Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Použití MLST markerů pro identifikaci druhu a kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana.*

Diplomová práce

Bc. Nicole Jánová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Jana Konopická, Ph.D.

České Budějovice 2023

Jánová, N., 2023: Použití MLST markerů pro identifikaci druhu a kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*. [The use of the MLST markers for species and strains identification of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Mgr. Thesis, in Czech] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Entomopathogenic fungi are a very diverse group of natural enemies of arthropods. In recent decades, a large number of mycoinsecticides have been developed to replace the more harmful chemical insecticides. *Beauveria bassiana* is probably the most commonly used biological control agent. To study its ecology and interaction in the environment, methods are needed that allow strain-specific identification of the respective fungal isolate. The aim of this study was to test the suitability of the MLST method (based on the extension of phylogenetic multi-locus DNA barcoding of fungi) for the identification of *B. bassiana* strains. Of the 10 loci selected, 6 were successfully analyzed. The number of sequence types (ST) identified indicates that this approach is feasible and can be readily adopted in further research.

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

V Českých Budějovicích dne 8.12. 2023 .....

Bc. Nicole Jánová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a odborné vedení při zpracování mé diplomové práce. Dále Ing. Janě Konopické za poskytnutí analyzovaného materiálu a množství cenných rad. V neposlední řadě také celé mé rodině a kamarádům za podporu během celého studia.

Obsah

1. Úvod 1
1.1 Houby (Fungi) 1
1.2 Entomopatogenní houby (entomopatogenic fungi, EPF) 2
1.2.1 Vývojový cyklus 2
1.2.2 Význam pro člověka 4
1.2.3 Rod *Beauveria* 5
1.3 Molekulární markery k identifikace EPF 8
1.3.1 „DNA barcoding“ (DB) 8
1.3.2 Multilokusová sekvenční typizace (MLST) 11
1.3.3 LSU introny 12
2. Cíle práce 13
3. Materiál a metody 14
3.1 Materiál 14
3.2 Metody 15
3.2.1 Izolace nativních kmenů *Beauveria bassiana* z dospělců mandelinky 15
bramborové 15
3.2.2 Izolace půdních kmenů metodou tzv. živých pastí 16
3.2.3 Morfologická identifikace houbových izolátů 16
3.2.4 Izolace DNA 16
3.2.5 PCR (Polymerázová řetězová reakce) 17
3.2.6 Gelová elektroforéza 19
3.2.7 Přečištění PCR produktů a sekvenace 20
3.2.8 Úprava sekvencí 20
3.2.9 Statistická analýza 20
4. Výsledky 23

4.1 Úspěšnost amplifikace a vytěžování dat (data mining) 23
4.2 Vnitrodruhová nukleotidová variabilita 23
4.3 Mezidruhová nukleotidová variabilita 28
4.4 Druhová identifikace a vliv geografie 30
4.5 Analýza MLST dat 31
4.6 LSU introny 34
5. Diskuse 35
5.1 Izolace DNA a PCR 35
5.2 Práce s genomy 35
5.3. Nukleotidová variabilita 36
5.4. Analýza lokusů pro MLST 36
5.5 LSU introny 39
6. Závěr 40
7. Literatura 41
8. Přílohy 49

1. Úvod

Beauveria bassiana představuje významný druh entomopatogenní houby. Parazituje na různých druzích členovců, proto našla využití jako biologický insekticid. Tento druh houby dokáže významně redukovat značné množství škůdců, např. kůrovce, termity nebo mandelinku bramborovou. Bylo zjištěno, že může představovat druhový komplex (= skupina morfologicky nerozlišitelných druhů), proto je identifikace pouze na základě morfologie nedostatečná a je nutné použití genetických markerů.

Pro případné komerční využití je však důležité i správně identifikovat kmeny *B. bassiana*, které jsou různě virulentní. Odlišení jednotlivých kmenů je důležité při průběžné kontrole, zdali nedošlo při testech virulence ke kontaminaci a dále také ke kontrole kvality komerčních biopreparátů. Při aplikaci v terénu pak ke kontrolnímu monitoringu, zdali se nejvirulentnější kmeny nerozšířily mimo oblast aplikace.

Použití mikrosatelitů i sekvenování celého genomu má značné nevýhody. V případě mikrosatelitů je to zejména hypervariabilita a technická náročnost, sekvenace celého genomu je zase finančně i časově náročná. Proto byla vybrána metoda multilokusové sekvenční typizace neboli MLST. Tato metoda byla původně zavedena k identifikaci kmenů bakterií. MLST systém je v současné době aplikován i u vyšších organismů, aplikace je ale složitější z důvodu přítomnosti heterozygotů. Z tohohle hlediska je aplikace MLST u *B. bassiana* jednodušší, jelikož se v našich zeměpisných šířkách vyskytuje výhradně v haploidním stavu.

1.1 Houby (Fungi)

Houby, latinsky Fungi, reprezentují druhou největší skupinu eukaryotických organismů na Zemi (O'Brien *et al.*, 2005). Jde o velmi různorodou skupinu heterotrofních eukaryot, vyznačující se především chitinózní buněčnou stěnou, nepřítomností asimilačních barviv a absencí fagotrofie (Naranjo-Ortiz and Gabaldón 2019). Na základě posledních odhadů vědců (rok 2021) bylo zjištěno, že houby zahrnují 6,28 milionu druhů (Baldrian *et al.* 2022). K roku 2023 bylo oficiálně popsáno více než 155 000 druhů. Zástupci patřící do říše hub jsou schopni okupovat širokou škálu přírodních i umělých prostředí a hrají významnou roli v lidském průmyslu, medicíně a výzkumu (Stajich *et al.* 2009).

Ve srovnání s rostlinami a živočichy jsou houby často považovány za jednoduché organismy. Houby však vykazují velkou rozmanitost v morfologii, ekologii a životních cyklech (Alexopoulos, Mims and Blackwell, 1996; Kirk *et al.*, 2001). Morfologicky houby mohou mít podobu mikroskopických jednobuněčných kvasinek, ale také makroskopických mnohobuněčných hub. Mohou se množit pohlavně i nepohlavně v různých strukturách, jako jsou například konidiofory nebo plodnice hub. Produkují jak pohlavní, tak i nepohlavní spory, které jsou schopné se šířit a přežívat nepříznivé podmínky prostředí (Alexopoulos, Mims and Blackwell, 1996; Kirk *et al.*, 2001).

1.2 Entomopatogenní houby (entomopatogenic fungi, EPF)

Jako entomopatogenní houby označujeme obligátní nebo fakultativní původce onemocnění hmyzu. Stejně tak jako rozeznáváme velkou rozmanitost hmyzích hostitelů, rozeznáváme i velkou diverzitu jejich houbových patogenů, které můžeme najít téměř ve všech odděleních hub. Je známo více než 700 druhů entomopatogenních hub, přičemž nejvíce zastoupeny jsou v odděleních Microsporidiomycota, Ascomycota a Entomophthoromycota. Mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu. Nejčastěji infikují larvy a kukly, infekce dospělců a vajíček je méně častá (Kubátová 2017).

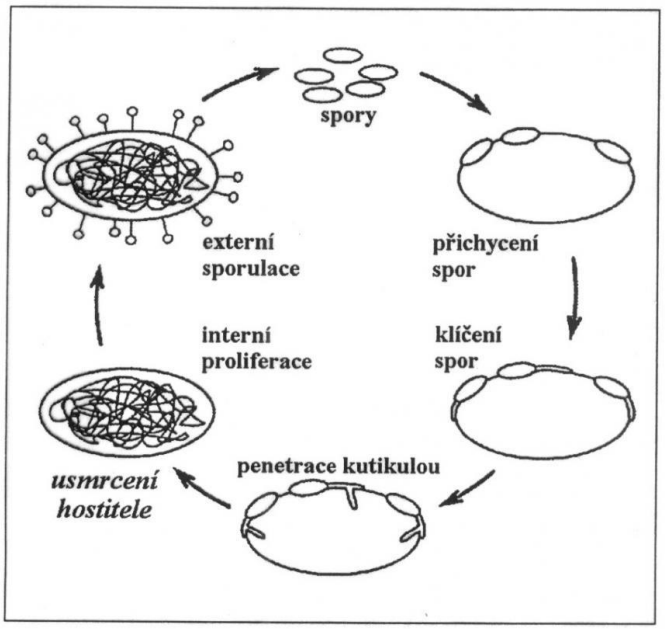
1.2.1 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus entomopatogenních hub lze rozdělit do tří fází. V první fázi dochází k adhezi a klíčení konidií na povrch kutikuly hostitele. Následuje parazitická fáze vývojového cyklu, kde patogen proniká do tělní dutiny hostitele a probíhá interní proliferace. V poslední, saprofytické fázi vývojového cyklu dochází k externí sporulaci a k tvorbě konidií nové generace (Vega *et al.* 2012). Vznik houbového onemocnění zpravidla zahajují vitální a virulentní konidie, tedy spory hub vzniklé nepohlavním rozmnožováním. Spory se v prostředí šíří zejména díky abiotickým faktorům, jako je voda a vzduch. Na šíření konidií se mohou podílet také biotické vektory, například háďátka, roztoči nebo jiné druhy hmyzu (Mascarin and Jaronski 2016). Schéma vývojového cyklu entomopatogenních hub je zobrazeno na Obr. 1.

Adheze konidií na kutikulu hostitele je prvním krokem vedoucím ke vzniku houbového onemocnění. Některé konidie hub jsou pokryty lepkavou adhezivní substancí, která jim umožňuje snadné přichycení na povrch kutikuly hmyzu (např. houby *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis* nebo *Hirsutella thompsonii*). U ostatních druhů entomopatogenních hub je adheze založená na přímé interakci mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie hub a kutikula hmyzu) nebo pomocí elektrostatických sil, případně i díky molekulárním interakcím mezi látkami na povrchu konidií a kutikuly hostitele (např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny nebo steroly). Přichycené konidie se při vhodných teplotních a vlhkostních podmínkách začnou zvětšovat (bobtnat) a posléze klíčit. Klíčení spor je indukováno především vysokou relativní vzdušnou vlhkostí (Evans and Hywel-Jones 1997).

Následně, při parazitické fázi vývojového cyklu, patogen proniká do tělní dutiny hostitele. Děje se tak přirozenými otvory hmyzu (řitní, ústní otvor, dýchací otvory) nebo prostřednictvím přímé penetrace kutikulou hmyzu. Na konci špičky hyf se vytváří tzv. apresoria, kde dochází k produkci kutikuly degradujících enzymů (lipázy, chitinázy, proteázy). Vstup do hostitele je umožněn jak enzymatickou degradací, tak i mechanickým tlakem (Goettel *et al.* 1989; Evans and Hywel-Jones 1997). Koncová špička hyfy následně invaduje narušenou kutikulou do tělní dutiny. Po penetraci patogenu do tělní dutiny houba začne vytvářet hyfová tělíska (tzv. blastospory), které se rychle množí pučením. Smrt hostitele nastává v důsledku intenzivní tvorby blastospor a produkcí toxických sekundárních metabolitů (Ortiz-Urquiza and Keyhani 2013; Valero-Jiménez *et al.* 2016). Sekundární metabolity se podílejí na deaktivaci obranného mechanismu hmyzích hostitelů a urychlují proces infekce entomopatogenních hub (Paschapur *et al.* 2021).

Mumifikací hmyzího hostitele je ukončena parazitická fáze a plynule nastává poslední, saprofytická fáze vývojového cyklu, kde dochází k prorůstání patogenu zpět na povrch těla a tvorbě vzdušného mycelia. Na vzdušném myceliu se poté začnou utvářet konidiofory, na kterých vznikají konidie nové generace. Nové konidie zůstávají vitální po dobu několika týdnů až měsíců. V optimálních podmínkách, které jsou dosaženy například ve sklenících, může celý vývojový cyklus probíhat 3-5 dní. V běžných podmínkách vegetačního období mírného pásma se doba cyklu pohybuje od 7 do 21 dní. Délka cyklu závisí na okolní teplotě a vlhkosti. Teplota, která se považuje za optimální, se pohybuje v rozmezí 20–30 °C (Feng, Poprawski, and Khachatourians 1994; Hajek and St leger 2003; Mascarin and Jaronski 2016).



Obr. 1: Schéma vývojového cyklu entomopatogenních hub (Landa 2003).

1.2.2 Význam pro člověka

Entomopatogenní houby také našly své využití u člověka. Příkladem je housenice čínská (*Ophiocordyceps sinensis)*, pravděpodobně nejstarší entomopatogenní houba hojně využívaná pro své účinky na lidské zdraví. Díky svým všestranným účinkům (léčba onemocnění srdce, plic, ledvin, pohlavních orgánů apod.) se již 2000 let uplatňuje v tradiční čínské medicíně (Antonín and Jablonský 2013). Dalším příkladem je *Tolypocladium inflatum* (teleomorfa – *Cordyceps subsessilis*). Tato houba, příbuzná housenici čínské, žije především v asexuálním stadiu (anamorfa) v půdách v chladnějších oblastech, avšak její sexuální stadium (teleomorfa) parazituje na broucích z čeledi Vrubounovití (Dhillion *et al.* 2002). Známá je především produkcí významných sekundárních metabolitů, jako jsou cyklosporiny a efrapeptiny. Cyklosporin A, který tato houba produkuje, slouží jako imunosupresivum a využívá se při transplantacích nebo při léčbě autoimunitních onemocnění (Hodge, Krasnoff, and Humber 1996). Entomopatogenní houby však mohou u člověka způsobovat i závažná onemocnění. I když se jedná pouze o vzácné případy, nákaza člověka je možná, jak dokládá studie *(*Henke *et al.* 2002). Tato studie popisuje případ pacientky pod imunosupresivní léčbou, která se nakazila houbou *Beauveria bassiana*. Právě lidé s potlačeným imunitním systémem jsou nejvíce náchylní k nákaze entomopatogenními houbami.

Velký význam mají entomopatogenní houby také v zemědělství a lesnictví, kde se uplatňují jako bioinsekticidy. Hlavním úkolem insekticidů je kontrolovat a snižovat populační hustotu cílového škůdce pod úroveň ekonomického „thresholdu“. Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně proti hmyzím škůdcům může být významnou alternativou k chemickým insekticidům, které jsou spojovány s rizikem vzniku rezistentních populací hmyzu a také se zvyšováním obsahu reziduí účinných látek v potravinách (Hardy 2014).

Jednou z výhod použití hub k biologické kontrole škůdců je bezesporu jejich široké spektrum hostitelů, kdy jeden houbový izolát mnohdy může pokrýt i několik druhů hmyzu. Mezi další výhody patří snadný přenos a šíření mezi populacemi hmyzu nebo také šetrnost k životnímu prostředí a vyšší bezpečnost pro necílové organismy včetně člověka. Naopak jejich hlavní nevýhodou je vyšší závislost účinnosti na podmínkách prostředí, zejména pak vzdušné vlhkosti a teplotě. Skleníky s kontrolovanou vzdušnou vlhkostí a teplotou jsou proto nejvhodnějším místem k využití přípravků na bázi entomopatogenních hub (Jackson and Jaronski, 2009; Montalva *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

K přípravě mykoinsekticidů se používají především druhy entomopatogenních hub, které jsou dobře kultivovatelné na umělých mediích, a to *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum*, *Cordyceps fumosorosea* a *Beauveria brongniartii* (Kubátová 2017). Rod *Beauveria* společně s další entomopatogenní houbou rodu *Metarhizium* tvoří téměř 70 % všech komerčně používaných mykoinsekticidů (Faria and Wraight 2007).

1.2.3 Rod *Beauveria*

Rod *Beauveria* řadíme do oddělení Ascomycota (Vřeckovýtrusné houby), třídy Sordariomycetes, řádu Hypocreales (masenkotvaré) a čeledi Cordycipitaceae. Jedná se o jeden z nejvýznamnějších rodů v rámci entomopatogenních hub (Abdessamad 2019). *Beauveria* byla poprvé představena francouzským mykologem Jean Paul Vuilleminem v roce 1912. Vuillemin vytvořil tento rod na počest Jeana Beauverie, který jako první popsal biologii a morfologické znaky tohoto taxonu (Macleod 1954).

Houby rodu *Beauveria*, jakožto hmyzí paraziti, hrají důležitou roli v přírodních a zemědělských ekosystémech a mají velký potenciál pro použití jako mykoinsekticidy (Ownley et al. 2008). Kromě toho je *Beauveria* také významným zdrojem sekundárních metabolitů, jako jsou bassianolid, beauvericin, polyketidy nebo terpenoidy (Xu *et al.*, 2007; Molnár,

Gibson and Krasnoff, 2010). Zástupci, patřící do tohoto rodu mají kosmopolitní výskyt, rostou přirozeně v půdách po celém světě. Dále se vyznačují širokým spektrem hmyzích hostitelů. Parazitují zejména na larvách a dospělcích hmyzu z řádu *Lepidoptera* (motýly), *Diptera* (dvoukřídlí), *Coleoptera* (brouci), *Neuroptera* (síťokřídlí), *Orthophera* (rovnokřídlí), *Hymenoptera* (blanokřídlí), *Hemiptera* (polokřídlí), *Thysanoptera* (třásněnky) (Kos and Celar 2013).

Mezi nejvýznamnější zástupce patří *B. bassiana, B. pseudobassiana, B. brongniartii, B. caledonica, B. tenella, B. amorpha, B. malawiensis, B. vermiconia*. Protože zástupci tohoto rodu jsou fenotypově jednodušší a nevykazují žádné taxonomicky informativní, vegetativní, pohlavní nebo nepohlavní reprodukční struktury, je velice náročné až nemožné morfologicky rozlišit některé druhy. Determinačními znaky pro identifikaci jsou tvar a velikost konidií, ty se však často mohou překrývat. Aby tak nedošlo k záměně jednotlivých druhů, je nutná genotypizace s použitím molekulárních metod (Macleod, 1954; Kendrick and de Hoog, 1972).

1.2.3.1 Beauveria bassiana

Nejznámějším druhem rodu *Beauveria* je *B. bassiana*. Tento druh je anamorfou asijské entomopatogenní houby *Cordyceps bassiana*. Stejně tak jako jiné druhy rodu *Beauveria*, se i *B. bassiana* rozmnožuje výhradně nepohlavně (Uribe and Khachatourians, 2004; Dara, Montalva and Barta, 2019). Pro její kolonie je typická bílá, krémová barva, později kolonie mohou mít až nažloutlé zbarvení. Tvoří hyalinní, kulovité konidie, které dosahují velikosti 2,5 – 3,5 µm. Konidiogenní buňky společně s konidiemi utváří shluky, které mohou na plně vysporulované kultuře připomínat bavlněné míčky. Po vytvoření shluků se charakter kultury mění na prašný (Kendrick and de Hoog 1972; S. Rehner 2005).

Pro nákazu *B. bassiana* je používán název „bílá muskardina“. Označení vzniklo na základě charakteristického bílého mycelia, které prorůstá infikovaným hmyzem, viz Obr. 2 (Imoulan et al. 2017). Komerčně se používá v biologické ochraně proti škůdcům po celém světě (Milosavljevic et al. 2021). Houba rodu *Beauveria* infikuje hmyz přímou degradací hostitelské kutikuly. Nemusí tak dojít k požití houbových propagulí, což je výhodné pro použití v biologické ochraně rostlin (Bateman *et al.* 1998). Bylo navíc zjištěno, že beauvericin, tedy toxin produkovaný houbou *B. bassiana*, má v porovnání s ostatními mykotoxiny EPF nejefektivnější larvicidní schopnosti (Q. Wang and Xu 2012).

Virulence jednotlivých kmenů *B. bassiana*, použitých v této práci, byla otestována proti mandelince (Zemek et al. 2021).

Obr. 2: Nákaza *B. bassiana*, tzv. „bílá muskardina“ (https://www.agritek.co.nz/).

Beauveria bassiana jakožto druh parazituje na širokém spektru hostitelů členovců. Různé kmeny se však mohou lišit v rozsahu svých hostitelů. Některé kmeny mají úzký rozsah hostitelů, některé naopak parazitují na široké škále hmyzích hostitelů a měly by být tedy považovány za neselektivní biologické insekticidy. Znalost hostitelského rozsahu u kmenů *B. bassiana* je zásadní, protože určuje jednak ekonomický potenciál a také možné riziko pro necílové organismy (Rohrlich *et al.* 2018).

I když je *B. bassiana* patogenní vůči širokému spektru hmyzích hostitelů, její biologická účinnost závisí na zdroji izolace (Goble *et al.* 2011). Ve studio Bayman *et al.* 2021 byla porovnávána účinnost lokálních izolátů *B. bassiana* vůči komerčně používanému kmenu GHA, který je součástí přípravku mycotrol, na brouku *Hypothenemus hampei* (coffee berry borer). Bylo zjištěno, že lokální kmeny *B. bassiana* mají oproti kmenu GHA vyšší schopnost přežití a perzistence v lokálních podmínkách prostředí. Lokální izoláty tak mohou být do budoucna příslibem pro biologickou kontrolu nejenom u *Hypothenemus hampei*.

1.3 Molekulární markery k identifikace EPF

V současné době existuje již více než 130 komerčních produktů s EPF (mykoinsekticidů). Interakce s okolním životním prostředím jsou však málo prostudované, přičemž jako důležitý předpoklad pro studie interakcí je nezbytná identifikace jednotlivých kmenů. Tradiční kultivační technika je jednak časově náročná a také nejednoznačná, neboť u EPF chybí konzistentní diskriminační morfologické znaky, které by nebyly závislé na fyziologii i kultivačních médiích. S nástupem PCR amplifikace začalo postupně vznikat velké množství různých molekulárních markerů, příkladem mohou být mikrosatelity nebo „DNA barcoding“ (Reineke *et al.* 2014).

Mikrosatelity jsou využívány zejména v populační genetice. Byly zavedeny i u *Beauveria bassiana* (např. Rehner and Buckley 2003; Reineke *et al.* 2014; Castro-Vásquez *et al.* 2021). Při jejich praktickém použití se však ukázalo, že se potýkají s obvyklými problémy, jako je druhová specifita nebo velké množství tzv. „nulových alel“. Jedná se o alely, u nichž neproběhla amplifikace z důvodu mutace v místech nasedání primerů, dochází tedy ke vzniku falešných homozygotů (Wattier *et al.* 1998). Mikrosatelity se v současné době začínají používat v kombinací s „barcodovými“ markery.

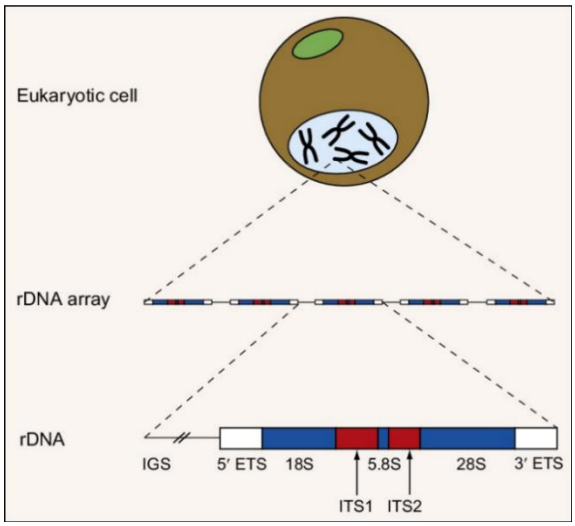
1.3.1 „DNA barcoding“ (DB)

„DNA barcoding“ byl zaveden v roce 2003 a od té doby je široce používán jako molekulární a bioinformační systém (Hebert et al. 2003). Jedná se o standardizovaný způsob identifikace druhů živočichů, rostlin a hub za pomoci minimálního úseku DNA. Spočívá v amplifikaci a sekvenaci specifické sekvence DNA (500 – 800 bp dlouhé) a následném porovnání se sekvencemi uloženými v referenčních databázích, jako např. je BOLD (Barcode of life data system) nebo ISHAM (International society of human and animal mycology) (Irinyi et al. 2015). Druhy jsou tak identifikovány na základě podobnosti sekvencí. Ideální „barcode“ marker by měl splňovat to, aby mezidruhová genetická variabilita přesahovala tu vnitrodruhovou, tj. „barcoding gap“. Zároveň musí být zvolen úsek DNA, který bude mít konzervativní vazebné místo primeru u různých taxonomických skupin (Guo et al. 2022).

1.3.1.1 „DNA barcoding“ u hub

Na rozdíl od živočichů, kde se k DB používají zejména markery mitochondriální (např. *COI,* část mitochondriální cytochromoxidázy I), u hub se k tomuto účelu využívají pouze markery jaderné. To je dáno hlavně tím, že mitochondrie hub je ve srovnání s mitochondrií živočichů velmi odlišná – může mít až 170 k bp, přitom má redukován kódující obsah, u některých hub může zcela chybět (Chatre and Ricchetti 2014).

Oficiálním DB pro identifikaci druhů hub byl v roce 2012 mezinárodním konsorciem určen lokus *ITS* (= internal transcribed spacer) (Schoch *et al.* 2012). *ITS* u hub představuje zhruba 600 párů bazí dlouhou oblast v ribozomálním tandemově se opakujícím genovém klastru jaderného genomu (nr DNA, nuclear ribosomal DNA). *ITS* spacer se skládá ze dvou oblastí, a to *ITS1* a *ITS2*. Tyto oblasti jsou od sebe odděleny prostřednictvím 5.8S rRNA genu, který je lokalizován mezi 18S (3′ konec) a 28S (5′ konec) rRNA geny. Schéma *ITS* je zobrazeno na Obr. 3 (Horton and Bruns 2001; Irinyi *et al.* 2016). Výhodou tohoto markeru je jeho poměrně snadná amplifikace. To je dáno především díky tomu, že je *ITS* součástí mnohonásobně se opakujících genových klastrů, což významně zvyšuje účinnost jeho amplifikace (Vilgalys and Gonzalez 1990). Další výhodou je také to, že může být snadno amplifikován u všech druhů hub pomocí universálních primerů (White 1990). V současné době však bylo prokázáno, že tento marker nevykazuje dostatečnou genetickou variabilitu k oddělení některých blízce příbuzných druhů hub, včetně těch, které jsou součástí rodu *Beauveria* (Sung *et al.* 2007; Bischoff, Rehner, and Humber 2009). Z tohoto důvodů byly navrženy doplňkové markery, které by měly zpřesnit identifikaci na úrovni druhů.



Obr. 3: Schéma *ITS* oblasti u eukaryot, červeně vyznačeny *ITS1* a *ITS2* fragmenty (Stat *et al.* 2012).

Mezi sekundární (doplňkové) markery řadíme především protein kódující geny. Jedná se například o translační elongační faktor 1 α (*TEF1 α*), největší (*RPB1*) a druhou největší (*RPB2*) podjednotku RNA polymerázy II, *topoizomerázu I* (*TOP1*), *β-tubulin* (*β-tub*) nebo *calmodulin (CAM).* Jejich výhoda spočívá především v přítomnosti intronových oblastí, které se ve srovnání s *ITS* mnohdy mohou vyvíjet rychleji (Tkacz and Lange 2004). Předpokládá se také, že se tyto lokusy u hub vyskytují pouze v jedné kopii. Jejich exony obsahují méně mutací, proto jsou v porovnáním s *ITS* markerem méně variabilní v jejich délce. Tyto předpoklady tak dávají možnost snadného rozpoznání homologie a konvergence (Raja et al. 2017).

TEF 1 α je součástí proteinového komplexu elongačního faktoru 1, který je zodpovědný za řízení elongace (prodlužování) polypeptidového řetězce na ribozomu při translaci. Stielow *et al.*, 2015 ve své práci zmiňují, že *TEF 1 α* obsahuje oblasti s vyšší mutační rychlostí, a proto se jedná o nejslibnějšího doplňkového DB marker kandidáta. V práci Rehner and Buckley, 2005 byl marker *TEF 1* α společně s *ITS* použit k vyřešení fylogeneze u druhů rodu *Beauveria*. *RPB1* a *RPB2* markery, kódující 2 největší podjednotky RNA polymerázy II, byly společně s dalšími geny (*ITS*, *TEF1*, *Bloc*) využity k objasnění fylogenetických vztahů u rodu *Beauveria*, v práci Rehner *et al.*, 2011. *TOP 1* byl jako doplňující DB marker u hub zkoumán v práci Lewis et al. 2011. Bylo zjištěno, že tento lokus je slibným DB markerem pro odlišení druhů rodu *Fusarium* a *Penicillium*, kde primární *ITS* marker není příliš účinný. *β-tub* je považován za sekundární DB marker u medicínsky důležitého rodu *Penicillium*.

Mezi nekódující sekundární markery řadíme např. *Bloc* nebo *IGS*. Lokus *Bloc* je nekódující intergenovou oblastí, specifickou pro rod *Beauveria*, která byla úspěšně použita k oddělení druhu *B. malawiensis* (S. A. Rehner *et al.* 2006).

Rehner *et al.* 2006 pro studium fylogenetiky u rodu *Beauveria* použili 4 markery (*ITS*, *TEF1α*, *RPB1*, *RPB2*). Stielow *et al.* 2015 ve své práci použili obdobné lokusy a vytipovali další, dohromady otestovali 8 markerů. Raja *et al.* 2017 následně vytvořili souhrn 13 genů použitelných pro druhovou identifikaci hub.

1.3.2 Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

Metoda multilokusové sekvenční typizace neboli MLST poprvé vešla do povědomí v roce 1998, kdy významně přispěla k výzkumu gramnegativní bakterie *Neisseria meningitidis* způsobující závažné onemocnění – meningitidu (M. C. Maiden et al. 1998). Od té doby se tato metoda začala využívat ke zkoumání genetické struktury nejenom patogenních a nepatogenních bakterií, ale u velkého a stále rostoucího počtu diploidních organismů (M. C. J. Maiden 2006). MLST data, která jsou sdílena po celém světě prostřednictvím internetových databází, byla úspěšně využita v molekulárně epidemiologických šetřeních, populační biologii anebo v evolučních analýzách. Rostoucí rychlost a nižší náklady na stanovení nukleotidových sekvencí spolu se zdokonalenými webovými databázemi a analytickými nástroji představují perspektivu stále širšího využití MLST (Maiden, 2006; Ibarz Pavón and Maiden, 2009).

Tato metoda je založena na DNA sekvenování více genových fragmentů (obvykle 6-7) s cílem odhalit jejich alelové varianty. MLST definuje kmen jako tzv. sekvenční typ (ST) (ekvivalent haplotypu) na základě kombinace alel (tj. alelového profilu) u setu sledovaných genů. Nejprve se prostřednictvím DNA sekvenování stanoví sekvence několika vybraných genů, následně jsou sekvence přiřazeny do alelových typů, kombinace typů alel poté vytvoří sekvenční typ (ST). Hlavní výhodou MLST je velký rozlišovací potenciál, který umožňuje využití v epidemiologických nebo populačních studiích (Baldo *et al.* 2006).

Několik studií, např. Balajee *et al.* 2007; Petit and Excoffier 2009; Roe *et al.* 2010, prokázalo, že s použitím více lokusů, na místo jednoho, se zvyšuje poměr úspěšných identifikací druhů, a naopak dochází k minimalizaci rizika nepřesného určení druhů. MLST systém také pomáhá vymezit a diagnostikovat kryptické druhy. Proto jsou v současné době při rozpoznávání druhů hub silné tendence přechodu z „barcodingu“ k MLST systému.

MLST systém se již začal využívat i u diploidních organismů, zejména k odlišení kmenů u parazitů (např. Roman *et al*. 2018). V tomto ohledu je však použití u hub jednodušší, jelikož velká část entomopatogenních hub vyskytujících se v našich zeměpisných šířkách je haploidních, a proto odpadá problém s heterozygoty. Tento systém byl zpočátku navrhnut pouze pro identifikaci druhů a fylogenetiku hub, např. Raja *et al.* 2017; Lücking *et al.* 2020. Y. Wang *et al.* 2022 ho však použili i pro charakterizaci různě virulentních kmenů *Beauveria bassiana.*

Optimální MLST marker by měl splňovat několik základních parametrů. Měl by být univerzální, aby mohl být použit u různých houbových taxonů. Dále by měl být snadno amplifikovatelný, neutrální a také by měl vykazovat dostatečnou variabilitu, aby bylo dosaženo maximálního rozlišení druhů a kmenů. (CBOL Plant Working Group 2009; Tomasini *et al.* 2013).

1.3.3 LSU introny

U saprofytických a parazitických hub byly nalezeny v SSU (small subunit) a LSU (large subunit) genech, které kódují velkou (LSU, 28S RNA) a malou (SSU, 18S RNA) podjednotku ribozomu, introny skupiny I (Holst-Jensen *et al.*, 1999; Cannone *et al.*, 2002). Jedná se o velkou skupinu intronů, která je charakteristická tzv. „samo-splicingem“ (sestřihem) z prekurzorových transkriptů. Nalézáme je u široké škály eukaryotických i prokaryotických organismů (Rosewich and Kistler 2000). V jaderném eukaryotickém genomu jsou součástí ribosomálního tandemově se opakujícího genového klastru (Gutell, Larsen, and Woese 1994).

Jsou charakteristické přítomností konzervovaných sekvenčních elementů – P, Q, R a S, které se podílejí na tvorbě sekundárních struktur intronů I, potřebných pro samo sestřih z transkriptů RNA (Cech, 1988; Michel and Westhof, 1990). Na základě komparativní sekvenční analýzy byly dosud popsané introny I rozděleny do 11 podskupin – IA1–IA3, IB1–IB4, IC1–IC3, ID (Michel and Westhof 1990). Fylogenetická distribuce intronů skupiny I je rozšířená a často také sporadická, což naznačuje, že tyto introny jsou mobilními genetickými elementy schopnými horizontálního přenosu mezi evolučně odlišnými liniemi (Dujon 1989).

Neuvéglise and Brygoo, 1994 byli prvními, kdo popsal tyto introny u *B. brongniartii*, příbuzného druhu *B. bassiana*. O několik roků později Neuvéglise, Brygoo and Riba, 1997 na základě variabilního zastoupení LSU intronů úspěšně identifikovali kmeny *B. brongniartii*. Možná identifikace kmenů *B. bassiana* na základě LSU intronů byla proto otestována i v této práci.

2. Cíle práce

- Na základě literatury vybrat set markerů pro multilokusovou sekvenční typizaci kmenů *Beauveria bassiana.*

- Osekvenovat vybrané markery u kmenů *B. bassiana* ze sbírky ENTÚ.

- Ověřit vhodnost vybraných markerů pro MLST daného druhu.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

V této studii bylo pracováno se dvěma sadami původních vzorků, pocházejících z různých míst České republiky. První sada zahrnovala nativní kmeny *Beauveria bassiana*, které byly získány z infikovaného dospělce mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*), druhá sada zahrnovala půdní izoláty *Beauveria bassiana* z bramborových polí. Sběr vzorků provedla Ing. Oxana Skoková Habuštová, Ph.D. z entomologického ústavu BC AV ČR. Jednotlivé vzorky hub společně s jejich lokalitami jsou zobrazeny v Tab. I.

Tab. I: Přehled nativních kmenů *Beauveria bassiana* získaných z infikovaného dospělce mandelinky bramborové a půdních izolátů z bramborových polí.

Kmen	**Druh**	**Zdroj**	**Lokalita**	**Zkratky**
Bb1	*Beauveria bassiana*	mandelinka	České Budějovice	Bb1_CZ
Bb2	*Beauveria bassiana*	mandelinka	České Budějovice	Bb2_CZ
Bb3	*Beauveria bassiana*	mandelinka	České Budějovice	Bb3_CZ
Bb4	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Malonty	Bb4_CZ
Bb5	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Malonty	Bb5_CZ
Bb6	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Malonty	Bb6_CZ
Bb7	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Bělčice	Bb7_CZ
Bb8	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Bělčice	Bb8_CZ
Bb9	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Oblajovice	Bb9_CZ
Bb10	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Bojanovice	Bb10_CZ
Bb11	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Bojanovice	Bb11_CZ
Bb12	*Beauveria bassiana*	mandelinka	Bojanovice	Bb12_CZ
Bb1b	*Beauveria bassiana*	půda – bram. pole	Bělčice	Bb1b_CZ
Bb3b	*Beauveria bassiana*	půda – bram. pole	Havlíčková Borová	Bb3b_CZ
Bb5b	*Beauveria bassiana*	půda – bram. pole	Žabčice	Bb5b_CZ

Pro porovnání byla přidána sada ortologních DNA sekvencí z genomů 19 ti kmenů *B. bassiana*, které jsou veřejně dostupné v databázi GenBank (viz Tab. II).

Tab. II: Přehled kmenů *B. bassiana,* získaných z databáze GenBank.

Kmen	**GenBank**	**Lokalita**	**Zkratky**
ECA_26	GCA_022684745.1	Kostarika	ECA_26_CR
ECA_13	GCA_022684725.1	Honduras: Comayagua	ECA_13_HN
ECA_44	GCA_022684715.1	Portoriko: Comerio	ECA_44_PR
ARSEF 1520	GCA_001684195.1	Francie: Prades	ARSEF 1520_FR
JAU2	GCA_011316055.1	Indie: Gujarat, Junagadh	JAU2_IN
ARSEF 2597	GCA_001684205.1	Indie	ARSEF 2597_IN
ARSEF 3097	GCA_012654165.1	Itálie	ARSEF 3097_IT
KNU-101	GCA_025380265.1	Korejská republika: Daegu	KNU-101_KP
ERL836	GCA_010099065.1	USA: California	ERL836_US
Bv 062	GCA_003337105.1	Kolumbie: Santander	Bv 062_CO
JEF-007	GCA_002871155.1	Korejská republika: Hoengseong	JEF-007_KP
BCC 2660	GCA_002224115.1	Thajsko	BCC 2660_TH
ECA_0	GCA_022684765.1	Kostarika: Cartago	ECA_0_CR
QB028	GCA_015266365.1	Čína: Guangzhou	QB028_CN
ECA_27	GCA_022684705.1	Kostarika: Limon	ECA_27_CR
ECA_31	GCA_022684695.1	Kostarika: San Jose	ECA_31_CR
ECA_01	GCA_022758125.1	Kostarika: Cartago	ECA_01_CR
HN6	GCA_014607475.1	Čína: Zhenjiang, Jiangsu	HN6_CN
D1-5	GCA_000770705.1	Čína: Dehui, Jilin Province	D1-5_CN

Pro mezidruhová porovnání byly použity ortologní sekvence z genomů *B. brongniartii* (Bbrong, MBC 630), *B. asiatica* (Basia, MBC 659), *B. australis* (Baus, MBC 212), *B. medogensis* (Bmedo, MBC 320), *B. pseudobassiana* (Bpseu, MBC158) a *B. varroae* (Bvarro, MBC 525).

3.2 Metody

3.2.1 Izolace nativních kmenů *Beauveria bassiana* z dospělců mandelinky bramborové

Nativní kmeny *Beauveria bassiana* byly izolovány přenesením houbových spor z dospělců mandelinky bramborové na selektivní medium na bázi PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma-Aldrich) s fungicidem dodinem (0.05 g/L) a antibiotiky cykloheximidem (0,25 g/l) a chloramfenikolem (0,5 g/l) (Sigma-Aldrich).

Přenos spor byl proveden formou separačních čar za použití inokulační kličky pod binolupou. Petriho misky se selektivním mediem a houbovými sporami byly následně vloženy do termostatu a inkubovány při konstantní teplotě 25 °C 14 dní. Po 7 dnech byla zkontrolována čistota kmenů, při zjištění kontaminace byly kmeny znovu přeneseny (pasážovány) na nové selektivní medium. Kmeny byly uloženy ve formě alginátových pelet při teplotě -22 °C.

3.2.2 Izolace půdních kmenů metodou tzv. živých pastí

K izolaci půdních kmenů byla použita metoda tzv. živých pastí -„ Tenebrio bait method“. Do každé Petriho misky bylo vloženo 20 g testovaného půdního vzorku. Vzorky byly zvlhčeny vodou (1-2 ml) a následně k nim byly přidány larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*, 10 jedinců/1 miska). Následovala inkubace při 25 °C v termostatu. Po uplynutí 14 dní byly z larev izolovány narostlé kmeny entomopatogenních hub. Izolace byla provedena stejným způsobem jako u předešlých kmenů izolovaných z mandelinky bramborové.

3.2.3 Morfologická identifikace houbových izolátů

Morfologickou identifikaci provedla Ing. Jana Konopická, Ph.D. z Entomologického ústavu AV ČR. Houbové izoláty byly identifikovány na základě velikosti a tvaru konidií a pomocí morfologie konidiogenních buněk a kolonií. K tomuto účelu byl používán světelný mikroskop Olympus CH20 (Olympus Optical Co., Ltd.), zvětšení 400x. Morfologická identifikace byla následně ověřena s využitím DNA barcodingu.

3.2.4 Izolace DNA

DNA byla izolována z čerstvého mycelia narostlého na Petriho miskách s PDA médiem. Každé mycelium bylo shromážděno do sterilních 1.5 ml zkumavek. K extrakci genomové DNA byl používán komerční Column DNA Lego kit (Top – Bio). Bylo postupováno přesně podle protokolu od výrobce. Finální eluce byla provedena pouze jednou, jelikož výtěžnost DNA byla dostatečná. Vyextrahovaná DNA byla následně skladována při -18 ˚C a použita jako templát pro PCR.

3.2.5 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Reakční směs pro PCR byla míchána v 11.1–11.5 µl objemu v závislosti na použité polymeráze. Složení reakční směsi je zobrazeno v Tab. III. Na závěr bylo ke směsi vždy přidáno 1.5 µl templátové DNA. Každá PCR reakce byla míchána na ledu a v 0.2 ml zkumavkách. Byly používány 2 druhy polymeráz, a to Unis Taq polymeráza (Top-Bio) a TaKaRa Ex Taq polymeráza (TaKaRa Bio). U většiny PCR reakcí byla využita Unis polymeráza. Citlivější, TaKaRa Ex Taq polymeráza, byla použita pouze v případech, kdy se PCR amplifikace daného úseku DNA pomocí UNIS polymerázy nedařila.

Tab. III: Rozpis reakční směsi pro PCR.

	Unis Taq[µl]	**TaKaRa Ex Taq [µl]**
ddH_2O	7.25	7.75
10x Unis/ 10x ExTaq pufr	1.25	1.25
dNTPs (2,5 mM)	1	1
Primer forvard (5µM)	0.75	0.75
Primer revers (5µM)	0.75	0.75
Unis Taq (5U/µl) / Ex Taq (5 U/µl) polymeráza	0.1	0.05
DNA	1.5	1.5

3.2.5.1 Vybrané primery

Na základě literatury S. A. Rehner et al. 2006; Stielow *et al.*, 2015 a Raja *et al.*, 2017 bylo konsenzuálně vybráno a otestováno celkem 10 jaderných markerů, které byly doporučeny jako univerzálně použitelné pro „DNA barcoding“ hub. K detekci LSU intronů byly na základě literatury Nikoh and Fukatsu, 2001 vybrány primery ILA1 a ILB1, pomocí nichž je možné naamplifikovat oblast zahrnující 4 introny. Přehled všech primerů je zachycen v Tab. IV. U jednotlivých primerů byla nejprve otestována kvalita jejich nasedání (tzv. „annealing“), s využitím odpovídajících sekvencí *B. bassiana* z dostupných genomů.

Tab. IV: Seznam všech použitých markerů a k nim odpovídajících primerů.

Marker	Primery	Směr	Sekvence 5´→3´	Reference
ITS	ITSf1	F	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	Ji, Zhang and He, 2003
	ITSr1	R	CTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGC	Ji, Zhang and He, 2003
ITS *	ITS1f	F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	White, 1990
	ITS4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White, 1990
Tef1α	EF1-983F	F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	Rehner and Buckley, 2005
	EF1-2218R	R	ATGACACCRACRGCRACRGTYTG	Rehner and Buckley, 2005
RPB1	RPB1 af	F	GARTGYCCDGGDCAYTTYGG	Matheny *et al.*, 2002
	RPB1 cr	R	CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA	Matheny *et al.*, 2002
RPB2	RPB 2-5f	F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu, Whelen and Hall, 1999
	RPB 2-7cr	R	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	Liu, Whelen and Hall, 1999
Bloc	B5.1F	F	CGACCCGGCCAACTACTTTGA	Rehner *et al.*, 2006
	B3.1R	R	GTCTTCCAGTACCACTACGCC	Rehner *et al.*, 2006
*IGS**	LR12	F	CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA	James et al. 2001
	18S1.2Frev	R	GCTTAATCTTTGAGACAAGCA	James et al. 2001
LSU – intron	ILA1	F	GCCAGAAAGTGRTGTTGACGCAAT	Nikoh and Fukatsu, 2001
	ILB1	R	GRTRACATTCATCAGYAGGGTAAA	Nikoh and Fukatsu, 2001
β – tub	Bt 2a	F	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass and Donaldson, 1995
	Bt 2b	R	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass and Donaldson, 1995
TOP 1	TOP1-501f	F	ACTGCCAAGGTTTTCCGTACHTACAACGC	Stielow *et al.*, 2015
	TOP1-501r	R	CCAGTCCTCGTCAACWGACTTRATRGCCCA	Stielow *et al.*, 2015
*PGK**	PGK-533f	F	GTYGAYTTCAAYGTYCC	Stielow *et al.*, 2015
	PGK-533f	R	ACACCDGGDGGRCCGTTCCA	Stielow *et al.*, 2015
	PGK-511f	F	GTYGSTGCYYTGCCMACCATCAA	Stielow *et al.*, 2015
	PGK-511r	R	ATCTTGTCRGMRACCTTRGCACC	Stielow *et al.*, 2015
*CAM**	CMD5	F	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	Hong *et al.*, 2005
	CMD6	R	CCGATAGAGGTCATAACGTGG	Hong *et al.*, 2005

∗neúspěšná PCR amplifikace

3.2.5.2 PCR profily

K PCR amplifikaci byl využíván termocykler TProfessional TRIO Thermocycler (Biometra), popřípadě Mastercycler ep gradientS (Eppendorf). Všechny reakce probíhaly standardně v 6 ti krocích – predenaturace, denaturace, annealing (nasednutí primerů), elongace postelongace a uchování vzorků.

PCR profily k jednotlivým markerům byly sestavovány buď na základě nukleotidového složení primerů a předpokládané délky PCR produktu nebo byly přímo přejaty z literatury. Rozpis úspěšně použitých PCR profilů je zobrazen v Tab. V.

Tab. V: Rozpis úspěšně použitých PCR profilů pro amplifikaci vybraných markerů.

	ITS	***Tef1α***	***RPB1***	***RPB2***	***Bloc***
1. Predenaturace	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min	94 °C/2 min
2.Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s
3.Annealing	50 °C/40 s	?49 °C/45 s	50 °C/45 s	50 °C/45 s	57 °C/45 s
4.Elongace	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/1 min
5.Postelongace	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min	72 °C/2 min
6.Uchování	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞
Počet cyklů 2-4	35	35	35	35	35
	LSU – intron	***β–tub***	***TOP 1***		
1.Predenaturace	94 °C/2 min	94 °C/5 min	94 °C/2 min		
2.Denaturace	94 °C/30 s	94 °C/30 s	94 °C/30 s		
3.Annealing	55 °C/35 s	55 °C/30 s	55 °C/30 s		
4.Elongace	72 °C/1 min	72 °C/45 min	72 °C/1 min		
5.Postelongace	72 °C/2 min	72 °C/7 min	72 °C/2 min		
6.Uchování	4 °C/∞	4 °C/∞	4 °C/∞		
Počet cyklů 2-4	35	35	40		

3.2.6 Gelová elektroforéza

Po proběhlé PCR reakci bylo nutné ověřit její úspěšnost pomocí gelové elektroforézy. Elektroforetická separace mimo jiné také sloužila k určení velikosti a množství PCR produktu. Byl používán 2 % agarózový gel. Jeho příprava zahrnovala nejprve rozpuštění 4g agarózy ve 200 ml 1x TAE pufru. Zásobní 50x TAE pufr byl připraven smícháním 121g 2M Tris, 28,55 ml 1M kyseliny octové, 50 ml 0,05M EDTA a doplněn 421,45 ml H_20. Gel byl rozehříván v mikrovlnné troubě po dobu 3-4 minut, následovalo jeho zchlazení pod proudem tekoucí vody. Do zchlazeného gelu bylo poté napipetováno 15 µl ethidium bromidu, který měl koncentraci 0,5 µg/µl. Při závěrečném kroku byl gel nalit do připravené plastové formy. Do formy s rozlitým gelem byly umístěny hřebínky. Gel byl ponechán ve formě za nepřístupu světla a při pokojové teplotě tuhnout, zhruba po dobu 30–40 minut.

Do každé jamky v gelu byly pokaždé nanášeny 3 µl PCR produktu smíchané s 1 µl nanášecího pufru (70 % ddH_20, 30 % glycerol, 0,5 % bromfenolová modř). K určení velikosti a množství analyzovaného fragmentu byl používán velikostní standard DNA marker 200-1500 (Top Bio). Elektroforéza probíhala při napětí 120V při pokojové teplotě asi 30 minut. Rozdělené PCR produkty byly následně vizualizovány na UV transiluminátoru.

3.2.7 Přečištění PCR produktů a sekvenace

PCR produkty bylo před sekvenováním nutné enzymaticky přečistit od nespotřebovaných dNTPs a primerů. K tomuto účelu bylo ke každému PCR produktu přidáno vždy 0,5 µl Exonukleázy I (Exo I, 20 U/µl, ThermoFisherScientific) a 1 µl alkalinní fosfatázy (FastAP, 1U/µl, ThermoFisherScientific). Reakce byla míchána na ledu. Následně byly vzorky zvortexovány a inkubovány v termocykleru při 37°C 15 minut a při 80 °C 15 minut.

V rámci přípravy na sekvenaci bylo vždy smícháno 5 µl použitého primeru s 5 µl přečištěného PCR produktu v 1,5 ml zkumavce. Takto připravené vzorky byly poslány do firmy Eurofins Genomic, kde probíhala sekvenace.

3.2.8 Úprava sekvencí

Nejprve byly sekvence manuálně upraveny v programu Chromas 2.6.6. Tento program sloužil k odstranění sekvencí primerů a úvodních nekvalitních píků. Pro další úpravu sekvencí byl využit program SeqMan z programového balíčku DNASTAR Lasergene (DNASTAR, Inc.), kde byl z forward a revers sekvencí vytvořen tzv. „contig“ (kontinuální sekvence). Před analýzou byla pomocí databáze GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) a BOLD (http://boldsystems.org) provedena kontrolní identifikace získaných sekvencí.

3.2.9 Statistická analýza

V programu MEGA X (Kumar et al. 2018) byly všechny sekvence seřazeny a pomocí metody „Muscle“ byl vytvořen tzv. alignment. Tento program byl dále použit k vytvoření tzv.

„konkatenovaného“ souboru spojením sekvencí všech 6 ti genů (*ITS*, *TEF1α*, *RPB1*, *RPB2*, *Bloc*, *TOP1*) pro každý kmen zvlášť.

V programu DnaSP 6 (Rozas et al. 2017) byly vypočteny základní parametry genetické variability a dále byl určen počet haplotypů, haplotypová (HD) a nukleotidová diverzita (π). V tomto programu byly také pomocí metody klouzavého okénka („sliding window“) sestrojeny grafy, znázorňující rozložení variability po celé délce analyzovaného lokusu. Byl zde také proveden test neutrality na základě vnitrodruhové genetické variability – Tajimovo D.

Program PhyML (Guindon et al. 2010) byl použit pro vytvoření fylogenetických stromů metodou Maximum Likelihood (ML). V tomto programu byl nejprve vybrán nejvhodnější model genetické vzdálenosti (Lefort, Longueville, and Gascuel 2017) a následně byly sestrojeny ML fylogenetické stromy; podpora větví byla stanovena na základě testu aLRT SH-like (approximate Likelihoo Ratio - Shimodaira–Hasegawa test). Jako outgroup pro zakořenění byla použita *Cordyceps militaris* (Cmili CM01), její sekvence byly staženy z databáze GenBank. Fylogramy byly graficky upraveny v programu TVBOT (Xie et al. 2023). Klastrová analýza PCoA (Principal Coordinate Analysis) byla provedena v programu GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2012), na základě genetické vzdálenosti p - distance, která byla vypočtena ve výše uvedeném programu MEGA.

Pro analýzu možné selekce u genů kódujících proteiny byl použit webový server Datamonkey (https://www.datamonkey.org/), který umožňuje testování různých selekčních hypotéz. Všechny implementované modely jsou založeny na poměru nesynonymních (Ks) a synonymních (Ks) substitucí v alignmentu ortologních sekvencí (Weaver et al. 2018), z něhož je vytvořen fylogram. Byly použity následující modely:

BUSTED (Branch-Site Unrestricted Statistical Test for Episodic Diversification) - nejobecnější test, který detekuje pozitivní selekci na celém genu, nebo zda došlo k pozitivní selekci alespoň na jednom kodonu na jedné větvi fylogenetického stromu (Murrell et al. 2015).
MEME (Mixed Effects Model of Evolution) –metoda zjišťuje, jestli jsou jednotlivé kodony pod vlivem krátkodobé selekce (Murrell et al. 2012).

FEL (Fixed Effects Likelihood) – model testuje, zda jsou jednotlivé kodony pod vlivem dlouhodobé selekce (Kosakovsky Pond and Frost 2005).

Pro analýzu MLST dat byl použit software MLSTest (Tomasini *et al.*,2013), který umožňuje posoudit vhodnost použitých markerů a případně vybrat jejich nejvhodnější kombinaci pro MLST daného organismu. Tento program umožňuje stanovení následujících parametrů:

Alelový profil – vyhodnocení variability každého lokusu zvlášť

ST – sekvenační typ neboli haplotyp konkatenované sekvence.

TE – typizační efektivita (typing efficiency) je definována jako počet odlišných sekvenčních typů (ST) na polymorfní místo.

DP – rozlišovací síla (discriminatory power) - pravděpodobnost, že dva náhodně vybrané kmeny ze souboru nepříbuzných kmenů budou rozlišeny příslušnou typizační metodou (Hunter 1990).

GD – genotypová diverzita; je stanovena hodnota minimální, průměrná a maximální.

V tomto programu byla také pomocí Templetonova testu kongruence a detekce alelových sítí ověřena případná rekombinace. Finální analýzou je pak optimalizační schéma, kdy je vyhodnoceno, jaký počet lokusů a jejich kombinace vede k největší rozlišovací síle.

4. Výsledky

Při prvotním ověřování jednotlivých DNA sekvencí prostřednictvím BLAST v databázi GenBank byly sekvence identifikovány jako *Beauveria*, ale ne vždy bylo toto zařazení jednoznačné.

4.1 Úspěšnost amplifikace a vytěžování dat (data mining)

V této práci bylo na základě literatury Rehner *et al.*, 2006; Stielow *et al.*, 2015 a Raja *et al.*, 2017 vybráno a otestováno celkem 10 jaderných markerů, u nichž se uvedené práce shodovaly na jejich univerzálnosti v rámci hub. Jednalo se o 7 genů kódujících proteiny – *TEF1 α*, *RPB1*, *RPB2*, *TOP 1*, *β-tub*, *CAM* a *PGK* a tři nekódující geny – *ITS*, *Bloc* a *IGS*. Na základě literatury Neuvéglise, Brygoo and Riba, 1997 byl dále také vybrán a otestován speciální marker – LSU intron.

Úspěšná amplifikace a sekvenace většiny analyzovaných vzorků se podařila u 6 ti vybraných lokusů – *TEF1 α*, *RPB1*, *RPB2*, *TOP 1, ITS* a *Bloc*. U *β – tub* se podařilo amplifikovat všechny sekvence, avšak výsledné chromatogramy byly nekvalitní, a proto tento marker nebyl zahrnut do MLST analýzy. Markery *CAM*, *PGK* a *IGS* se nám i po opakovaných pokusech o optimalizaci PCR profilu amplifikovat nepodařilo u žádného vzorku.

Pro statistické vyhodnocení variability byla použita i data z genomů dostupných v databázi GenBank. Soustředila jsem se přitom na genomy alespoň částečné anotované, což vedlo k úspěšnému nalezení všech markerových sekvencí z 19 ti genomů (viz Tab. II). Obdobným způsobem byly nalezeny i markerové sekvence z dalších druhů rodu *Beauveria* a druhu *Cordyceps militaris*. Pro následující analýzy byly tedy použity jen ty druhy a kmeny, u nichž byly z databází nalezeny sekvence všech lokusů.

4.2 Vnitrodruhová nukleotidová variabilita

K získaným sekvencím z České republiky bylo ke statistickému vyhodnocení vnitrodruhové variability vybraných markerů přidáno 19 ortologních DNA sekvencí z genomů *B. bassiana* z různých států světa. Celkem bylo u většiny markerů analyzováno 34 sekvencí. U markeru *β – tub* se podařilo osekvenovat pouze 5 vlastních sekvencí, proto se u tohoto markeru snížil počet analyzovaných sekvencí na celkový počet 24. Obdobně u lokusu *RPB1*

se podařilo získat 14 vlastních sekvencí, proto byl celkový počet sekvencí snížen na číslo 33. U každého markeru byly sekvence vždy upraveny na jednotnou délku. Vyhodnocovány byly jak jednotlivé markery zvlášť, tak i konkatenovaný soubor (KS) zahrnující sekvence složené z 6 ti vybraných markerů (*ITS*, *TEF1* α, *RPB1*, *RPB2*, *TOP1*, *Bloc*). Marker *β – tub* nebyl do konkatenovaného souboru zahrnut, jelikož se nám nepodařilo získat dostatečný počet jeho sekvencí, a proto byl vyhodnocen pouze samostatně.

V tab. VI. Jsou zobrazeny základní charakteristiky vnitrodruhové nukleotidové variability. K vyhodnocení byl použit program DnaSP.

Tab. VI: Vnitrodruhová genetická variabilita jednotlivých markerů a konkatenovaného souboru (KS), N = délka sekvence, P = počet polymorfismů, Pi = počet parsimoniálně informativních míst, h = počet haplotypů, HD = haplotypová diverzita, π = nukleotidová diverzita.

Marker	Počet sekvencí	N (bp)	P	Pi	h	HD	π
ITS	34	617	20	6	14	0,838	0,005
TEF1α	34	904	21	12	13	0,834	0,004
RPB1	33	691	16	7	9	0,824	0,003
RPB2	34	973	9	2	8	0,704	0,001
Bloc	34	964	114	88	27	0,982	0,032
TOP1	34	753	24	18	12	0,806	0,009
∗β-tub	24	289	8	3	7	0,750	0,006
KS	34	4902	188	126	32	0,995	0,011

∗ nebyl zahrnut do konkatenovaného souboru

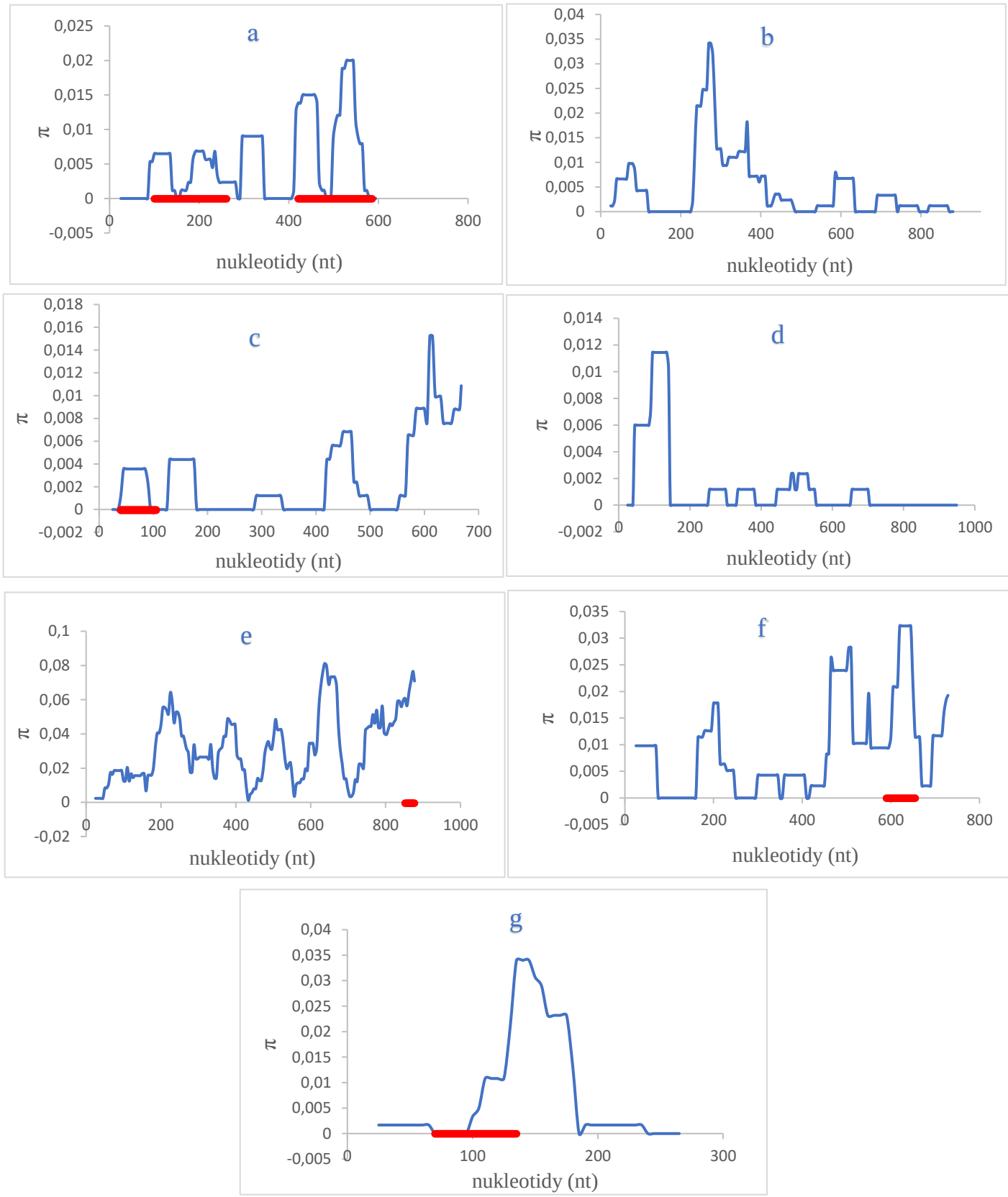
Největší počet polymorfismů (114), stejně jako parsimoniálně informativních míst (88), bylo nalezeno u lokusu *Bloc*. Naopak gen *β-tub* obsahoval nejméně polymorfních míst (8) a *RPB2* (2) marker nejméně parsimoniálně informativních míst. U konkatenovaného souboru bylo zjištěno 188 polymorfismů a 126 parsimoniálně informativních míst.

Počet haplotypů se u jednotlivých markerů pohyboval v rozmezí od 7 do 27, nejméně bylo objeveno u *β-tub*, nejvíce u *Bloc*. Celkový počet haplotypů u konkatenovaného souboru byl 32. U intergenové oblasti *Bloc* byla zjištěna také nejvyšší hodnota haplotypové diverzity, která byla 0,982. Nejmenší hodnotu HD (0,704) měl lokus *RPB2*.

Hodnoty nukleotidových diverzit se pohybovaly v rozmezí od 0,001 (u *RPB2* markeru) do 0,032 (u *Bloc* markeru). Hodnota HD u konkatenovaného souboru činila 0,995, hodnota π se rovnala 0,011.

Je patrné, že počet haplotypů pro jednotlivé lokusy je poměrně nízký, s výjimkou markeru *Bloc*. Rozložení haplotypů u jednotlivých markerů a konkatenovaného souboru je zobrazen v souhrnné tabulce v Příloze 1.

Dále byly pomocí metody klouzavého okénka („sliding window“) sestrojeny grafy, které znázorňují rozložení variability po celé délce analyzovaného lokusu. Grafy jsou znázorněny na Obr. 4.



Obr. 4: Rozložení variability podél celé délky sekvence jednotlivých lokusů, pozice intronů znázorněna červeně, a) *ITS,* b) *TEF1α*, c) *RPB1*, d) *RPB2*, e) *Bloc*, f) *TOP1*, g) *β-tub*.

U markeru *ITS* byla variability rozložena rovnoměrně po celé délce jeho sekvence, největší pík byl kolem pozice 550. nt. U lokusu *TEF1α* bylo nalezeno nejvíce variabilních míst v úseku mezi 200. – 300. nt. Marker *RPB1* měl nejvíce variabilních míst zastoupeno na konci jeho sekvence, tedy kolem 600. nt. Naopak tomu bylo u lokusu *RPB2*, kde bylo největší variability dosaženo na začátku jeho sekvence, kolem 100. nt. Z obrázku dále můžeme vyčíst, že u *Bloc* markeru byla variabilita rozložena rovnoměrně po celé jeho sekvenci, avšak vrcholu dosahovala v oblasti okolo 600. – 700. nt. U markeru *TOP 1* bylo nejvíce variabilních míst lokalizováno v druhé půli jeho sekvence, tedy zhruba od 500. – 750. nt. Nejvíce variabilních míst bylo u lokusu *β-tub* nalezeno v úseku od 100. – 200. nt. Introny se zjevně svou variabilitou od exonových neodlišují.

V DnaSP byl také u všech lokusů spočítán test neutrality – Tajimovo D. Tajimův D test může v případě záporných signifikantních hodnot poukazovat na selekční „smetení" (selective sweep) nebo nárůst populace. V případě signifikantně kladných hodnot se může jednat o vliv balancované selekce nebo nedávné působení „bottlenecku", tedy zmenšení velikosti populace. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. VII.

Tab. VII: Test neutrality – Tajimovo D.

Marker	Tajimovo D	Signifikance
ITS	-1,432	p> 0.10
TEF1α	-0,745	p> 0.10
RPB1	-1,261	p> 0.10
RPB2	-1,341	p> 0.10
Bloc	-0,191	p> 0.10
TOP1	0,366	p> 0.10
⁎***β-tub***	-0,740	p> 0.10
KS	-0,401	p> 0.10

⁎nebyl zahrnut do konkatenovaného souboru

U všech markerů byly hodnoty nesignifikantní, nebyl tedy zjištěn žádný vliv selekce.

4.3 Mezidruhová nukleotidová variabilita

Pro vyhodnocení variability mezi druhy *Beauveria* byly k získaným sekvencím *B. bassiana* (Bass) z Čr přidány sekvence šesti příbuzných druhů, a to *B. brongniartii* (Bbrong, MBC630), *B. asiatica* (Basia, MBC659), *B. australis* (Baus, MBC212), *B. medogensis* (Bmedo, MBC320), *B. pseudobassiana* (Bpseu, 158) a *B. varroae* (Bvarro, MBC525).

V programu MEGA byly u každého markeru pomocí metody p – distance spočítány genetické vzdálenosti mezi druhy (viz Tab. VIII a přílohy 2-8).

Tab. VIII: Genetické vzdálenosti (p – distance) mezi druhy *Beauveria* u konkatenovaného souboru, modře znázorněny odchylky.

	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002
Bbrong	0,041		0,002	0,002	0,002	0,003	0,003
Basia	0,043	0,027		0,003	0,003	0,003	0,003
Baus	0,042	0,016	0,031		0,002	0,003	0,003
Bmedo	0,043	0,016	0,030	0,016		0,003	0,003
Bpseu	0,044	0,038	0,045	0,042	0,042		0,003
Bvarro	0,030	0,039	0,043	0,042	0,043	0,041	

Hodnoty genetické vzdálenosti mezi druhy *Beauveria* se pohybovaly od 0,016 do 0,045. Největší genetická vzdálenost byla pozorovaná mezi druhy *B. pseudobassiana* a *B. asiatica*, nejmenší mezi *B. australis* a *B. brongniartii* a taktéž mezi *B. medogensis* a *B. brongniartii*.

Pro analýzu selekce genů kódujících proteiny byly požity alignmenty mezidruhové, zahrnující 6 příbuzných druhů rodu *Beauveria* a referenční kmen *B. bassiana* HN6. Sekvence byly upraveny podle ORF tak, že obsahovaly pouze kódující sekvence. Výsledky selekční analýzy jsou zobrazeny v Tab. XI.

Tab. XI: Selekční analýza genů kódujících proteiny.

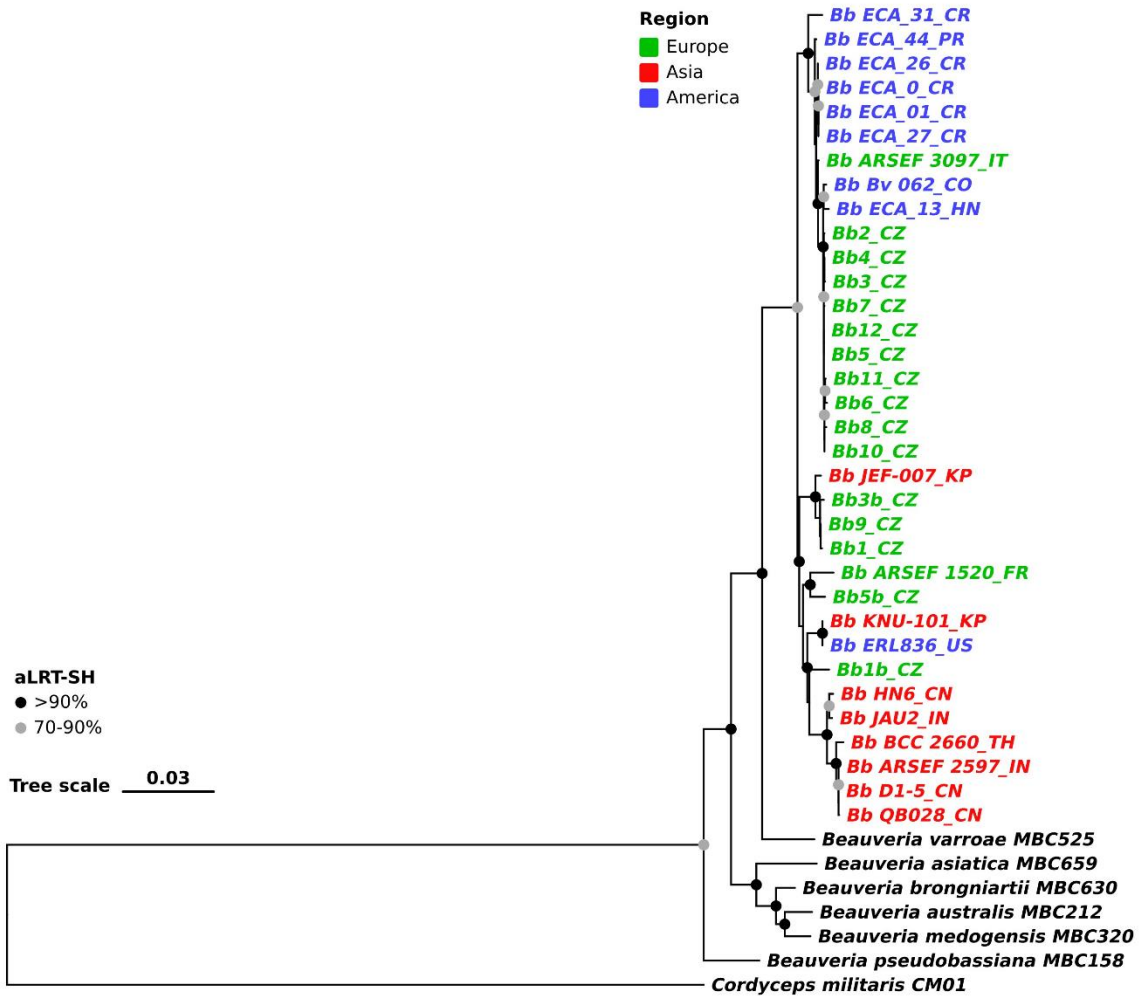
	BUSTED gen – pozitivní selekce	**MEME p <=0.01 kodony – krátkodobá diverzifikační/purifikační**	**FEL p <=0.01 kodony – dlouhodobá diverzifikační/purifikační**
TEf1α/ 331 kodonů	p=0.50	0/0	0/0
Rpb1/ 378 kodonů	p=0.34	0/0	0/0
Rpb2/ 210 kodonů	p=0.07	0/0	0/0
β – tub/ 97 kodonů	p=0.50	0/0	0/2
Top1 / 261 kodonů	p=0.20	0/0	0/1

U většiny lokusů žádný z použitých testů nenalezl signifikantní vliv selekce. Pouze u β – tub byly nalezeny dva kodony a u *TOP1* jeden kodon, kde by mohla účinkovat purifikační selekce, ale signifikance nebyla vysoká.

Dále byly pro každý lokus sestrojeny fylogenetické stromy, které sloužily k ověření druhové identity českých kmenů (viz Přílohy 9-15). Druhová identifikace sekvenovaných kmenů proběhla za pomoci příbuzných druhů a referenční sekvence BbHN6 uspokojivě, s výjimkou fylogramu *β-tub*.

4.4 Druhová identifikace a vliv geografie

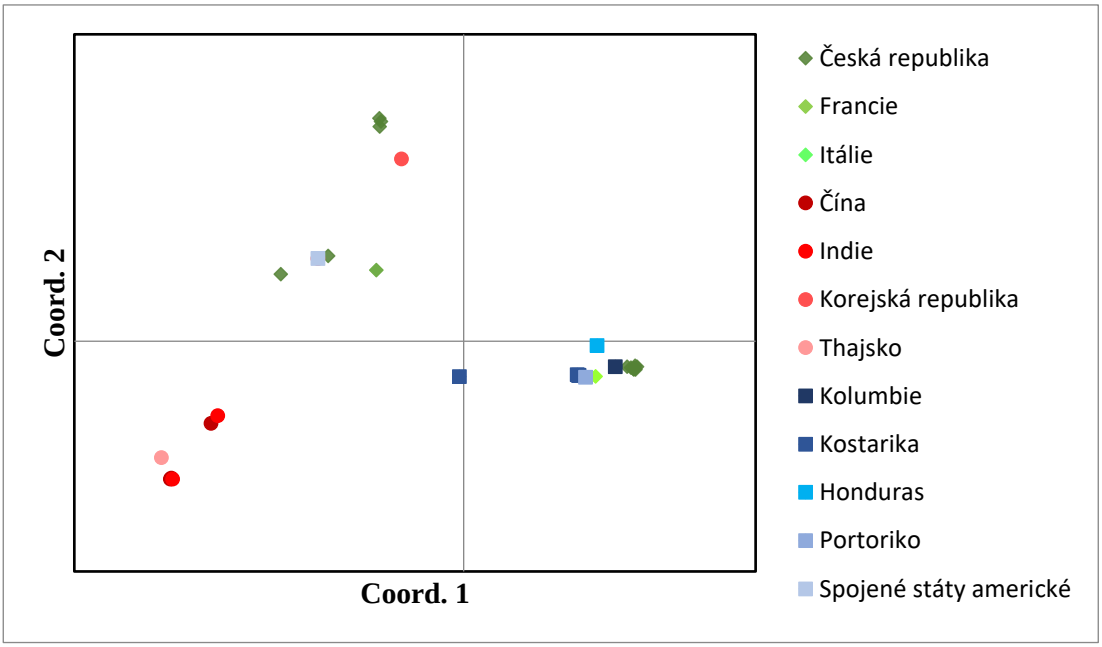
Fylogram (viz Obr. 5) vytvořený z konkatenovaného souboru všech kmenů *B. bassiana* a vybraných příbuzných druhů zcela jednoznačně oddělil všechny kmeny a druhy od sebe s vysokou statistickou podporou.



Obr. 5: Fylogenetický strom konkatenovaného souboru, zkratky viz Tab. I a II (Maximum Likelihood, podpora větví – aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris.*

Z Obr. 5 je patrné, že došlo k oddělení *B. bassiana* od ostatních příbuzných druhů, s podporou vyšší než 70 %, takže druhové zařazení všech kmenů bylo verifikováno. Na fylogramu je také naznačeno klastrování i podle větších regionů (Evropa, Asie, Amerika).

Na základě genetických distancí bylo u konkatenovaného souboru pomocí klastrovací metody PCoA (Principal Coordinates Analysis) otestováno možné rozdělení vzorků podle jejich geografických lokalit (viz Obr. 6).



Obr. 6: Klastrovací analýza – PCoA, barevné rozlišení – zeleně Evropa, červeně Asie, modře Amerika.

Z Obr. 6 je patrné, že došlo k vytvoření menšího shluku zahrnujícího asijské kmeny, zatímco kmeny z evropského a amerického regionu se jeví více promíchané, což je obdobné shlukování i na fylogramu.

4.5 Analýza MLST dat

K MLST analýze byly použity konkatenované soubory pouze těch kmenů, u kterých byly získány sekvence ze všech lokusů. Celkem tedy bylo analyzováno 33 konkatenovaných sekvencí. Sekvence musely být pro MLST analýzu dále zkráceny o n-kové pozice, neboť použitý program nemá možnost výpočtu z nejednoznačných bazí (tj. označených podle kódu IUPAC).

V programu MLSTest byly nejprve určeny alelové profily (viz Příloha 16) a dále vypočítána genetická diverzita u 6 ti analyzovaných lokusů (viz Tab. X).

Tab. X: Genetická diverzita u 7 analyzovaných genů, TE (typing efficiencies) = „typizační efektivita“, DP (discriminatory power) = „rozlišovací (diskriminační) síla“, ST = sekvenční typ.

Lokus	Počet alel	Počet polymorfismů	TE	DP
ITS	13	30	0,433	0,838
TEF1 α	12	22	0,545	0,834
RPB1	9	14	0,643	0,834
RPB2	8	9	0,889	0,713
Bloc	21	119	0,176	0,961
TOP1	11	23	0,478	0,806
∗*β – tub*	7	8	0.875	0,750
ST	29	217	0,341	0,991

∗ nebyl zahrnut do ST

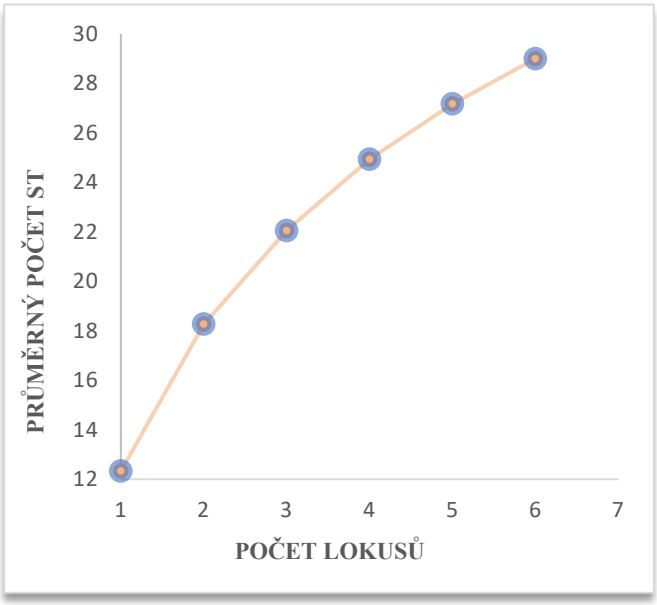
Počet polymorfních míst se u jednotlivých lokusů pohyboval v rozmezí od 8 (*β – tub*) do 119 (*Bloc*). *β – tub* měl nejnižší počet alel (8), nejvíce alel bylo zjištěno u *Bloc* markeru (21). U lokusu *Bloc* byla také zjištěna nejvyšší hodnota diskriminační síly (DP = 0,961), u lokusu *RPB2* naopak nejnižší (DP = 0,713). Nejvyšší zjištěná hodnota TE byla 0,889 (*RPB2*), nejnižší 0,176 (*Bloc*). Diskriminační síla u konkatenovaného souboru 6 genů byla vypočítána na hodnotu 0,991. Z celkového počtu 33 analyzovaných kmenů se podařilo oddělit 29.

V následující Tab. XI. jsou výsledky optimalizační analýzy, zahrnující počty lokusů, počet jejich možných kombinací a dále minimální, průměrná a maximální genotypová diverzita (GD), vyjádřena jako počet detekovaných sekvenčních typů ST. Maximální genotypová diverzita pomáhá při výběru minimálního počtu lokusů. Průměrná GD může poskytovat informaci o tom, zda přidání dalšího lokusu do úplného MLST schématu zvýší pozorovanou genotypovou diverzitu.

Tab. XI.: Počet lokusů (jejich možných kombinací) a pozorovaná genotypová diverzita (ST).

Počet lokusů (kombinace)	min. počet ST	průměrný počet ST	max. počet ST
1 (6)	8	12,33333	21
2 (15)	13	18,26667	24
3 (20)	16	22,05	26
4 (15)	21	24,93333	27
5 (6)	25	27,16667	28
6 (1)	29	29	29

Na základě zjištěných hodnot průměrné GD byl sestrojen graf (Obr. 7).



Obr. 7: Průměrná GD (ST) s narůstajícím počtem lokusů.

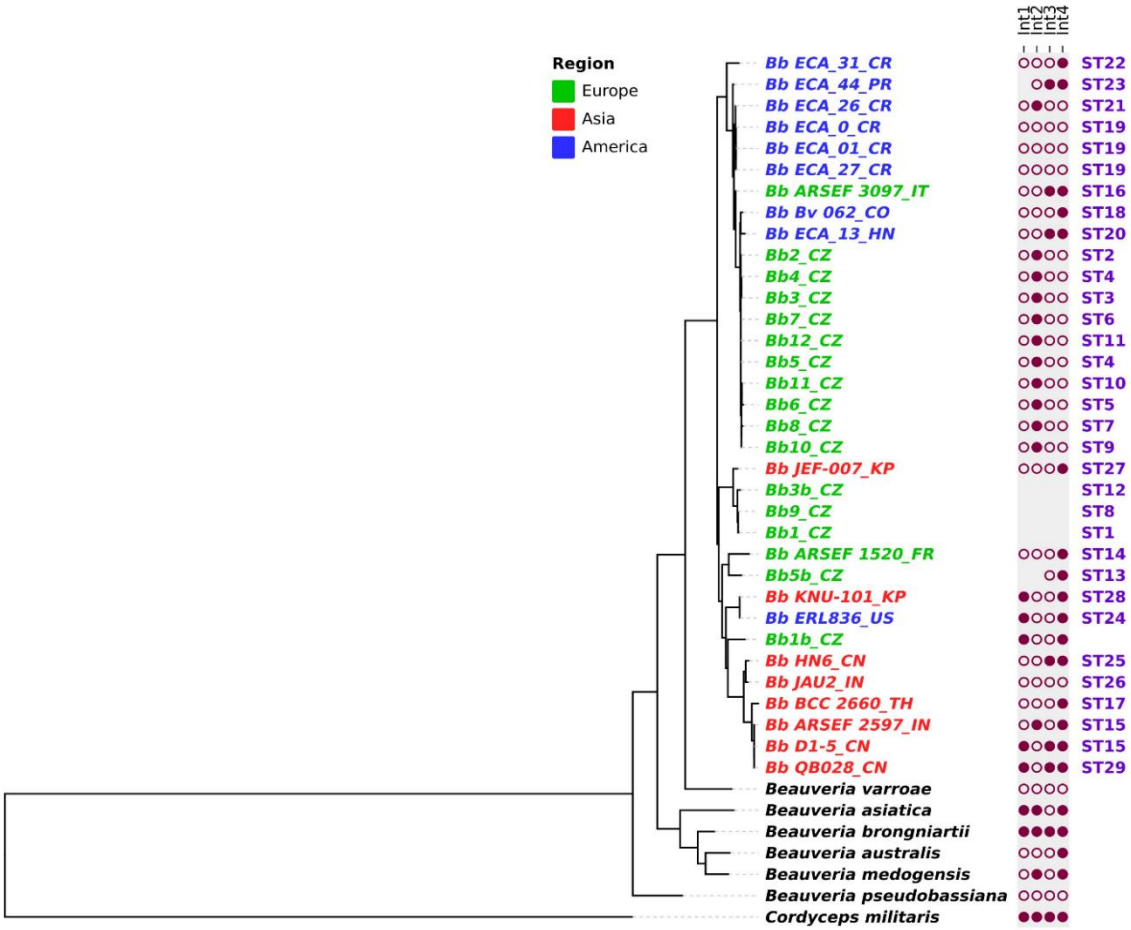
Z tabulky i grafu je patrné, že s přibývajícím počtem lokusů, rostou i hodnoty genotypových diverzit. S přidáním posledního 6. lokusu je dosaženo nejvyšších hodnot GD (29). Z grafu lze také vyčíst, že hodnoty GD nedosahují asymptoty, a proto by bylo vhodné přidat další lokus, který by dokázal hodnoty GD ještě zvýšit.

Pomocí MLSTest byla také otestována možnost rekombinace u jednotlivých lokusů. Vzhledem k tomu, že nebyly nalezeny žádné alelové síťové struktury a Templetonův test byl neprůkazný, možnost rekombinace se nepotvrdila. To znamená, že všechny vyšetřované kmeny jsou v haploidním stadiu.

4.6 LSU introny

U analyzovaných sekvencí bylo detekováno různé zastoupení LSU intronů. Všechny 4 introny byly detekovány pouze u *C. militaris* a *B. brongniartii*. U všech českých kmenů *B. bassiana* izolovaných z mandelinky byl identifikován pouze intron 2, který byl monomorfní. Zatímco u půdních izolátů (Bb1b, Bb5b) byl detekován shodně intron 4 a u Bb1b intron 1. U kmenu Bb5b se nám podařilo získat pouze část sekvence, proto nemůžeme říct, zda byl i u tohoto kmenu intron 1 přítomen. Přidání informace o intronech by rozlišilo dva kmeny se ST15, u ostatních kmenů s identickým ST k podobnému odlišení nedošlo. Přehled zastoupení LSU intronů u všech použitých sekvencí je zobrazen v Příloze 17 a Obr. 8

Fylogram na Obr.8 shrnuje výsledky analýzy fylogenetické, fylogeografické, sekvenční typizace a prezence či absence intronů.



Obr. 8: Fylogenetický strom ze všech jedinců s intronovými profily a ST, vyplněné kolečko – intron přítomen, prázdné kolečko – intron chybí, ST – sekvenční typ (Maximum Likelihood, podpora větví – aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.

5. Diskuse

5.1 Izolace DNA a PCR

Všechny vzorky byly izolovány metodou standardně používanou v naší laboratoři, tedy pomocí kolonkového kitu (Column DNA Lego kit). Bylo však zjištěno, že již zhruba po 3 měsících DNA degradovala, proto se některé lokusy nedařilo amplifikovat znovu. Do budoucna by bylo tedy dobré DNA rozdělit do alikvótů a zamrazit nebo po uplynutí zmíněné doby raději připravit čerstvý izolát.

K PCR amplifikaci byly využívány 2 polymerázy, a to Unis Taq (Top-Bio) a TaKaRa ExTaq (TaKaRa Bio). Primárně byla používaná prvně zmíněná Unis Taq, která měla u většiny vzorků dobré výsledky. Zejména u markeru *TOP1* však bylo potřeba použít citlivější polymerázu. K amplifikaci byla proto použita dražší, ale citlivější TaKaRa ExTaq, s kterou bylo dosaženo lepších výsledků. U markerů *CAM*, *IGS* a *PGK* se i přes použití Takara Extaq polymerázy, BSA (Bovine serum albumin) nebo změně PCR profilu, amplifikace nezdařila. Dále s nimi proto nebylo pracováno. Je otázka, zda by byl PCR nezdar překonán další optimalizací, či zda v místě nasedání primerů není nějaká mutace a alternativní primery by fungovaly lépe. Použité PCR profily byly u všech markerů podobné jako v literatuře *Raja et al.* 2017, Stielow *et al.* 2015 a Rehner *et al.*, 2011.

5.2 Práce s genomy

Vzhledem k tomu, že sbírka naší laboratoře sestává jen z kmenů izolovaných v ČR, bylo žádoucí přidat i data z kmenů z jiných regionů. Pro tento účel jsem proto použila genomová data, která jsou veřejně k dispozici v databázi GenBank. Na počátku projektu bylo přístupno 25 genomů *B. bassiana*, u nichž se ale nepodařilo najít všechny požadované lokusy – úspěch byl jenom u 19 ti kmenů. Později byly v databázi GenBank uloženy ještě další genomy (nyní celkový počet 199), ale ty nejsou anotovány, takže vyhledávání lokusů bylo časově náročné, a proto od něj bylo upuštěno. Jak je uvedené výše, ani v anotovaných genomech se nepodařilo najít všechny lokusy, např. u referenčního kmene ARSEF2670 se nepodařilo dohledat klasický marker pro „DNA barcoding“ hub, a to *ITS*.

5.3. Nukleotidová variabilita

Nejmenší počet polymorfních míst i haplotypů byl zjištěn u lokusu *β-tub*. To však mohlo být dáno tím, že se u tohoto markeru podařilo získat pouze 24 sekvencí, tedy méně než u ostatních markerů, nebo také délkou jeho sekvence, která byla pouze 289 bp. Naopak nejvíce variabilní byl lokus *Bloc*, což dokládal největší počet polymorfismů, haplotypů i haplotypové diverzity (HD). Tento lokus se z většiny sestává z genu *sphingomyelin phosphodiesterase*, který končí na bázi 885. Dalších asi 120 bazí tvoří mezigenová oblast, kde byl předpokládán největší výskyt variabilních míst. Tento předpoklad se však nenaplnil, rozložení variabilních míst bylo rovnoměrné po celé délce jeho sekvence.

Konkatenovaný soubor odhalil celkem 32 haplotypů. Bylo tedy zjištěno, že na základě kombinace vybraných 6 ti genů se povedlo oddělit 32 kmenů *B. bassiana*, z celkového počtu 34. Z toho lze usuzovat, že by bylo žádoucí přidat ještě další lokusy.

Pro kontrolu, zda je rozložení variability rovnoměrné po celé délce sekvence analyzovaných lokusů, byly pomocí klouzavého okénka v programu DnaSP sestrojeny grafy. Bylo zjištěno, že u markeru *RPB2* bylo nejvíce variabilních míst nalezeno již na úplném začátku jeho sekvence, zatímco zbytek jeho sekvence vykazoval menší variabilitu. Z tohoto důvodu by bylo dobré navrhnout alternativní primery k amplifikaci pouze tohoto variabilního úseku.

Lokusy *ITS*, *RPB1*, *Bloc*, *TOP1* a *β-tub* zahrnovaly i introny, což jsou nekódující sekvence a předpokládá se, že mohou být více variabilní. Tento předpoklad je i výchozím pro specifický typ markerů používaný v populační genetice, a to tzv. EPIC (exon-primed intron crossing), kdy je cíleně amplifikován intron pomocí primerů z přiléhajících exonů. Ve vybraném setu markerů se však tento předpoklad nepotvrdil.

5.4. Analýza lokusů pro MLST

U vybraných markerů byly otestovány všechny základní parametry, které by měl MLST marker splňovat, a to amplifikovatelnost a s tím související kvalita chromatogramů, univerzalita, neutralita a dostatečná variabilita – diskriminační síla (CBOL Plant Working Group 2009; Tomasini *et al.* 2013).

Splnění požadavku na univerzalitu vycházelo z literatury Raja *et al.*, 2017 a Stielow *et al.*, 2015, kdy byly již předem vybrány geny, doporučeny v těchto publikacích jako univerzální pro „DNA barcoding“, neboť byly jejich sekvence získány napříč čeleděmi a druhy, a zastoupeny u daných druhů pouze v jedné kopii.

Požadavek na amplifikovatelnost znamená poměrně snadné získání PCR produktu bez zdlouhavých optimalizací. Zaměřila jsem se hlavně na to, aby byl amplifikační profil pokud možno stejný pro většinu jedinců, tedy rozmezí teploty nasedání primerů (annealingu) držet tak, aby bylo co nejužší. Výchozím bodem byl opět profil doporučený výše uvedenými autory, který však, vzhledem k jinému setu chemikálií i termocykleru bylo nutno upravit.

U většiny vybraných markerů byl parametr amplifikovatelnosti splněn. Výjimku tvořily lokusy *CAM*, *IGS* a *PGK*, které se amplifikovat nepodařilo. Lokus *β-tub* se sice naamplifikovat povedlo, po sekvenaci se však zjistilo, že chromatogramy u většiny vzorků nemají dostatečnou kvalitu. Je tedy na zvážení, zda navrhnout alternativní primery anebo raději vybrat další markery.

I když se v případě MLST markerů nejedná o použití pro studium evoluce, i zde by měly být vybrané markery z hlediska selekce spíše neutrální. Analyzovaný set tento požadavek splňuje. Purifikační selekce naznačená mezidruhovým srovnáváním u *β-tub* a *TOP1* je omezena pouze na minimální množství kodonů (2 a 1), a tak zřejmě variabilitu lokusů významně neovlivňuje. Vzhledem k tomu, že pro MLST bakterií jsou používány „housekeeping“ geny, které jsou díky podobnému typu selekce konzervované, tedy i *β-tub* a *TOP1* mohou být v obdobném schématu použity.

Diskriminační síla jednotlivých genů byla vyhodnocena v programu MLSTest. K tomuto účelu musely být použity konkatenované soubory pouze z těch jedinců, u kterých byly získány sekvence ze všech lokusů. Z tohoto důvodu musel být odebrán kmen Bb1b, u kterého se nepovedla získat sekvence lokusu *RPB1*. Sekvence dále také musely být zkráceny o n-kové pozice. Výsledné počty alel u konkatenovaného souboru se proto lišily od počtu zjištěných konkatenovaných haplotypů vyhodnocených v programu DnaSP. Výsledky jsou nejednotné z důvodu různého algoritmu výpočtu použitých programů. Zatímco program MEGA je schopný akceptovat nejednoznačné pozice (IUPAC kódy), program DnaSP požaduje nahrazení n-kem nebo otazníkem a tuto pozici vynechává u všech jedinců, program MLSTest není schopný toto vůbec akceptovat, a proto je nutno sekvence o nejednoznačné pozice zkrátit.

Hodnoty diskriminační síly (DP) u jednotlivých lokusů se pohybovaly v rozmezí od 0,713 (*RPB2*) do 0,961 (*Bloc*). V porovnání s prací Johnson-Mackinnon *et al.*, 2019, kde bylo obdobně testováno v softwaru MLSTest 5 genů kódujících proteiny k identifikaci kmenů *Neoparamoeba perurans*, bylo v této práci dosaženo vyšších hodnot DP. V porovnání se studií Roman et al. 2018, kde byla zkoumána genetická diverzita u kmenů *Trypanozoma cruzi*, byly hodnoty DP zase srovnatelné s naší prací. To naznačuje, že výběr lokusů byl správný.

Bylo také zjištěno, že nejvyšší hodnoty genotypové diverzity (největší počet ST) byly dosaženy až po přidání posledního 6. markeru, kdy došlo k oddělení 29 z celkového počtu 33 kmenů. V práci Roman et al. 2018 bylo na základě kombinace 4 housekeeping genů odděleno 33 z celkového počtu 35 ti izolátů, bylo zde tedy dosaženo o něco lepších výsledků.

Dále bylo však také zjištěno, že hodnoty genotypové diverzity nedosahují asymptoty. Přidáním dalšího lokusu do MLST schéma se proto genotypová diverzita pravděpodobně bude ještě zvyšovat. Do budoucna by proto bylo vhodné do MLST schéma přidávat další lokusy, průběžně kontrolovat, zda dochází k asymptotě a zda dojde k oddělení všech 33 kmenů.

Identifikací kmenů *Beauveria* s použitím mikrosatelitových markerů se zabývaly např. práce Enkerli *et al.* 2001; Meyling *et al.* 2009; Reineke *et al.* 2014 nebo Wraight *et al.* 2022. Ve všech studiích byl používán různý počet lokusů, v práci Meyling *et al.* 2009 bylo amplifikováno až 18 lokusů. Počet haplotypů ale nevedl k rozlišení kmenů. Navíc zde byly obvyklé problémy spojené s amplifikací, zejména přítomnost tzv. nulových alel.

Zemek *et al.*, 2021 otestovali ve své práci virulenci všech 12 použitých kmenů (Bb1-12) a zjistili, že nejvíce virulentní je kmen Bb8 (mortalita – 100 %). Velkou virulenci vykazovali dále také kmeny Bb4, Bb10, Bb11 a Bb12 (mortalita shodně 97.73%).

I když vybrané geny pravděpodobně nesouvisí s virulencí, tak nejvíce virulentní kmen Bb8 má svůj unikátní konkatenovaný haplotyp (ST = 7), stejně tak jako další kmeny s velkou virulencí – Bb10 (ST9), Bb11 (ST10) nebo Bb12 (ST11). Pouze kmen Bb4 sdílí konkatenovaný haplotyp s kmenem Bb5 (ST4).

5.5 LSU introny

Na rozdíl od studie Neuvéglise, Brygoo and Riba, 1997, kde na základě různého zastoupení LSU intronů došlo k identifikaci jednotlivých kmenů *B. brongniartii*, v naší práci na základě tohoto intronu k oddělení českých kmenů *B. bassiana* nedošlo. Téměř všechny analyzované kmeny z ČR sdílely shodně jen intron 2, jehož sekvence byla navíc identická (monomorfní). Pouze půdní kmeny izolované z bramborových polí, tedy Bb1b a Bb5b se odlišovaly a obsahovaly shodně intron 4. Stejně jako v práci Wang *et al.*, 2003 se tak potvrdilo, že LSU intron je k tomuto účelu zřejmě nevhodný.

Vzhledem k tomu, že několik prací naznačuje, že se LSU introny mohou přenášet horizontálně (např. Holst-Jensen *et al.*, 1999; Hibbett, 1996) mohlo by být zajímavé zaměřit se na jejich užitečnost pro populační genetiku. Pokud se určitý intron šíří jen v určité lokalitě, pak by mohl sloužit jako lokální „značka“, stejná pro všechny kmeny z dané oblasti. U našich kmenů se to však nepotvrdilo, jelikož i izoláty ze stejných lokalit obsahovaly různé zastoupení LSU intronů, a naopak kmeny ze vzdálených lokalit měly podobný intronový profil. Do budoucna stojí také za zvážení, zda výskyt intronů nesouvisí spíše s tím, z jakého prostředí nebo hostitele byly kmeny izolovány, i když doposud podobné korelace nebyly zjištěny (Garrido-Jurado *et al.* 2011).

6. Závěr

V posledních letech dochází k velkému rozvoji mykopesticidů. Bylo vyvinuto více než 130 komerčních produktů na bázi EPF, avšak interakce s okolním prostředím jsou stále prozkoumány málo. Identifikace jednotlivých kmenů je základním předpokladem pro studium těchto interakcí. Cílem mé práce tak bylo nejenom otestovat druhovou identifikaci, ale také identifikaci jednotlivých kmenů *Beauveria bassiana*, pravděpodobně nejpoužívanější houby v biologické ochraně.

K tomuto účelu byla vybrána metoda multilokusové sekvenční typizace (MLST), která je založena na sekvenování více genových fragmentů. Na základě literatury Raja et al. 2017 Stielow et al. 2015 a Rehner et al. 2011 bylo konsenzuálně vybráno celkem 10 jaderných markerů. Úspěšná amplifikace a sekvenace se podařila u 6 ti lokusů *(ITS, TEF1α, RPB1, RPB2, Bloc, TOP1)*. Na základě kombinací těchto genů došlo k oddělení 29 kmenů *B. bassiana* z celkového počtu 33. Zároveň hodnoty genetické diverzity (největší počet ST) nedosahovaly asymptoty, přidáním dalších lokusů do MLST schéma se proto genotypová diverzita (počet ST) pravděpodobně bude ještě zvyšovat. Do budoucna by tak bylo vhodné vybrat a přidat další lokusy do MLST schéma a následně otestovat, zda dojde k oddělení všech 33 kmenů. Na základě zjištěného počtu ST tak můžeme konstatovat, že metoda MLST je k identifikaci jednotlivých kmenů vhodná a může být snadno použita v dalším výzkumu.

7. Literatura

Abdessamad, Imoulan. 2019. “Transitions from Single-to Multi-Locus Approach in Determining Cryptic and Describing New Species within Beauveria Genus (Cordycipitaceae, Hypocreales): A Review.” *Phytotaxa* 413(4): 257–73.

Alexopoulos, C J, C W Mims, and M M Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. Wiley. https://books.google.cz/books?id=7wAVAQAAIAAJ.

Antonín, Vladimir, and Ivan a kol. Jablonský. 2013. *Houby Jako Lék*. Ottovo nakladatelství.

Balajee, S A et al. 2007. “Aspergillus Species Identification in the Clinical Setting.” *Studies in mycology* 59: 39–46.

Baldo, Laura et al. 2006. “Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont Wolbachia Pipientis.” *Applied and environmental microbiology* 72(11): 7098–7110.

Baldrian, Petr, Tomáš Větrovský, Clémentine Lepinay, and Petr Kohout. 2022. “High-Throughput Sequencing View on the Magnitude of Global Fungal Diversity.” *Fungal Diversity* 114(1): 539–47. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00472-y.

Bateman, R P et al. 1998. “Some Observations on the Dose Transfer of Mycoinsecticide Sprays to Desert Locusts.” *Crop Protection* 17(2): 151–58. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219497001130.

Bayman, Paul et al. 2021. “Local Isolates of Beauveria Bassiana for Control of the Coffee Berry Borer Hypothenemus Hampei in Puerto Rico: Virulence, Efficacy and Persistence.” *Biological Control* 155: 104533. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964421000037.

Bischoff, Joseph F, Stephen A Rehner, and Richard A Humber. 2009. “A Multilocus Phylogeny of the Metarhizium Anisopliae Lineage.” *Mycologia* 101(4): 512–30.

Cannone, Jamie J et al. 2002. “The Comparative RNA Web (CRW) Site: An Online Database of Comparative Sequence and Structure Information for Ribosomal, Intron, and Other RNAs.” *BMC bioinformatics* 3: 2.

Castro-Vásquez, Ruth M et al. 2021. “Identification and Phylogenetic Analysis of a Collection of Beauveria Spp. Isolates from Central America and Puerto Rico.” *Journal of Invertebrate Pathology* 184: 107642. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201121001099.

CBOL Plant Working Group. 2009. “A DNA Barcode for Land Plants.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31): 12794–97.

Cech, T R. 1988. “Conserved Sequences and Structures of Group I Introns: Building an Active Site for RNA Catalysis--a Review.” *Gene* 73(2): 259–71.

Chatre, Laurent, and Miria Ricchetti. 2014. “Are Mitochondria the Achilles’ Heel of the Kingdom Fungi?” *Current opinion in microbiology* 20: 49–54.

Dara, Surendra K, Cristian Montalva, and Marek Barta. 2019. “Microbial Control of Invasive Forest Pests with Entomopathogenic Fungi: A Review of the Current Situation.” *Insects* 10(10).

Dhillion, Shivcharn S, Hanne Svarstad, Cathrine Amundsen, and Hans Chr Bugge. 2002. "Bioprospecting: Effects on Environment and Development." *Ambio* 31(6): 491–93.

Dujon, B. 1989. "Group I Introns as Mobile Genetic Elements: Facts and Mechanistic Speculations--a Review." *Gene* 82(1): 91–114.

Enkerli, Jürg, Franco Widmer, Cesare Gessler, and Siegfried Keller. 2001. "Strain-Specific Microsatellite Markers in the Entomopathogenic Fungus Beauveria Brongniartii." *Mycological Research* 105(9): 1079–87. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095375620861970X.

Evans, Harry C, and Nigel L Hywel-Jones. 1997. "2.1 - Entomopathogenic Fungi." In *Soft Scale Insects Their Biology, Natural Enemies and Control*, eds. Yair Ben-Dov and Chris J B T - World Crop Pests Hodgson. Elsevier, 3–27. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572437997800759.

Faria, Marcos R de, and Stephen P Wraight. 2007. "Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types." *Biological Control* 43(3): 237–56. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964407001843.

Feng, M G, T J Poprawski, and G G Khachatourians. 1994. "Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana for Insect Control: Current Status." *Biocontrol Science and Technology* 4(1): 3–34. https://doi.org/10.1080/09583159409355309.

Garrido-Jurado, Inmaculada et al. 2011. "Genetic Analyses Place Most Spanish Isolates of Beauveria Bassiana in a Molecular Group with Word-Wide Distribution." *BMC Microbiology* 11(1): 84. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-84.

Glass, N L, and G C Donaldson. 1995. "Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes." *Applied and environmental microbiology* 61(4): 1323–30.

Goble, T A, J F Dames, M P Hill, and S D Moore. 2011. "Investigation of Native Isolates of Entomopathogenic Fungi for the Biological Control of Three Citrus Pests." *Biocontrol Science and Technology* 21(10): 1193–1211. https://doi.org/10.1080/09583157.2011.608907.

Goettel, Mark et al. 1989. "Ultrastructural Localization of a Cuticle-Degrading Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus Metarhizium Anisopliae during Penetration of Host (Manduca Sexto) Cuticle." *Microbiology-sgm* 135: 2233–39.

Guindon, Stéphane et al. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." *Systematic biology* 59(3): 307–21.

Guo, Mali et al. 2022. "Life Barcoded by DNA Barcodes." *Conservation genetics resources* 14(4): 351–65.

Gutell, R R, N Larsen, and C R Woese. 1994. "Lessons from an Evolving RRNA: 16S and 23S RRNA Structures from a Comparative Perspective." *Microbiological reviews* 58(1): 10–26.

Hajek, Ann, and Raymond St leger. 2003. "Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts." *Annual Review of Entomology* 39: 293–322.

Hardy, Margaret C. 2014. “Resistance Is Not Futile: It Shapes Insecticide Discovery.” *Insects* 5(1): 227–42.

Hebert, Paul D N, Alina Cywinska, Shelley L Ball, and Jeremy R deWaard. 2003. “Biological Identifications through DNA Barcodes.” *Proceedings. Biological sciences* 270(1512): 313–21.

Henke, Markus Oliver et al. 2002. “Human Deep Tissue Infection with an Entomopathogenic Beauveria Species.” *Journal of Clinical Microbiology* 40(7): 2698–2702.

Hibbett, D S. 1996. “Phylogenetic Evidence for Horizontal Transmission of Group I Introns in the Nuclear Ribosomal DNA of Mushroom-Forming Fungi.” *Molecular biology and evolution* 13(7): 903–17.

Hodge, Kathie T, Stuart B Krasnoff, and Richard A Humber. 1996. “Tolypocladium Inflatum Is the Anamorph of Cordyceps Subsessilis.” *Mycologia* 88(5): 715–19. http://www.jstor.org/stable/3760965.

Holst-Jensen, A, M Vaage, T Schumacher, and S Johansen. 1999. “Structural Characteristics and Possible Horizontal Transfer of Group I Introns between Closely Related Plant Pathogenic Fungi.” *Molecular biology and evolution* 16(1): 114–26.

Hong, Seung-Beom et al. 2005. “Polyphasic Taxonomy of Aspergillus Fumigatus and Related Species.” *Mycologia* 97(6): 1316–29.

Horton, Thomas R, and Thomas D Bruns. 2001. “The Molecular Revolution in Ectomycorrhizal Ecology: Peeking into the Black-Box.” *Molecular Ecology* 10(8): 1855–71. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x.

Hunter, Paul R. 1990. “Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods.” *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1903–5. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:33567490.

Ibarz Pavón, Ana Belén, and Martin C J Maiden. 2009. “Multilocus Sequence Typing.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 551: 129–40.

Imoulan, Abdessamad et al. 2017. “Entomopathogenic Fungus Beauveria: Host Specificity, Ecology and Significance of Morpho-Molecular Characterization in Accurate Taxonomic Classification.” *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20(4): 1204–12. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226861517302959.

Irinyi, Laszlo et al. 2015. “International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS Reference DNA Barcoding Database--the Quality Controlled Standard Tool for Routine Identification of Human and Animal Pathogenic Fungi.” *Medical mycology* 53 4: 313–37. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:3494604.

Irinyi, Laszlo, Michaela Lackner, G Sybren de Hoog, and Wieland Meyer. 2016. “DNA Barcoding of Fungi Causing Infections in Humans and Animals.” *Fungal biology* 120(2): 125–36.

Jackson, Mark A, and Stefan T Jaronski. 2009. “Production of Microsclerotia of the Fungal Entomopathogen Metarhizium Anisopliae and Their Potential for Use as a Biocontrol Agent for Soil-Inhabiting Insects.” *Mycological research* 113(Pt 8): 842–50.

James, Timothy Y, Jean-Marc Moncalvo, Sean Li, and Rytas Vilgalys. 2001.

"Polymorphism at the Ribosomal DNA Spacers and Its Relation to Breeding Structure of the Widespread Mushroom Schizophyllum Commune." *Genetics* 157(1): 149–61. https://doi.org/10.1093/genetics/157.1.149.

Ji, Ya-Jie, De-Xing Zhang, and Li-Jun He. 2003. "Evolutionary Conservation and Versatility of a New Set of Primers for Amplifying the Ribosomal Internal Transcribed Spacer Regions in Insects and Other Invertebrates." *Molecular Ecology Notes* 3(4): 581–85. https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00519.x.

Johnson-Mackinnon, Jessica C et al. 2019. "Multilocus Sequence Typing (MLST) and Random Polymorphic DNA (RAPD) Comparisons of Geographic Isolates of Neoparamoeba Perurans, the Causative Agent of Amoebic Gill Disease." *Pathogens (Basel, Switzerland)* 8(4).

Kendrick, B Jacob, and G Sybren de Hoog. 1972. "The Genera Beauveria, Isaria, Tritirachium and Acrodontium Gen. Nov." *Mycologia* 65: 976. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:88112602.

Kirk, Paul, Paul Cannon, John David, and Joost Stalpers. 2001. "Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi."

Kos, Katarina, and Franci A Celar. 2013. "Sensitivity of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. to Selected Herbicides." *Pest management science* 69(6): 717–21.

Kosakovsky Pond, Sergei L, and Simon D W Frost. 2005. "Not so Different after All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites under Selection." *Molecular biology and evolution* 22(5): 1208–22.

Kubátová, Alena. 2017. "Entomopatogenní Houby – Nerovný Souboj." *Živa* (5): 250–54.

Kumar, Sudhir et al. 2018. "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms." *Molecular biology and evolution* 35(6): 1547–49.

Landa, Z. 2003. "Entomopatogenní Houby - Živé Proti Živému." *Zemědělec* 33(5).

Lee, Se Jin et al. 2017. "Entomopathogenic Beauveria Bassiana Granules to Control Soil-Dwelling Stage of Western Flower Thrips, Frankliniella Occidentalis (Thysanoptera: Thripidae)." *BioControl* 62: 1–10.

Lefort, Vincent, Jean-Emmanuel Longueville, and Olivier Gascuel. 2017. "SMS: Smart Model Selection in PhyML." *Molecular Biology and Evolution* 34(9): 2422–24. https://doi.org/10.1093/molbev/msx149.

Lewis, Christopher et al. 2011. "Identification of Fungal DNA Barcode Targets and PCR Primers Based on Pfam Protein Families and Taxonomic Hierarchy." *The Open Applied Informatics Journal* 511.

Liu, Y J, S Whelen, and B D Hall. 1999. "Phylogenetic Relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerse II Subunit." *Molecular biology and evolution* 16(12): 1799–1808.

Lücking, Robert et al. 2020. "Unambiguous Identification of Fungi: Where Do We Stand and How Accurate and Precise Is Fungal DNA Barcoding?" *IMA Fungus* 11(1).

Macleod, Donald M. 1954. "Investigation on the Genera Beauveria Vuill. and Tritirachium Limber." *Botany* 32: 818–90. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:84303792.

Maiden, M C et al. 1998. “Multilocus Sequence Typing: A Portable Approach to the Identification of Clones within Populations of Pathogenic Microorganisms.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 3140–45.

Maiden, Martin C J. 2006. “Multilocus Sequence Typing of Bacteria.” *Annual review of microbiology* 60: 561–88.

Mascarin, Gabriel Moura, and Stefan T. Jaronski. 2016. “The Production and Uses of Beauveria Bassiana as a Microbial Insecticide.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(11).

Matheny, P Brandon, Yajuan J Liu, Joseph F Ammirati, and Benjamin D Hall. 2002. “Using RPB1 Sequences to Improve Phylogenetic Inference among Mushrooms (Inocybe, Agaricales).” *American journal of botany* 89(4): 688–98.

Meyling, Nicolai V et al. 2009. “Community Composition, Host Range and Genetic Structure of the Fungal Entomopathogen Beauveria in Adjoining Agricultural and Seminatural Habitats.” *Molecular ecology* 18(6): 1282–93.

Michel, F, and E Westhof. 1990. “Modelling of the Three-Dimensional Architecture of Group I Catalytic Introns Based on Comparative Sequence Analysis.” *Journal of molecular biology* 216(3): 585–610.

Milosavljevic, Marija et al. 2021. “Isolation, Identification and Phylogenetic Position of Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana from Ips Typographus in Serbia.” *Fresenius Environmental Bulletin* 30: 9443–48.

Molnár, István, Donna M Gibson, and Stuart B Krasnoff. 2010. “Secondary Metabolites from Entomopathogenic Hypocrealean Fungi.” *Natural product reports* 27(9): 1241–75.

Montalva, Cristian et al. 2016. “Conidiobolus Macrosporus (Entomophthorales), a Mosquito Pathogen in Central Brazil.” *Journal of invertebrate pathology* 139: 102–8.

Murrell, Ben et al. 2012. “Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection.” *PLoS genetics* 8(7): e1002764.

———. 2015. “Gene-Wide Identification of Episodic Selection.” *Molecular Biology and Evolution* 32(5): 1365–71. https://doi.org/10.1093/molbev/msv035.

Naranjo-Ortiz, Miguel A, and Toni Gabaldón. 2019. “Fungal Evolution: Major Ecological Adaptations and Evolutionary Transitions.” *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 94(4): 1443–76.

Neuvéglise, C, and Y Brygoo. 1994. “Identification of Group-I Introns in the 28s RDNA of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Brongniartii.” *Current genetics* 27(1): 38–45.

Neuvéglise, C, Y Brygoo, and G Riba. 1997. “28s RDNA Group-I Introns: A Powerful Tool for Identifying Strains of Beauveria Brongniartii.” *Molecular ecology* 6(4): 373–81.

Nikoh, N., and T. Fukatsu. 2001. “Evolutionary Dynamics of Multiple Group I Introns in Nuclear Ribosomal RNA Genes of Endoparasitic Fungi of the Genus Cordyceps.” *Molecular Biology and Evolution* 18(9): 1631–42.

O’Brien, Heath E et al. 2005. “Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples.” *Applied and environmental microbiology* 71(9): 5544–50.

Ortiz-Urquiza, Almudena, and Nemat O Keyhani. 2013. “Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle.” *Insects* 4(3): 357–74.

Ownley, Bonnie H et al. 2008. “Beauveria Bassiana: Endophytic Colonization and Plant Disease Control.” *Journal of invertebrate pathology* 98(3): 267–70.

Paschapur, Amit et al. 2021. “Unraveling the Importance of Metabolites from Entomopathogenic Fungi in Insect Pest Management.” In , 89–120.

Peakall, Rod, and Peter E Smouse. 2012. “GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research-an Update.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 28(19): 2537–39. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22820204.

Petit, Rémy J, and Laurent Excoffier. 2009. “Gene Flow and Species Delimitation.” *Trends in Ecology & Evolution* 24(7): 386–93. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534709001244.

Raja, Huzefa A., Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, and Nicholas H. Oberlies. 2017. “Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community.” *Journal of Natural Products* 80(3): 756–70.

Rehner, Stephen. 2005. “Phylogenetics of the Insect Pathogenic Genus Beauveria.”

Rehner, Stephen A. et al. 2006. “Phylogenetic Origins of African and Neotropical Beauveria Bassiana s.l. Pathogens of the Coffee Berry Borer, Hypothenemus Hampei.” *Journal of Invertebrate Pathology* 93(1): 11–21.

Rehner, Stephen A., and E. P. Buckley. 2003. “Isolation and Characterization of Microsatellite Loci from the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana (Ascomycota: Hypocreales).” *Molecular Ecology Notes* 3(3): 409–11.

Rehner, Stephen A et al. 2011. “Phylogeny and Systematics of the Anamorphic, Entomopathogenic Genus Beauveria.” *Mycologia* 103(5): 1055–73.

Rehner, Stephen A, and Ellen Buckley. 2005. “A Beauveria Phylogeny Inferred from Nuclear ITS and EF1-Alpha Sequences: Evidence for Cryptic Diversification and Links to Cordyceps Teleomorphs.” *Mycologia* 97(1): 84–98.

Reineke, Annette et al. 2014. “Microsatellite Markers to Monitor a Commercialized Isolate of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana in Different Environments: Technical Validation and First Applications.” *Biological Control* 70: 1–8. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964413002788.

Roe, Amanda D et al. 2010. “Multilocus Species Identification and Fungal DNA Barcoding: Insights from Blue Stain Fungal Symbionts of the Mountain Pine Beetle.” *Molecular ecology resources* 10(6): 946–59.

Rohrlich, Clara et al. 2018. “Variation in Physiological Host Range in Three Strains of Two Species of the Entomopathogenic Fungus Beauveria.” *PloS one* 13(7): e0199199.

Roman, Fabiola, Alena M Iñiguez, Matthew Yeo, and Ana M Jansen. 2018. “Multilocus Sequence Typing: Genetic Diversity in Trypanosoma Cruzi I (TcI) Isolates from Brazilian Didelphids.” *Parasites & vectors* 11(1): 107.

Rosewich, U Liane, and H Corby Kistler. 2000. “Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Fungi.” *Annual Review of Phytopathology* 38(1): 325–63. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.325.

Rozas, Julio et al. 2017. “DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets.” *Molecular biology and evolution* 34(12): 3299–3302.

Schoch, Conrad L et al. 2012. “Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241–46.

Stajich, Jason E et al. 2009. “The Fungi.” *Current biology : CB* 19(18): R840-5.

Stat, Michael et al. 2012. “Molecular Delineation of Species in the Coral Holobiont.” *Advances in marine biology* 63: 1–65.

Stielow, J. B. et al. 2015. “One Fungus, Which Genes? Development and Assessment of Universal Primers for Potential Secondary Fungal DNA Barcodes.” *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35(1): 242–63.

Sung, Gi-Ho et al. 2007. “Phylogenetic Classification of Cordyceps and the Clavicipitaceous Fungi.” *Studies in mycology* 57: 5–59.

Tkacz, Jan, and Lene Lange. 2004. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*.

Tomasini, Nicolás, Juan J. Lauthier, Martin S. Llewellyn, and Patricio Diosque. 2013. “MLSTest: Novel Software for Multi-Locus Sequence Data Analysis in Eukaryotic Organisms.” *Infection, Genetics and Evolution* 20: 188–96. http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.029.

Uribe, Daniel, and George G Khachatourians. 2004. “Restriction Fragment Length Polymorphism of Mitochondrial Genome of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana Reveals High Intraspecific Variation.” *Mycological research* 108(Pt 9): 1070–78.

Valero-Jiménez, Claudio A et al. 2016. “Genes Involved in Virulence of the Entomopathogenic Fungus Beauveria Bassiana.” *Journal of invertebrate pathology* 133: 41–49.

Vega, Fernando, Nicolai Meyling, Janet Luangsa-Ard, and Meredith Blackwell. 2012. “Fungal Entomopathogens.” In *Fungal Entomopathogens*, , 171–220.

Vilgalys, R, and D Gonzalez. 1990. “Organization of Ribosomal DNA in the Basidiomycete Thanatephorus Praticola.” *Current Genetics* 18(3): 277–80. https://doi.org/10.1007/BF00318394.

Wang, Chengshu, L. I. Zengzhi, Milton A. Typas, and Tariq M. Butt. 2003. “Nuclear Large Subunit RDNA Group I Intron Distribution in a Population of Beauveria Bassiana Strains: Phylogenetic Implications.” *Mycological Research* 107(10): 1189–1200.

Wang, Qinggui, and Lijian Xu. 2012. “Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 17(3): 2367–77.

Wang, Yao et al. 2022. “Species Diversity and Virulence Potential of the Beauveria Bassiana Complex and Beauveria Scarabaeidicola Complex.” *Frontiers in Microbiology* 13. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.841604.

Wattier, R, C R Engel, P Saumitou-Laprade, and M Valero. 1998. “Short Allele Dominance as a Source of Heterozygote Deficiency at Microsatellite Loci: Experimental Evidence at the Dinucleotide Locus Gv1CT in Gracilaria Gracilis (Rhodophyta).” *Molecular Ecology* 7(11): 1569–73. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00477.x.

Weaver, Steven et al. 2018. “Datamonkey 2.0: A Modern Web Application for Characterizing Selective and Other Evolutionary Processes.” *Molecular Biology and Evolution* 35(3): 773–77. https://doi.org/10.1093/molbev/msx335.

White, Thomas J. 1990. “Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics.” https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85783615.

Wraight, S P et al. 2022. “Laboratory Studies Assessing the Microbial Biocontrol Potential of Diverse Strains of Beauveria Bassiana Isolated from Coffee Berry Borer, with Emphasis on Strains from Hawai’i Island and Comparisons to Commercial Strain GHA.” *Journal of invertebrate pathology* 194: 107819.

Xie, Jianmin et al. 2023. “Tree Visualization By One Table (TvBOT): A Web Application for Visualizing, Modifying and Annotating Phylogenetic Trees.” *Nucleic Acids Research* 51(W1): W587–92. https://doi.org/10.1093/nar/gkad359.

Xu, Yuquan et al. 2007. “Cytotoxic and Antihaptotactic Beauvericin Analogues from Precursor-Directed Biosynthesis with the Insect Pathogen Beauveria Bassiana ATCC 7159.” *Journal of natural products* 70(9): 1467–71.

Zemek, Rostislav, Jana Konopická, Eva Jozová, and Oxana Skoková Habuštová. 2021. “Virulence of Beauveria Bassiana Strains Isolated from Cadavers of Colorado Potato Beetle, Leptinotarsa Decemlineata.” *Insects* 12(12): 1–13.

Internetové zdroje:

https://www.agritek.co.nz

https://www.ncbi.nlm.nih.gov

http://boldsystems.org

8. Přílohy

Příloha 1: Rozložení haplotypů u jednotlivých lokusů a konkatenovaného souboru.

	ITS	***TEF1α***	***RPB1***	***RPB2***	***Bloc***	***TOP1***	***β-tub***	**KS**
Bb1_CZ	1	1	1	1	1	1	-	1
Bb2_CZ	2	2	2	2	2	2	-	2
Bb3_CZ	2	2	2	2	3	2	1	3
Bb4_CZ	2	2	2	2	4	3	-	4
Bb5_CZ	2	2	2	2	5	3	-	5
Bb6_CZ	3	2	2	2	6	2	1	6
Bb7_CZ	4	2	2	3	7	3	-	7
Bb8_CZ	2	2	2	2	8	3	-	8
Bb9_CZ	1	1	1	1	9	4	2	9
Bb10_CZ	5	2	2	2	10	3	-	10
Bb11_CZ	2	2	3	2	11	2	-	11
Bb12_CZ	4	2	2	2	5	3	-	12
Bb1b_CZ	6	3	-	1	12	5	-	13
Bb3b_CZ	1	1	1	4	13	6	2	14
Bb5b_CZ	7	4	4	5	14	7	3	15
Bb ARSEF1520_FR	8	5	5	1	15	8	4	16
Bb ARSEF2597_IN	9	6	5	6	16	9	5	17
Bb ARSEF3097_IT	2	2	6	2	17	3	1	18
Bb BCC2660_TH	10	7	5	6	18	9	6	19
Bb Bv062_CO	2	8	2	2	19	3	1	20
Bb D1-5_CN	9	6	5	6	20	9	5	21
Bb ECA0_CR	2	8	7	2	21	3	1	22
Bb ECA01_CR	2	8	7	2	21	3	1	22
Bb ECA13_HN	2	8	7	2	22	3	1	23
Bb ECA26_CR	2	8	2	2	21	3	1	24
Bb ECA27_CR	2	8	7	2	21	3	1	22
Bb ECA31_CR	11	9	8	7	23	10	7	25
Bb ECA44_PR	12	2	7	2	23	3	1	26
Bb ERL836_US	7	10	9	1	24	11	5	27
Bb HN6_CN	9	11	5	6	25	12	5	28
Bb JAU2_IN	9	12	5	6	26	9	5	29
Bb JEF007_KP	13	8	1	8	27	4	2	30
Bb KNU101_KP	7	13	9	1	24	11	5	31
Bb QB028_CN	14	6	5	6	20	9	5	32

Příloha 2: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *ITS*, modře znázorněny odchylky.

	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,005	0,005	0,005	0,005	0,006	0,005
Bbrong	0,017		0,003	0,002	0,002	0,004	0,004
Basia	0,020	0,005		0,004	0,002	0,004	0,004
Baus	0,014	0,004	0,008		0,003	0,005	0,004
Bmedo	0,017	0,002	0,003	0,005		0,004	0,004
Bpseu	0,022	0,010	0,011	0,013	0,011		0,005
Bvarro	0,015	0,010	0,012	0,010	0,012	0,013	

Příloha 3: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *TEF1α*, modře znázorněny odchylky.

	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,004	0,004	0,003	0,003	0,005	0,003
Bbrong	0,013		0,004	0,003	0,002	0,005	0,003
Basia	0,020	0,011		0,004	0,003	0,006	0,004
Baus	0,011	0,007	0,013		0,002	0,005	0,003
Bmedo	0,009	0,004	0,011	0,002		0,005	0,003
Bpseu	0,027	0,023	0,030	0,023	0,021		0,005
Bvarro	0,012	0,010	0,017	0,010	0,008	0,024	

Příloha 4: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *RPB1*, modře znázorněny odchylky.

	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,005
Bbrong	0,019		0,004	0,003	0,003	0,005	0,006
Basia	0,020	0,012		0,004	0,004	0,006	0,006
Baus	0,020	0,009	0,012		0,003	0,006	0,006
Bmedo	0,019	0,008	0,010	0,004		0,006	0,006
Bpseu	0,031	0,020	0,025	0,025	0,023		0,007
Bvarro	0,021	0,028	0,026	0,029	0,028	0,039	

Příloha 5: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *RPB2*, modře znázorněny odchylky.

	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,005	0,005	0,005	0,006	0,005	0,005
Bbrong	0,022		0,004	0,004	0,004	0,005	0,005
Basia	0,024	0,019		0,005	0,005	0,005	0,006
Baus	0,027	0,013	0,026		0,004	0,006	0,006
Bmedo	0,031	0,015	0,028	0,014		0,006	0,006
Bpseu	0,028	0,027	0,031	0,034	0,036		0,006
Bvarro	0,021	0,031	0,035	0,035	0,039	0,036	

Příloha 6: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *Bloc*, modře znázorněny odchylky.

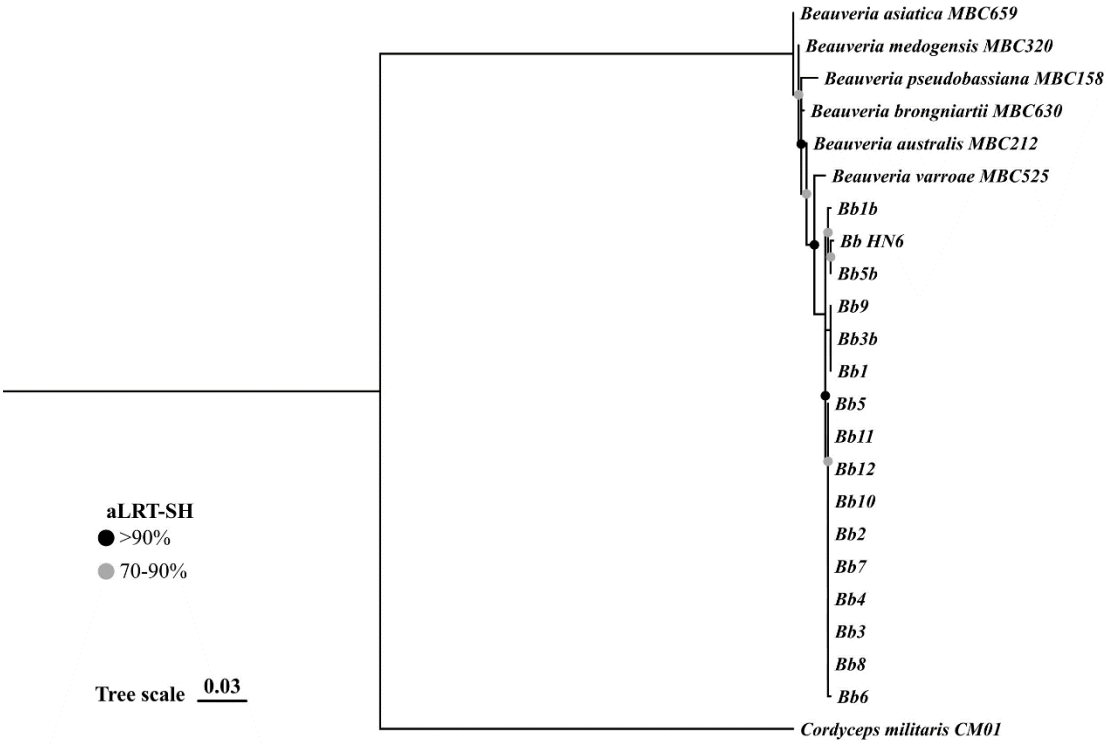
	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,010	0,010	0,010	0,010	0,009	0,008
Bbrong	0,113		0,008	0,006	0,006	0,009	0,009
Basia	0,115	0,071		0,009	0,009	0,010	0,010
Baus	0,114	0,040	0,078		0,007	0,009	0,009
Bmedo	0,119	0,041	0,079	0,046		0,009	0,009
Bpseu	0,101	0,087	0,106	0,095	0,095		0,009
Bvarro	0,076	0,091	0,104	0,097	0,099	0,082	

Příloha 7: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *TOP1*, modře znázorněny odchylky.

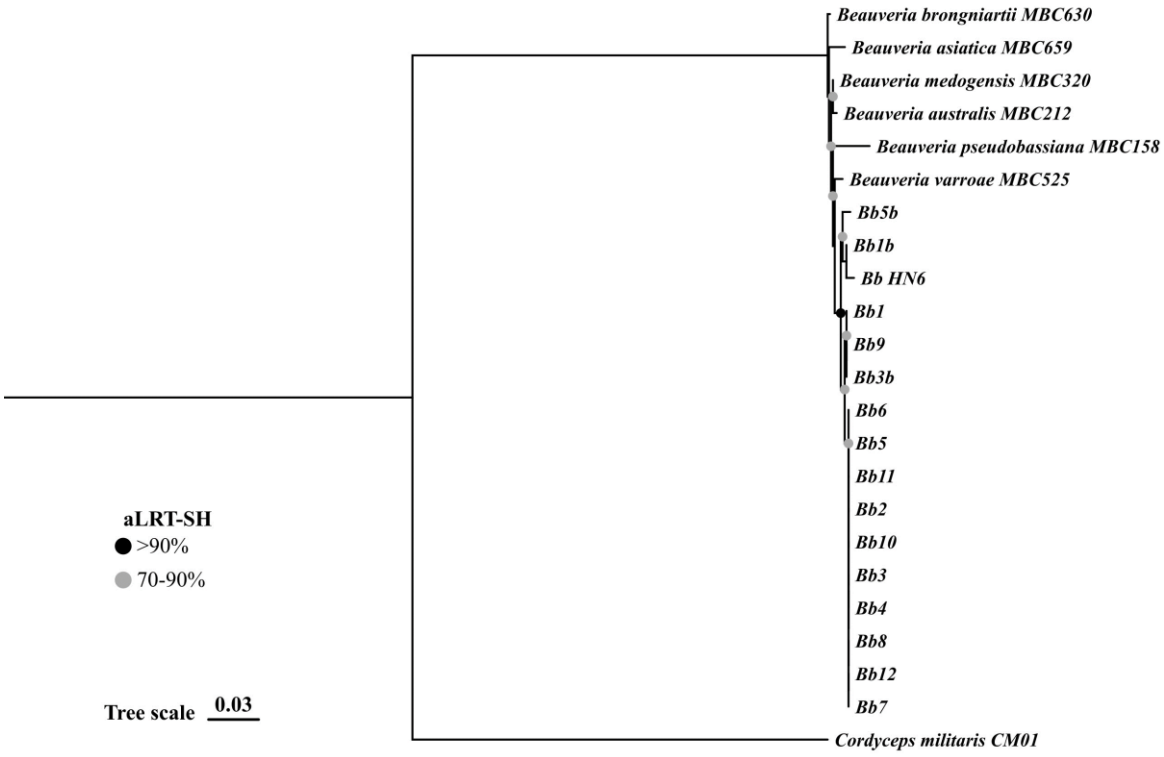
	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,007	0,007	0,007	0,008	0,007	0,005
Bbrong	0,048		0,006	0,004	0,004	0,008	0,008
Basia	0,044	0,032		0,007	0,007	0,008	0,008
Baus	0,050	0,014	0,035		0,005	0,008	0,008
Bmedo	0,049	0,016	0,035	0,016		0,008	0,008
Bpseu	0,043	0,048	0,048	0,048	0,052		0,007
Bvarro	0,024	0,055	0,049	0,054	0,057	0,041	

Příloha 8: Genetické vzdálenosti (p-distance) mezi druhy *Beauveria* – lokus *β-tub*, modře znázorněny odchylky.

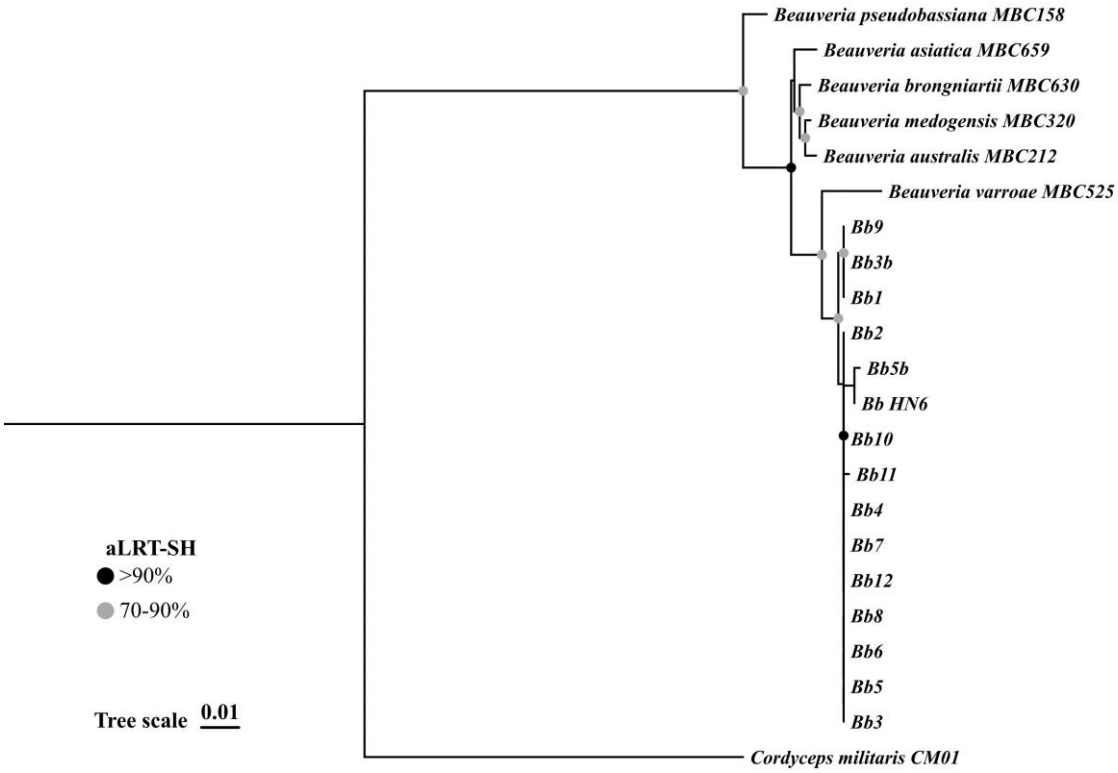
	Bbass	Bbrong	Basia	Baus	Bmedo	Bpseu	Bvarro
Bbass		0,011	0,012	0,012	0,011	0,011	0,010
Bbrong	0,042		0,006	0,007	0,007	0,011	0,011
Basia	0,045	0,014		0,008	0,005	0,011	0,011
Baus	0,048	0,017	0,017		0,008	0,009	0,011
Bmedo	0,045	0,014	0,007	0,017		0,011	0,011
Bpseu	0,042	0,035	0,035	0,028	0,035		0,010
Bvarro	0,031	0,035	0,035	0,038	0,035	0,031	



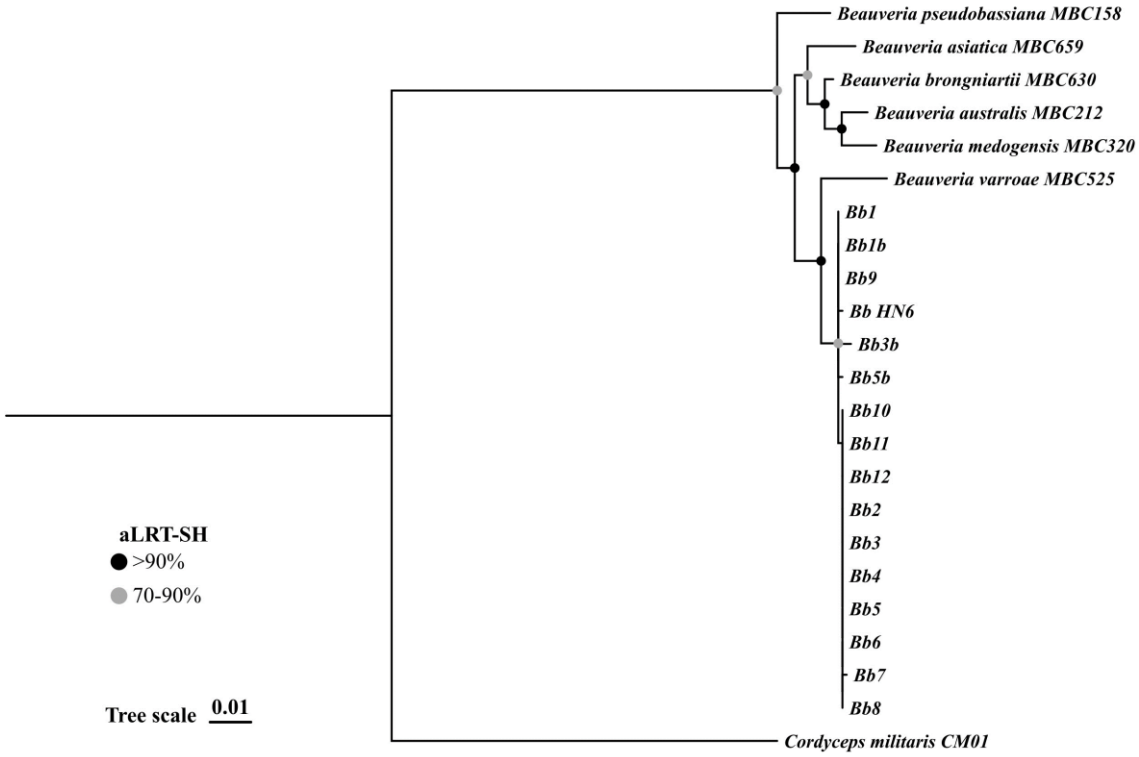
Příloha 9: Fylogram pro lokus *ITS* (Maximum Likelihood, model K80 +G, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.



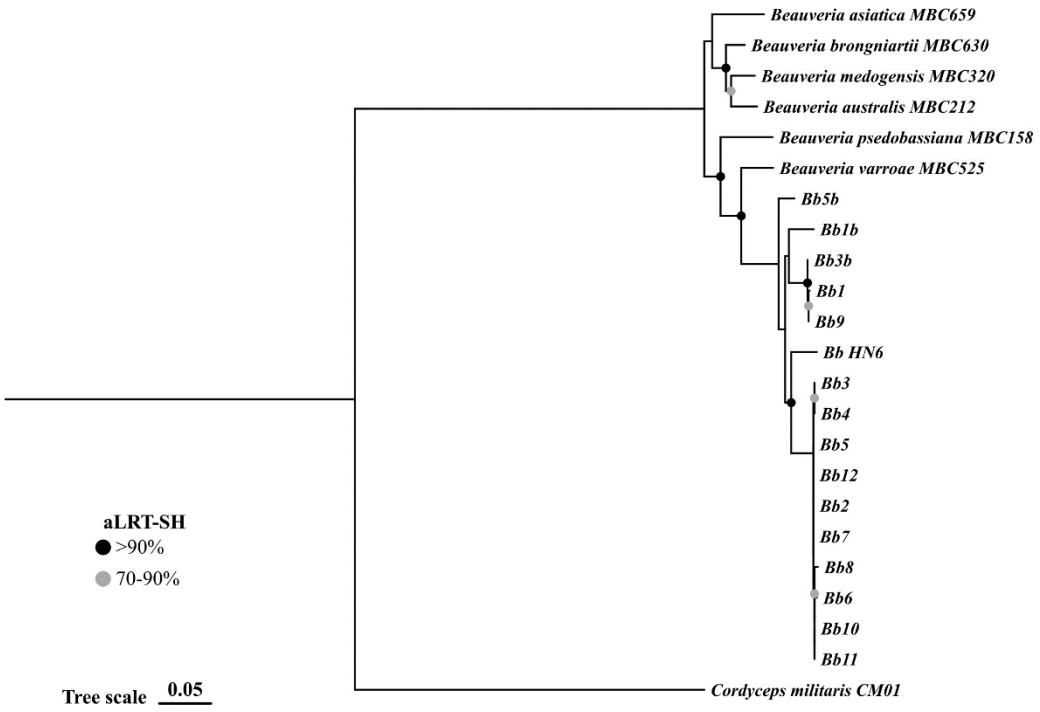
Příloha 10: Fylogram pro lokus *TEF1α* (Maximum Likelihood, model TN93 +I, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.



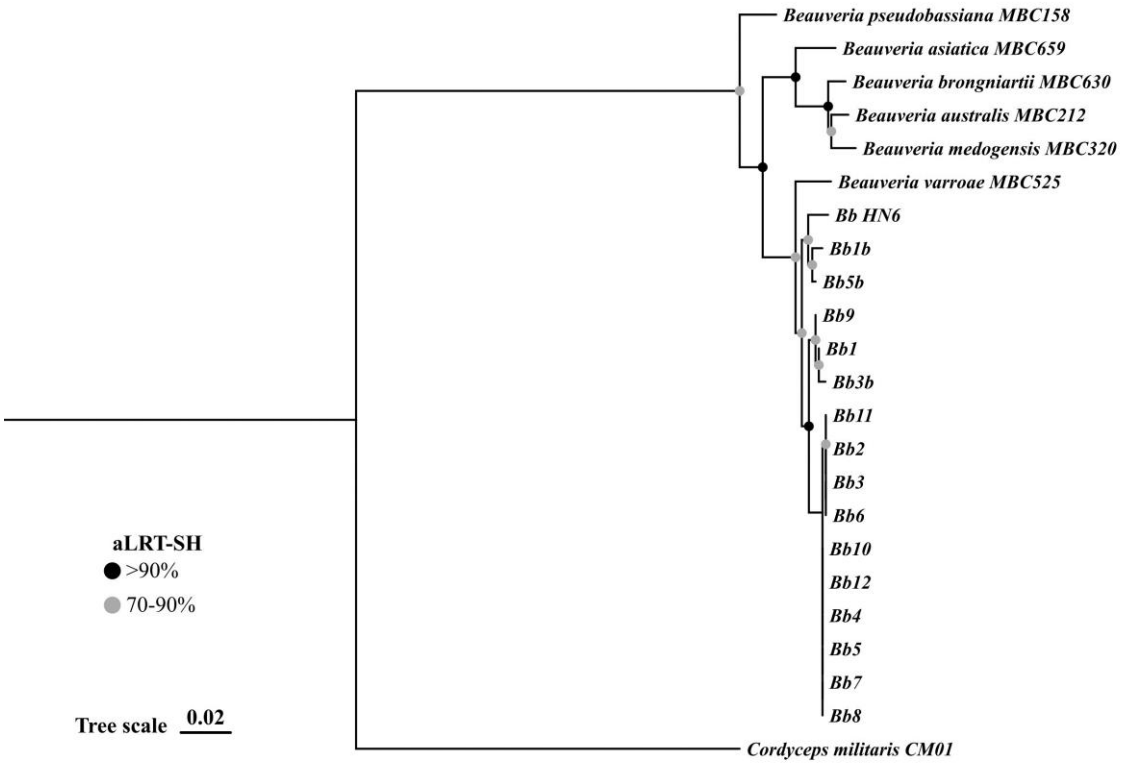
Příloha 11: Fylogram pro lokus *RPB1* (Maximum Likelihood, model TN93 +I, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.



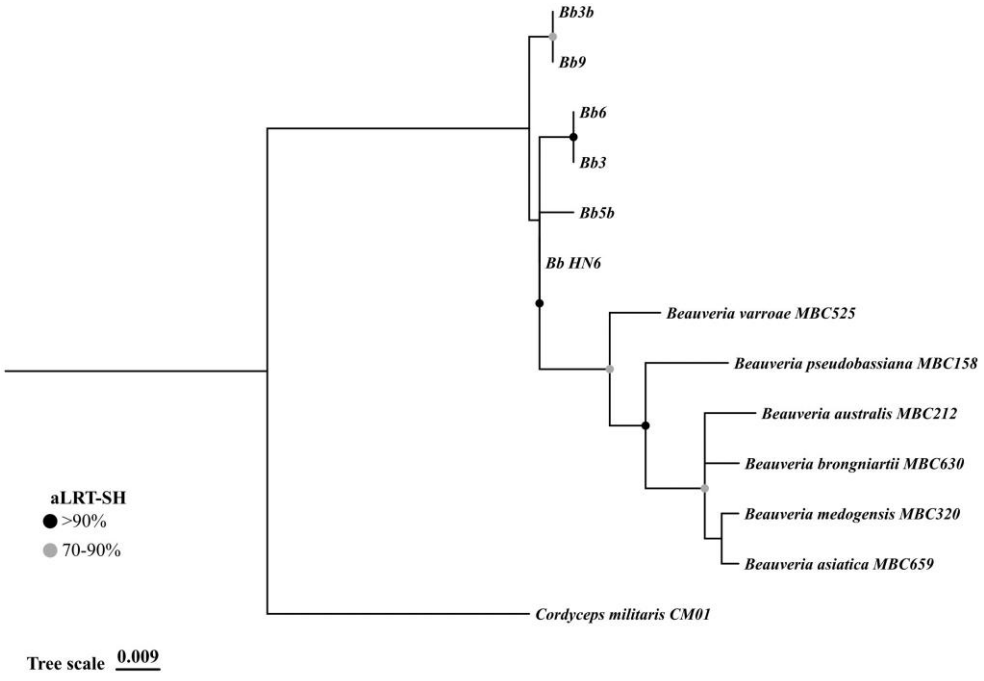
Příloha 12: Fylogram pro lokus *RPB2* (Maximum Likelihood, model TN93 +G, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.



Příloha 13: Fylogram pro lokus *Bloc* (Maximum Likelihood, model HKY85 +G, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.



Příloha 14: Fylogram pro lokus *TOP1* (Maximum Likelihood, model TN93 +G, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.



Příloha 15: Fylogram pro lokus *β-tub* (Maximum Likelihood, model K80 +G, aLRT-SH). Fylogram je zakořeněn pomocí *Cordyceps militaris*.

Příloha 16: MLST analýza – alelové profily.

Kmen	*ITS*	*TEF1α*	*RPB1*	*RPB2*	*Bloc*	*TOP1*	⁎*β-tub*	*ST*
Bb1_CZ	1	1	1	1	1	1	-	1
Bb2_CZ	2	2	2	2	2	2	-	2
Bb3_CZ	2	2	2	2	3	2	1	3
Bb4_CZ	2	2	2	2	2	3	-	4
Bb5_CZ	2	2	2	2	2	3	-	4
Bb6_CZ	3	2	2	2	4	2	1	5
Bb7_CZ	4	2	2	3	2	3	-	6
Bb8_CZ	2	2	2	2	5	3	-	7
Bb9_CZ	1	1	1	1	1	4	2	8
Bb10_CZ	5	2	2	2	6	3	-	9
Bb11_CZ	2	2	3	2	7	2	-	10
Bb12_CZ	4	2	2	2	2	3	-	11
Bb3b_CZ	1	1	1	4	8	5	2	12
Bb5b_CZ	6	3	4	5	9	6	3	13
Bb ARSEF1520_FR	7	4	5	1	10	7	4	14
Bb ARSEF2597_IN	8	5	5	6	11	8	5	15
Bb ARSEF3097_IT	2	2	6	2	12	3	1	16
Bb BCC2660_TH	9	6	5	6	13	8	6	17
Bb Bv062_CO	2	7	2	2	14	3	1	18
Bb D1-5_CN	8	5	5	6	11	8	5	15
Bb ECA0_CR	2	7	7	2	15	3	1	19
Bb ECA01_CR	2	7	7	2	15	3	1	19
Bb ECA13_HN	2	7	7	2	16	3	1	20
Bb ECA26_CR	2	7	2	2	15	3	1	21
Bb ECA27_CR	2	7	7	2	15	3	1	19
Bb ECA31_CR	10	8	8	7	17	9	7	22
Bb ECA44_PR	11	2	7	2	17	3	1	23
Bb ERL836_US	6	9	9	1	18	10	5	24
Bb HN6_CN	8	10	5	6	19	11	5	25
Bb JAU2_IN	8	11	5	6	20	8	5	26
Bb JEF007_KP	12	7	1	8	21	4	2	27
Bb KNU101_KP	6	12	9	1	18	10	5	28
Bb QB028_CN	13	5	5	6	11	8	5	29

⁎nebyl zahrnut do ST

Příloha 17: Přehled zastoupení LSU intronů u kmenů *B. bassiana*, + intron zastoupen, na – nelze aplikovat.

Přibližná pozice	2563	2449	2066	1921
LSU introny	**1**	**2**	**3**	**4**
Bb2		+		
Bb3		+		
Bb4		+		
Bb5		+		
Bb6		+		
Bb7		+		
Bb8		+		
Bb10		+		
Bb11		+		
Bb12		+		
Bb1b	+			+
Bb5b	na	na		+
Bb_ARSEF_1520				+
Bb_ARSEF2597		+		+
Bb_ARSEF3097			+	+
Bb_BCC2660				+
Bb_Bv062				+
Bb_D1-5	+		+	+
Bb_ECA0				
Bb_ECA01				
Bb_ECA13			+	+
Bb_ECA26		+		
Bb_ECA27				
Bb_ECA31				+
Bb_ECA44	na		+	+
Bb_ERL836	+			+
Bb_HN6			+	+
Bb_JAU2				
Bb_JEF007				+
Bb_KNU101	+			+
Bb_QB028	+		+	+
Basia	+	+		+

Baus				+
Brong	+	+	+	+
Bmedo		+		+
Bpseu				
Bvarro				
Cmili	+	+	+	+