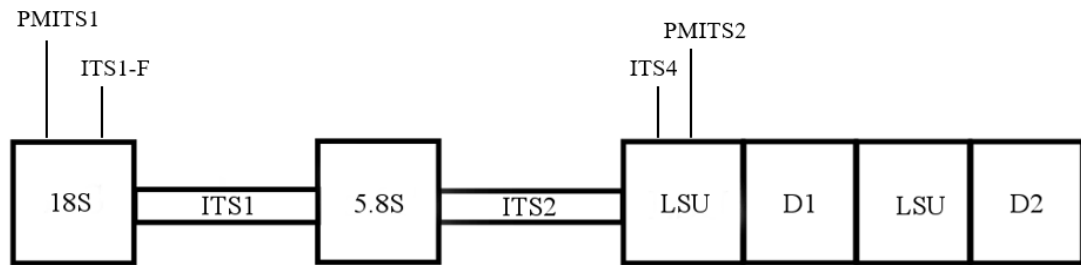
Pre získanie sekvenčných dát pri obligátne biotrofných patogénoch zo skupiny múčnatkotvaré sa v súčasnosti používa tzv. nested PCR. Jedná sa o modifikáciu klasickej PCR reakcie, ktorá sa všeobecne používa v situáciách, kedy je nutné zvýšiť senzitivitu a/alebo špecificitu PCR (Green a Sambrook, 2019). Táto metóda je teda vhodným nástrojom štúdia obligátne biotrofných patogénov rastlín, pri ktorých nie je možné kultivovať patogén oddelene mimo svojho hostiteľa a pri izolácii DNA dochádza ku koextrakcii DNA patogénu a jeho hostiteľa. Nested PCR zvyčajne zahrnuje dve sekvenčné amplifikačné reakcie, z nich každá používa iný pár primerov. Použitím primerov špecificky sa viažucich na DNA patogénu sa v priebehu prvej PCR reakcie zvýši špecificita reakcie, pretože po jej priebehu získame produkt obsahujúci vysoké zastúpenie PCR fragmentov odvodených z DNA patogénu. Tento produkt sa používa ako templát (cieľ) pre druhú PCR, v ktorej sú použité primery cieleňé do vnútorných častí oblasti PCR produktu získaného v prvom kroku (Kitner a Michalcová, 2017; Green a Sambrook, 2019).

Vo všeobecnosti sa odporúča kombinovať výsledky získané sekvenáciou niekoľko genomických regiónov. Pri použití nevhodného markeru totiž môže dôjsť k nesprávnemu taxonomickému a fylogenetickému zaradeniu, a preto nie je vhodné sa spoliehať iba na jeden molekulárny marker (Prahl et al., 2021). Sekvenčný protokol, ktorý prezentuje Bradshaw a Tobin (2020) umožňuje sekvenovanie vzoriek starých až 130 rokov, čo môže byť mimoriadne užitočné pri študovaní epidemiologických, ekologických, fytopatologických

a taxonomických problémov v patogénom systéme múčnatkotvarých (Bradshaw a Tobin, 2020).

Výsledky sekvencií pochádzajúce z rôznych geografických oblastí od rôznych autorov sú pomerne ľahko porovnateľné vďaka archivácií vo verejne dostupných internetových databázach ako je napríklad GenBank (Kitner, 2013).

Kombináciou výsledkov získaných pomocou klasických fytopatologických a molekulárno-genetických metód sú v súčasnosti vykonávané taxonomické revízie druhových komplexov a popisované nové druhy patogénnych húb, vrátane rôznych druhov múčnatkotvarých (Bradshaw et al., 2017, 2022; Braun et al., 2019).



Obrázok 5 Mapa primerov použitých pre amplifikáciu a sekvenovanie (ITS1-F/ITS4) jadrového ITS regiónu pri múčnatkotvarých. Kresba: Čurná, A.

2.5 Životný cyklus

Vláknité huby z oddelenia vreckaté huby (*Ascomycota*), do ktorých sa radí aj múčnatka, majú podobnú stavbu buniek a spór, pričom spóry sú morfológicky rôznorodé a výrazné. Bunky sú tvorené z bunkovej steny, jadra, vakuoly, voroninového telieska a ďalších organel (Glawe, 2008).

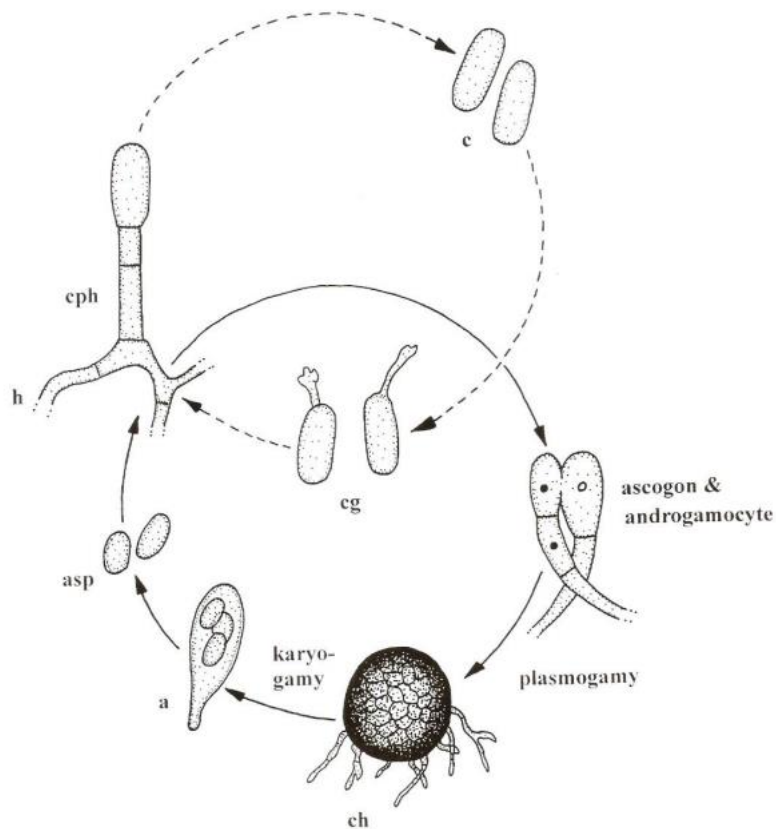
Životný cyklus sa skladá zo sexuálneho (teleomorfného) a asexuálneho (anamorfného) štádia, pričom niektoré zo štádií môže chýbať. Pri niektorých rodoch bolo zistené len jedno zo štádií životného cyklu (Glawe, 2008).

Výskyt sexuálnej a asexuálnej fázy závisí tiež od klimatických podmienok. Niektoré druhy tvoria asexuálne štádia v miernom klimatickom podnebí, pričom sexuálne štádia v miernom klimatickom podnebí netvoria. Príkladom je druh *Erysiphe berberidis* DC.,

pri ktorom sa vyskytuje pohlavné štádium v Európe, ale v západnom Washingtone sa vyskytuje iba nepohlavné štádium (Glawe, 2008). Na území Slovenskej republiky sa vyskytujú pri viacerých druhoch obe štádia – pohlavné aj nepohlavné (Paulech, 1995).

Najdôležitejšími abiotickými faktormi prostredia, ovplyvňujúcimi vývoj a rast druhov múčnatkotvarých sú teplota, celková vlhkosť vzduchu, slnečné žiarenie, koncentrácia CO₂ vo vzduchu ako aj zloženie a pohyb ovzdušia. Vývoj závisí aj od biotických faktorov ako sú hostiteľské druhy, iné patogény, hyperparazity či ľudská činnosť (Mieslerová et al., 2022).

Správne porozumenie spoločného nazývania múčnatky a hostiteľov je nevyhnutné k správnej stratégii kontroly patogénu. Načasovanie jednotlivých štádií životného cyklu tohto fytopatogénu je korelované so životnými cyklami hostiteľov (Glawe, 2008).



Obrázok 6 Životný cyklus múčnatkotvarých (*Erysiphales*), a = vrečko, asp = askospory, c = konídie, cg = klíčiace konídie, ch = chasmothécium, cph = konidiofor, h = hýfy (Braun a Cook, 2012).

2.5.1 Infekcia

Konídie, askospóry klíčiace na vhodnom substráte, mycélium prezimujúce v dormantných pupeňoch či trvalo prezimujúce mycélium dávajú impulz na vznik infekčného cyklu. Iniciácia cyklu z askospór nie je však až tak bežná pri všetkých druhoch múčnatkotvarých. Vyskytuje sa predovšetkým pri druhu *Blumeria graminis* (múčnatka trávová) (Sedlářová et al., 2021).

Infekčný cyklus je najčastejšie podnietený konídiami po dopade na hostiteľský organizmus, kedy konídie vyklíčia. Klíčne vlákna sa prostredníctvom apresórií, krátkych bočných výrastkov hýf produkujúcich penetračné hroty, prichytia na povrch hostiteľa. Penetračné hroty, úzke výstupky z apresórií, prenikajú bunkovými stenami hostiteľov a infikujú ich. Prenikanie penetračných hrotov do hostiteľských buniek je sprevádzané vysokým turgorom a enzymatickou aktivitou (Paulech, 1995; Glawe, 2008).

Pri úspešnom infekčnom procese a náchylnosti hostiteľa dochádza v epidermálnych bunkách k tvorbe haustórií (epifiticky). Tie sa podieľajú na udržovaní parazitického vzťahu medzi zástupcami múčnatkotvarých a hostiteľským organizmom (Petřeková, 2018).

Taktiež je pri niektorých druhoch možná aj nepriama penetrácia. Ide o infekciu, počas ktorej hýfy vstupujú do hostiteľa prostredníctvom prieduchov. Jedná sa napríklad o rod *Leveillula*. Pri úspešnom infekčnom procese a náchylnosti hostiteľa dochádza k tvorbe hýf vnútri pletiva (intercelulárne).

Pri priamej aj pri nepriamej penetrácii následne dochádza k rozrastaniu priehradkového mycélia s jednoduchým pórom, ktoré zahajuje na konidioforoch tvorbu konídií (sporuláciu) (Sedlářová et al., 2021).

Zvyčajne sa na konci vegetačnej sezóny pri dobrých podmienkach tvoria pohlavné orgány – gametangiá. Tie sú rozlíšené na samčie pohlavné orgány (antheridium) a samičie pohlavné orgány (askogon). Ich kopuláciou vznikajú trvalé chasmothéciá (plodnice obsahujúce vrecká s haploidnými vreckospórami). Tento proces je ovplyvnený viacerými faktormi a to predovšetkým hostiteľom a podmienkami prostredia. Nie všetky druhy múčnatkotvarých tvoria chasmothéciá. Chasmothéciá sú novou kombináciou genetického materiálu a sú významné pre evolúciu patogénu ale aj pre prežitie nepriaznivých podmienok (Lebeda et al., 2017).

2.5.2 Anamorfné štádium

Nepohlavné štádium životného cyklu nie je známe pri všetkých rodoch. Medzi rody, pri ktorých nebolo preukázané, patria *Brasiliomyces*, *Typhulochaeta* a *Parauncinula*. Naopak napríklad v rodoch *Microidium* a *Oidium* je zaznamenané výhradne anamorfné štádium (Glawe, 2008).

Po infekcii hostiteľského organizmu vznikajú mladé biele, prípadne priehľadné hýfy, ktoré utvárajú mycélium. Hýfy sa počas dozrievania predlžujú, vetvia a súčasne menia sfarbenie na šedú, červenú alebo hnedú farbu (Lebeda et al., 2017).

Do radu múčnatkotvaré spadá 12 rodov patriacich medzi ektoparazity. Tie sa vyznačujú produkciou vegetatívneho mycélia a konídií epifiticky na povrchu hostiteľa. Zvyšné štyri rody (*Phyllactinia*, *Pleochaeta*, *Queirozia* a *Leveillula*) tvoria monofyletickú skupinu, ktorá zahŕňa organizmy produkujúce endofytické a hemiendofytické mycélium. Zástupcovia rodu *Leveillula* vytvárajú endofytické hýfy, z ktorých vznikajú konídie a konidiofory, tie prerastajú prieduchmi von z pletív (Glawe, 2008; Takamatsu, 2013b; Sedlářová et al., 2021).

Bunky hyalínneho mycélia, tvoreného hýfami, sú tenkostenné, priehradkované, jednojadrové a vakuolizované (Paulech, 1995). Tvar buniek je rôznorodý. Pozorované boli rovné, zvlnené či uzlovité tvary so šírkou približne od 2 μm do 10 μm . Ich dĺžka sa pohybuje medzi 20 μm – 150 μm , pričom sa vetvia približne v pravých uhloch (Glawe, 2008; Braun a Cook, 2012; Petřeková, 2018).

Čas pretrvávania mycélia nie je jednotný. Bunky hýf môžu byť perzistentné (pretrvávajúce). Tento typ mycélia zostáva na povrchu hostiteľa od jeho vzniku až do konca vegetácie, prípadne je schopné prežiť aj počas zimy. Mycélium môže tiež pretrvať na povrchu hostiteľa iba krátko. V tomto prípade ide o tzv. zanikajúce mycélium (Paulech, 1995).

V rade múčnatkotvaré pozorujeme dva typy modifikácií hýf. Prvou modifikáciou sú apresóriá, druhou haustóriá (Petřeková, 2018). Rozdiel je pozorovateľný v morfológií a vo funkcií. Apresóriá sú infekčné štruktúry, bočné výrastky či rozšírenia vlákien, ktorými sa mycélium upevňuje na povrch hostiteľa. Vznikajú na kľúčnych vláknach alebo hyfách a vďaka nim parazitická huba priľne k povrchu rastliny. Haustóriá sú tvarovo aj funkčne špecializované štruktúry hruškovitého tvaru s primárnou funkciou zaistenia výživy patogénu prijímaním živín z buniek hostiteľa (Paulech, 1995).

Pri niektorých druhoch môžeme pozorovať tvorbu sekundárnych hýf. Somatické (asimilačné) hýfy sú zdrojom vzniku konidioforov (Lebeda et al., 2017). Konidiofory sú špecializované útvary na tvorbu konídií, vegetatívnych rozmnožovacích útvarov. Sú orientované približne kolmo vzhľadom na povrch hostiteľa. Na prvú bazálnu bunku (foot - cell) je napojená jedna alebo viac (distálnych) buniek a tiež generatívna bunka, ktorá sa podieľa na tvorbe konídie (Braun a Cook, 2012; Lebeda et al., 2017).

Konídie sú jednobunkové, tenkostenné, zvyčajne hyalínne spóry (Paulech, 1995). Ich prostredníctvom je zaistené nápadné nepohlavné rozmnožovanie, počas ktorého je na vegetatívnych alebo generatívnych orgánoch hostiteľa vytvorený typický biely práškovitý povlak.

Väčšina konídií je schopná vyklíčiť až potom, čo dôjde k odtrhnutiu konídie od konidioforu, napríklad pôsobením vetra či mechanických síl (Petřeková, 2018). Následne sa na hostiteľskom organizme vytvorí primárne kľúčne vlákno, vyvíjajúce sa v mycélium alebo je sekundárne pretvárané (Braun a Cook, 2012).

2.5.3 Teleomorfné štádium

Počas pohlavného štádia životného cyklu huba na povrchu infikovaného hostiteľa tvorí plodnice s vreckami a askospórmi (Paulech, 1995). V rade múčnatkotvaré sú plodnice nazývané chasmothécia. Tento termín pre pomenovanie askokarpov (pohlavných plodníc) pri múčnatkotvarých navrhli Braun et al. (2002) a to pre odlíšenie od iných askomycét (Braun a Cook, 2012). V starších literatúrach sú chasmothéciá nazývané ako kleistothéciá či perithéciá.

Chasmothécia, na rozdiel od kleistothécií, majú pravidelne usporiadané vrecká a pukajú vertikálnou alebo horizontálnou štrbinou (Paulech, 1995; Glawe, 2008; Lebeda et al., 2017). Praskanie chasmothécií je spôsobené zvýšením turgorového tlaku, ktorý vzniká potom čo chasmothécium absorbuje voľnú vodu (Glawe, 2008).

Pohlavné plodnice v rade múčnatkotvaré sa vyznačujú zo začiatku bledým sfarbením, to sa mení na žlté, jantárové a v štádiu zrelosti na hnedé až čierne (Glawe a Dugan, 2006). Zrelé chasmothécia sú ohraničené stenou (perídiom), ktorej štruktúra sa líši pri jednotlivých taxónoch (Paulech, 1995). Chasmothécia dosahujú veľkosti od 50 μm do 400 μm , pričom môžu byť zanorené v hustej spleti hýf ale netvorí sa v prieduchoch. Mycélium v neskorších

fázach vývojového cyklu zabezpečuje dostatočné uloženie živín a vývojový cyklus môže prebiehať nezávisle od množstva dodávanej energie od hostiteľa (Glawe, 2008).

Chasmothécium môže vzniknúť 4 spôsobmi, na základe ktorých rozdeľujeme tieto typy: pohlavný typ monoaskálny (jednovreckový), sexuálny typ polyaskálny (viacvreckový), pseudopohlavný typ a nepohlavný typ. Pri nepohlavnom type nedochádza ku kontaktu s pohlavnými orgánmi, a ak dôjde, jadro samčieho androgamocytu degraduje (Braun a Cook, 2012).

Na obode chasmothécia, prípadne na jeho spodnej strane sa nachádzajú apendixy. Ide o druhovo špecifické prívesky (Petřeková, 2018). Tie slúžia k prichyteniu chasmothécia na hostiteľský organizmus či na orientáciu chasmothécii pri pohybe vzduchom (Glawe, 2008).

Pohlavné rozmnožovanie je aktivizované produkciou gametangií (gamocystov). Tie sú rozdelené na samčie a samičie. Samčie gametangia sa nazývajú antheridia, prípadne androgamocysty a samičie askagónia či gynogamocysty. Po splynutí plaziem v priebehu plasmogamie dochádza ku dikaryotizácií, prechodu jadra z androgamocysty do gynogamocysty. Ide o proces, ktorého výsledkom je bunka s dvomi jadrami. Pri monoaskálnych bunkách môže dikaryotický stav pretrvávajú dlhšie ako pri polyaskálnych druhoch (Glawe, 2008; Braun a Cook, 2012).

Po dikaryotizácií dochádza k rastu hýf. Tie sú produkované jednojadrovými bunkami askogónia. Ich úlohou, na ktorej sa podieľajú aj bunky s antherídiami, je vytvoriť perídium. Viacjadrové askogónium sa delí na množstvo dikaryotických a monokaryotických buniek. Na rozdiel od perídia, ktoré je tvorené z jednojadrových buniek, vrecká sú tvorené z dvojjadrových buniek. Ku karyogamií a k meióze dochádza na začiatku vývoja vrecka (Glawe, 2008; Lebeda et al., 2017).

Počet vreciek nie je medzi rodmi ustálený. Pohybuje sa od 1, napríklad niektoré druhy z rodu *Podosphaera*, po približne 40 pri niektorých druhoch rodu *Leveillula*. Počet je korelovaný s objemom jednotlivých chasmothécii (Braun a Cook, 2012).

Čeľaď *Erysiphaceae* formuje jeden typ vrecka, typ *Erysiphe*. Vyznačuje sa absenciou apikálneho póru. Askospóry sa uvoľňujú cez stenčenú časť pred tvarovanej vrcholovej steny vrecka. V jednom vrecku sa nachádza od 2 do 8 jednobunkových elipsovito vajcovitých až cylindrických askospór bez nápadných vakuol. Askospóry sú zvyčajne rovné, niekedy

zvlnené, bezfarebné nažltlo až nazelenalé s rozmermi od 10 μm – 50 μm na dĺžku a od 8 μm – 30 μm na šírku (Glawe, 2008; Braun a Cook, 2012).

Vyčnievajúce alebo voľné vrecká v istý okamžik, napríklad po daždi, prasknú a súčasne vypustia svoje spóry (Braun a Cook, 2012; Lebeda et al., 2017). Počet askospór vo vrecku sa líši druh od druhu, pričom počet sa pohybuje od 2 do 8 askospór (Paulech, 1995).

2.6 Prežívanie nepriaznivých podmienok

Obligátne parazity, medzi ktoré patrí aj rad múčnatkotvaré, musia byť schopné prežiť aj počas ročných období, kedy je citlivé tkanivo hostiteľskej rastliny nedostupné. Pre navrhnutie vhodnej stratégie kontroly patogénu je znalosť prežitia nepriaznivých podmienok týchto organizmov užitočná. V súčasnosti poznáme 3 hlavné spôsoby prežitia.

Prvým spôsobom je prežitie prostredníctvom chasmothécií. Tie sú prispôsobené na prežívanie v chladných, ale aj suchých horúcich oblastiach. Druhou možnosťou je prežitie prostredníctvom púčikov hostiteľských rastlín, kedy druhy z radu múčnatkotvaré infikujú pupene pomocou hýf s haustóriami, konidioforov či konídií a prežívajú tu nepriaznivé obdobie. Treťou možnosťou je prežitie pomocou mycélií. Tie zostávajú zachované na infikovaných hostiteľoch s listami pretrvávajúcimi cez zimu (Glawe, 2008; Glawe a Grove, 2015).

2.7 Hyperparaziti múčnatkotvarých

Zástupcovia z radu múčnatkotvaré majú približne 40 prirodzených nepriateľov z oddelenia húb. Ide o široký okruh vreckatých húb, podstupujúcich pohlavné či nepohlavné štádia v priebehu životného cyklu, a pár druhov z oddelenia bazídiových húb patriacich k rodu *Tilletiopsis* rozmnožujúcich sa nepohlavne (Braun a Cook, 2012).

Najbežnejším a najdôležitejším hyperparazitom múčnatkotvarých, napádajúcich približne 66 druhov z nich, je *Ampelomyces quisqualis* Ces, ktorý patrí k nepohlavne sa rozmnožujúcim vreckatým hubám (Braun a Cook, 2012).

Ampelomyces quisqualis je druh vyskytujúci sa intracelulárne. Počas svojho životného cyklu infikuje hýfy a reprodukčné orgány (chasmothécia, konidiofory a konídie) svojho hostiteľa, napr. obligátneho parazita *P. xanthii* či druhový komplex *G. orontii*, pričom vnútri ich stielok vytvorí rozmnožovací útvary pyknidy (Lebeda et al., 2017).

Výskyt *A. quisqualis* sa na hostiteľovi prejavuje negatívne a môže viesť k zničeniu napadnutej kolónie. Tento poznatok sa využíva tiež komerčne, napríklad na ochranu viniča hroznorodého pred múčnatkou viničovou (Lebeda et al., 2017).



Obrázok 7 Pyknidy hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* pod mikroskopom pri zväčšení 400x. Foto: Čurná, A.

2.8 Geografické rozšírenie

Medzi významné historické informácie o hostiteľoch radu múčnatkotvaré a o ich geografickej distribúcií patrí práca Ammana z roku 1986 (Glawe, 2008). Na základe jeho poznatkov, ale aj poznatkov ďalších bádateľov, môžeme predpokladať, že sa fytopatogénne mikromycéty z radu múčnatkotvaré vyskytujú prevažne v miernom podnebnom pásme na severnej pologuli (Paulech, 1995).

Smerom k oblasti rovníku a pólom sa ich početnosti a druhové zastúpenia znižujú (Paulech, 1995). V Nórsku sú niektoré hostiteľské druhy rastlín schopné vyhnúť sa fytopatogénom, a to migráciou smerom bližšie k polárnemu kruhu. Ide napríklad o hostiteľskú rastlinu *Betula* spp. a patogéna *Erysiphe betulae* (Lebeda et al., 2017).

V subtropických a tropických podnebných pásmach tvoria tieto obligátne parazity iba anamorfné štádia. Ich celkové početnosti a početnosti druhov v týchto podnebných pásmach

nedosahujú také hojnosti ako v miernom klimatickom pásme severnej pologule (Paulech, 1995).

V humídnych tropických oblastiach sú druhy z radu múčnatkotvaré ohrozené každodennými zrážkami, ktoré môžu splachovať spóry z povrchu hostiteľov. Je to výsledok extrémnej adaptácie na suché teplé počasie, kedy v priebehu evolúcie došlo k strate génov kódujúcich hydrofóbiny, na cystein bohaté proteíny odpudzujúce vodu, nachádzajúcich sa vo vrchnej vrstve bunkovej steny (Sedlářová et al., 2021).

Rozmanitosť radu múčnatkotvaré je v mnohých častiach sveta výrazne podceňovaná. Počet druhov zaznamenaných v Severnej Amerike je pravdepodobne len zlomkom všetkých vyskytujúcich sa druhov na danom území (Glawe, 2008). Nedostatočné dáta pochádzajú tiež z oblastí Južnej Ameriky, Afriky a Ázie s výnimkou Číny, Japonska a ruskej časti Ázie (Braun a Cook, 2012).

S intenzívnejším globálnym transportom rastlinného materiálu, vrátane leteckého, sú spóry šírené na veľmi veľké vzdialenosti od miest pôvodného výskytu. V prípade, že spóry nájdú vhodnú hostiteľskú rastlinu, infikujú ju a patogén sa môže nekontrolovateľne šíriť (Petřeková, 2018). Príkladom môže byť distribúcia druhu *Erysiphe flexuosa* napádajúceho pagaštan konský (*Aesculus hippocastanum*), ktorý bol pôvodne popísaný v Severnej Amerike, pričom sa v roku 2000 začal šíriť v Európe. Dostal sa napríklad na Slovensko či do Chorvátska (Petřeková, 2018). Dôkazom sú aj rastlinné záznamy o patogénnych hubách zavlečených do Nemecka a okolitých zemí, ktorých autormi sú Kreisel a Scholler. Od roku 1750 do roku 1994 bolo do skúmaných zemí zavlečených 16 druhov. Z toho 5 pôvodných zo Severnej Ameriky, 5 pôvodných z Ázie, 1 z Európy a 5 s nejasným pôvodom (Petřeková, 2018).

Medzi známe príklady šírenia patogénov poľnohospodárskych plodín do nových oblastí od polovice 19. storočia do začiatku 20. storočia patrí aj druh *Erysiphe necator*, ktorý parazituje na viniči hroznorodom. Tento druh má pôvod v Severnej Amerike, pričom v roku 1845 bol známy už aj v Európe a do roku 1852 sa vyskytoval v celej Európe vrátane Stredozemia. Vzhľadom na dlhú históriu vinohradníctva a pozornosť pri jeho pestovaní je mimoriadne nepravdepodobné, aby sa *E. necator* vyskytoval v Európe už skôr (Glawe, 2008). Ďalším druhom je *Podosphaera macularis*, pôvodom z Európy. Tá sa do štátu Washington, ktorý je hlavným producentom chmeľu v USA, dostala až v roku 1990 (Lebeda et al., 2017).

Distribúcia druhov na nové územia môže spôsobiť potláčanie iných druhov vyskytujúcich sa na danom území. Napríklad exotický druh *Erysiphe palczewskii*, potlačil fínsky endemický druh *Erysiphe trifolii* parazitujúci na karagane stromovitej (*Caragana arborescens*) (Glawe, 2008).

Ukazuje sa, že k šíreniu múčnatkotvarých na nové územie a k ich výskytu na nových hostiteľských rastlinách prispievajú aj klimatické zmeny a znečistenie ovzdušia (Glawe, 2008). Predlžujúce sa vegetačné obdobie má za následok pri niektorých druhoch väčšie množstvo produkovaných chasmothécií a teda hojnejšiu populáciu múčnatkotvarých v nasledujúcich vegetačných obdobiach (Glawe, 2008).

Na druhej strane existuje hypotéza, že napr. odsírenie tepelných elektrární vedie k väčšiemu rozšíreniu druhov z radu múčnatkotvaré, nakoľko dôsledkom ich odsírenia dosahuje síra v ovzduší menší percentuálny podiel. Existuje hypotéza, že vyšší podiel síry v ovzduší prirodzene eliminoval múčnatkotvaré. Je zaujímavé, že už v starovekom Grécku a Ríme sa k ochrane rastlín používala elementárna síra. Na začiatku 19. storočia bola síra používaná vo vylepšenej forme ako polysulfid vápenatý a dodnes je súčasťou v rade bežných prípravkov používaných k ochrane voči múčnatkotvarým (Lebeda a Mieslerová, 2010; Juroch, 2012; Lebeda et al., 2017).

2.8.1 Evolúcia radu múčnatkotvaré

Odhad o približnom čase, kedy prebehla evolúcia na planéte Zem, predstavuje dôležité informácie o živote. Jediným priamym dôkazom, ktorý nám informácie poskytuje, sú fosílné záznamy. To ale predovšetkým platí pre fosílie zvierat a veľkej časti rastlín. Opakom sú huby, pri ktorých sú fosílné záznamy extrémne vzácne. V rade múčnatkotvaré neexistuje žiadna spoľahlivá fosília, a preto týmto spôsobom nie sme schopní určiť ich vek. Alternatívnym spôsobom na určenie obdobia vzniku je využitie metód molekulárnej biológie (Takamatsu a Matsuda, 2004).

Údaje zo sekvencií v kombinácii s morfológickými znakmi hostiteľských organizmov a ich paleontologickými informáciami sú výborným sklbením na zistenie pôvodu a spôsobu šírenia radu múčnatkotvaré (Glawe, 2008).

Matsuda a Takamatsu (2003) zistili na základe sekvenovania ITS 28S rDNA regiónov blízky koevolučný vzťah medzi rodom *Golovinomyces* a zástupcami rastlín z čeľade *Asteraceae*, a to predovšetkým v počiatočných štádiách evolúcie. Podobný, no o niečo menej

výraznejší vzťah bol zistený aj pri evolúcií čeľade *Magnicellulatae* s rodmi *Podosphaera* a *Leveillula* (Matsuda a Takamatsu, 2003).

Počiatok krytosemenných rastlín je, po molekulárnej determinácii, datovaný na obdobie neskorej jury. Vzhľadom k tomu je nepravdepodobné, aby druhy z radu múčnatkotvaré vznikli skôr ako v perióde jury (pred 179-158 Ma), nakoľko ide o obligátnych parazitov (Takamatsu, 2013a), museli sa vyvinúť o niečo neskôr, teda najskôr v kriede (približne pred 135 Ma) (Takamatsu, 2013a).

Výskum autorov Takamatsu et al. (2013) poukazuje na dve dôležité fázy v evolúcií múčnatkotvarých. V prvej fáze dochádzalo k taxonomickej divergencii *Erysiphaceae* v súvislosti s fylogenetickým vývojom zástupcov čeľadi *Asteraceae*. Teda s novými hostiteľskými taxónmi (rodmi/druhmi) vznikali aj nové taxóny patogénov, ktoré sa prispôbovali novo vznikajúcim hostiteľským taxónom v rámci *Asteraceae*. Druhá fáza predstavovala tzv. „host-jumping“, kedy sa patogén prispôbil na iného hostiteľa z čeľade *Asteraceae* alebo z iného oddelenia krytosemenných rastlín (Matsuda a Takamatsu, 2003).

Analýzy nrDNA ITS potvrdili, že čeľaď *Asteraceae* vznikla v Južnej Amerike, následne migrovala do Severnej Ameriky, kedy sa predpokladá aj vznik kladu *Golovinomyces* (Takamatsu et al., 2006). Nato, po uzavretí Panamskej šije, približne pred 3.1 – 2.8 miliónmi rokov, minimálne jedna zo skupín *Golovinomyces* migrovala zo Severnej Ameriky do Južnej Ameriky (Glawe, 2008).

2.9 Rody múčnatkotvarých parazitujúcich na zástupcoch rodu *Lactuca*

2.9.1 Rod *Golovinomyces*

Rod *Golovinomyces* zahŕňa 46 druhov vyskytujúcich sa vo svete (Braun a Cook, 2012). Jedná sa o druhy spôsobujúce široké spektrum ekonomicky dôležitých rastlinných chorôb (Bradshaw et al., 2022).

Prevládajúci druh, z radu *Golovinomyces*, vyskytujúci sa na zástupcoch rodu *Lactuca* spp. bol dlho nazývaný ako *Golovinomyces cichoracearum* (DC) Heluta, predtým *Erysiphe cichoracearum* (DC) (Mieslerová et al., 2020b). Prvý, kto predstavil *E. cichoracearum* DC., bol Salmon v jeho monografií v roku 1900. Išlo o druh s veľkým okruhom hostiteľských rastlín (Pirnia a Taheri, 2020). Infikoval napríklad čeľade *Apocynaceae*, *Campanulaceae*,

Crassulaceae, *Malvaceae*, *Papaveraceae*, *Solanaceae*, a *Violaceae* (Mieslerová et al., 2020b).

Golovinomyces cichoracearum sa časom rozčleňoval na ďalšie druhy podľa hostiteľských rastlín, či morfológických charakteristík (Pirnia a Taheri, 2020). Takamatsu et al. (2013) určili v rode *Golovinomyces* 11 línií. Sedem z nich zahŕňa čeľaď *Asteraceae* ako svoj hostiteľský organizmus (Takamatsu et al., 2013). Múčnatkotvaré parazitujúce na zástupcoch rodoch *Lactuca*, *Cichorium*, *Mycelis* a *Taraxacum* boli zahrnuté v 3. skupine nazývanej *G. orontii* (Pirnia a Taheri, 2020; Mieslerová et al., 2020b).

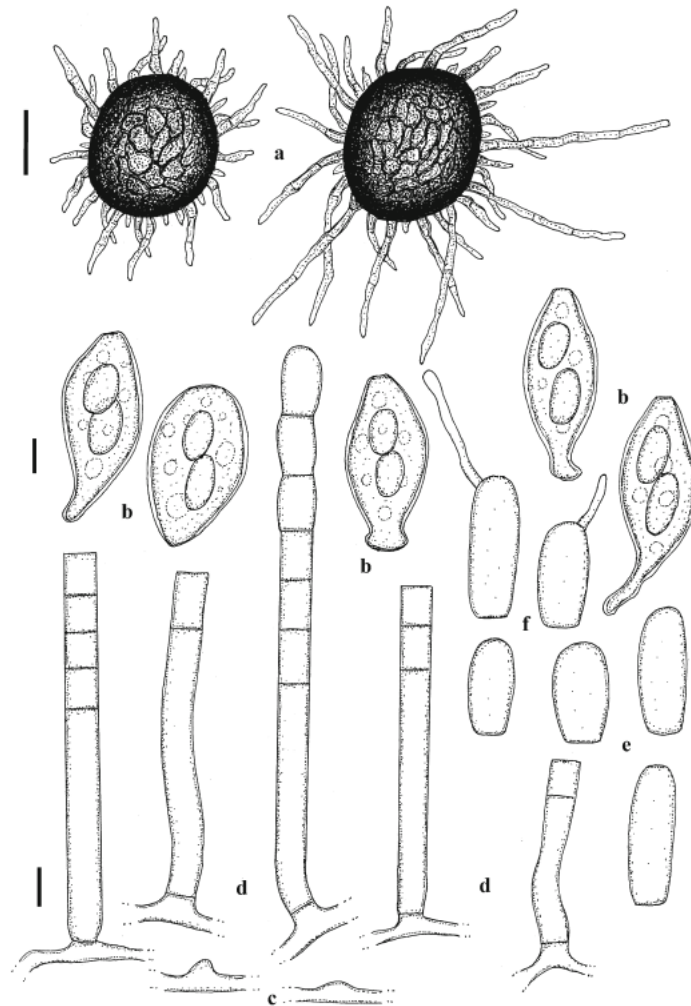
V roku 2019 bola publikovaná taxonomická revízia *G. orontii*, v ktorej bola pomocou ITS a 28S rDNA preukázaná genetická heterogenita tohto druhu (Braun et al., 2019). Sekvencie pochádzajúce z rôznych zberov determinované ako *G. orontii* (s. lat.) boli rozdelené do troch skupín, ktoré boli revidované po morfológickej a genetickej stránke a následne delimitované. Ako *G. orontii* (s. str.) boli označené sekvencie z typových položiek *Erysiphe orontii* – teda *Misopates orontium*. Nový druh *G. tabaci* bol zavedený pre ďalšiu skupinu, jasne morfológicky a geneticky odlišnú od *G. orontii* sensu stricto (s. str.). Konečne bol pre múčnatkotvaré infikujúce rody *Cichorium*, *Lactuca*, a ďalšie hostiteľské rastliny patriace do ďalších rastlinných čeľadí zavedený nový taxón.

Golovinomyces bolayi je pomenovaný na počesť švajčiarskeho mykológa a fytopatológa Adriana Bolaya za jeho poznatky o múčnatkotvarých vo Švajčiarsku. Druh je morfológicky podobný *G. orontii* s. str., ale jasne odlišný na základe ITS sekvencií (Braun et al., 2019).

Pri druhu *G. bolayi* bolo zaznamenané pohlavné aj nepohlavné rozmnožovanie. Druh sa vyznačuje tvorbou tenkého ektofytického bieleho hyalínneho mycélia, z ktorého neskôr vyrastú vzpriamené konidiofory typu *Euoidium* dosahujúce dĺžky od 80 µm do 290 µm. Bunky hýf sú rovné, jemne prehnuté, široké 3 – 9 µm. Rovné či jemne prehnuté, valcovité bunky foot-cell dosahujú rozmery 30 – 100 µm x 9 – 15 µm. Počet distálnych buniek nadväzujúcich na foot-cell sa pohybuje od 1 do 4 s dĺžkou od 10 µm do 30 µm. Konídie elipsoidného tvaru na herbalizovaných vzorkách dosahujú veľkosť 20 – 38 µm x 12 – 20 µm. Pri pohlavnom rozmnožovaní dochádza k tvorbe chasmothécií dosahujúcich rozmery 75 – 160 µm s viacerými (5 – 25) vreckami s 2 až 3 spórmi. Vrecká sú elipsovitého tvaru, dĺžky 40 – 75 µm, šírky 20 – 40 µm, často v dospelosti s počtom olejových kvapiek. Spóry sú taktiež elipsovitého tvaru s dĺžkou 16 – 30 µm a šírkou 10 – 20 µm (Braun et al., 2019).

Disperzia je zabezpečená pomocou konídií, chasmothécií a askospór prenášanými vetrom, človekom, zvierat'om či poľnohospodárskym strojom. Ide o organizmus s globálnym rozšírením, zaznamenaný vo viac ako 30 krajinách ako napríklad Austrália, Nemecko, Grécko, Čile, Česká republika (Lebeda et al., 2017; Mieslerová et al., 2020a).

Symptómy sa na hostiteľoch prejavujú od skorého leta do skorej jesene (Lebeda et al., 2017). K infekcií môže dôjsť už v máji, najneskôr v októbri (Mieslerová et al., 2020a). Napadnuté bývajú skôr staršie rastliny a staršie listy, pričom sa na ich povrchu tvorí biely povlak. Napadnuté pletivá môžu byť deformované, nekrotizované, zasychajúce až umierajúce (Lebeda et al., 2017).



Obrázok 8 Infekcia *G. bolayi* na *L. serriola*, a = chasmothécia, b = vrecká, c = apresória hýf, d = konidiofory, e = konídie, f = klíčiace konídie (Braun et al., 2019).

2.9.2 Rod *Podosphaera*

Samotný rod *Podosphaera* sa delí na dve sekcie - *Sphaerotheca* a *Podosphaera* – skôr považované za samostatné rody. Vo všeobecnosti sa zástupcovia sekcie *Podosphaera* vyskytujú z 90% na drevinách z čeľadi *Rosaceae* (Takamatsu et al., 2010). Na zástupcoch rodu *Lactuca* je výskyt zatiaľ málo známy a jedná sa o infekcie spôsobené druhom *P. xanthii* (DC) Heluta, skôr popísaným ako *Podosphaera (Sphaerotheca) fusca*. Ide o organizmus infikujúci veľké množstvo hostiteľských druhov rastlín z čeľadi *Asteraceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, a *Verbenaceae* (Mieslerová et al., 2020a).

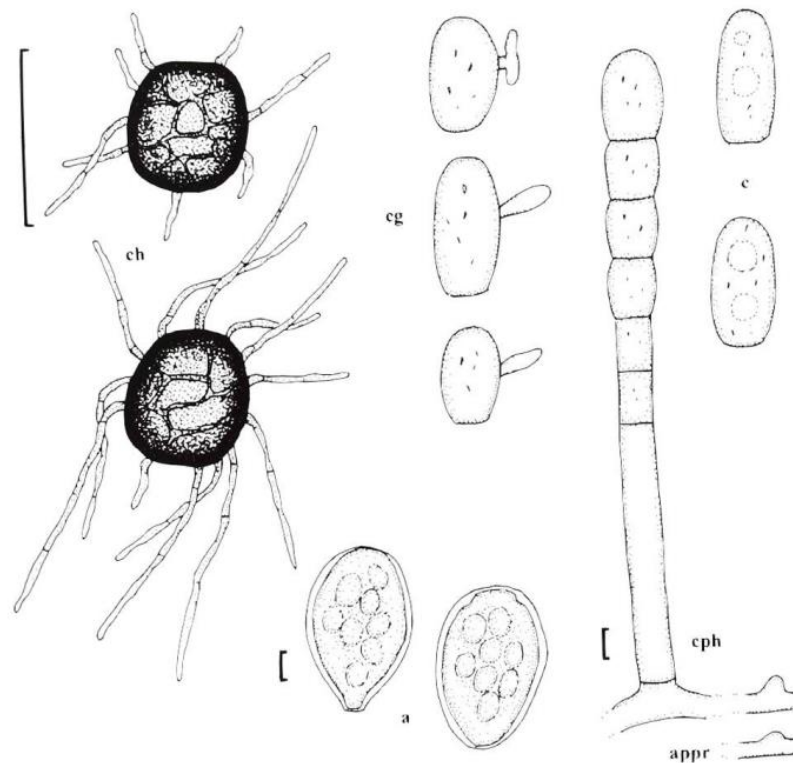
Tradične sa za hlavného pôvodcu ochorenia na pestovanom šaláte spôsobeného múčnatkotvarými považuje *Golovinomyces bolayi* (Mieslerová et al., 2020a). Prvý výskyt *P. xanthii* bol popísaný na pestovanom hlávkovom šaláte v Južnej Kórei (Shin et al., 2006). Čím sa pohľad na hlavného pôvodcu tohto ochorenia zmenil, nakoľko sa oba druhy môžu vyskytovať na hostiteľovi spoločne, a to predovšetkým v štátoch východnej a juhovýchodnej Ázie. Štúdie *P. xanthii* na šaláte nie sú časté a dokladá to aj malý počet záznamov v nukleotidových databázach (dva ITS a dva 28S rDNA) získaných z *P. fusca* z infekcií *L. indica* a *L. raddeana* v. *elata* (Mieslerová et al., 2020a).

Podosphaera xanthii je považovaná za komplexný a heterogénny druh, ktorý potrebuje revíziu (Mieslerová et al., 2020a). Pre svoj rast preferuje teplé humídne oblasti (Braun a Cook, 2012). Optimálne teploty pre klíčenie konídií, infekciu a sporuláciu sú približne v rozpätí medzi 22,3°C až 25,7°C (Mieslerová et al., 2020a).

V rode *Podosphaera* pozorujeme pohlavné aj nepohlavné štádium (Lebeda et al., 2017). Ide o rod s ektofytickým mycéliom tvoriacim nepravidelné plochy či súvisle povlaky. Tenkostenné hýfy s hladkým či skoro hladkým povrchom dosahujú šírku 3 – 10 µm, pričom na nich môžeme pozorovať nenápadné až jemne vystúpené apresória. Z mycélia v nepohlavnom štádiu životného cyklu vyrastajú vzpriamené konidiofory typu *Euoidium*, rovnako ako pri rode *Golovinomyces*. Na valcovitú bunku foot-cell dosahujúcu rozmery 30 – 100 µm x 10 – 13 µm nadväzujú 1 až 4 bunky, z ktorých sa v dlhých reťazcoch tvoria konídie obsahujúce fibrozínové telieska. Konídie sú elipsovité s dĺžkou 25 – 45 µm a šírkou 14 – 22 µm (Braun a Cook, 2012). Počas pohlavného štádia životného cyklu dochádza k tvorbe chasmothécií s jedným vreckom. To je rozdiel od rodov *Golovinomyces* a *Leveillula* (Lebeda et al., 2017). Na spodnej polovici chasmothécií merajúcich od 70 do

115 μm sa tvorí rôznyi počet prívieskov. Tie sú myceloidné a vetvené. Široko elipsovité až guľaté vrecko s rozmermi 60 – 80 μm x 50 – 65 μm v sebe nesie 6 až 8 elipsoidných až guľatých askospór s rozmermi 15 – 23 μm x 12 – 17 μm . Askospóry dozrievajú až neskôr vo vrecku sú väčšinou nezrelé. Sú bezfarebné (Braun a Cook, 2012).

Shin et al. (2006) skúmali výskyt tohto obligátneho patogénu na kultúrnom šaláte v skleníkoch v Kórei. Do výskumu zahrnuli 174 skleníkov, pričom 121 z nich bolo zamorených chorobou. Prišli k záveru, že *Podosphaera* spôsobuje v Kórei vážne straty, nakoľko približne 60% rastlín bolo nepredajných (Shin et al., 2006).



Obrázok 9 *P. xanthii*, a = vrecká, appr = apesória, c = konídie, cg = klíčiace konídie, cph = konidiofor, ch = chasmothécia (Braun a Cook, 2012).

2.9.3 Rod *Leveillula*

Rod *Leveillula* zahŕňa 40 svetovo sa vyskytujúcich druhov, vrátane minimálne 2 druhov spôsobujúcich ochorenie na zástupcoch rodu *Lactuca* spp. (Lebeda et al., 2017; Petřeková, 2018; Lebeda et al., 2019). Prvý z nich je *Leveillula lactucarum* Durrieu a Rostam, ktorý je patogénnym druhom na *L. orientalis*, *L. tatarica* a *L. viminea*. Druhým druhom je *Leveillula*

lactucae-serriolae Khodap. a Hedjar, ktorý je patogénny na druhoch *L. azerbaijanica*, *L. scarioloides* a *L. serriola* (Braun a Cook, 2012; Lebeda et al., 2019). Niektorých zástupcov rodu *Lactuca* spp. napáda aj druh *Leveillula picridis* Durrieu a Rostam (Voytyuk et al., 2009; Braun a Cook, 2012; Kabaktepe et al., 2015).

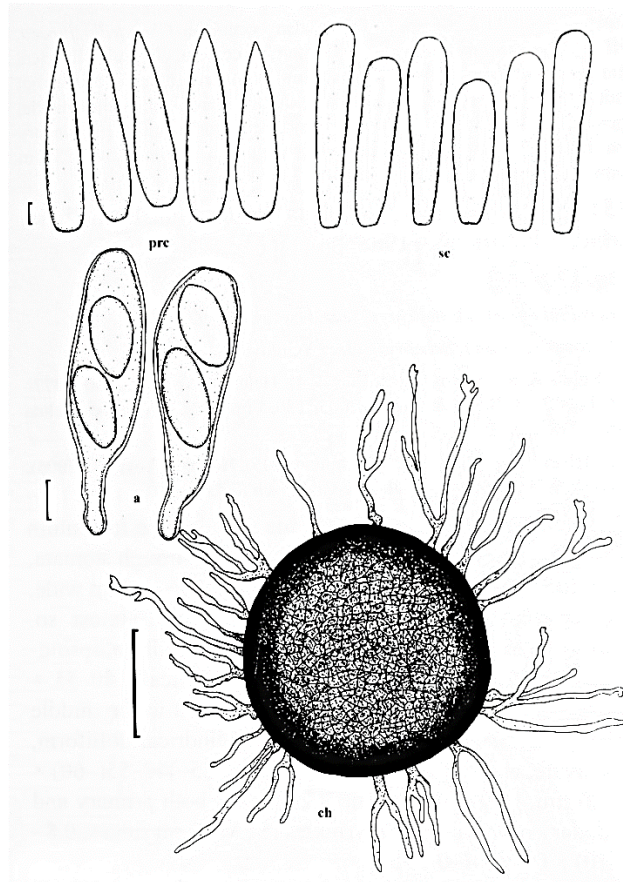
Vo všeobecnosti sa rod *Leveillula* vyskytuje v teplých, suchých oblastiach. Pozorovaný bol v Afrike, Ázii, Južnej Amerike, Južnej Európe a v západných častiach Severnej Ameriky (Mieslerová et al., 2020a). Teplé suché podmienky (xerofytické) spôsobili adaptáciu, ktorou je schopnosť konídií vyklíčiť rýchlo bez závislosti na presnej hodnote relatívnej vlhkosti (Braun a Cook, 2012).

Druhy rodu *Leveillula* majú ako jediné z múčnatkotvarých endofytické mycélium, tým pádom sú endoparazitmi. Počas nepohlavného rozmnožovania produkujú konidiofory typu *Pseudoidium*, čím sa odlišujú napríklad od druhov rodu *Golovinomyces* či *Podosphaera*. V priebehu pohlavného rozmnožovania vznikajú chasmothécia s viacerými vreckami so zvyčajne 2 spórami (Braun a Cook, 2012; Lebeda et al., 2017). Chasmothécia sa vyznačujú svojou veľkosťou a zvyčajne dosahujú rozmery viac ako 150 μm (Braun a Cook, 2012).

Druh *Leveillula lactucarum* tvorí pretrvávajúce biele povrchové mycélium, z ktorého vyrastajú dlhé niťovité konidiofory s valcovitými foot-cell. Tie dosahujú rozmery 50 – 60 μm x 5 – 7 μm . Konídie sú jasne diferencované na primárne a sekundárne. Primárne konídie približne valcovitého tvaru vznikajú jednotlivo. Dosahujú rozmery 35 – 60 μm x 11 – 20 μm . Povrch konídií pod elektrónovým mikroskopom vykazuje zvrásnenie a priehlbinky. Sekundárne konídie sú približne valcovitého tvaru s oblým zakončením veľkostne identické s primárnymi. Chasmothécia s rozmermi 150 – 225 μm obsahujú niekoľko vreciek s 2 spórami s veľkosťou 25 – 40 μm x 14 – 24 μm (Braun a Cook, 2012; Lebeda et al., 2019).

Druh *Leveillula lactucae-serriolae* vytvára podobné mycélium ako druh *L. lactucarum*, pričom hýfy tohto druhu sú striedmo rozvetvené, priehradkové, hyalínne s hladkým povrchom dosahujúce šírku 2 – 5 μm . Konídie sú formované jednotlivo. Primárne konídie kopijovitého, podlhovastého, úzkeho tvaru dosahujú rozmery 50 – 75 μm x 13 – 18 μm . Zvyčajne sú rozšírené v prvej polovici či v strede. Sekundárne konídie sú zvyčajne širšie v druhej polovici a dosahujú rozmery 50 – 85 μm x 13 – 18 μm . Na chasmothéciách rozmerov 185 – 225 μm sú dobre rozvinuté rozvetvené prívesky. Počet elipsových vreciek sa pohybuje od 30 do 55. Ich veľkosť sa pohybuje od 85 μm do 115 μm

na dĺžku a od 28 μm do 35 μm na šírku. V každom vrecku sú 2 spóry elipsovito guľatého tvaru s veľkosťou 30 – 40 μm x 15 – 23 μm . Podobne ako pri druhu *L. lactucarum* sú bezfarebné (Braun a Cook, 2012).



Obrázok 10 *Leveillula lactucae-serriolae*; prc = primárne konídie, sc = sekundárne konídie, a = vrecká, ch = chasmothécium (Braun a Cook, 2012).

Na hostiteľských organizmoch *Lactuca* spp. (Voytyuk et al., 2009; Kabaktepe et al., 2015) boli pri patogéne *Leveillula picridis* namerané kratšie konídie ako na hostiteľských organizmoch *Picris* spp.. Rozdiel bol takisto aj v ich tvare. Na hostiteľoch z rodu *Lactuca* spp. dosahovali konídie dĺžku 35 – 60 μm . Pri primárnych konídiach sú prívěsky zaguľatené a v strede zúžené. Celkovo dosahujú konidiofory tohto druhu dĺžku 60 – 200 μm . Pri pohľade na sekundárne konídie pod elektrónovým mikroskopom pozorujeme pozdĺžne vyvýšeniny. Chasmothécia rozmerov 130 – 250 μm sú v prípade vysušenia vo vrchnej polovici konkávne. Prívěsky chasmothécii sú predovšetkým v dolnej polovici chasmothécii dobre vyvinuté,

nevetvené, svetlo hnedé. Niekoľkopočetné vrecká (15 – 35) rozmerov 50 – 120 μm x 25 – 40 μm obsahujú 2 bezfarebné až olivovohnedé spóry elipsovito guľatého tvaru dosahujúce rozmery 25 – 38 μm x 14 – 24 μm (Braun a Cook, 2012). Druh *L. picridis* je uvádzaný z niekoľko európskych štátov, ale výskyt na území ČR doposiaľ nebol popísaný (Dvořáková 2016).

Je zaujímavé, že doposiaľ nebol ani jeden z vyššie uvedených zástupcov rodu *Leveillula* zaznamenaný na kultúrnom šaláte, a tým pádom ako jediný z nich zatiaľ nepredstavuje ekonomickú hrozbu pre komerčné pestovanie (Mieslerová et al., 2020a).

2.10 Rod *Lactuca*

Rod *Lactuca* s približne 270 druhmi patrí do podtribusu Lactucinae, pričom *Lactuca* je jeden z najznámejších zástupcov tohoto tribusu. Ten spolu s ďalšími rodmi radíme do podčeľade Cichorieae v čeľadi Asteraceae. Podčeľaď Cichorieae je charakterizovaná tvorbou bieleho latexu a prítomnosťou päťpočetných kvetov (Kilian et al., 2009). Taxonómia rodu *Lactuca* sa neustále vyvíja a žiadny z príbuzných rodov podtribusu Lactucinae nečelil v priebehu posledných 200 rokov toľkým zmenám vo vymedzení, systematickom postavení a druhovej klasifikácii (Wang, 2013).

Rod *Lactuca* je rod kvitnúcich rastlín známy ako šalát (Mieslerová, 2020a). Tvorí ho celá rada rastlinných foriem, od jednoročných cez dvojročné po viacročné druhy. Zahŕňa bylinné druhy ale aj kry, s koreňmi, podzemnými stolónmi či s hl'uzovitými koreňmi (Lebeda et al., 2004). Stonka je vzpriamená, 10 až 250 cm vysoká. Jednoduchá alebo rozkonárená, lysá alebo s trichómami. Listy sú špirálovito usporiadané. Bazálne listy sú zvyčajne v prízemnej ružici (Doležalová et al., 2002).

Nedávne molekulárne štúdie zo sekvenovania RNA preukazujú domestikovanie kultúrneho šalátu v oblasti úrodného polmesiaca približne pred 10 800 rokmi pred našim letopočtom. Odtiaľ sa druh rozšíril po Európe a neskôr do Číny, kde sa odčleňovali nové typy (Mieslerová et al., 2020a). Zástupcovia rodu *Lactuca* sa vyskytujú v miernych a teplých klimatických oblastiach väčšinou na severnej pologuli (Európa, Ázia, Indonézia, Severná Amerika) a v Afrike. Väčšina z druhov sú xerotermné rastliny, dobre adaptované na suché klimatické podmienky s výnimkou pár endemických druhov podobným lianam nachádzajúcim sa v horách strednej Afriky (Lebeda et al., 2004; Kilian et al., 2017).

Ekologicky sú druhy veľmi rôznorodé. Niektoré z nich sú bežné európske ruderálne synantropné druhy preferujúce disturbancie (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*), niektoré sú bežné v lese (*L. aurea*, *L. biennis*, *L. sibirica*), niektoré sú kalcifilné a typické pre Stredomorie (*L. tenerrima*, *L. graeca*), niektoré preferujú útesy pri pobreží (*L. acanthifolia*), niektoré polosuché chladné oblasti so stepnou vegetáciou, najčastejšie na zasolených lúkach či pieskových substrátoch (*L. tatarica*) (Lebeda et al., 2004; Lebeda et al., 2021).

Zástupcovia sú využívaní ako zelenina, olej, či potrava pre dobytok (*Lactuca sativa*), či ako tradičný rastlinný liek – antiseptiká či lieky proti kašľu (*L. serriola*, *L. virosa*) (Mieslerová, 2020a; Lebeda et al., 2022).

3 Materiál a metódy

3.1 Zber a spracovanie vzoriek

Pracovali sme so zbierkou 33 vzoriek múčnatkotvarých, ktoré predstavovali vysušené listy hostiteľských rastlín z rodu *Lactuca*, infikovaných obligátnymi parazitmi z rodu múčnatkotvaré. Súbor týchto vzoriek bol zhromaždený pracovníkmi Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v rokoch 2014 – 2020, a to na základe ich zberov alebo spoluprácou so zahraničnými partnermi (Rijk Zwaan, Holandsko; Dr. Tomáš Pavlíček, Universita of Haifa, Izrael). Zozbieraných bolo 33 vzoriek pochádzajúcich z krajín Európy, USA a Ázie (Tab. 1). Zozbierané vzorky boli po zbere herbalizované. Hostiteľské rastliny pochádzali z týchto zástupcov rodu *Lactuca*: *L. aculeata*, *L. altaica*, *L. saligna*, *L. sativa* a *L. serriola*. Kompletný zoznam vzoriek spolu s lokalitou zberu, dátumom zberu a menom pracovníka, ktorý vzorku zbieral je uvedený v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 Kompletný zoznam 33 skúmaných vzoriek s informáciami o jednotlivých zberoch.

Číslo vzorky	Lokalita zberu	Súradnice výskytu	Hostiteľská rastlina	Dátum zberu	Zbieral/a
6	Holandsko	neuvedené	<i>L. saligna</i>	2011	A. Lebeda
27	Holandsko	neuvedené	<i>L. aculeata</i>	27.07.2014	A. Lebeda
28	Holandsko (Maasdijk)	neuvedené	<i>L. saligna</i>	2017	A. Lebeda
33	Holandsko (Maasdijk)	neuvedené	<i>L. serriola</i>	2017	A. Lebeda
34	Holandsko (Maasdijk)	neuvedené	<i>L. aculeata</i>	2017	A. Lebeda
35	Holandsko (Maasdijk)	neuvedené	<i>L. altaica</i>	2017	A. Lebeda
57	Nemecko (Heisede)	N 52° 15.233' E 009° 50.683'	<i>L. serriola</i>	2017	A. Lebeda
59	Nemecko	N 51° 53.383' E 010° 02.55'	<i>L. serriola</i>	2017	A. Lebeda
68	Nemecko	N 50° 49.217' E 012° 19.316'	<i>L. serriola</i>	2017	A. Lebeda
75	Nemecko	N 47° 50.467' E 008° 57.934'	<i>L. serriola</i>	2017	A. Lebeda
77	Maďarsko	neuvedené	<i>L. serriola</i>	05/2014	A. Lebeda
109	Španielsko (Catalonia)	neuvedené	<i>L. serriola</i>	29.08.2018	A. Lebeda
116	Chorvátsko (Sotin)	N 45° 17.196' E 019° 06.754'	<i>L. serriola</i>	11.08.2018	A. Lebeda
132	Chorvátsko (Netretič)	N 45° 30.507' E 015° 24.78'	<i>L. serriola</i>	17.08.2018	A. Lebeda
152	Česká republika (Velké Karlovice)	N 49° 21.735' E 018° 18.048'	<i>L. serriola</i>	08.08.2019	A. Lebeda
159	Slovenská republika (Hybe)	N 49° 02.613' E 019° 50.136'	<i>L. serriola</i>	09.08.2019	A. Lebeda

Tabuľka 1 (Pokračovanie) Kompletný zoznam 33 skúmaných vzoriek s informáciami o jednotlivých zberoch.

Číslo vzorky	Lokalita zberu	Súradnice výskytu	Hostiteľská rastlina	Dátum zberu	Zbieral/a
165	Poľsko (Grybów II.)	N 49° 36.817' E 020° 56.878'	<i>L. serriola</i>	12.08.2019	A. Lebeda
170	Slovenská republika (Spišské Vlachy)	N 48° 58.143' E 020° 46.948'	<i>L. serriola</i>	16.08.2019	A. Lebeda
172	Slovenská republika (Župčany)	N 49° 00.454' E 021° 09.791'	<i>L. serriola</i>	18.08.2019	A. Lebeda
173	Slovenská republika (Korkoluh)	N 49° 18.462' E 021° 12.808'	<i>L. serriola</i>	18.08.2019	A. Lebeda
174	Slovenská republika (Spišské Hanušovce)	N 49° 19.972' E 020° 20.626'	<i>L. serriola</i>	19.08.2019	A. Lebeda
185	Rakúsko	neuvadené	<i>L. sativa</i>	10/2020	Rijk Zwaan
186	USA	neuvadené	<i>L. sativa</i>	04/2020	Rijk Zwaan
188	Nemecko	neuvadené	<i>L. sativa</i>	08/2020	Rijk Zwaan
189	Portugalsko	neuvadené	<i>L. sativa</i>	09/2020	Rijk Zwaan
190	Francúzsko	neuvadené	<i>L. sativa</i>	09/2020	Rijk Zwaan
192	Belgicko	neuvadené	<i>L. sativa</i>	10/2020	Rijk Zwaan
197	Japonsko	neuvadené	<i>L. sativa</i>	03/2021	Rijk Zwaan
200	Japonsko (Shikoku, Miyoshi)	N 33° 57.964' E 133° 42.685'	<i>Lactuca</i> sp.	06.10.2019	T. Pavlíček
203	Japonsko (Shikoku, Miyoshi)	N 33° 57.79' E 013° 22.31'	<i>Lactuca</i> sp.	09.10.2019	T. Pavlíček
211	Japonsko (Honshu, Maiko)	N 34° 37.654' E 135° 02.39'	<i>Lactuca</i> sp.	30.09.2019	T. Pavlíček
246	Česká republika (Protivanov)	N 49° 28.698' E 016° 49.657'	<i>L. serriola</i>	11.08.2021	M. Kitner
247	Česká republika (Protivanov)	N 49° 28.634' E 016° 49.648'	<i>L. serriola</i>	11.08.2021	M. Kitner

3.2 Použité chemikálie pre mikroskopickú a molekulárnu determináciu

- Agaróza – SeaKem LE Agarose (Lonza)
- Alkalická fosfatáza - FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μ L) (Thermo Scientific)
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP mix) dNTPs PCR Mix (10 mM) (Serva)
- Destilovaná voda (sterilná, PCR grade - stupeň čistoty vhodný pre molekulárne analýzy)
- DNA farbivo - EZ Vision Bluelight DNA (VWR Life Sciences)
- DNA marker - HyperLadder 50bp (Bioline)
- EDTA dvojsodná sůl dihydrát, Na₂EDTA·2H₂O (VWR)
- Etanol(Sigma - Aldrich)
- Exenukleáza - Exonuclease I (20 U/ μ L) (Thermo Scientific)
- Fuchsin (Thermo Scientific)
- Hydroxid draselný, KOH (Lachner)
- Isopropanol (Lachner)
- Kyselina boritá, H₃BO₃ (Lachner)
- Kyselina chlorovodíková, HCl (Lachner)
- Kyselina mliečna (VWR)
- Lactofuchsin - pracovný roztok
- Laurylsíran sodný dodecylsíranu sodný, SDS (Sigma)
- Morský čistý piesok (Lachema)
- Polymeráza s pufrom - GoTaq[®] G2 DNA Polymerase (5 U/ μ l), 5x Green Go Taq Buffer (Promega)
- Trishydroxymethylaminomethna (Tris) (Sigma)

3.3 Popis zloženia použitých roztokov

- Etanol, 75% roztok (Sigma - Aldrich) (na 100 ml)
 - o 74,63 ml 99,5% etanolu
 - o 25,37 ml destilovanej vody
- KOH – 3% roztok (na 100 ml)
 - o 3 g KOH

- 100 ml destilovanej vody
- Lactofuchsin - pracovný roztok (na 100 ml)
 - 0,1 g kyslého fuchsinu
 - 100,0 mL kyseliny mliečnej
- SDS pufr (na 100 ml)
 - 10,0 g SDS
 - 90 ml destilovanej vody, po rozpustení doplniť objem na 100 ml
- TBE pufr – roztok 0,5x
 - 5,4 g trishydroxymethylaminometanu (Tris)
 - 2,75 g kyseliny borité H_3BO_3
 - 2 ml roztoku Na_2EDTA
 - 0,5 mol.l-1, pH 8,0 rozpustiť v 40 ml deionizovanej vody doplniť deionizovanou vodou na 0,05 l

3.4 Prístroje

- Analytická váha 572 (Kern)
- Binokulárna lupa STM 15623241 HH (Intraco micro)
- Centrifúga 5415 D (Eppendorf)
- Centrifúga 5804 R (Eppendorf)
- Centrifúga MiniStar Silverline (VWR; USA)
- Digestor Vitrum 1500 (Vitrum)
- Elektroforetická jednotka OWL A6 (OWL)
- Elektroforetický zdroj EPS 601 (Amersham Biosciences)
- Fotodokumentačný systém s UV transiluminátorom Firereader max (Uvitec Cambridge)
- Chladnička CP 4003-20 (Liebherr)
- Liehový kahan
- Magnetická miešačka MS2 (IKA)
- Mikroskop Olympus CX 40 s objektívom so zväčšením 400 x (Olympus)
- Mikrovlnná rúra ETA 3203 (ETA)
- Mini centrifúga MCF 2360 (LMS)
- Mraznička GN 3023 (Liebherr)

- PCR cyklér Mastercycler Pro S (Eppendorf)
- Pipety:
 - o sada pipiet Eppendorf Research (0,1–2,5 µl, 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl) (Eppendorf)
 - o 8-kanálová pipeta Eppendorf Research Pro 10-100 µl (Eppendorf)
 - o 8-kanálová pipeta VWR 1 – 10 µl, (VWR)
- Vákuová odparka, CentriVap Concentrator (Labconco)
- Výrobník na vložkový ľad GB 9 (Brema)

3.5 Mikroskopická determinácia

3.5.1 Morfológická determinácia pomocou 3% roztoku KOH

Za účelom morfológickej determinácie druhov z radu múčnatkotvaré bola použitá metóda využívajúca 3% roztok KOH (Lebeda, 1983). Roztok KOH umožňuje dobré pozorovanie tvaru konídií, vrátane fibrozínových teliesok, ktoré sú prítomné napríklad pri druhu *Podosphaera xanthii*, zatiaľ čo bunky zástupcov rodu *Golovinomyces* a *Leveillula* tieto telieska neobsahujú.

Príprava preparátov prebiehala nasledovne. Na podložné sklíčko bola kvapkadlom nanesená kvapka 3% roztoku KOH, do ktorého bola pomocou pinzety a skalpela zoškrabaná časť mycélia z príslušnej herbárovej položky. Následne bola kvapka s mycélium prikrytá krycím sklíčkom a výsledný preparát bol mikroskopovaný pomocou mikroskopu Olympus CX 40 s objektívom so zväčšením 400 x.

3.5.2 Meranie morfológických charakteristík anamorfného štádia

Za účelom merania morfológických charakteristík anamorfného štádia druhov *G. bolayi* a *P. xanthii* bola použitá vriaca lactofuchsinová metóda farbenia podľa Shina (Shin a McKenzie, 2004). Mikroskopickému meraniu predchádzala príprava vzoriek, v priebehu ktorej bol z každej skúmanej vzorky pripravený nasledovne jeden preparát. Ten predstavoval približne 1 cm² infikovaného listu, ktorý bol pomocou pinzety prenesený na podložné sklíčko infikovanou stranou smerom hore. Nato bol preparát na podložnom sklíčku, v zapnutom digestore, zakvapkaný pracovným roztokom lactofuchsinu. Podložné sklíčko bolo nad kahanom spracovávané krátkym zahrievaním na vysokej teplote, pokiaľ sa neobjavili kyslé

pary odparujúceho sa lactofuchsinu. Následne bol infikovaný list otočený na druhú stranu a v krátkom zahrievaní sme pokračovali do momentu, kým sa neobjavili kyslé pary. Tento proces bol opakovaný celkovo štyrikrát.

Na čisté podložné sklíčko bola následne kvapnutá kvapka destilovanej vody, do ktorej bolo skalpelom zoškrabnuté mycélium zafarbené lactofuchsinom. Následne bolo podložné sklíčko prikryté krycím sklíčkom a pozorované svetelným mikroskopom Olympus CX 40 s mierkou pod zväčšením 400 x. Mycélia na preparátoch boli sfarbené ružovou až fialovou farbou.

Pri každej z 33 vzoriek sme merali dĺžku konidioforov, dĺžku foot-cell, počet distálnych buniek konidioforu, dĺžku a šírku konídií. Pri každej vzorke sme spravili 30 meraní.

Namerané hodnoty boli prepočítané podľa kalibračnej tabuľky z dielikov na mikrometre (μm) a následne boli vložené do tabuliek v programe Microsoft Excel 2016. Pomocou tohto programu boli vypočítané hodnoty aritmetického priemeru a smerodajnej odchýlky. Zároveň bola zistená minimálna a maximálna hodnota z nameraných hodnôt. Takisto bol vypočítaný index tvaru konídií (tzn. pomer ich dĺžky a šírky). Z vypracovaných tabuliek boli vytvorené súhrnné tabuľky a stĺpcové grafy.

3.6 Molekulárna determinácia

3.6.1 Extrakcia DNA pomocou SDS metódy

Samotnej extrakcií DNA predchádzala príprava preparátov. Zo všetkých 33 vzoriek boli vyradené vzorky obsahujúce *Ampelomyces quisqualis*, dôsledkom čoho bolo spracovávaných iba 28 vzoriek. Pre vlastnú extrakciu DNA sme použili metódu podľa Edwards et al. (1991), ktorí vynašli spôsob rýchlej extrakcie malých množstiev DNA bez použitia fenolu či chloroformu. Pod binokulárnou lupou bol pomocou skalpela a pinzety z každej vzorky odobraný 1 cm^2 s najväčším výskytom patogénu. Odrezaný kúsok bol vložený do Eppendorfky (ďalej len Epp) s objemom 1,5 ml. Do všetkých Epp bolo pridané malé množstvo morského piesku a následne bola uskutočnená homogenizácia plastovým tlčíkom. Nato bolo k zmesi pridaných ďalších 350 μl SDS pufru a bola vykonaná dodatočná homogenizácia. Epp boli na 5 min pri teplote 4°C a pri otáčkach 14 000 centrifugované. Po centrifugácii bola horná vodná fáza (supernatant) prepipetovaná do novej Epp a bolo

pridaných 350 µl isopropanolu. Následne boli Epp asi tridsaťkrát prevrátené, aby sa obsah v nich premiešal. Epp boli vložené na 10 min do centrifúgy pri maximálnych otáčkach (14 000 rpm). Následne bol supernatant zliaty a zvyšky isopropanolu boli osušené otrením Epp o filtračný papier. Do Epp bolo pridaných 500 µl 70% etanolu a následne prebehla centrifugácia na 5 min pri maximálnych otáčkach. Supernatant bol opäť zliaty a Epp boli usušené vo vákuovom odparovači. Odparok DNA bol rozpustený v 50 µl sterilnej vody a Epp boli následne uložené do mrazničky pri -20°C.

3.6.2 Nested PCR

Tabuľka 2 Primery použité v tejto bakalárskej práci.

Časť Nested PCR	Primer	Sekvencie primerov (5' → 3')	Zdroj
PCR 1	PMITS1	TCGGACTGGCCCAGGGAGA	Cunnington et al., 2003
PCR 1	PMITS2	TCACTCGCCGTTACTGAGGT	Cunnington et al., 2003
PCR 2	ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes a Bruns, 1993
PCR 2	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990

Pred uskutočnením prvej PCR reakcie boli vzorky vyextrahovanej DNA zriedené v sterilnej destilovanej vode v pomere 1:1 (tzn. do 10 µl DNA bolo pridaných 10 µl deionizovanej vody), premiešané a stočené v centrifúge. Všetky reagenty (tzn. pufr, voda, dNTPs, zmes priameho (F) a spätného priemeru (R) a polymeráza) potrebné pre prípravu PCR reakčnej zmesi (pozri Tab. 3) boli rozmrazené, krátko stočené v centrifúge a prenesené do polystyrénového boxu s ľadom.

Do 1,5 ml mikroskúmavky bola pripravená PCR reakčná zmes pre 33 vzoriek postupným pipetovaním jednotlivých zložiek PCR reakčnej zmesi podľa nasledujúcej tabuľky.

Tabuľka 3 Zloženie PCR reakčnej zmesi.

Zloženie PCR zmesi	Objem pre 1 vzorku [μl]	Pipetovaný objem pre 33 vzoriek (z toho 5x rezerva) [μl]
Deinizovaná voda	6,32	208,6
5x pufr	1,90	62,7
Roztok dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,15	5,0
Primery F a R ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,38	po 6,3
G2 Go Taq polymeráza ($5\text{U } \mu\text{l}^{-1}$)	0,05	1,7

PCR reakčná zmes bola premiešaná a krátko stočená na centrifúge. Následne bola zmes elektronickou pipetou rozpipetovaná po 13,8 μl zmesi k 1,2 μl nariedenej DNA príslušnej vzorky, ktoré sme dopredu napipetovali do jamiek v 96 jamkovej PCR doske. Po pripipetovaní PCR reakčného mixu k vzorkám DNA boli jamky uzavreté prelepením špeciálnou PCR fóliou, krátko premiešané, stočené a vložené do cycleru. V cycleri prebehlo prvé kolo nested polymerázovej reťazovej reakcie, s rozpätím teplôt a časových intervalov jednotlivých krokov PCR reakcie ako uvádza Tabuľka 4. Annealingová teplota (tzn. teplota nasadenia primerov) bola nastavená na 62°C .

Tabuľka 4 Teplotné a časové podmienky PCR reakcií (Ta (annealingová teplota) je uvedená v texte).

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Doba trvania [min:sek]	Počet cyklov
1.	94	05:00	1x
2.	94	00:45	} 35x
3.	Ta	00:45	
4.	72	01:00	
5.	72	10:00	1x
6.	8	∞	

Produkty prvej PCR reakcie boli nariedené zmiešaním 2 μl vzniknutého PCR produktu a 48 μl deionizovanej vody. Výsledný roztok bol použitý ako matrica v nadväzujúcej PCR reakcií. Príprava PCR reakčného mixu a priebeh PCR reakcie bola

prakticky rovnaká ako v prípade prvej PCR reakcie, líšila sa iba použitými primermi a annealingovou teplotou (55°C).

3.6.3 Gélová elektroforéza

Pre zistenie prítomnosti či neprítomnosti PCR produktov vo vzorkách bola vykonaná elektroforézou na 1% agarózovom géle. Príprava agarózového gélu bola nasledovná. Navážené 3 g agarózy v kadičke, boli zaliate 300 ml 0,5x TBE pufru a následne rozvarené v mikrovlnnej rúre. Roztok bol miešaný na elektromagnetickej miešačke. Po jeho schladnutí bolo do neho pridaných 4,5 µl farbiva na DNA (EZ-Vision Bluelight DNA) a následne bol roztok vyliaty do elektroforetickej vaničky, do ktorej boli vložené 4 hrebienky. Po približne 1 hodine gél stuhol a hrebienky boli vybrané. Vanička s gélom bola presunutá do elektroforetickej komôrky. Komôrka bola zaliata 0,5x TBE pufrom tak, aby sa utvorila 2-3 mm vrstva pufru nad agarózovým gélom. Do prvých jamiek, utvorených hrebienkom, boli napipetované 3 µl DNA markeru (HyperLadder™ 50bp, Bioline), do ostatných jamiek bolo pipetovaných 5 µl z každej vzorky. Elektroforetická komôrka bola uzatvorená, káble pripojené k zdroju napätia a po nastavení 110 V bola elektroforetická separácia spustená. Po 50 min. bola elektroforéza ukončená, káble boli odpojené od zdroja a gél s vaničkou bol vybratý. Vanička bola osušená papierovými obrúskami a gél bol vložený do UV transiluminátoru, kde boli PCR produkty vyfotografované.

3.6.4 Príprava vzoriek pre sekvenčné laboratórium

Pred zaslaním PCR produktov na sekvenciu musia byť produkty prečistené. Jedná sa o postup, kedy sa odstraňujú nespotrebované zložky PCR reakčnej zmesi (primery a dNTPs) použité v predchádzajúcich reakciách. Pre tento účel sme vykonali tzv. enzymatický postup prečistenia PCR produktov, pri ktorom sa používajú dva enzýmy. Pre degradáciu reziduálnych primerov sa používa exonukleáza I, zatiaľ čo alkalická fosfatáza zaisťuje defosforyláciu zvyškových dNTPs (Kim a Blackshaw, 2001).

Prípravu pracovného roztoku sme vykonali pipetovaním jednotlivých komponentov prečisťovacieho roztoku do Epp podľa Tabuľky 5. Následne sme v cycleri zvolili program na prečistenie vzoriek (pozri Tab. 6).

Tabuľka 5 Zloženie roztoku pre enzymatické prečistenie PCR produktov.

Zloženie PCR zmesi	Objem pre 1 vzorku [μ l]
Deinizovaná voda	6,100
Pufr dodávaný k alkalickej fosfatáze	1,155
Alkalická fosfatáza	0,075
Exonukleáza I	0,200
Celkovo pipetovaných 7,5 μ l výslednej zmesi k 10 μ l PCR produktu	

Tabuľka 6 Program na prečistenie vzoriek.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Doba trvania [min]	Počet cyklov
1.	37	15	1x
2.	85	15	1x
3.	7	∞	

Po prečistení bolo prepipetovaných 5 μ l každého PCR produktu do novej 96 jamkovej dosky a pripipetovaných 5 μ l príslušného sekvenčného primeru. Pre získanie informácie o celej amplifikovanej ITS oblasti bol každý produkt sekvenovaný zvlášť priamym a zvlášť spätným primerom použitým pri druhej PCR reakcii použitého Nested PCR protokolu. Sekvenácia prebehla vo firme MacroGen Europe (Amsterdam, Holandsko).

3.6.5 Postup spracovania sekvenčných dát

Vyhodnotenie sekvenčných dát bolo spracované v programe Geneious 7.1.7 (Kearse et al., 2012). Do tohto programu boli importované výsledné sekvencie DNA, ich nekvalitné časti boli orezané. Vytvorili sme prekrytie nukleotidových sekvencií získaných pomocou priameho a spätného primeru. Sekvencie boli skontrolované a problematické miesta boli editované. Následne bola konsenzuálna sekvencia exportovaná do formátu fasta a uložená s príponou *.fas. Na priradenie jednotlivých sekvencií ku konkrétnym druhom múčnatkotvarých bola použitá webová stránka Národného centra pre biotechnologické informácie (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Na webovej stránke prostredníctvom funkcie Blast

(Nucleotide Blast) boli vložením vyexportovaných sekvencií do vyhľadávacieho formulára nájdené uložené záznamy, ktoré vykazovali najvyššiu zhodu s dátami autora týchto riadkov. Pre porovnanie sekvenčných dát získaných v tejto bakalárskej práci so sekvenciami deponovanými v databázy NCBI bola pomocou MEGA version 11 urobená konštrukcia fylogenetického stromu (Tamura et al., 2021). Autor týchto riadkov postupoval podľa inštrukcií vedúceho práce, kedy k svojim sekvenciám doplnil záznamy z NCBI vykazujúcimi najvyššiu mieru zhody. Taktiež doplnil referenčné sekvencie o sekvencie z článkov, ktoré sa venovali molekulárnej determinácii múčnatkotvarých na *Lactuca* spp.. Takto mohla byť vizuálne zobrazená zhoda s deponovanými záznamy ITS sekvencií zo vzoriek múčnatkotvarých na šalátoch a rovnako načrtnuté vzájomné vzťahy medzi ďalšími skupinami múčnatkotvarých. Celkovo bolo použitých 55 nukleotidových sekvencií, ktorých odpovedajúce časti boli pod seba zoradené tak, aby odpovedajúce si nukleotidové báze ležali pod sebou (funkcia Align by MUSCLE) a zarovnané na oboch koncoch výsledného alignmentu na rovnakú dĺžku. Výsledný sekvenčný alignment sme použili pre konštrukciu fylogenetického stromu (metóda Minimum Evolution), správnosť typológie výsledného stromu bola štatisticky overená pomocou tzv. bootstrapovej analýzy (1 000 replikácií).

4 Výsledky

4.1 Mikroskopická determinácia

4.1.1 Variabilita patogénnych druhov vo vzorkách

V 33 skúmaných vzorkách boli pomocou metódy s použitím roztoku KOH detegované 2 druhy patogénov z radu *Erysiphales*, a to *Golovinomyces bolayi* a *Podosphaera xanthii*. Pri tomto pozorovaní bola taktiež detegovaná prítomnosť hyperparazita *Ampelomyces quisqualis*.

Druh *P. xanthii*, ktorého konídie obsahovali fibrozínové telieska, sa vyskytoval len na 3 vzorkách. Všetky tieto 3 vzorky pochádzali z Japonska. Druh *G. bolayi*, s konídiami bez fibrozínových teliesok, sa vyskytoval na 30 vzorkách pochádzajúcich z Európy, USA a taktiež z Ázie (z Japonska). Ani na jednom zo vzoriek nebol detegovaný druh rodu *Leveillula*.

S výskytom patogénu *G. bolayi*, na ktorom sa súčasne nachádzal aj hyperparazit *A. quisqualis* bolo 5 vzoriek – č. 109, 116, 170, 172, 173. Tieto vzorky sme z ďalšieho výskumu vyradili (tzn. bez uskutočnenia morfológického a molekulárneho hodnotenia). Preferenciu výskytu *G. bolayi* a *P. xanthii* na hostiteľskej rastline nebolo možné určiť vzhľadom na malý počet vzoriek s patogénom *Podosphaera xanthii* a taktiež pre neúplné informácie o hostiteľských druhoch tohto patogénu nakoľko je pri daných vzorkách dostupná informácia len o pôvode z rodu *Lactuca*.

Porovnaním vzoriek s ohľadom na geografické rozšírenie sme schopní konštatovať, že druh *P. xanthii* sa vyskytoval iba na vzorkách z Japonska, kdežto druh *G. bolayi* sa nachádzal vo všetkých skúmaných oblastiach.

4.1.2 Morfológická variabilita anamorfných štádií

4.1.2.1 Dĺžka a šírka konídií

Na zistenie morfológickej variability anamorfných štádií jednotlivých druhov sme v prípade štúdia konídií merali ich dĺžku a šírku. Oba parametre sme merali pri všetkých vzorkách. Namerané hodnoty spracované štatistickými vzorcami akými sú aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, minimálna a maximálna hodnota sú zhrnuté v Tabuľke 7 a 8. Vo

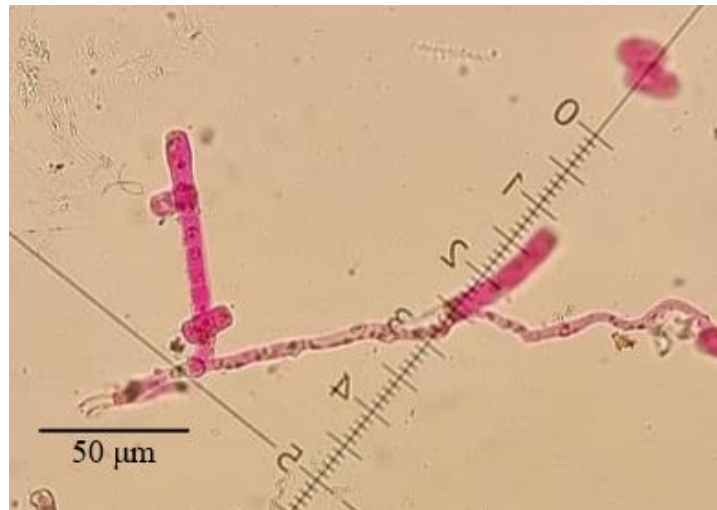
vyššie uvedených Tabuľkách je vypočítaný aj index tvaru konídií (tzn. pomer ich dĺžok a širok).

4.1.2.1.1 *Golovinomyces bolayi*

Priemerná nameraná dĺžka konídií pri druhu *G. bolayi* dosahovala $28,65 \mu\text{m} \pm 2,953 \mu\text{m}$. Najkratšie konídie s dĺžkou $19,52 \mu\text{m}$ boli namerané pri vzorke číslo 165 z Poľska a pri vzorkách 152, 246 a 247 pochádzajúcich z Českej republiky s druhmi *L. serriola*. Najdlhšie konídie s dĺžkou $43,92 \mu\text{m}$ pochádzali zo vzorky číslo 188, s druhom *L. sativa* z Nemecka.

Priemerná šírka konídií dosahovala $13,72 \mu\text{m} \pm 1,464 \mu\text{m}$. Celkovo najužšie konídie so šírkou $9,76 \mu\text{m}$ sa vyskytovali pri 9 vzorkách, z 8 krajín (Holandsko, USA, Francúzsko, Maďarsko, Nemecko, Česká republika, Slovenská republika, Poľsko), označených nasledujúcimi číslami: 35, 6, 186, 190, 77, 68, 152, 159, 165. Najširšie konídie boli namerané vo vzorke číslo 35 pochádzajúce z Holandska s hostiteľskou rastlinou *L. altaica* dosahujúce $19,52 \mu\text{m}$.

Najmenšia hodnota indexu tvaru konídií (1,88) bola vypočítaná vo vzorke číslo 247 pôvodom z Českej republiky na *L. serriola*. Naopak najvyššia hodnota tohto indexu (2,61) bola zaznamenaná vo vzorke č. 197 na *L. sativa* pôvodom z Japonska.



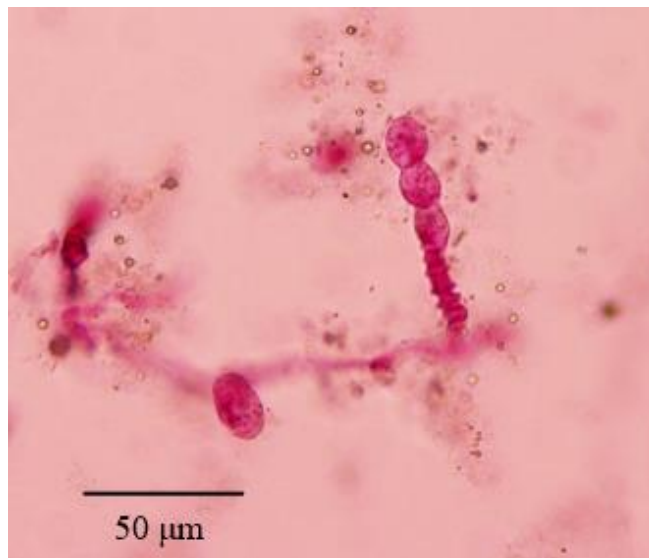
Obrázok 11 Mikroskopická fotografia konídií a konidioforov druhu *G. bolayi*. Foto: Čurná, A.

4.1.2.1.2 *Podosphaera xanthii*

Priemerná dĺžka konídií pri druhu *P. xanthii* bola $27,71 \mu\text{m} \pm 3,200 \mu\text{m}$. Celkovo najkratšie aj najdlhšie konídie sa vyskytovali vo vzorke č. 200 na herbalizovanej položke *Lactuca* spp. pochádzajúcej z Japonska. Najkratšie konídie dosahovali dĺžky $22,08 \mu\text{m}$ a naopak najdlhšie $34,97 \mu\text{m}$.

Priemerná šírka konídií bola $16,22 \mu\text{m} \pm 1,700 \mu\text{m}$. Najužšie konídie sa vyskytovali vo vzorke číslo 211 so šírkou $9,73 \mu\text{m}$. Najširšie konídie so šírkou $20 \mu\text{m}$ boli namerané vo vzorke číslo 203. Obe vzorky pochádzali z Japonska z herbalizovaných položiek *Lactuca* spp..

Najmenšia hodnota indexu tvaru konídií druhu *P. xanthii* bola zaznamenaná vo vzorke č. 203 s hodnotou 1,64. Najväčšia hodnota (1,81) bola vypočítaná vo vzorke číslo 211.



Obrázok 12 Mikroskopická fotografia konídií a konidioforov druhu *P. xanthii*. Foto: Čurná, A.

Tabuľka 7 Dĺžka a šírka konídií pri druhu *Golovinomyces bolayi* (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

			Dĺžka konídií <i>Golovinomyces bolayi</i>				Šírka konídií <i>Golovinomyces bolayi</i>				Index tvaru konídií (Shape index) <i>Golovinomyces bolayi</i>
Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP dĺžka/AP šírka
6	<i>L. saligna</i>	NL	29,12	2,861	24,40	36,60	13,83	1,958	9,76	17,08	2,11
27	<i>L. aculeata</i>	NL	27,90	2,455	24,4	34,16	12,93	1,305	12,20	17,08	2,16
28	<i>L. saligna</i>	NL	28,79	2,066	24,40	31,72	13,83	1,480	12,20	17,08	2,10
33	<i>L. serriola</i>	NL	28,55	2,324	24,40	34,16	13,42	1,537	12,20	17,08	2,13
34	<i>L. aculeata</i>	NL	28,87	2,405	26,84	34,16	13,26	1,657	12,20	17,08	2,18
35	<i>L. altaica</i>	NL	28,55	3,745	21,96	34,16	13,50	2,698	9,76	19,52	2,11
57	<i>L. serriola</i>	DE	27,25	2,648	24,40	34,16	13,18	1,216	12,20	14,64	2,07
59	<i>L. serriola</i>	DE	26,43	1,931	21,96	29,28	13,91	1,454	12,20	17,08	1,90
68	<i>L. serriola</i>	DE	27,53	1,829	24,40	31,72	13,66	1,766	9,76	17,08	2,02

Tabuľka 7 (Pokračovanie) Dĺžka a šírka konídií pri druhu *Golovinomyces bolayi* (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

			Dĺžka konídií <i>Golovinomyces bolayi</i>				Šírka konídií <i>Golovinomyces bolayi</i>				Index tvaru konídií (Shape index) <i>Golovinomyces bolayi</i>
Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP dĺžka/AP šírka
75	<i>L. serriola</i>	DE	27,82	2,448	24,40	31,72	12,69	0,993	12,20	14,64	2,19
77	<i>L. serriola</i>	HU	25,95	2,838	21,96	36,60	12,77	1,888	9,76	17,08	2,03
132	<i>L. serriola</i>	HR	27,98	2,698	24,40	31,72	13,50	1,534	12,20	17,08	2,07
152	<i>L. serriola</i>	CZ	26,27	2,914	19,52	31,72	13,01	1,612	9,76	17,08	2,02
159	<i>L. serriola</i>	SK	25,86	1,766	21,96	29,28	13,34	1,663	9,76	17,08	1,94
165	<i>L. serriola</i>	PL	26,60	3,096	19,52	34,16	12,44	1,173	9,76	14,64	2,14
174	<i>L. serriola</i>	SK	27,98	3,250	21,96	36,60	14,31	1,894	12,20	17,08	1,95
185	<i>L. sativa</i>	AT	29,12	3,200	24,40	36,60	12,61	0,093	12,20	14,64	2,31
186	<i>L. sativa</i>	US	30,83	3,105	24,40	36,60	12,44	0,982	9,76	14,64	2,48

Tabuľka 7 (Pokračovanie) Dĺžka a šírka konídií pri druhu *Golovinomyces bolayi* (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

			Dĺžka konídií <i>Golovinomyces bolayi</i>				Šírka konídií <i>Golovinomyces bolayi</i>				Index tvaru konídií (Shape index) <i>Golovinomyces bolayi</i>
Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP dĺžka/AP šírka
188	<i>L. sativa</i>	DE	30,74	4,513	24,40	43,92	12,93	1,137	12,20	14,64	2,38
189	<i>L. sativa</i>	PT	28,96	2,773	24,40	34,16	13,34	1,238	12,20	14,64	2,17
190	<i>L. sativa</i>	FR	31,07	4,390	24,40	41,48	12,93	1,454	9,76	17,08	2,40
192	<i>L. sativa</i>	BE	31,07	3,621	24,40	39,04	13,26	1,230	12,20	14,64	2,35
197	<i>L. sativa</i>	JP	35,51	4,390	24,40	41,18	13,58	1,387	12,20	17,08	2,61
246	<i>L. serriola</i>	CZ	29,60	3,434	19,52	36,60	14,64	1,570	12,20	17,08	2,02
247	<i>L. serriola</i>	CZ	27,82	3,113	19,52	34,16	14,80	1,687	12,20	17,08	1,88
AP celkovo:			28,65	2,953	21,69	33,46	13,72	1,464	11,29	1,46	2,15

Tabuľka 8 Dĺžka a šírka konídií pri druhu *Podosphaera xanthii* (JP = Japonsko).

Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	Dĺžka konídií <i>Podosphaera xanthii</i>				Šírka konídií <i>Podosphaera xanthii</i>				Index tvaru konídií (Shape index) <i>Podosphaera xanthii</i>
			AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP dĺžka/AP šírka
200	<i>Lactuca</i> sp.	JP	27,20	3,200	22,08	34,97	16,17	1,390	13,22	19,23	1,68
203	<i>Lactuca</i> sp.	JP	27,92	2,660	23,06	32,68	17,01	1,440	13,33	20,00	1,64
211	<i>Lactuca</i> sp.	JP	28,01	2,920	22,29	34,75	15,49	2,270	9,73	18,58	1,81
AP celkovo:			27,71	2,930	22,48	34,13	16,22	1,700	12,09	19,27	1,71

4.1.2.2 Dĺžka konidioforov, dĺžka foot-cell a počet distálnych buniek

Počas štúdia anamorfných znakov oboch druhov sme sa zamerali aj na vzhľad konidioforov. Merali sme ich celkovú dĺžku a dĺžku foot-cell. Zároveň sme počítali ich distálne bunky. Výsledky sú po štatistickom spracovaní zhrnuté v Tabuľke 10 a 11.

4.1.2.2.1 *Golovinomyces bolayi*

V prípade štúdia dĺžky konidioforov druhu *G. bolayi* mal aritmetický priemer hodnotu $114,45 \mu\text{m} \pm 30,961 \mu\text{m}$. Najkratšie konidiofory s dĺžkou $48,80 \mu\text{m}$ dosahovala vzorka číslo 246 z Českej republiky na *L. serriola*. Najdlhšie konidiofory s dĺžkou $297,68 \mu\text{m}$ zahŕňala vzorka číslo 189 pochádzajúca z Portugalska na *L. sativa*.

Skúmaním variability dĺžky foot-cell sme prišli k záveru, že priemerná dĺžka merala $44,60 \mu\text{m} \pm 15,771 \mu\text{m}$. Najkratšia foot-cell sa vyskytovala vo vzorke číslo 35 na *L. altaica* pochádzajúca z Holandska s dĺžkou $12,2 \mu\text{m}$. Najdlhšia foot-cell bola odmeraná vo vzorke číslo 189 pochádzajúcej z Portugalska na *L. sativa* s rozmerom $195,20 \mu\text{m}$.

Posledný zo skúmaných parametrov konidioforov bol počet ich distálnych buniek. Celkový aritmetický priemer počtu distálnych buniek bol $4,55 \pm 1,413$. Najmenší počet distálnych buniek bol 2 a to v prípade 21 vzoriek. Maximálny počet distálnych buniek, 10, bol nameraný vo vzorke číslo 189 z Portugalska na *L. sativa*.

4.1.2.2.1.1 *Podosphaera xanthii*

Pri druhu *P. xanthii* sme boli schopní odmerať dĺžku konidioforov a taktiež dĺžku foot-cell. Vzhľadom na nekvalitný a málo početný materiál sa nám nepodarilo spočítať počet distálnych buniek ani pri jednej zo sledovaných vzoriek. Štatisticky spracované výsledky zahŕňa Tabuľka 11.

Priemerná dĺžka konidioforov bola $114,5 \mu\text{m} \pm 22,700 \mu\text{m}$. Najkratšie konidiofory s dĺžkou $73,22 \mu\text{m}$ vykazovala vzorka číslo 200. Najdlhšie konidiofory sa nachádzali vo vzorke číslo 203, kedy ich dĺžka dosahovala $211,35 \mu\text{m}$. Obe vzorky pochádzali z herbalizovanej položky *Lactuca* spp. pôvodom z Japonska.

V prípade štúdie foot-cell bola priemerná dĺžka $35,57 \mu\text{m} \pm 6,740 \mu\text{m}$. Najkratšiu foot-cell dosahovala vzorka číslo 211 s dĺžkou $21,2 \mu\text{m}$ pochádzajúca z Japonska na

herbalizovanej vzorke *Lactuca* spp.. Najdlhšiu foot-cell sme namerali pri vzorke číslo 203, kedy jej dĺžka dosahovala 64,37 μm .

Tabuľka 9 Dĺžka konidioforov, foot-cell, počet distálnych buniek konidioforov pri druhu *Golovinomyces bolayi* (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

			Dĺžka konidioforov <i>Golovinomyces bolayi</i>				Dĺžka foot-cell <i>Golovinomyces bolayi</i>				Počet distálnych buniek konidioforov <i>Golovinomyces bolayi</i>			
Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	AP [µm]	SD [µm]	min. [µm]	max. [µm]	AP [µm]	SD [µm]	min. [µm]	max. [µm]	AP [ks]	SD [ks]	min. [ks]	max. [ks]
6	<i>L. saligna</i>	NL	126,39	25,602	73,20	161,04	38,32	13,650	14,64	73,20	5,47	1,252	3,00	8,00
27	<i>L. aculeata</i>	NL	107,36	21,842	61,00	146,40	61,41	11,729	39,04	82,96	3,90	1,094	2,00	5,00
28	<i>L. saligna</i>	NL	95,49	20,057	60,00	146,40	48,07	10,275	31,72	75,64	4,60	1,429	2,00	7,00
33	<i>L. serriola</i>	NL	112,24	26,567	58,56	165,92	66,53	14,569	41,48	97,60	3,90	1,626	2,00	7,00
34	<i>L. aculeata</i>	NL	106,38	24,142	61,00	183,00	62,87	14,252	41,48	109,80	3,77	1,382	2,00	6,00
35	<i>L. altaica</i>	NL	119,26	28,943	61,00	161,04	36,52	13,093	12,20	63,44	5,10	1,470	2,00	8,00
57	<i>L. serriola</i>	DE	119,15	23,891	61,00	161,04	54,49	13,339	34,16	78,08	4,93	1,230	2,00	6,00
59	<i>L. serriola</i>	DE	132,66	26,939	63,44	183,00	49,70	8,293	34,16	73,20	5,87	1,332	2,00	8,00

Tabuľka 9 (Pokračovanie) Dĺžka konidioforov, foot-cell, počet distálnych buniek konidioforov pri druhu *Golovinomyces bolayi* (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	Dĺžka konidioforov <i>Golovinomyces bolayi</i>				Dĺžka foot-cell <i>Golovinomyces bolayi</i>				Počet distálnych buniek konidioforov <i>Golovinomyces bolayi</i>			
			AP [µm]	SD [µm]	min. [µm]	max. [µm]	AP [µm]	SD [µm]	min. [µm]	max. [µm]	AP [ks]	SD [ks]	min. [ks]	max. [ks]
68	<i>L. serriola</i>	DE	108,42	30,318	51,24	163,48	47,58	15,362	34,16	112,24	4,87	1,479	2,00	7,00
75	<i>L. serriola</i>	DE	110,61	32,220	61,00	180,56	53,03	13,712	36,60	90,28	4,73	1,258	2,00	7,00
77	<i>L. serriola</i>	HU	134,85	27,923	90,28	234,24	52,54	8,199	41,48	73,20	5,00	1,203	2,00	7,00
132	<i>L. serriola</i>	HR	116,79	32,766	61,00	170,80	44,33	6,662	36,60	25,00	5,33	1,605	3,00	8,00
152	<i>L. serriola</i>	CZ	106,55	21,705	61,00	146,40	38,80	8,724	24,40	61,00	4,77	1,223	2,00	8,00
159	<i>L. serriola</i>	SK	126,64	22,640	85,40	170,80	41,64	6,810	31,72	58,56	5,07	0,828	3,00	7,00
165	<i>L. serriola</i>	PL	120,37	28,087	73,20	158,60	41,64	8,547	24,40	61,00	5,43	1,478	3,00	8,00
174	<i>L. serriola</i>	SK	109,31	41,405	53,68	195,20	40,26	13,769	19,52	73,20	4,57	1,501	2,00	9,00
185	<i>L. sativa</i>	AU	150,47	41,533	73,20	226,92	109,96	26,334	48,80	146,40	3,27	1,530	2,00	7,00
186	<i>L. sativa</i>	US	132,74	31,310	82,96	208,08	84,18	27,611	39,04	146,40	3,23	1,073	2,00	5,00

Tabuľka 9 (Pokračovanie) Dĺžka konidioforov, foot-cell, počet distálnych buniek konidioforov pri druhu *Golovinomyces bolayi* (AT = Rakúsko, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, JP = Japonsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

			Dĺžka konidioforov <i>Golovinomyces bolayi</i>				Dĺžka foot-cell <i>Golovinomyces bolayi</i>				Počet distálnych buniek konidioforov <i>Golovinomyces bolayi</i>			
Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [ks]	SD [ks]	min. [ks]	max. [ks]
188	<i>L. sativa</i>	DE	151,36	38,186	73,20	273,28	108,34	30,520	48,80	183,00	3,13	1,306	2,00	7,00
189	<i>L. sativa</i>	PT	181,21	50,373	104,92	297,68	129,89	27,677	78,08	195,20	4,30	2,231	2,00	10,00
190	<i>L. sativa</i>	FR	134,93	30,551	85,40	204,96	85,81	28,420	36,60	161,04	3,67	1,493	2,00	8,00
192	<i>L. sativa</i>	BE	164,38	35,915	78,08	231,80	110,29	28,226	51,24	170,80	4,30	1,466	2,00	7,00
197	<i>L. sativa</i>	JP	158,60	41,989	73,20	217,16	76,45	14,376	48,80	100,04	5,43	2,300	2,00	9,00
246	<i>L. serriola</i>	CZ	115,57	41,207	48,80	219,60	42,62	17,357	14,64	85,40	4,40	1,354	2,00	6,00
247	<i>L. serriola</i>	CZ	100,37	27,914	53,68	151,28	40,99	12,774	24,40	73,20	4,63	1,189	2,00	7,00
AP celkovo:			114,45	30,961	62,39	173,24	44,60	15,771	25,10	66,87	4,55	1,413	2,16	1,413

Tabuľka 10 Dĺžka konidioforov, foot-cell, počet distálnych buniek konidioforov pri druhu *Podosphaera xanthii* (JP = Japonsko).

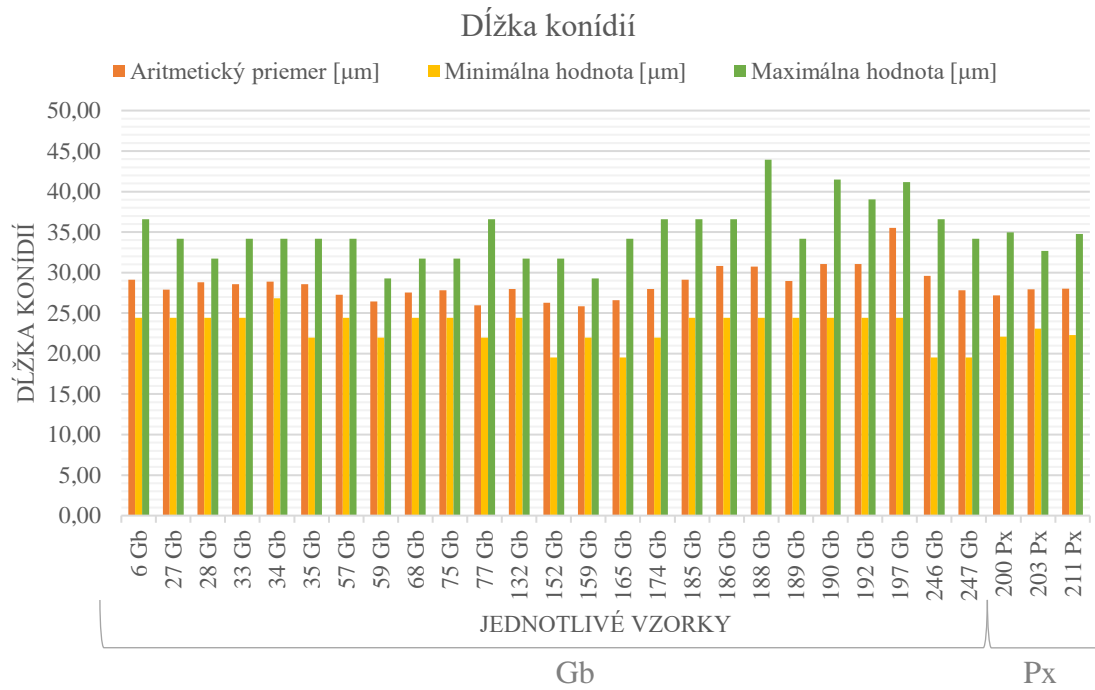
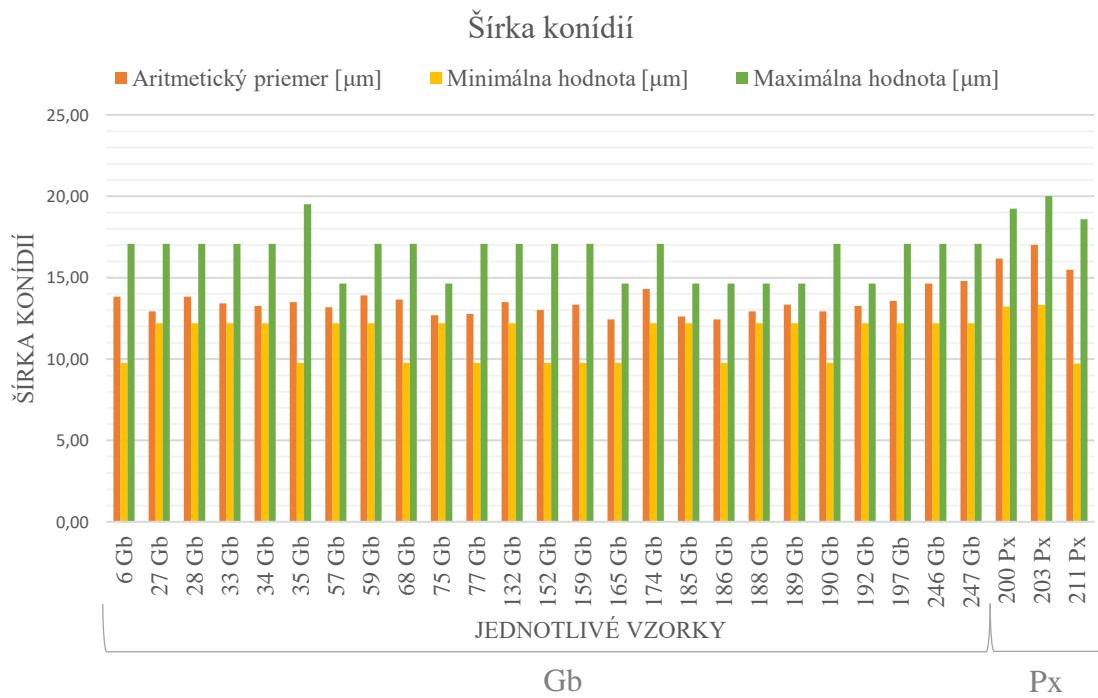
Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	Dĺžka konidioforov <i>Podosphaera xanthii</i>				Dĺžka foot-cell <i>Podosphaera xanthii</i>				Počet distálnych buniek konidioforov <i>Podosphaera xanthii</i>			
			AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [μm]	SD [μm]	min. [μm]	max. [μm]	AP [ks]	SD [ks]	min. [ks]	max. [ks]
203	<i>Lactuca</i> sp.	JP	137,16	26,980	77,48	211,35	42,49	7,110	27,32	64,37	x	x	x	x
211	<i>Lactuca</i> sp.	JP	105,68	24,210	74,31	185,51	32,58	7,120	21,20	57,61	x	x	x	x
200	<i>Lactuca</i> sp.	JP	99,30	16,900	73,22	139,44	31,64	5,990	22,51	42,62	x	x	x	x
AP celkovo:			114,05	22,700	75,00	178,77	35,57	6,740	23,68	54,87	x	x	x	x

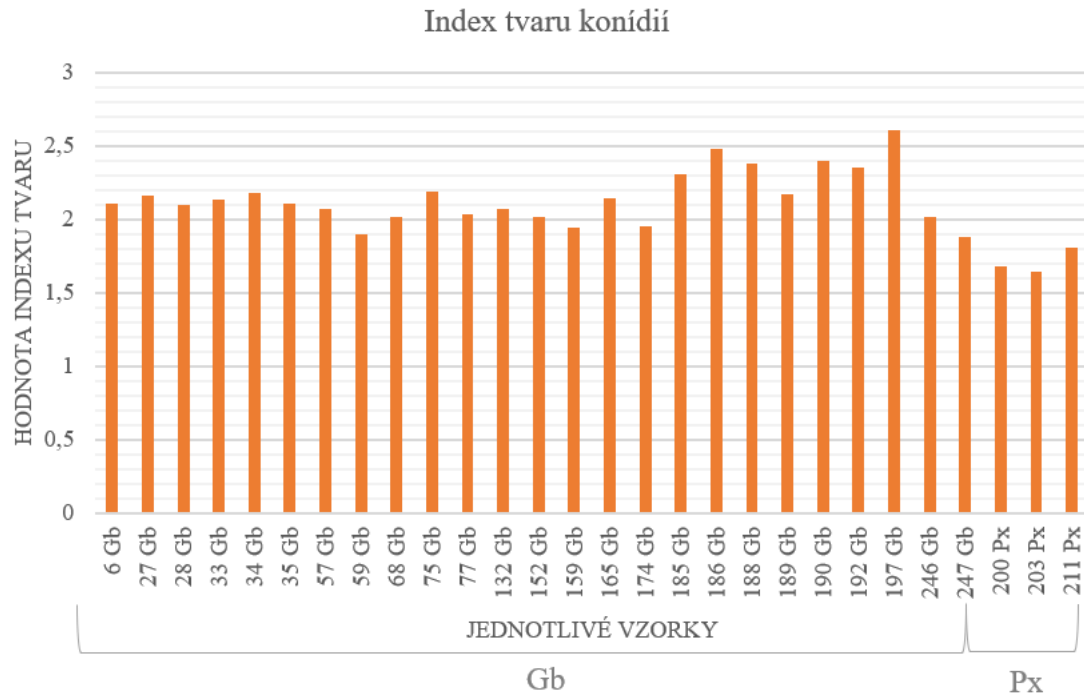
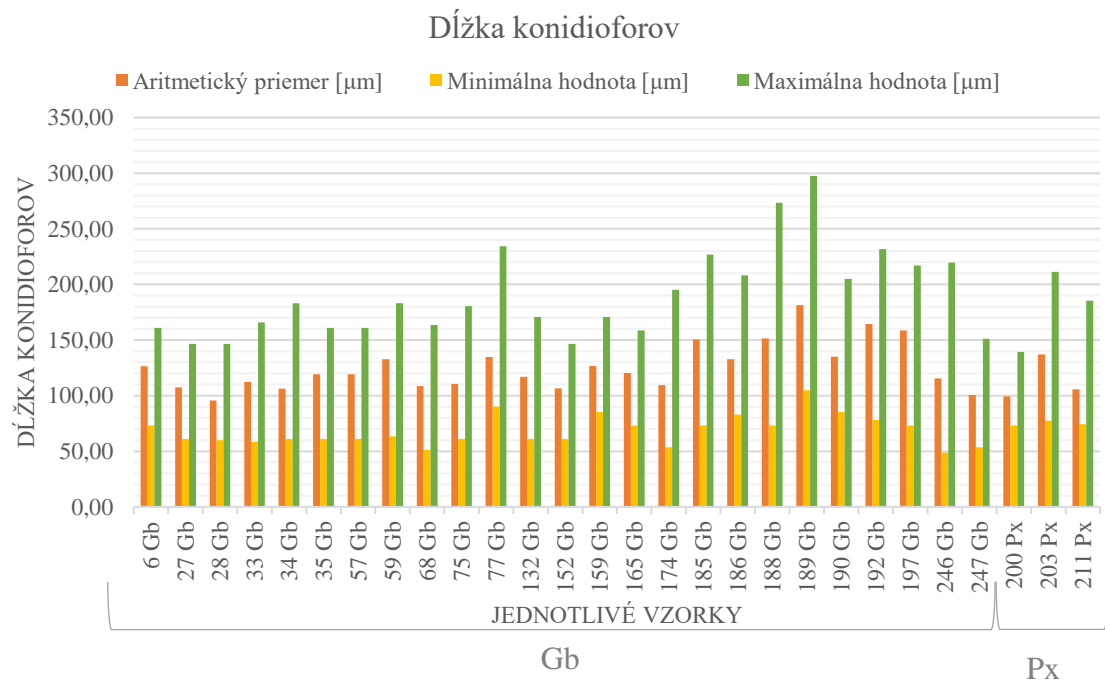
4.1.2.3 Zhrnutie dát z nameraných morfológických charakteristík

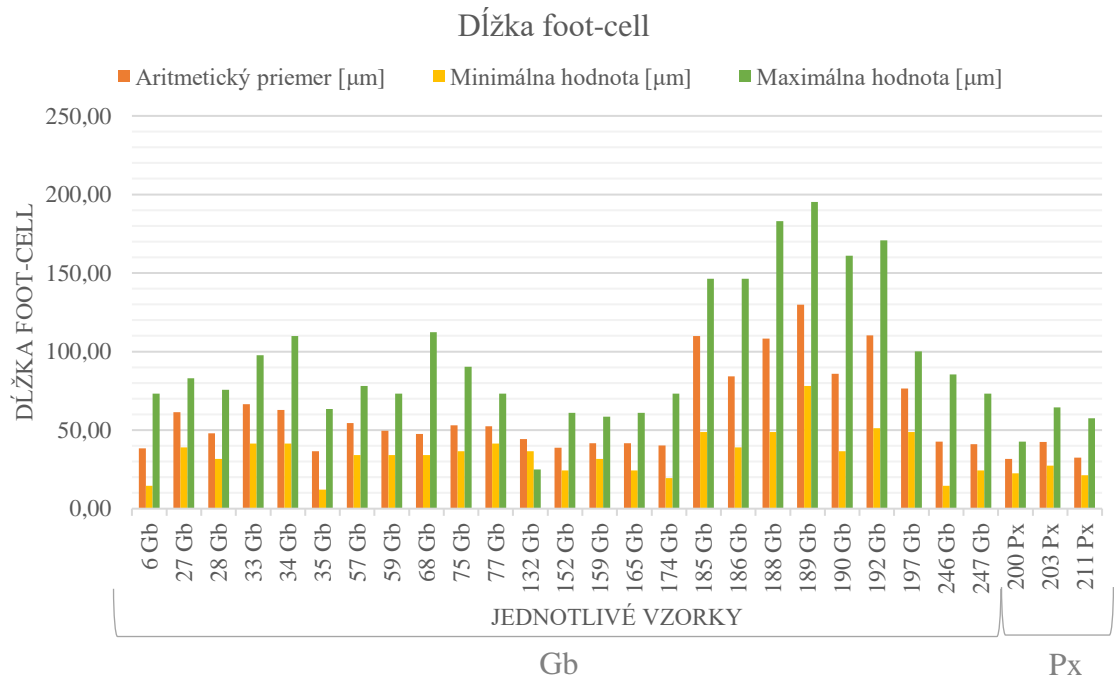
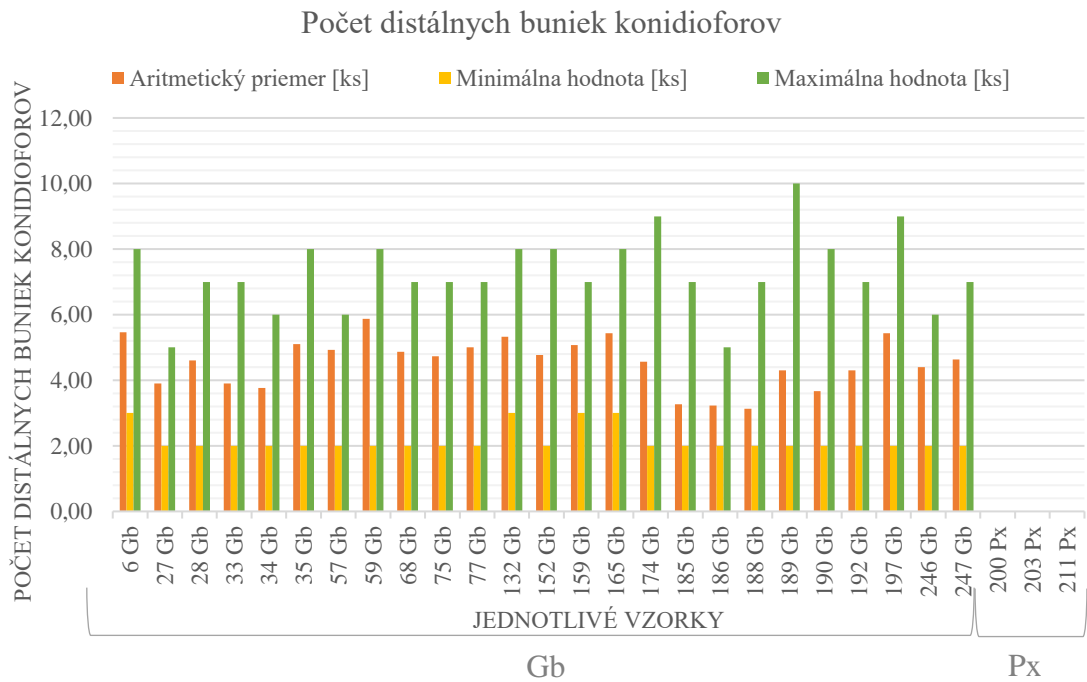
4.1.2.3.1 Porovnanie druhu *Golovinomyces bolayi* s druhom *Podosphaera xanthii*

Konídie, ich šírka a dĺžka, sa pri druhoch *G. bolayi* a *P. xanthii* v priemere od seba líšili o 0,96 μm . Najnižší rozdiel v aritmetických priemeroch, odhliadnuc od smerodajných odchýlok, bol zaznamenaný v maximálnej dĺžke konídií, kedy išlo o rozdiel 0,67 μm . Najväčší rozdiel bol zaznamenaný pri maximálnej priemernej hodnote šírky konídií a to 2,54 μm . Dĺžku, resp. šírku jednotlivých konídií znázorňuje Graf 1, resp. Graf 2. Indexy tvaru konídií dosahovali nižšie hodnoty pri druhu *P. xanthii* ako pri druhu *G. bolayi*, kedy ich rozdiel v priemere činil hodnotu 0,44. Jednotlivé indexy pri konkrétnych druhoch vyjadruje Graf 3.

Jednotlivé konidiofory boli variabilnejšie než konídie, vrátane variability vnútri druhu. Rozdiel medzi aritmetickými priermi nameraných vlastností pri konidioforoch druhov *G. bolayi* a *P. xanthii* činil 7,23 μm . Najnižší rozdiel aritmetických priemerov medzi týmito druhmi bol zaznamenaný v dĺžke konidioforov, kedy dosahoval 0,40 μm . Najväčší rozdiel medzi druhmi, 12,61 μm , bol zaznamenaný v minimálnej hodnote dĺžky konidioforov. Dĺžku konidioforov jednotlivých vzoriek znázorňuje Graf 4. Z Grafu 5 je možné vyčítať rozdiely v dĺžke foot-cell v rámci vzoriek, Graf 6 vyjadruje rozdiel v počte ich distálnych buniek. Nakoľko sa nejednalo o počtovo vyrovnané súbory nebolo možné určiť presnú štatistickú signifikantnosť výsledkov.

Graf 1 Dĺžka konídií druhov *G. bolayi* a *P. xanthii*.Graf 2 Šírka konídií druhov *G. bolayi* a *P. xanthii*.

Graf 3 Index tvaru konidií druhov *G. bolayi* a *P. xanthii*.Graf 4 Dĺžka konidioforov druhov *G. bolayi* a *P. xanthii*.

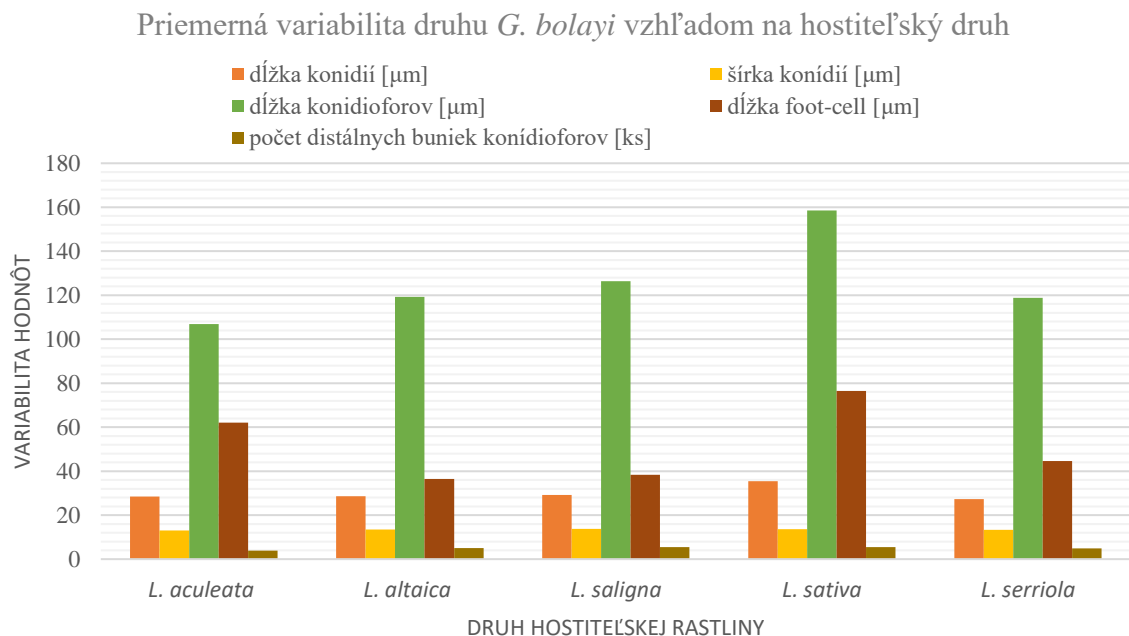
Graf 5 Dĺžka foot-cell druhov *G. bolayi* a *P. xanthii*.Graf 6 Počet distálnych buniek druhu *G. bolayi*. Pri druhu *P. xanthii* nebolo možné distálne bunky spočítať.

4.1.2.3.2 Porovnanie variability patogénu vzhľadom na druh hostiteľskej rastliny

V priebehu štúdie sa nepodarilo určiť existenciu druhovej špecifikácie patosystému *Lactuca* – múčnatkotvaré nakoľko v druhu *P. xanthii* neboli dostupné dostatočné informácie o hostiteľských organizmoch. Z výsledkov však môžeme usudzovať, že patogén *Golovinomyces bolayi* nemá preferenciu na konkrétny druh zástupcu *Lactuca* spp., nakoľko bolo infikovaných viacej druhov z tohto rodu.

Pre nedostatočné informácie nebolo možné zistiť rozdiely anamorfných štádií druhu *P. xanthii* vzhľadom na druh hostiteľskej rastliny, a preto sme toto kritérium hodnotili len v druhu *G. bolayi*. Z Grafu 6 vyplýva, že tento druh tvorí najdlhšie konidiofory a súčasne najdlhšie bunky foot-cell na hostiteľoch druhu *L. sativa*. Na tomto hostiteľovi produkuje aj najdlhšie konídie. Ich šírka je naprieč rôznymi hostiteľskými organizmami pomerne vyrovnaná. Nakoľko herbalizované položky so zástupcami druhu *L. sativa* pochádzali zo 7 krajín z Európy, Ázie ale aj Ameriky usudzujeme, že veľkosti anamorfných znakov (dĺžka konidioforov, foot-cell a konídií) nemajú súvis s geografickým pôvodom hostiteľov.

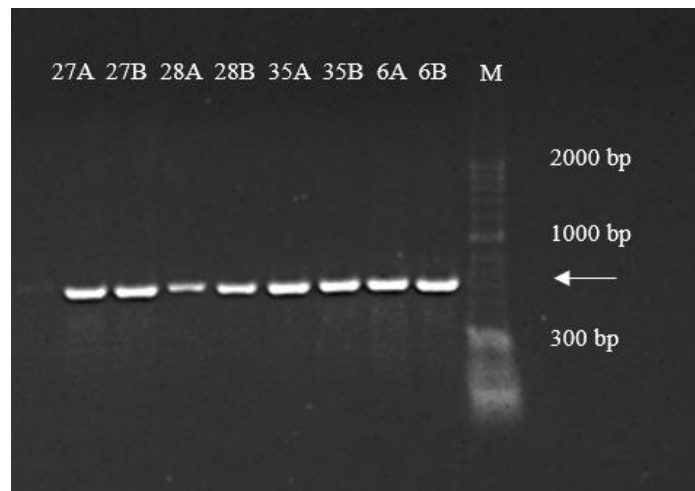
Graf 7 Zrovnanie priemerných hodnôt variability anamorfných štádií druhu *G. bolayi* vzhľadom na hostiteľský druh.



4.2 Molekulárna determinácia

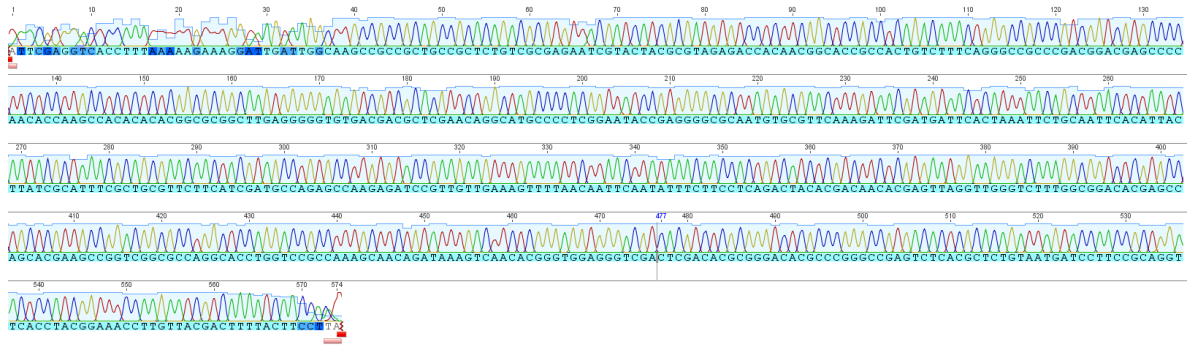
4.2.1 Vyhodnotenie sekvenčných dát

V tejto časti práce sa pomocou nested PCR podarilo získať PCR produkt pri všetkých 28 analyzovaných vzorkách. Príklad elektroforetického gélu, na ktorom bol overený priebeh PCR reakcie, je prezentovaný na Obr. 10.



Obrázok 13 Výsledok elektroforézy. Čísla v hornej časti obrázku predstavujú čísla vzoriek, písmena A a B označujú repliky danej vzorky, M predstavuje DNA štandard, šípka označuje pozíciu výsledných PCR produktov (600-700bp).

Všetkých 28 vzoriek bolo sekvenovaných pomocou priameho a spätného primeru, použitého pri druhej PCR, podľa príslušného nested PCR protokolu. Získané sekvencie boli kvalitné (Obr. 11), bez prítomnosti prekrývaných pík (vrcholov) alebo inak zle čitateľných častí. Preložením oboch sekvencií príslušnej vzorky v programe Geneious sme získali informácie o poradí nukleotidov v celej sekvenovanej oblasti.



Obrázok 14 Ukážka výsledného elektroforogramu ITS regiónu vzorky 33 – printscreen z programu Geneious.

Pomocou programu Geneious sme tiež získali informáciu o počte ribotypov (molekulárnych variant) – teda unikátnych sekvencií kódujúcich rRNA, odlišujúcich sa prítomnosťou jednobodových polymorfizmov (SNP) alebo prítomnosťou inzercí alebo delcií (indely) časti nukleotidových sekvencií.

Sekvencie nájdených ribotypov sme podrobili vyhľadávaniu a zrovnávaniu so záznamami uloženými v internetovej databáze NCBI (National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kedy sme sledovali úroveň zhody vzoriek v databáze (Identita) s našimi vzorkami a vykonali tak molekulárnu identifikáciu taxonu. Z popisu záznamov v databáze sme zistili napríklad tiež hositeľský druh a geografický pôvod vzorky. Týmto spôsobom sme konštatovali, že pri 20 vzorkách sa jednalo o druh *G. bolayi*, pri 3 vzorkách o druh *P. xanthii*.

Päť vzoriek (57, 59, 152, 159 a 247) predstavovalo sekvencie hubových organizmov, ktoré sme neidentifikovali pod mikroskopom. Kontaminácia bola nájdená až sekvenovaním, pričom ich sekvencie sa nezhodovali na 100% so žiadnym z deponovaných záznamov. Išlo o infekciu neznámymi nekultivovateľnými hubovými organizmami (vzorky č. 59, 247), úroveň zhody bola pod 99%. Vo vzorke č. 57 bol identifikovaný druh *Hyalopeziza raripila* (Ascomycota), s identitou 99,24 – 99,81%. Vzorka č. 152 bola infikovaná nekultivovaným hubovým organizmom *Tetracladium*, so vzorkami z databázy NCBI HG935125, GQ219953 a HG935173 sa zhodovala na úrovni identity 96,75%. Vo vzorke č. 159 bola nájdená 99,42% zhoda so záznamom FJ820741 – *Cyathicula cyathoidea* – vzorka zo vzduchu.

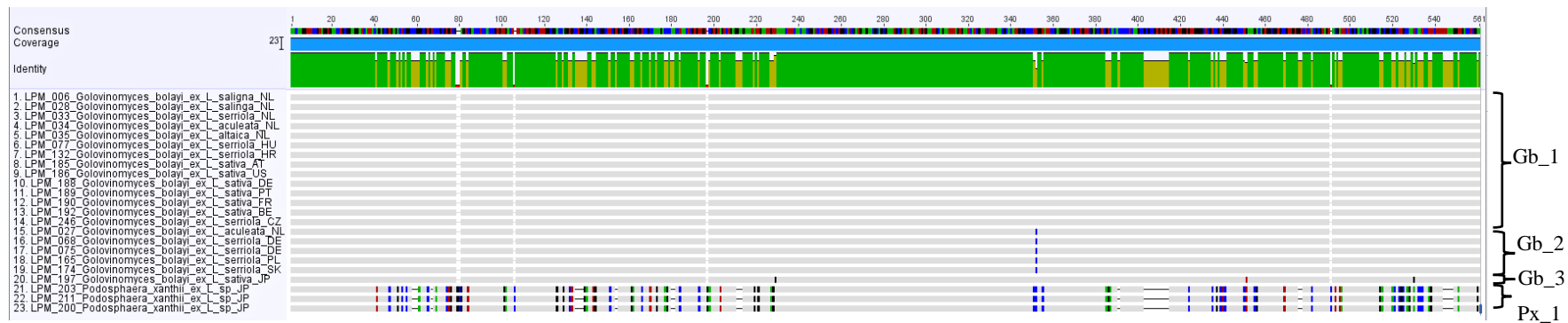
Vyššie opísané vzorky (57, 59, 152, 159 a 247) boli z výskumu vylúčené – neboli zaradené do nasledujúcich molekulárnych analýz.

Z Obrázku 15 sú zrejmé jednotlivé rozdiely medzi sekvenciami druhov *G. bolayi* a *P. xanthii*. V rámci druhu *G. bolayi* boli pozorované tri ribotypy (molekulárne varianty časti DNA kódujúcej rRNA; Gb_1, Gb_2, Gb_3). Najčastejší ribotyp Gb_1 bol charakteristický pre 14 vzoriek (Tab. 12). Druhý ribotyp (Gb_2) bol pozorovaný pri 5 vzorkách (27, 68, 75, 165 a 174). Tieto vzorky sa líšili od Gb_1 iba v 1 SNP a to na pozícii 348. V tomto prípade išlo o nahradenie tymínu za cytozín. Ribotyp Gb_3 bol charakteristický iba pre vzorku 197. Táto vzorka sa od Gb_1 líšila v 3 SNP a to na pozíciách 225, 447 a 525. V tomto prípade išlo o nahradenie tymínu guanínom a naopak. V rámci druhu *P. xanthii* bol pozorovaný len jeden ribotyp (Px_1).

Finálne so zrovnaním sekvencií všetkých vzoriek (Obr. 12) je zrejmá jasná odlišnosť oboch zmienených druhov, predstavovaná 116 SNP a niekoľko chýbajúcimi úsekmi pri sekvenciách *P. xanthii*. Dĺžka získanej oblasti ITS regiónu pri druhu *G. bolayi* bola 556 párov báz a pri druhu *P. xanthii* 527 párov báz.

Tabuľka 11 Výsledky molekulárnej determinácie vzoriek PM na zástupcoch rodu *Lactuca* (AT = Rakúsko, Aq = *Ampelomyces quisqualis*, BE = Belgicko, CZ = Česká republika, DE = Nemecko, FR = Francúzsko, Gb = *Golovinomyces bolayi*, HR = Chorvátsko, HU = Maďarsko, L. = *Lactuca*, NL = Holandsko, PL = Poľská republika, PT = Portugalsko, SK = Slovenská republika, US = Spojené štáty americké).

Číslo vzorky	Hostiteľská rastlina	Lokalita zberu	Výsledok determinácie	Ribotyp
6	<i>L. saligna</i>	NL	Gb	Gb_1
27	<i>L. aculeata</i>	NL	Gb	Gb_2
28	<i>L. saligna</i>	NL	Gb	Gb_1
33	<i>L. serriola</i>	NL	Gb	Gb_1
34	<i>L. aculeata</i>	NL	Gb	Gb_1
35	<i>L. altaica</i>	NL	Gb	Gb_1
68	<i>L. serriola</i>	DE	Gb	Gb_2
75	<i>L. serriola</i>	DE	Gb	Gb_2
77	<i>L. serriola</i>	HU	Gb	Gb_1
132	<i>L. serriola</i>	HR	Gb	Gb_1
165	<i>L. serriola</i>	PL	Gb	Gb_2
174	<i>L. serriola</i>	SK	Gb	Gb_2
185	<i>L. sativa</i>	AT	Gb	Gb_1
186	<i>L. sativa</i>	US	Gb	Gb_1
188	<i>L. sativa</i>	DE	Gb	Gb_1
189	<i>L. sativa</i>	PT	Gb	Gb_1
190	<i>L. sativa</i>	FR	Gb	Gb_1
192	<i>L. sativa</i>	BE	Gb	Gb_1
197	<i>L. sativa</i>	JP	Gb	Gb_3
200	<i>Lactuca</i> sp.	JP	Px	Px_1
203	<i>Lactuca</i> sp.	JP	Px	Px_1
211	<i>Lactuca</i> sp.	JP	Px	Px_1
246	<i>L. serriola</i>	CZ	Gb	Gb_1



Obrázok 15 Rozdiely v oblasti ITS regiónov medzi vzorkami *G. bolayi* a *P. xanthii* zvýraznené farebnými pruhmi (SNP) alebo vynechaním miest (delécie). Jednotlivé ribotypy sú vyznačené na pravej strane obrázku (Gb_1-3, Px_1).

Prvý z ribotypov druhu *G. bolayi*, obsahujúci 14 nami študovaných vzoriek sa s prvými tromi záznamami v databáze NCBI zhodoval na 100% svojim prekryvom ako aj úrovňou zhody. V databáze išlo o vyššie uvedené záznamy NR_163289 a LC417105. Vo výsledkoch bol tretí záznam LC417104 identický s LC417105, pričom sa jednalo o *G. bolayi* z *Lactuca saligna*. Naše hostiteľské organizmy druhu *G. bolayi* sa pri tejto DNA sekvencií zhodovali so zástupcami v databáze s hostiteľskými organizmami v ich rode, v rode *Lactuca*. Druhovo boli zhodné položka č. 6 a č. 28 s hostiteľským organizmom *L. saligna*, položky č. 77 a 246 s hostiteľom druhu *L. serriola* a položky č. 185, 186, 188, 189, 190, 192 s druhom *L. sativa*. Naše položky sa vyskytovali aj na hostiteľských druhoch, ktoré sa medzi prvými tromi vzorkami z databázy nevyskytovali, a to na *L. aculeata* (vzorka č. 34) a *L. altaica* (vzorka č. 35) a na *L. serriola* (vzorky č. 33 a 132).

Ribotyp 2 nájdený vo vzorkách č. 27, 68, 75, 165 a 174 zahrňujúce druh *G. bolayi* sa zhodoval so záznamom LC417107. Táto sekvencia bola získaná zo vzorky *G. bolayi* z *L. serriola* pôvodom z Českej republiky, z Olomouca. Druhá a tretia vzorka v databáze sa s našimi vzorkami zhodovali z 99,82%. Jednalo sa o záznamy NR_163289 (typová položka *G. bolayi* infikujúca *L. serriola*, Maďarsko) a o záznam LC417105 (*G. bolayi* na *L. sativa*, Holandsko). Išlo teda o *G. bolayi* nájdené na rovnakom hostiteľskom okruhu rastlín. Hostiteľské organizmy v priebehu nášho výskumu patrili k druhom *L. aculeata* (vzorka č. 27) a *L. serriola* (vzorky č. 68 a 75, 165 a 174). Ďalšími zo vzoriek, s ktorými sa tento ribotyp zhodoval, boli napríklad vzorky AB077661 (*L. muralis* (*Mycelis muralis*), Švajčiarsko, identita 100%), LC417106 (*L. serriola*, Maďarsko, identita 100%) či vzorka LC417108 na *L. serriola* z Južnej Afriky (identita 99,81%).

Nukleotidová sekvencia ribotypu 3, unikátna pre vzorku 197, sa z 99,64% zhodovala so záznamom LC417096 popísaným ako *G. bolayi* s hostiteľským organizmom *Kalanchoe* sp., pôvodom z Nemecka. Rovnaká zhoda bola nájdená pri zázname KP642016 (*G. orontii* z *Verbena bonariensis*, pôvodom z Anglicka) a AB769457 (*G. bolayi* z *Arabidopsis thaliana*, pôvod z Maďarska). Prvý traja hostitelia z databázy sa pri tomto ribotype nezhodovali s hostiteľmi nášho výskumu. Hostiteľským rodom *Lactuca* sa identitou na 99,64% zhodovala položka KP260660 (*L. serriola*, Kórea).

Pri druhu *P. xanthii* vykazovali naše vzorky (č. 200, 203, 211) so 100% úroveň zhody s *P. xanthii* infikujúcim druh *Eclipta prostrata* (MT260063); *P. xanthii* parazitujúcim na *Cyanthillium cinereum* pôvodom z Číny (MN203658); a *P. xanthii* na hostiteľskom druhu

Bidens sp. pôvodom z Thajska (LC270780). Pri všetkých ribotypoch bola nájdená 100% zhoda v prekryve s deponovanými sekvenciami – tzn. zrovnávané sekvencie mali rovnakú dĺžku.

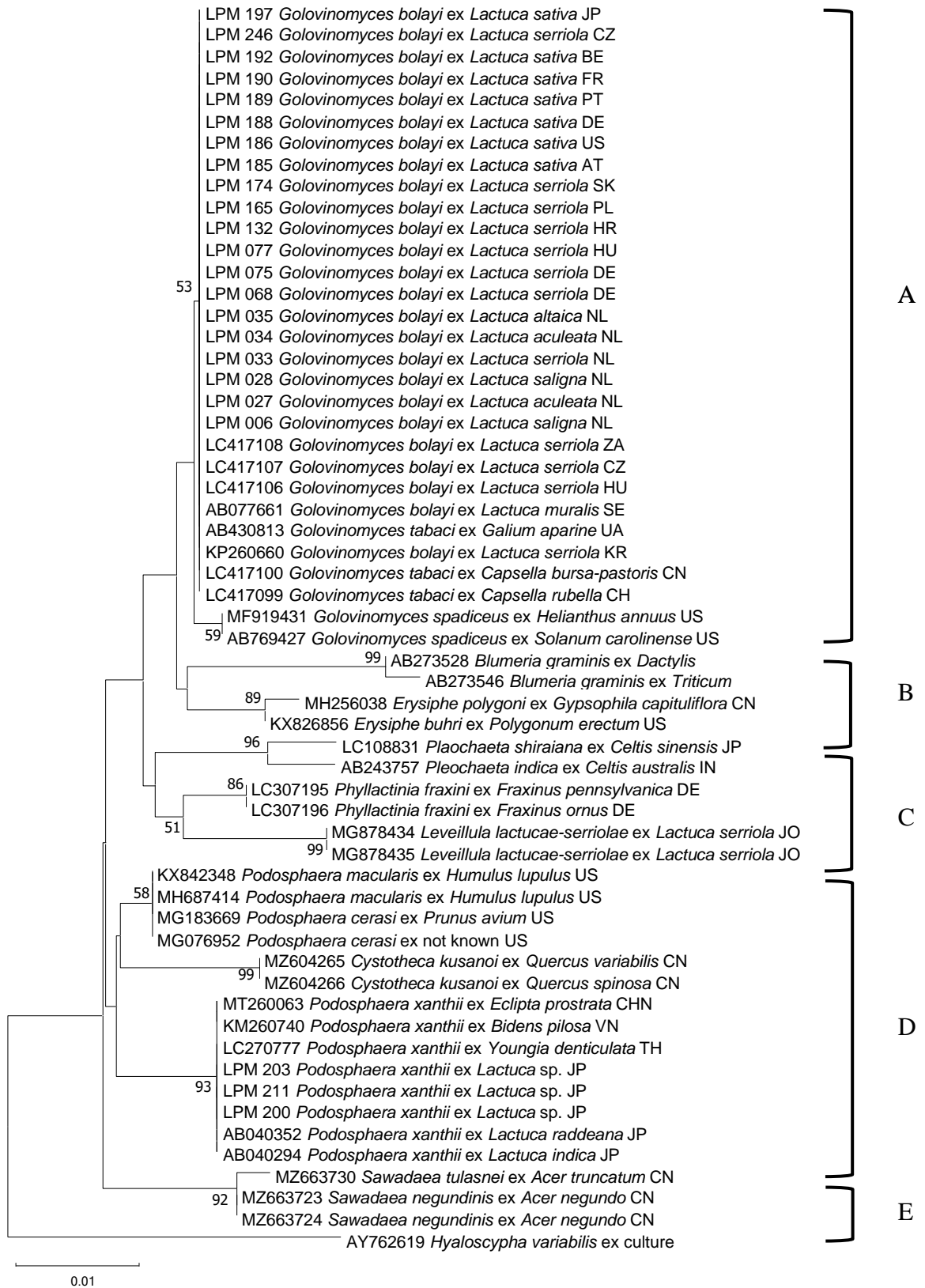
4.2.2 Fylogenetická rekonštrukcia

Do tohto hodnotenia boli použité všetky získané sekvencie *G. bolayi* a *P. xanthii*, ktoré sme doplnili o ďalšie referenčné záznamy z nukleotidovej databázy NCBI (zástupcovia rodov *Golovinomyces*, *Erysiphe*, *Blumeria*, *Pleochaeta*, *Leveillula*, *Phyllactinia*, *Sawadaea*, *Cystotheca*, *Leohumicola* a *Hyaloscypha*). Hlavným účelom bolo overiť správnosť molekulárnej identifikácie vzoriek a načrtnúť vzťahy medzi rodmi *Golovinomyces*, *Leveillula* a *Podospaera*. Taktiež vieme porovnať príbuznosť týchto rodov s inými rodmi či ich umiestnenie v rámci tribusov. Celkovo bolo použitých 58 nukleotidových sekvencií, dĺžka výsledného alignmentu bola 362 nukleotidov.

Výsledný fylogenetický strom je prezentovaný na Obrázku 16, bol vytvorený pomocou programu MEGA X (metóda Minimum Evolution; complete deletion; 1000 bootstrapových replikácií), a bolo na ňom detegovaných 5 hlavných skupín odpovedajúcich zaradeniu do tribusov čeľade *Erysiphaceae*.

Prvý tribus *Golovinomyceteae* predstavuje skupinu A (Obr. 15) s druhmi *G. bolayi* a *G. tabaci*. Z tejto vetvy sa novou vetvou odčlenili druhy *G. spadiceus*. Tribus *Erysipheae* predstavujú druhy *Erysiphe buhri*, *E. polygona*, tie sa odčlenili naraz s tribusom *Blumerieae* zastúpeným druhom *Blumeria graminis*, pričom ležia v spoločnej skupine B.

Ďalšiu skupinu (C) predstavuje odčlenenie druhu *Pleochaeta indica* spolu s *Pleochaeta shiraiana* a odčlenenie *Leveillula lactucae-serriolae* s *Phyllactinia fraxini*. Tieto druhy spadajú do tribusu *Phyllactinieae*. Skupinu D vytvorili zástupcovia tribusu *Cystothecae* s rodmi *Cystotheca* (druh *Cystotheca kusanoi*) a *Podospaera* (druhy *P. macularis*, *P. cerasi* a neskôr *P. xanthii*). Posledná skupina, skupina E predstavuje ITS sekvencie rodu *Sawadaea*. Fylogenetický strom bol zakorenený pomocou druhu *Hyaloscypha variabilis*.



Obrázok 16 Phylogenetický strom prezentujúci taxonomické postavenie študovaných vzoriek s vybranými taxónmi čeľade *Erysiphaceae*.

5 Diskusia

Výskumu múčnatkotvarých, ako aj ich hostiteľským rastlinám sa celosvetovo venovalo niekoľko autorov. Na území Česka a Slovenska sa jedná o autorov J. Kliku (1923, *Monografie českých padlí*); E. Beneša, J. Benadu a J. Špačeka (*Zemědělská fytopatologie: I díl*); C. Paulecha (1995, *Flóra Slovenska X/1Huby Múčnatkotvaré*); A. Lebedu, B. Mieslerovej, J. Huszára a B. Sedlákovéj (*Padlí kulturních a planě rostoucích rostlin*, 2017); V. Petřekovej [2018, *Atlas vybraných druhů padlí (řád Erysiphales) v České republice*]; M. Sedlákovéj, B. Mieslerovej, Z. D. Trojanovej a A. Lebedu (2021, *Biotrofní houby a peronosporý planě rostoucích rostlin*). Celosvetovo najaktuálnejšie a najuznávanéjšie dielo venované štúdiu múčnatkotvarých, ktorého autormi sú U. Braun a R. T. A. Cook nesie názov *Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews)* (2012).

V rámci nami realizovaného výskumu múčnatkotvarých na druhoch rodu *Lactuca* bol v 3 vzorkách identifikovaný druh *Podosphaera xanthii*, ktorého konídie obsahujú fibrozínové telieska. Druh *Golovinomyces bolayi*, bez prítomnosti fibrozínových teliesok, sa vyskytoval na 30 vzorkách. Ani na jednej zo vzoriek nebol detegovaný druh rodu *Leveillula*. Literárne údaje vyššie uvedenou tézu potvrdzujú, napr. v práci Braun et al. (2019) neboli fibrozínové telieska zaznamenané v konídiách druhu *G. bolayi*. Naopak prítomnosť fibrozínových teliesok v druhu *P. xanthii* popisuje Shin et al. (2006). Nami získané výsledky sú teda v súlade s vyššie uvedenými štúdiami. Rody *Golovinomyces* a *Podosphaera* je možné rozlíšiť taktiež na základe znakov pohlavného (teleomorfného) štádia (napr. počet vreciek v chasmothécii), ale pohlavné štádia v našich vzorkách nájdené neboli.

V priebehu skúmania variability anamorfných štádií sledovaných druhov sme dospeli k záveru, že priemerná nameraná dĺžka konídií druhu *G. bolayi* dosahovala $28,65 \mu\text{m} \pm 2,953 \mu\text{m}$. Najkratšie konídie s dĺžkou $19,52 \mu\text{m}$ boli namerané pri vzorke číslo 165 z Poľska a pri vzorkách 152, 246 a 247 pochádzajúcich z Českej republiky s druhmi *L. serriola*. Najdlhšie konídie s dĺžkou $43,92 \mu\text{m}$ pochádzali zo vzorky číslo 188, s druhom *L. sativa* z Nemecka. Braun et al. (2019) uvádzajú dĺžku konídií $25 - 35 \mu\text{m}$, a napríklad Pirnia a Taheri (2020) namerali dĺžku konídií $25 - 34 \mu\text{m}$. Aritmetické priemery nami nameraných hodnôt sa s výsledkami vyššie uvedených autorov zhodujú.

Pirnia a Taheri (2020) uvádzajú šírku konídií druhu *G. bolayi* v rozmedzí $14 - 18 \mu\text{m}$, Braun et al. (2019) v rozmedzí $12 - 18 \mu\text{m}$. Taktiež nami nameraná šírka konídií sa zhoduje s výsledkami zahraničných autorov, pohybuje sa v rozmedzí od $9,76 \mu\text{m}$ (9 vzoriek, z 8

krajín Holandsko, USA, Francúzsko, Maďarsko, Nemecko, Česká republika, Slovenská republika, Poľsko) po 19,52 μm (1 vzorka, Holandsko).

Nami zistená priemerná dĺžka konídií druhu *P. xanthii* bola 27,71 $\mu\text{m} \pm 3,200 \mu\text{m}$. Celkovo najkratšie aj najdlhšie konídie sa vyskytovali vo vzorke č. 200 na herbalizovanej pološke *Lactuca* spp. pochádzajúcej z Japonska. Najkratšie konídie dosahovali dĺžky 22,08 μm a naopak najdlhšie 34,97 μm . Štúdiu dĺžky konídií druhu *P. xanthii* sa venoval napr.. Shin et al. (2006) uvádzajúci rozmery od 24 μm po 34 μm . O niečo širšie rozpätie hodnôt uvádza Křístková (1999), a to od 18,8 μm po 40,6 μm . Priemerné hodnoty nami nameraných vzoriek sa s vyššie uvedenými výskumami zhodujú, avšak nami získané hodnoty vykazovali väčšie rozpätie dĺžok konídií oproti údajom zo štúdie Shin et al. (2006).

Šírka konídií druhu *P. xanthii* uvádzaná v literatúre sa pohybuje od 15 μm po 22 μm (Shin et al., 2006), resp. od 12,5 μm po 21,9 μm (Křístková, 1999). V rámci nami realizovaného výskumu boli namerané užšie konídie. Najuššie konídie sa vyskytovali vo vzorke č. 211 (9,73 μm), zatiaľ čo najširšie konídie (20 μm) boli namerané vo vzorke č. 203. Priemerná šírka konídií druhu *P. xanthii* bola 16,22 $\mu\text{m} \pm 1,700 \mu\text{m}$.

V priebehu nášho výskumu bola vypočítaná priemerná hodnota indexu tvaru konídií pri druhu *G. bolayi* 2,15. Najnižší index dosahovala vzorka č. 247 (Česká republika, *L. sativa*) s hodnotou 1,88. Najvyššia hodnota (2,61) bola vypočítaná vo vzorke č. 197 z *L. sativa* pôvodom z Japonska. Nami vypočítané údaje sú v súlade s výskumom autorov Braun a Cook (2019), ktorí zaznamenali hodnotu indexu tvaru konídií v rozpätí od 1,3 po 3,6.

Braun a Cook (2012) uvádzajú hodnotu indexu tvaru konídií pri druhu *P. xanthii* v rozpätí od 1,5 po 1,9. Křístková (1999) uvádza hodnotu tohto indexu pri druhu *P. xanthii* od 1,0 po 2,6, pričom priemernú hodnotu stanovuje na 1,65. Nami vypočítaná priemerná hodnota indexu tvaru konídií dosahovala 1,71. Najvyššiu hodnotu indexu (1,81) sme zaznamenali vo vzorke č. 211. Najnižšiu hodnotu (1,64) dosahovala v rámci nášho výskumu vzorka č. 203. Nami vypočítané údaje sú v súlade s vyššie uvedenými autormi výskumov.

V rámci štúdia dĺžky konidioforov druhu *G. bolayi* mal aritmetický priemer hodnotu 114,45 $\mu\text{m} \pm 30,961 \mu\text{m}$. Najkratšie konidiofory s dĺžkou 48,80 μm vykazovala vzorka č. 246 z Českej republiky na druhu *L. serriola*. Najdlhšie konidiofory (297,68 μm) dosahovala vzorka č. 189 pochádzajúca z Portugalska na druhu *L. sativa*. Braun et al. (2019) uvádzajú dĺžku konidioforov druhu *G. bolayi* v rozmedzí 80 – 290 μm . Priemerné hodnoty namerané

v tejto bakalárskej práci spadajú do publikovaného rozmedzia, avšak naše dáta rozpätia dĺžky konidioforov (predovšetkým pri minimálnych údajoch) výrazne znižujú.

Braun et al. (2019) vo svojej štúdií druhu *G. bolayi* uvádzajú dĺžku foot-cell 40 – 100 μm . Pirnia a Taheri (2020) zaznamenali pri tomto druhu dĺžku foot-cell 45 – 70 μm . Naše výsledky merania dĺžky foot-cell sú v súlade s týmito prácami. V priebehu skúmania variability dĺžky foot-cell druhu *G. bolayi* sme prišli k záveru, že priemerná dĺžka bola $44,60 \mu\text{m} \pm 15,771 \mu\text{m}$. Najkratšia foot-cell (12,2 μm) sa vyskytovala vo vzorke č. 35 na druhu *L. altaica* pochádzajúca z Holandska. Najdlhšia foot-cell (195,20 μm) bola nameraná vo vzorke č. 189 pochádzajúcej z Portugalska na druhu *L. sativa*.

Posledným zo skúmaných parametrov konidioforov bol počet ich distálnych buniek. Celkový aritmetický priemer počtu distálnych buniek druhu *G. bolayi* bol $4,55 \pm 1,413$. Najnižší počet distálnych buniek bol 2 ks, a išlo zároveň o najčastejší počet detegovaný pri 21 vzorkách. Maximálny počet distálnych buniek (10 ks) bol nameraný vo vzorke č. 189 z Portugalska na druhu *L. sativa*. Braun et al. (2019) uvádzajú počet distálnych buniek od 1 po 4 kusy. Pirnia a Taheri (2020) zaznamenali 2 – 4 kusy distálnych buniek. Maximálny počet nami zistených distálnych buniek je teda vyšší ako uvádzajú vyššie uvedení autori.

V rámci realizovaného výskumu druhu *P. xanthii* dosahovala priemerná dĺžka konidioforov $114,5 \mu\text{m} \pm 22,700 \mu\text{m}$. Najkratšie konidiofory s dĺžkou 73,22 μm vykazovala vzorka č. 200. Najdlhšie konidiofory sa nachádzali vo vzorke č. 203 (211,35 μm). Shin et al. (2006) vo výskume druhu *P. xanthii* skúmali dĺžku konidioforov, pričom namerali hodnoty od 100 μm do 240 μm .

Priemerná nameraná dĺžka foot-cell druhu *P. xanthii* dosahovala hodnotu $35,57 \mu\text{m} \pm 6,740 \mu\text{m}$. Najkratšiu foot-cell mala vzorka č. 211, s dĺžkou 21,2 μm . Najdlhšiu foot-cell sme namerali pri vzorke č. 203, kedy jej dĺžka dosahovala 64,37 μm . Braun a Cook (2012) uvádzajú dĺžku foot-cell druhu *P. xanthii* v rozmedzí od 25 μm po 45 μm . Nami namerané hodnoty sa s ich výskumom zhodujú.

Vzhľadom na nekvalitný a málo početný materiál získaný od poskytovateľa vzoriek nebolo možné v rámci druhu *P. xanthii* detegovať počet distálnych buniek ani pri jednej zo sledovaných vzoriek.

Napriek tomu, že vzorky druhu *G. bolayi* pochádzali z rôznych krajín, neboli medzi nimi nájdené rozdiely v hodnotených znakoch, ktoré by súviseli s ich geografickým výskytom. Rovnako oblasť výskytu *G. bolayi* v našom materiáli odpovedá viacerým

literárnym zdrojom potvrdzujúcim výskyt tohto druhu v rôznych krajinách. Napr. Braun et al. (2019) uvádzajú výskyt *G. bolayi* vo Švajčiarsku, Japonsku, USA, Maďarsku a v Argentíne.

Dva z troch ribotypov ITS regiónu *G. bolayi* svojimi sekvenciami odpovedajú niektorému zo záznamov uložených v databázy NCBI. Najpočetnejší ribotyp sa vyskytoval v 14 vzorkách, a bol zhodný so sekvenciami použitými napr. v štúdiách Braun et al. (2018, 2019) alebo Kruse et al. (2023). Druhá z molekulárnych variant identifikovaná pri 5 vzorkách bola identická so sekvenciami použitými vo výskumu autorov Braun et al. (2019). Zaujímavým zistením je ribotyp nájdený vo vzorke 197 (Japonsko), pri ktorom nebola nájdená zhoda s predchádzajúcim záznamom v NCBI. Najviac podobné (identita 99,64%) sekvencie boli použité v štúdiách Ellingham a Aeshad (2015), Park et al. (2015), resp. Braun et al. (2019). Vyššie uvádzaná vzorka dosahovala v rámci nášho výskumu z morfológického hľadiska najdlhšie konídie (AP 35,51 μm) spomedzi všetkých skúmaných vzoriek druhu *G. bolayi* (AP 28,65 μm).

V tejto bakalárskej práci sme preukázali výskyt *P. xanthii* na rode *Lactuca* iba na materiáli z Japonska. To rámcovo odpovedá literárnym údajom popisujúcim výskyt *P. xanthii* na tomto rode z tejto oblasti. Výskyt *P. fusca* (synonymum *P. xanthii*) (Pérez-García et al., 2009) na *L. sativa* v Kórei zaznamenali Shin et al. (2006) a Lee et al. (2007). Rovnako výskum kolektívu Hirata et al. (2000) uvádza výskyt druhu *P. fusca* (*P. xanthii*) na *L. indica* a *L. raddeana* v Japonsku. Braun a Cook (2012) taktiež uvádzajú výskyt *P. xanthii* na zástupcoch čeľade *Asteraceae*, vrátane rodu *Lactuca*. Okrem tejto čeľade Braun a Cook (2012) uvádzajú tiež výskyt druhu *P. xanthii* na zástupcoch čeľadí *Balsaminaceae*, *Caricaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Gesneriaceae*, *Malvaceae*, *Medusagynaceae*, *Polemoniaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae* a *Verbenaceae*. Sekvencie našich vzoriek *P. xanthii* sú zhodné so sekvenciami použitými v štúdiách Xu (2020), Wu (2019), resp. Hirata et al. (2000). Hostiteľský rod našich vzoriek je taktiež zhodný s hostiteľským rodom ktorý uvádzajú Braun a Cook (2012).

Druhovú špecifitu patosystému *Lactuca* spp. – múčnatkotvaré (teda preferenciu hostiteľského druhu daným patogénom) nebolo možné určiť vzhľadom na nedostatočné informácie o hostiteľských organizmoch druhu *P. xanthii*. V rámci druhu *G. bolayi* špecifickú druhovú špecializáciu nepredpokladáme, nakoľko tento druh infikoval rôzne druhy z rodu *Lactuca*. Braun et al. (2019) uvádzajú výskyt druhu *G. bolayi* napríklad na

druhoch *L. serriola*, *L. saligna*, *L. sativa*, *L. muralis* a taktiež na druhoch *Picris hieracioides*, *Cichorium intybus*, *Campanula rapunculoides*, *Cucurbita pepo*, *Fragaria ananassa*, *Lamium amplexicaule*, *Taraxacum officinale*, *Veronica arvensis* a *Kalanchoe blossfeldiana*. Bradshaw et al. (2022a) uvádzajú výskyt *G. bolayi* na druhu *L. spicata*, *L. serriola*, *Asperugo procumbens* a *Trigonotis peduncularis*.

Zostavenie fylogenetického stromu potvrdilo príbuznosť samostatne vyčlenených vetví s rodmi *Leveillula*, *Podosphaera* a *Golovinomyces*. Výsledný fylogenetický strom zahŕňajúci vzorky *G. bolayi* a *P. xanthii* z nášho súboru vzoriek zodpovedá typológii stromov publikovaných autormi Takamatsu (2013b), Mieslerová et al. (2020a) a Bradshaw a Tobin (2020).

6 Záver

Štúdium rodov *Podosphaera*, *Golovinomyces* a *Leveillula* z radu múčnatkotvaré je dôležité pre získanie ďalších poznatkov o týchto rodoch. Tie prispievajú k ochrane významných hospodárskych plodín akou je napríklad šalát siaty. Nové dáta pomôžu ľahšie predikovať výskyt týchto rodov na konkrétnych zástupcoch a predísť tak ekonomickým stratám.

Analýza 33 herbalizovaných položiek druhov *Lactuca aculeata*, *L. altaica*, *L. saligna*, *L. sativa* a *L. serriola* potvrdila výskyt druhov *Golovinomyces bolayi* a *Podosphaera xanthii*. Všetkých 33 vzoriek bolo podrobených mikroskopickej determinácii, v priebehu ktorej bolo vyradených 5 vzoriek infikovaných druhom *Ampelomyces quisqualis*. Ďalších 5 vzoriek bolo vyradených po sekvencií ITS regiónu, nakoľko sme v nich detegovali ďalšie hubové organizmy. Do fylogenetických analýz bolo zahrnutých 23 vzoriek.

Molekulárna determinácia potvrdila výsledky z mikroskopickej determinácie, teda výskyt druhov *G. bolayi* a *P. xanthii* v rovnakých vzorkách. Pri druhu *G. bolayi* bola detegovaná vnútrodruhovú genetickú variabilitu prítomnosťou 3 ribotypov. Jeden z týchto ribotypov nebol doposiaľ v nukleotidových databázach uložený. Vytvorenie fylogenetického stromu s referenčnými sekvenciami preukázalo správnosť molekulárnej identifikácie a ukázalo na vzťahy medzi rodmi *Leveillula*, *Podosphaera* a *Golovinomyces*.

Problematika štúdia múčnatkotvarých infikujúcich pestovaný šalát a jeho planých progenitorov je veľmi dôležitá, nakoľko sa jedná o patogény, ktoré môžu ovplyvňovať poľnohospodárske výnosy tejto plodiny, a tým aj človeka. Ďalšie výskumy sú dôležité pre porozumenie životných cyklov, stratégií prežívania či rozšírenia tohto ochorenia a následne k jeho obmedzeniu.

7 Zoznam použitej literatúry

- Bauerová M., Turčáni M. a Omelka R. (2004): Polymerázová reťazová reakcia (PCR): Vysokoškolské učebné texty – multimediálne CD. Nitra: FPV UKF, 15 s. ISBN 80-8050-689-2. Dostupné z: <https://www.kbg.fpvai.ukf.sk/publikacie/PCRmaterial.pdf>.
- Bradshaw M. a Tobin P. C. (2020): Sequencing Herbarium Specimens of a Common Detrimental Plant Disease (Powdery Mildew). *Phytopatology* [online]. The American Phytopathological Society, 110(7): 1248-1254. DOI: 10.1094/PHYTO-04-20-0139-PER. ISSN 0031-949X. Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-04-20-0139-PER>.
- Bradshaw M., Braun U., Götz M., Meeboon J., Takamatsu S. (2017): Powdery mildew of *Chrysanthemum* × *morifolium*: phylogeny and taxonomy in the context of *Golovinomyces* species on Asteraceae hosts, *Mycologia*, 109:3, 508-519, DOI: 10.1080/00275514.2017.1358136.
- Bradshaw M., Braun U., Pfister D. (2022): Phylogeny and taxonomy of the genera of Erysiphaceae, part 1: *Golovinomyces*. *Mycologia*. 114. 10.1080/00275514.2022.2115419.
- Braun U. a Cook R. (2012): Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews). Utrecht : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2012. ISBN 978-90-70351-89-2.
- Braun U. a Takamatsu S. (2000): Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecae) inferred from rDNA ITS sequences - some taxonomic consequences. *Schlechtendalia*. 4. 1-33.
- Braun U., Zhao T. T., Cho S. E. a Shin H. D. (2018): *Golovinomyces cynoglossi* voucher GLM-F056808 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: MH189695. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 10. 4. 2018 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH189695.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=4&RID=3JR5JUTA016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH189695.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=4&RID=3JR5JUTA016).
- Braun U., Shin H., Takamatsu S., Meeboon J., Kiss L., Lebeda, A., Kitner M., Goetz M. (2019): Phylogeny and taxonomy of *Golovinomyces orontii* revisited. *Mycological Progress*. 18. 335-357. 10.1007/s11557-018-1453-y.

- Cíchová M. a Prokšová M. (2012): Možnosti využitia metódy PCR v mikrobiologických analýzach vody. Bratislava: Výskumný ústav vodného hospodárstva, Národné referenčné laboratórium pre oblasť vôd na Slovensku, 2012, 251-260. Dostupné z: https://www.vuvh.sk/download/kniznica/zborniky/zb_hydrochemia12/28.pdf.
- Cunnington J. H., Takamatsu S., Lawrie A. C., Pascoe L. G. (2003): Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Aust. Plant Pathol.* 32(3):421-428.
- Ivana D., Křístková E., Lebeda A., Vinter V. (2002): Description of morphological characters of wild *Lactuca* L. spp. genetic resources (English-Czech version). *Horticultural Science (Prague)*. 29. 56-83. 10.17221/4461-HORTSCI.
- Du P., Ren W. a Lu Z. (2016): Uncultured fungus clone ZMTCB201207-47 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: KX516515. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 4. 7. 2016 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX516515.1?report=GenBank>.
- Dvořáková J. (2016): Studium výskytu zástupců čeledi Erysiphaceae (padlí) na okrasných rostlinách. Olomouc, 2016. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Katedra botaniky, Studijní obor: Biologie – Geografie. Vedoucí práce Doc. RNDr. Barbora Mieslerová, Ph.D.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991): A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 19: 1349. *Nucleic acids research*. 19. 1349. 10.1093/nar/19.6.1349.
- Ellingham O. H. a Arshad W. (2015): Uncultured Golovinomyces isolate OE2014PM28CS 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence: KP642016. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 13.1.2015 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP642016.1?report=GenBank>.
- Froehlich N. J., Despres V. R a Poeschl U. (2009): Uncultured fungus clone S253 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA

- gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence: FJ820741. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 12. 3. 2009 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ820741.1?report=GenBank>.
- Gardes M. a Bruns T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Glawe D., Dugan F. (2006): First Report of *Erysiphe (Uncinuliella) flexuosa* in western North America. *Pacific Northwest Fungi.* 10.2509/pnwf.2006.001.011.
- Glawe D. A. a Grove G. G (2015): Powdery Mildew Diseases. *Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook* [online]. Oregon: Oregon State University, 2023, 10.09.2015 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/pathogen-articles/common/fungi/powdery-mildew-diseases>.
- Glawe D. (2008): The Powdery Mildews: A Review of the World's Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual review of phytopathology.* 46. 27-51. 10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740.
- Green M. R. a Sambrook J. (2019): Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols,* 2019(2), 10.1101/pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>.
- Helleman S. B. (2020) *Hyalopeziza raripila* small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence: MT017660. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 3. 2. 2020 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT017660.1?report=GenBank>.
- Hirata T., Cunnington J., Paksiri U., Limkaisang S., Shishkoff N., Grigaliunaite B., Sato Y., Takamatsu S. (2000): Evolutionary analysis of subsection Magnicellulatae of *Podosphaera* section Sphaerotheca (Erysiphales) based on the rDNA ITS sequences with special reference to host plants. *Canadian Journal of Botany.* 78. 10.1139/cjb-78-12-1521.

- Huth L., Ash G. J., Idnurm A., Kiss L., Vaghefi N. (2021): The “Bipartite” Structure of the First Genome of *Ampelomyces quisqualis*, a Common Hyperparasite and Biocontrol Agent of Powdery Mildews, May Point to Its Evolutionary Origin from Plant Pathogenic Fungi, *Genome Biology and Evolution*, Volume 13, Issue 8, August 2021, evab182, <https://doi.org/10.1093/gbe/evab182>.
- Juroch, J. Ministerstvo Zemědělství ve spolupráci se Státní Rostlinolékařskou Správou. Původce padlí révy (2012): *Erysiphe necator* Schweinitz 1834. Praha, 2012, 8 s. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/153392/Listovka_padli_revy_opr.pdf.
- Kabaktepe Ş., Heluta V.P., Akata, I. 2015. Checklist of powdery mildews (Erysiphales) in Turkey. *Biological Diversity and Conservation* 8: 128–146.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. – *Bioinformatics* 28: 1647–1649.
- Kilian N., Gemeinholzer B., Lack H. W. (2009): Tribe Cichorieae. In: V.A. Funk, et al., editors, *Systematics, evolution, and biogeography of the Compositae*. Int. Assoc. Plant Taxon., Vienna. p. 343–383.
- Kilian N., Sennikov A., Zehuan W., Gemeinholzer B., Zhang J. (2017): Sub-Paratethyan origin and Middle to Late Miocene principal diversification of the Lactucinae (Cichorieae, Compositae) inferred from molecular phylogenetics, divergence-dating and biogeographic analysis. *Taxon*. 66. 675-703. 10.12705/663.9.
- Kim J. B. a Blackshaw S. (2001): One-step enzymatic purification of PCR products for direct sequencing. *Current protocols in human genetics*, Chapter 11: Unit 11.6.
- Kitner M. a Michalcová K. (2017): Molekulární metody studia fylogeneze a genetické variability padlí. In: Lebeda A., Mieslerová B., Huszár J., Sedláková B. (2017): *Padlí kulturních a planě rostoucích rostlin: taxonomie, biologie, ekologie a epidemiologie, mechanismy rezistence, šlechtění na odolnost, metody experimentální práce, diagnostika a ochrana rostlin*. Olomouc: Agriprint, s. 83-92. ISBN 978-80-87091-69-2.
- Kitner M., (2013): Molekulární markery využívané při studiu variability rostlin. In: Zajoncová L. et al., *Zajímavé přednášky z chemie a biologie pro SŠ pedagogy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, s. 93-110. ISBN 978-80-244-3670-8.

- Knapp M., Walch G. M. a Peintner U. (2015) Fungal sp. MKOTU7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence: KP714600. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 27. 1. 2015 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP714600.1?report=GenBank>.
- Krueger D. (2014): Uncultured *Tetracladium* genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, clone 09DWuC43 (MOTU1): HG935125. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 28. 1. 2014 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HG935125.1?report=GenBank>.
- Kruse J. (2023): *Golovinomyces bolayi* voucher POLL0060000204 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: OQ283830. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 19. 1. 2023 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OQ283830.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=3&RID=3JR5JUTA016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OQ283830.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=3&RID=3JR5JUTA016).
- Křístková E. (1999): Biologie a epidemiologie hub řádu Erysiphales na rodu *Cucurbita*. In: Křístková E., Lebeda A., Sedláková B. (2009): Species spectra, distribution and host range of cucurbit powdery mildews in the Czech Republic, and in some other European and Middle Eastern countries. *Phytoparasitica*. 37. 337-350. 10.1007/s12600-009-0045-4.
- Kuchta T. (2005): Polymerázová reťazová reakcia ako metóda na analýzu potravín. 44. Bratislava: Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie, Výskumný ústav potravinársky, 2005, 1-16. Bulletin potravinárskeho výskumu (Bulletin of Food Research).
- Lebeda A., Mieslerová B. (2010): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology*. 60. 400 - 415. 10.1111/j.1365-3059.2010.02399.x.

- Lebeda A., Doležalová I., Ferakova V., Astley D. (2004): Geographical Distribution of Wild *Lactuca* Species (Asteraceae, Lactuceae). *Botanical Review*. 70. 328-356. 10.1663/0006-8101(2004)070[0328:GDOWLS]2.0.CO;2.
- Lebeda A., Mieslerová B., Huszár J., Sedláková B. (2017): Padlí kulturních a planě rostoucích rostlin: taxonomie, biologie, ekologie a epidemiologie, mechanismy rezistence, šlechtění na odolnost, metody experimentální práce, diagnostika a ochrana rostlin. Olomouc: Agriprint, 2017. ISBN 978-80-87091-69-2.
- Lebeda A., Kitner M., Mieslerová B., Křístková E., Pavlíček T. (2019): *Leveillula lactucae-serriolae* on *Lactuca serriola* in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea* 58(2): 359-367. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediter-10622.
- Lebeda A., Křístková E., Khoury C. K., Carver D., Sosa A. C. (2021): Distribution and ecology of wild lettuces *Lactuca serriola* L. and *Lactuca virosa* L. in central Chile. *Hacquetia*. 21. 10.2478/hacq-2021-0019.
- Lebeda A., Křístková E., Kitner M. et al. (2022): Egypt as one of the centers of lettuce domestication: morphological and genetic evidence. *Euphytica* 218, 10 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02960-3>.
- Lebeda A. (1983): The genera and species spectrum of cucumber powdery mildew in Czechoslovakia. *Phytopatologische Zeitschrift* 108: 71–79.
- Lee S. Y., Kim Y. K., Lee Y. K. (2007): Cause and Control of Lettuce Powdery Mildew Caused by *Podosphaera fusca*. *The Korean Journal of Mycology*. 35. 10.4489/KJM.2007.35.2.115.
- Matsuda S., Takamatsu S. (2003): Evolution of host–parasite relationships of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 27. 314-27. 10.1016/S1055-7903(02)00401-3.
- Mieslerová B., Kitner M., Křístková E., Majeský L., Lebeda A. (2020a): Powdery Mildews on *Lactuca* Species – A Complex View of Host-Pathogen Interactions, *Critical Reviews in Plant Sciences*, DOI: 10.1080/07352689.2020.1752439.
- Mieslerová B., Kitner M., Petřeková V., Dvořáková J., Sedlářová M., Cook R.T.A., Lebeda A. (2020b): *Golovinomyces* powdery mildews on Asteraceae in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.*, 56: 163–179.

- Mieslerová B., Cook R. T. A., Wheeler C. P., Lebeda A. (2022): Ecology of Powdery Mildews – Influence of Abiotic Factors on their Development and Epidemiology, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 41:6, 365-390, DOI: 10.1080/07352689.2022.2138044.
- National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA: National Institutes of Health, Department of Health and Human Services [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome.
- Park M. J., Hong S. H., Cho S. E., Park J. H. a Shin H. D. (2014): *Golovinomyces orontii* voucher KUS:F24814 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence: KP260660. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 11. 12. 2014 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP260660.1?report=GenBank>.
- Paulech C. (1995): *Flóra Slovenska X/1*. Bratislava: VEDA, vydavateľstvo SAV, 1995. ISBN 80-224-0412-8.
- Pérez-García A., Romero D., Fernández-Ortuño D., López-Ruiz F., De Vicente A., Torés JA. (2009): The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. *Mol Plant Pathol*. 2009 Mar;10(2):153-60. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00527.x. PMID: 19236565; PMCID: PMC6640438.
- Petřeková V. (2018): *Atlas vybraných druhů padlí (řád Erysiphales) v České republice*. Praha: Academia, 2018. Studentské práce. ISBN 978-80-200-2800-6.
- Pirnia M., Taheri A. (2020): First occurrence of *Golovinomyces bolayi* on *Lactuca tuberosa* in Iran. *Plant Pathology & Quarantine* 10(1), 217–222, Doi 10.5943/ppq/10/1/20.
- Prahl R. E., Khan S., Deo R. C. (2021): The role of internal transcribed spacer 2 secondary structures in classifying mycoparasitic *Ampelomyces*. *PLoS ONE* 16(6): e0253772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253772>.
- Sedlářová M., Mieslerová B., Trojanová D. Z., Lebeda A. (2021): *Biotrofní houby a peronosporý planě rostoucích rostlin*. Praha: Česká fytopatologická společnost, 2021. ISBN 978-80-903545-6-2.
- Shin H. D., McKenzie E. H. C. (2004): Notes on the anamorphs of *Golovinomyces hyoscyami* and *G. verbasci* , , 42:5, 935-938, DOI: 10.1080/0028825X.2004.9512939.

- Shin H. D., Jee H. J., Shim C. K. (2006): First report of powdery mildew caused by *Podosphaera fusca* on *Lactuca sativa* in Korea. *Plant Pathology*, 55: 814-814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01463.x>.
- Schoch C., Seifert K., Huhndorf S. M., Robert V., Spouge J., Levesque C. A., Chen W., Crous P., Boekhout T., Damm U., Hoog S., Eberhardt U., Groenewald J. Z., Groenewald M., Hagen F., Houbraken J., Quaedvlieg W., Stielow B., Vu D., Walther G. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.
- Takamatsu S, Matsuda S. (2004): Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in Erysiphales. *Mycoscience* 45:340–44).
- Takamatsu S., Matsuda S., Niinomi S., Havrylenko M. (2006): Molecular phylogeny supports a Northern Hemisphere origin of *Golovinomyces* (Ascomycota: Erysiphales). *Mycological research*. 110. 1093-101. [10.1016/j.mycres.2006.07.005](https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.005).
- Takamatsu S., Niinomi S., Harada M., Havrylenko M. (2010): Molecular phylogenetic analyses reveal a close evolutionary relationship between *Podosphaera* (Erysiphales: Erysiphaceae) and its rosaceous hosts. *Persoonia*. 24. 38-48. [10.3767/003158510X494596](https://doi.org/10.3767/003158510X494596).
- Takamatsu S., Matsuda S., Gligaliunaite B. (2013): Comprehensive phylogenetic analysis of the genus *Golovinomyces* (Ascomycota: Erysiphales) reveals close evolutionary relationships with its host plants. *Mycologia*. 105. [10.3852/13-046](https://doi.org/10.3852/13-046).
- Takamatsu S., Shiroya Y., Kiss L., Heluta V. (2015): First comprehensive phylogenetic analysis of the genus *Erysiphe* (Erysiphales, Erysiphaceae) I. The *Microsphaera* lineage. *Mycologia*, 107(3), 475–489. <https://www.jstor.org/stable/26506909>.
- Takamatsu S. (2004): Phylogeny and evolution of the powdery mildew fungi (Erysiphales, Ascomycota) inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycoscience*. 45. 147-157. [10.1007/s10267-003-0159-3](https://doi.org/10.1007/s10267-003-0159-3).
- Takamatsu S. (2013a): Origin and evolution of the powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales). *Mycoscience*. 54. 75–86. [10.1016/j.myc.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.004).
- Takamatsu S. (2013b): Molecular phylogeny reveals phenotypic evolution of powdery mildews (Erysiphales, Ascomycota). *Journal of General Plant Pathology*. 79. [10.1007/s10327-013-0447-5](https://doi.org/10.1007/s10327-013-0447-5).

- Tamura K., Stecher G. & Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. – *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.
- Trojanová Z. (2017): Fylogenetické vzťahy jednotlivých tribu padlí (upraveno podľa Takamatsu, 2013). In: Lebeda A., Mieslerová B., Huszár J., Sedláková B. (2017): Padlí kultúrnych a planě rastoucích rastlín: taxonomie, biologie, ekologie a epidemiologie, mechanizmy rezistencie, šľachtění na odolnosť, metódy experimentálnej práce, diagnostika a ochrana rastlín. Olomouc: Agriprint, s. 29. ISBN 978-80-87091-69-2.
- Úrad pre vydávanie publikácií Európskej únie. Medziinštitucionálna príručka úpravy dokumentov. Luxemburg: Úrad pre vydávanie publikácií Európskej únie, 2022. ISBN 978-92-78-42786-3. Dostupné z: doi:10.2830/183435.
- Voytyuk S. O., Heluta V. P., Wasser S. P., Nevo E., Takamatsu S. (2009): Biodiversity of the Powdery Mildew Fungi (Erysiphales, Ascomycota) of Israel. A.R.A. GantnerVerlag K.-G., Ruggell, Germany, 290 pp.
- Vysoudil M., Lebeda A., Sedláková B., Křístková (2009): Long-lasting changes in the species spectrum of cucurbit powdery mildew in the Czech Republic - Influence of air temperature changes or random effect?. *Plant Protect. Sci.* 2009. 41-47. 10.17221/2807-PPS.
- Wang Z., Hua P., Kilian N. (2013): Molecular Phylogeny of the *Lactuca* Alliance (Cichorieae Subtribe Lactucinae, Asteraceae) with Focus on Their Chinese Centre of Diversity Detects Potential Events of Reticulation and Chloroplast Capture. *PloS one*. 8. e82692. 10.1371/journal.pone.0082692.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Wu H. (2019): *Podosphaera xanthii* strain HNVC-18 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: MN203658. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 23. 7. 2019 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN203658.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=2&RID=3JNDC13K013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN203658.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=2&RID=3JNDC13K013).

Xu D. (2020): *Podosphaera xanthii* isolate ITS5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: MT260063. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information [online]. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894: National Library of Medicine, 27. 3. 2020 [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT260063.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=3JNDC13K013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT260063.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=3JNDC13K013).