

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Percepce auxinového a cytokininového signálu v patogenní houbě *Claviceps purpurea*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| Autor: | Bc. Veronika Hloušková |
| Studijní program: | B1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D. |
| Rok: | 2017 |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

podpis diplomanta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, věnovaný čas a vedení při práci. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Márii Majeské Čudejkové Ph.D. za bioinformatické vyhodnocení sekvenčních dat a Mgr. Michaele Hradilové za poskytnutí mutanta Δ CpAEC. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Ondřejovi Plíhalovi Ph.D., Mgr. Josefu Vrabkovi, Ing. Kristýně Hromadové a ostatním kolegům z Oddělení molekulární biologie za cenné rady a praktickou pomoc.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Veronika Hloušková |
| Název práce | Percepce auxinového a cytokininového signálu v patogenní houbě <i>Claviceps purpurea</i> |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2017 |

Abstrakt

Claviceps purpurea je fytopatogenní houba, která napadá jednoděložné rostliny včetně mnoha ekonomicky významných plodin jako jsou žito, ječmen a pšenice. V poslední fázi infekce tvoří v klasu napadené rostliny tzv. sklerocium, které obsahuje námelové alkaloidy. Tyto alkaloidy působí na centrální nervovou soustavu savců.

Auxiny a cytokininy jsou rostlinné hormony, které jsou nezbytné pro správný růst a vývoj rostlin. Některé fytopatogenní bakterie a houby pravděpodobně využívají tyto hormony k přeprogramování rostlin k vlastnímu prospěchu. Také bylo prokázáno, že tyto hormony jsou schopny vyvolat fyziologické změny v houbách samotných, což naznačuje, že houby také vnímají signál fytohormonů.

V této práci byla axenická kultura *C. purpurea* ošetřena auxinem a cytokininem a byla pozorována reakce houby na tyto fytohormony na úrovni transkripce.

| | |
|---------------|--|
| Klíčová slova | <i>Claviceps purpurea</i> , cytokinin, auxin, percepce a transdukce signálu, masivně paralelní sekvenování |
| Počet stran | 64 |
| Počet příloh | 1 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Bc. Veronika Hloušková |
| Title | Perception of auxin and cytokinin signals in pathogenic fungus <i>Claviceps purpurea</i> |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D. |
| The year of presentation | 2017 |

Abstract

Claviceps purpurea is phytopathogenic fungus. It parasitizes on monocotyledonous plants including many economically important crops like rye, barley and wheat. In the last phase of infection, the fungus produces so called sclerotium in the ear of the host plant. This sclerotium contains a lot of ergot alkaloids which affect central nervous system of mammals.

Auxins and cytokinins are plant hormones which are essential for proper growth and development of plants. Some phytopathological bacteria and fungi probably use these hormones to reprogram the host plant to their own benefit. It was also shown that these hormones are able to induce some physiological changes in fungi. It indicates that fungi are able to perceive signals of phytohormones as plants do.

In this thesis the axenic culture of *C. purpurea* was treated with auxin and cytokinin. The reaction of the fungus on transcriptional level was studied.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | <i>Claviceps purpurea</i> , cytokinin, auxin, signal perception and transduction, massive parallel sequencing |
| Number of pages | 64 |
| Number of appendices | 1 |
| Language | Czech |

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 9 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 10 |
| 2.1 | <i>Claviceps purpurea</i> | 10 |
| 2.2 | Auxiny | 13 |
| 2.2.1 | Metabolismus auxinů..... | 13 |
| 2.2.2 | Transport auxinů..... | 16 |
| 2.2.3 | Percepce a transdukce auxinového signálu | 18 |
| 2.2.4 | Auxiny ve fytopatogenních organismech..... | 22 |
| 2.3 | Cytokininy | 23 |
| 2.3.1 | Biosyntéza cytokininů v <i>Claviceps purpurea</i> | 24 |
| 2.3.2 | Percepce a transdukce cytokininového signálu | 26 |
| 2.3.3 | Cytokininy ve fytopatogenních organismech..... | 28 |
| 2.4 | Masivně paralelní sekvenování..... | 29 |
| 2.4.1 | Princip sekvenace pomocí Illumina/Solexa..... | 30 |
| 2.4.2 | Aplikace masivně paralelního sekvenování | 32 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 34 |
| 3.1 | Biologický materiál..... | 34 |
| 3.2 | Chemikálie | 34 |
| 3.3 | Enzymy, příslušné pufrы a komponenty pro molekulární biologii | 34 |
| 3.4 | Použité kity | 35 |
| 3.5 | Přístroje..... | 36 |
| 3.6 | Roztoky..... | 36 |
| 3.7 | Postupy..... | 37 |
| 3.7.1 | Kultivace <i>C. purpurea</i> pro tvorbu knihovny, experiment 1 | 37 |
| 3.7.2 | Kultivace <i>C. purpurea</i> pro tvorbu knihovny, experiment 2 | 37 |
| 3.7.3 | Izolace RNA | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.7.4 | Měření čistoty a koncentrace RNA | 38 |
| 3.7.5 | Reversní transkripce a qPCR vybraných genů | 38 |
| 3.7.6 | Příprava sekvenační cDNA knihovny | 39 |
| 3.7.7 | Kvantifikace sekvenační cDNA knihovny pomocí qPCR..... | 42 |
| 3.7.8 | Sekvenace cDNA knihoven..... | 43 |
| 3.7.9 | Kultivace <i>C. purpurea</i> pro analýzu auxinů | 43 |
| 3.7.10 | Analýza auxinů | 43 |
| 4 | VÝSLEDKY | 45 |
| 4.1 | Efekt auxinů a cytokininů na expresi genů v <i>Claviceps purpurea</i> | 45 |
| 4.2 | Vylučování auxinů do media houbami Cp20.1 a Δ CpAEC..... | 46 |
| 5 | DISKUZE..... | 49 |
| 5.1 | <i>Claviceps purpurea</i> neodpovídá na cytokininový signál..... | 49 |
| 5.2 | <i>Claviceps purpurea</i> reaguje na auxinový signál..... | 50 |
| 5.3 | Transport auxinů v <i>Claviceps purpurea</i> | 51 |
| 6 | ZÁVĚR | 53 |
| 7 | LITERATURA..... | 54 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 63 |
| 9 | PŘÍLOHY | 65 |

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma *Claviceps purpurea*, auxiny, cytokininy a masivně paralelní sekvenování
2. Ovlivnění exprese genů v houbě exogenní aplikací auxinu a cytokininu do axenické kultury houby
3. Transport auxinu v houbách *Claviceps purpurea* 20.1 a Δ CpAEC

1 ÚVOD

Auxiny a cytokininy jsou rostlinné hormony, které se podílí na regulaci mnoha procesů při růstu a vývoji rostliny. Některé fytopatogenní organismy jsou schopny tyto hormony také syntetizovat. Využívají je pravděpodobně k přeprogramování hostitelské rostliny k vlastnímu prospěchu. Bylo také prokázáno, že tyto hormony způsobují fyziologické změny v samotných fytopatogenních houbách, jako jsou změna morfologie a vývoje hyf, ovlivnění sporulace a příjmu živin. To naznačuje, že i některé houby mohou vnímat auxinový a cytokininový signál a reagovat na něj.

Claviceps purpurea je biotrofní fytopatogenní houba, která napadá mnoho rostlin, dokonce i ekonomicky významných plodin. Je známá tvorbou tzv. sklerocií v klasu napadené rostliny v poslední fázi infekce. Bylo prokázáno, že tato houba je schopna syntetizovat auxiny i cytokininy. Navíc, ošetření kultury *C. purpurea* cytokininem mělo za následek rapidní tvorbu dalších cytokininů. Absence *tZ* v myceliu mutované houby, která nebyla schopna jeho produkce, měla za následek hypersporulující fenotyp. Obě fakta naznačují, že *Claviceps* vnímá signál rostlinných hormonů.

V této práci byla vypracována literární rešerše, která se zabývá houbou *Claviceps purpurea*, metabolismem auxinů a cytokininů a také jejich signálními drahami. Dále jsou uvedeny známé informace o těchto rostlinných hormonech ve vztahu k fytopatogenním organismům. Praktická část této práce se pak zabývá změnami v expresi genů v houbě *C. purpurea* po ošetření auxinem a cytokininem.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea*

Claviceps purpurea neboli paličkovice nachová je obligátně biotrofní fytopatogenní houba. Patří do rodu *Claviceps* z oddělení vřeckovýtrusných hub (*Ascomycota*). Tento rod zahrnuje přes 30 různých druhů (Taber, 1985). Houby z tohoto rodu parazitují na více než 600 jednoděložných rostlinách, včetně mnoha hospodářsky významných plodin, jako jsou žito, pšenice, ječmen, kukuřice, oves a proso (Bove, 1970). *Claviceps purpurea* je nejznámějším a nejvíce studovaným členem tohoto rodu.

Její životní cyklus (Obr. 1) začíná na jaře, kdy se askospory roznášené větrem uchytí



Obr. 1 Životní cyklus *Claviceps purpurea* (Hulvová *et al.*, 2012).

na ještě neopylených pestících kvetoucích obilnin a vyklíčí (Luttrell, 1977). Období, kdy mohou infikovat rostliny, je tedy velmi krátké, protože *Claviceps* není schopna proniknout do rostliny jiným způsobem (Swan and Mantle, 1991). Spora prorůstá pestíkem podobně jako pyl po opylení, obklopí vajíčko a dostane se k cévnímu pletivu, odkud získává živiny pro svůj růst (Luttrell, 1980). Je nutné, aby celý tento proces proběhl nepozorovaně, protože jinak by rostlina mohla přísun živin uzavřít a houba by vyhladověla k smrti. Houba spotřebuje veškeré zásoby určené vyvíjejícímu se vajíčku, ale neprorůstá dále do rostliny; tato interakce mezi patogenem a hostitelem je konstantní po celou dobu infekce (Luttrell, 1980; Tudzynski *et al.*, 1995). Znakem úspěšnosti infekce, který lze pozorovat zvnějšku, je vyloučení malé kapičky, tzv. medovice. Tato medovice je bohatá na sacharidy a obsahuje také konidie, které jsou roznášeny na okolní rostliny především pomocí hmyzu, a dochází tak k propagaci sekundární infekce (Tudzynski *et al.*, 1995; Tenberge, 1999).

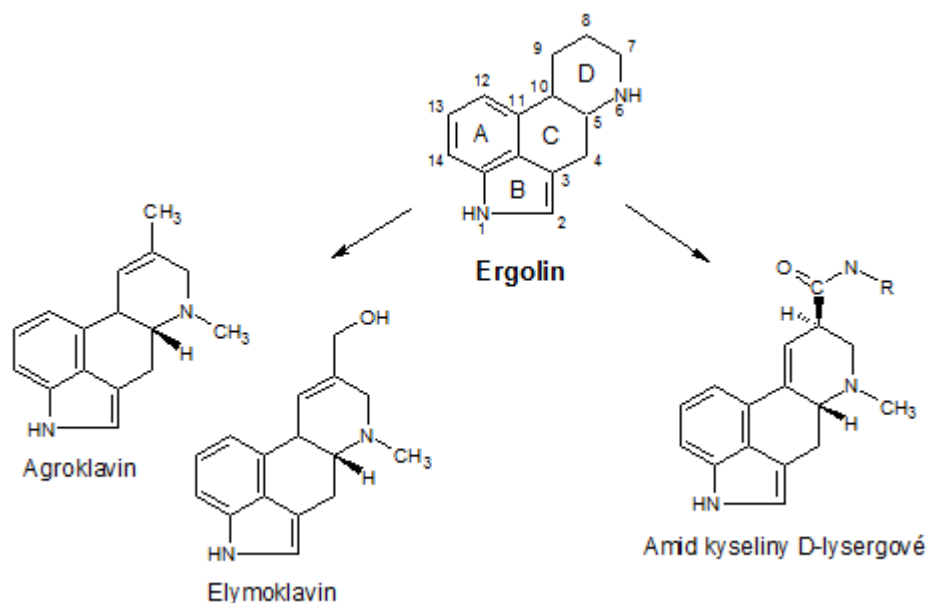
Poté, co houba zkonsumuje celý semeník včetně vajíčka, začnou její hyfy diferencovat a vzniká tzv. sklerocium (Obr. 2). Buňky sklerocia obsahují více vakuol a jsou menší a tlustější než buňky mycelia (Shaw and Mantle, 1980). Vytrálé sklerocium výrazně vyčnívá z klasu, má tvar podobný zrna, jeho kůra je tvrdá a má výraznou černo-fialovou barvu.

Pouze v této fázi životního cyklu produkuje houba námelové alkaloidy, díky kterým se jí dostalo takového zájmu. Obsah těchto alkaloidů ve sklerociu se pohybuje mezi

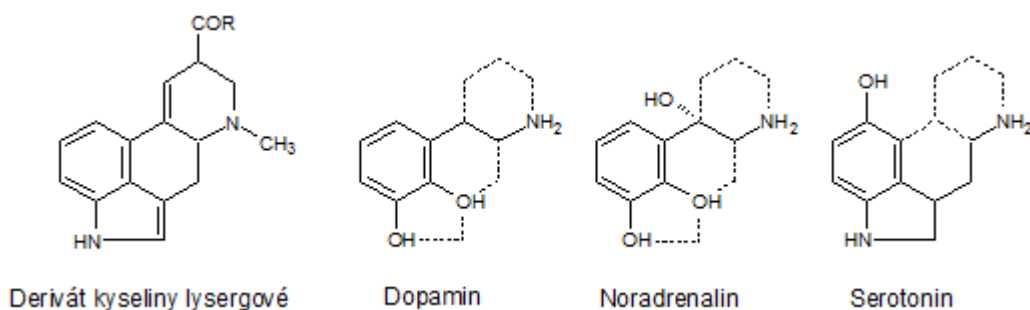


Obr. 2 Sklerocium *Claviceps purpurea* vyčnívající z klasu napadeného touto houbou (zdroj: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/miedema_kait/classification.htm).

A



B



Obr. 3 (A) Základní struktura ergolinu, tvořeného čtyřmi cykly, z něhož jsou odvozeny námelové alkaloidy; struktura dvou klavinových alkaloidů a amidu kyseliny lysergové; **(B)** Struktura kyseliny lysergové a její podoba s některými neurotransmitery.

0,01 až 0,2 % w/v (Tudzynski *et al.*, 1995). Strukturně jsou námelové alkaloidy deriváty indolu, který je různě substituován. Dělí se na dvě hlavní skupiny, klaviny (např. agroklavin, elymoklavin) a deriváty kyseliny lysergové (Obr. 3A) (Keller, 1999). Adicí diethylamidu ke kyselině lysergové získáme LSD, který má halucinogenní účinky (Hoffman, 1972).

Námelové alkaloidy působí na centrální nervovou soustavu savců, protože jejich struktura je podobná některým neurotransmiterům jako jsou dopamin, noradrenalin a serotonin (Obr. 3B), a tudíž se může vázat na stejné receptory. V minulosti způsobovaly onemocnění zvané ergotismus nebo také oheň sv. Antonína. Toto onemocnění se projevuje gangrénou, křečemi, šílenstvím, a nakonec může následovat smrt (Lee, 2009). V současné době se díky svým účinkům na centrální nervovou soustavu využívají k léčbě

neurodegenerativních chorob, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba, a také při migrénách (Schiff, 2006).

2.2 Auxiny

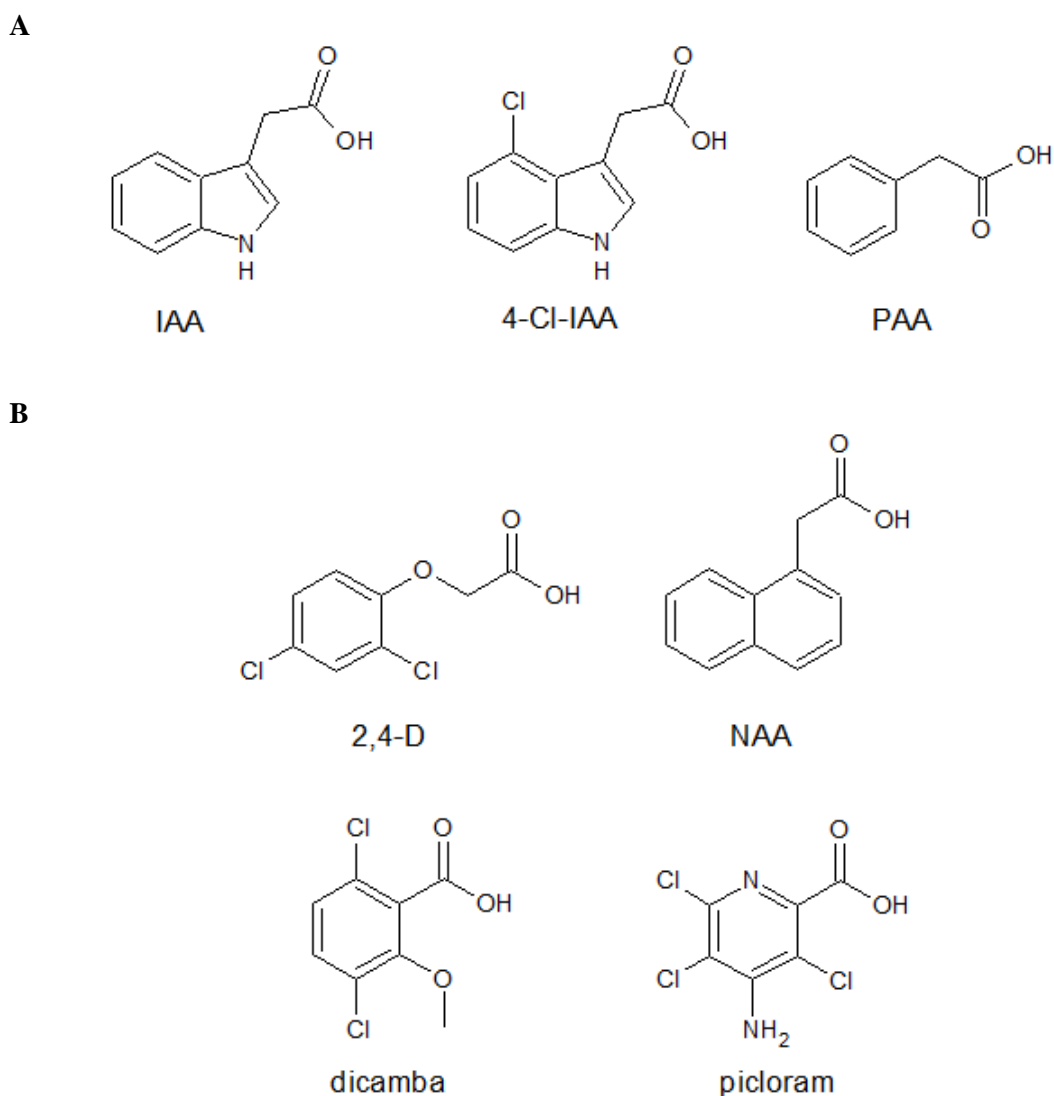
Auxiny jsou rostlinné hormony. Slovo „auxin“ je odvozeno z řeckého slova „auxein“, které znamená „růst, prodlužovat“. Auxiny jsou nezbytné pro vývoj rostliny. Na buněčné úrovni řídí auxiny prodlužování buněk změnou poddajnosti buněčné stěny, a také buněčné dělení. Tím, že regulují utváření meristémů, dávají vznik novým orgánům, jako jsou laterální (postranní) a adventivní kořeny (Woodward and Bartel, 2005; Vanneste and Friml, 2009). Dále podporují apikální dominanci a řídí nastolení a udržení polarity. Regulují senescenci (Ellis *et al.*, 2005), reakci na patogeny (Kazan and Manners, 2009; Fu and Wang, 2011) a abiotický stres (Wang *et al.*, 2010), vznik plodů (De Jong *et al.*, 2009) a opadávání listů.

Malé molekuly, které vyvolávají auxinovou odpověď, lze rozdělit na přirozeně se v organismech vyskytující a syntetické. Mezi přirozeně se vyskytující aktivní auxiny patří nejvýznamnější zástupce auxinů, kyselina indol-3-octová (IAA), dále kyselina 4-chlor-indol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylactová (PAA) (Obr. 4A). Další skupinou jsou přirozeně se vyskytující neaktivní auxinové prekursory, kam patří kyselina indol-3-pyrohroznová (IPyA), indolacetamin (IAM), indolacetaldoxim (IAOx), indol-3-acetonitril (IAN) a indol-3-acetaldehyd (IAAld). Mezi přirozeně se vyskytující zásobní formy auxinů patří indol-3-másečná kyselina (IBA), methylester IAA (MeIAA) a auxiny konjugované s aminokyselinami nebo cukry. Do skupiny syntetických auxinů patří 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D), 1-naftylactová kyselina (NAA), 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina (dicamba) a 4-amino-3,5,6-trichloropikolinová kyselina (picloram; Obr. 4B) (Korasick *et al.*, 2013).

Působení auxinů v rostlinách je regulováno třemi způsoby – biosyntézou, polárním auxinovým transportem a percepcí nebo signální transdukcí (Tivendale *et al.*, 2014).

2.2.1 Metabolismus auxinů

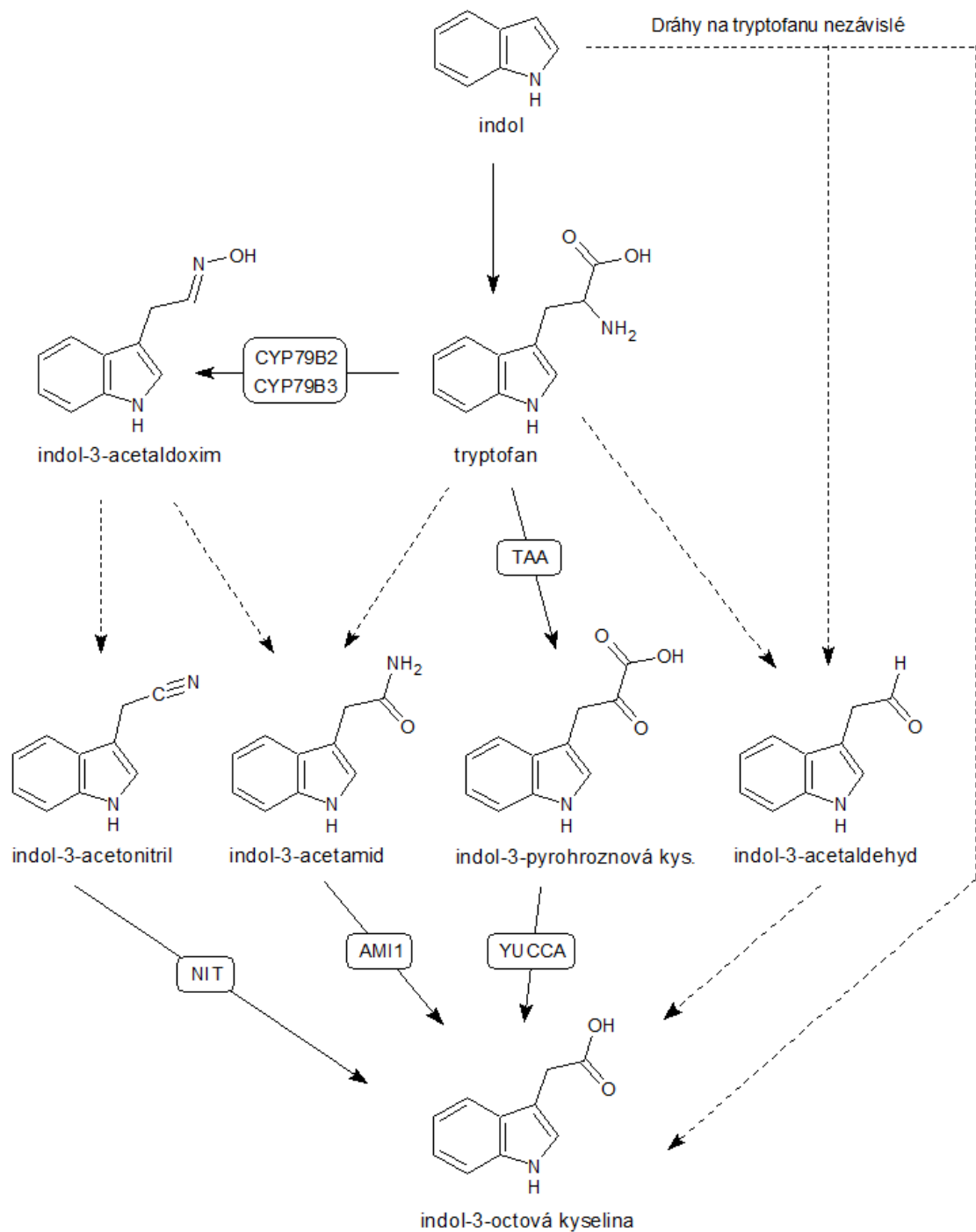
Biosyntéza auxinů může probíhat dvěma základními drahami, a to na tryptofanu závislou a na tryptofanu nezávislou dráhou. K drahám na tryptofanu závislým patří dráhy pojmenované podle meziproductů jako IPyA, IAOx a IAM (Obr. 5).



Obr. 4 (A) Struktura přirozeně se vyskytujících auxinů – kyselina indol-3-octová (IAA), kyselina 4-chlor-indol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA); **(B)** Struktura syntetických auxinů – 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), 1-naftyloctová kyselina (NAA), 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina (dicamba) a 4-amino-3,5,6-trichloropikolinová kyselina (picloram).

K tvorbě volné IAA nejvíce přispívá dráha IPyA a je to také zatím jediná dráha, která byla kompletně popsána (Zhao, 2012). Přeměna tryptofanu na IAA je dvoustupňový proces. V prvním kroku je tryptofan převeden na IPyA pomocí enzymu tryptofanaminotransferasy (TAA – EC 2.6.1.28) (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008). Druhým krokem je přeměna IPyA na volnou IAA, která je zajištěna flavinmonooxygenasami (YUCCA, EC 1.14.13.8) (Mashiguchi *et al.*, 2011; Stepanova *et al.* 2011; Won *et al.*, 2011).

IAOx dráha se vyskytuje v podstatě jen u brukvovitých (Quittenden *et al.*, 2009; Sugawara *et al.*, 2009). Enzymy cytochrom P450 monooxygenasy CYP79B2 a CYP79B3



Obr. 5 Biosyntetické dráhy vedoucí k tvorbě indol-3-octové kyseliny. Plnou šipkou jsou vyznačeny dráhy, u nichž jsou identifikovány příslušné enzymy, které je katalyzují. Přerušované šipky naznačují dráhy, jejichž enzymy zatím identifikovány nejsou; mohou zahrnovat i více kroků. CYP79B2 a CYP79B3 – enzymy patřící mezi cytochrom P450 monoxygenasy, TAA – tryptofanaminotransferasa, NIT – nitrolasa, AMI1 – amidasa, YUCCA – enzymy patřící mezi flavinmonoxygenasy (podle Korasick *et al.*, 2013).

(EC 1.14.13.125) převádějí tryptofan na indol-3-acetaldoxim. IAOx je poté převážně použit pro tvorbu obranných látek, jako jsou glukosinoláty (Bak *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Mikkelsen *et al.*, 2004), a jen jeho malá část je převedena na IAA (Zhao *et al.*,

2002; Sugawara *et al.*, 2009). Tato přeměna je uskutečněna přes indol-3-acetonitril (IAN) nebo přes indol-3-acetamid (IAM). Převedení IAOx na IAN zajišťuje pravděpodobně enzym CYP71A13 (EC 4.99.1.6) (Nafisi *et al.*, 2007). IAN je pak převeden na IAA pomocí nitrolas (NIT, EC 3.5.5.1) (Bartling *et al.*, 1992; Bartling *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2003).

V IAM dráze však může tento prekursor vznikat i nezávisle na IAOx z jiných prekursorů (Sugawara *et al.*, 2009). IAM je poté převeden na IAA pomocí enzymu amidasa (AMI1, EC 3.5.1.4) (Pollmann *et al.*, 2003).

Dalším předpokládaným auxinovým prekursorem a intermediátem je indol-3-acetaldehyd (IAAld) (Seo *et al.* 1998) a je možné, že je v rostlinách převáděn přímo na IAA (Korasick *et al.* 2013). Enzymy, které tyto přeměny zajišťují, však stále nejsou známy.

Při analýze *trp* mutantů *Arabidopsis* a kukuřice auxotrofních na tryptofan bylo zjištěno, že v mutovaných rostlinách nedošlo ke změně hladiny IAA oproti wild typu, což ukazuje, že IAA může být syntetizována i na tryptofanu nezávislou drahou (Wright *et al.*, 1991; Normanly *et al.*, 1993). O potenciálních intermediátech této dráhy je toho však známo jen málo a zatím nebyly identifikovány žádné geny, které by se této dráhy účastnily. Předpokládá se, že prekursorů této dráhy jsou indol a indol-3-glycerolfosfát (Ouyang *et al.*, 2000).

Kromě *de novo* biosyntézy může být volná IAA získána z inaktivního prekursoru indol-3-máselné kyseliny (IBA), methylesteru IAA nebo hydrolýzou z inaktivních zásobních forem, jako jsou konjugáty IAA s aminokyselinami nebo glukosou (Korasick *et al.* 2013).

2.2.2 Transport auxinů

Transport auxinů je zprostředkován specializovanými transportéry. Vylučování auxinu z buňky je zprostředkováno rodinami PIN proteinů a ABCB (ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B) proteinů, zatímco příjem IAA do buňky umožňují členové skupiny AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 transportérů (AUX1/LAX) (Peer *et al.*, 2011).

Členové rodiny AUX1/LAX se podobají aminokyselinovým permeasám. Jsou to H⁺ symportéry a vyskytují se v plasmatické membráně. Patří sem proteiny AUX1, LAX1, LAX2 a LAX3 (Swarup *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Na základě rozmanitých fenotypů

mutantů defektních v jednotlivých členech AUX1/LAX rodiny bylo prokázáno, že každý z těchto transportérů má jinou roli. Aktivita AUX1 je nutná pro gravitropismus (Bennett *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 1999), vývin kořenových vlásků (Grebe *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2009) a apikálního háčku (Vandenbussche *et al.*, 2010), a také pro fylotaxi (Reinhardt *et al.*, 2003; Bainbridge *et al.*, 2008). LAX3 hraje roli při vzniku postranních kořenů a vývinu apikálního háčku (Swarup *et al.*, 2008; Vandenbussche *et al.*, 2010). LAX1 a LAX2 regulují fylotaxi (Bainbridge *et al.* 2008) a LAX2 také reguluje diferenciaci cévních svazků v dělohách (Péret *et al.*, 2012). Všechny tyto auxinové transportéry jsou nezbytné pro polární transport auxinů a hrají roli v různých aspektech rostlinného vývoje.

Členové rodin PIN a ABCB proteinů zprostředkovávají vylučování auxinu ven z buňky. PIN proteiny jsou transportéry, které jsou řízeny auxinovým gradientem, a vyskytují se pouze u rostlin. Do skupiny *Arabidopsis* PIN proteinů se řadí 8 členů, a ty jsou rozděleny do dvou kategorií – dlouhé („long“) a krátké („short“) PIN proteiny.

Dlouhé PIN proteiny zahrnují PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 a PIN7. Tyto proteiny jsou lokalizovány na plasmatické membráně a všechny zajišťují polární transport IAA (Friml *et al.*, 2002a; Friml *et al.*, 2002b; Petrášek *et al.*, 2006). Každý z těchto proteinů však vykazuje specifickou a odlišnou lokalizaci v rostlině. Specifické umístění a polární lokalizace těchto proteinů jsou důležité pro rozdílnou distribuci auxinů, díky čemuž jsou regulovány různé aspekty vývoje rostlin (Zažímalová *et al.*, 2010).

Naproti tomu krátké PIN proteiny PIN5, PIN6 a PIN8 jsou lokalizovány na endoplasmatickém retikulu (ER), kde zajišťují transport IAA z cytoplasmy do ER (Mravec *et al.*, 2009; Dal Bosco *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2012; Sawchuk *et al.*, 2013). Zatím není známo, že by transport auxinů do ER nějak ovlivňoval růst rostliny, ale zdá se, že slouží k úpravě koncentrace IAA v cytoplasmě (Enders and Strader, 2015). Kromě výše uvedených krátkých PIN proteinů, PIN-LIKES (PILS) proteiny také zajišťují příjem auxinu do ER a mohou hrát roli v regulaci obsahu volného auxinu a jeho konjugátů s aminokyselinami v cytoplasmě (Barbez *et al.*, 2012).

Také některé ABCB transportéry jsou nutné pro vylučování auxinů, jsou to ABCB1, ABCB4, ABCB19 a ABCB21 (Remy and Duque, 2014). ABCB4 a ABCB21 dokonce mohou přepínat svou funkci v závislosti na vnitřní koncentraci auxinu, a tedy auxin do buňky přijímat, jsou-li jeho koncentrace v cytoplasmě nízké, nebo ho z ní vylučovat

při vyšších koncentracích auxinu (Yang and Murphy, 2009; Kamimoto *et al.*, 2012; Kubeš *et al.*, 2012).

2.2.3 Percepce a transdukce auxinového signálu

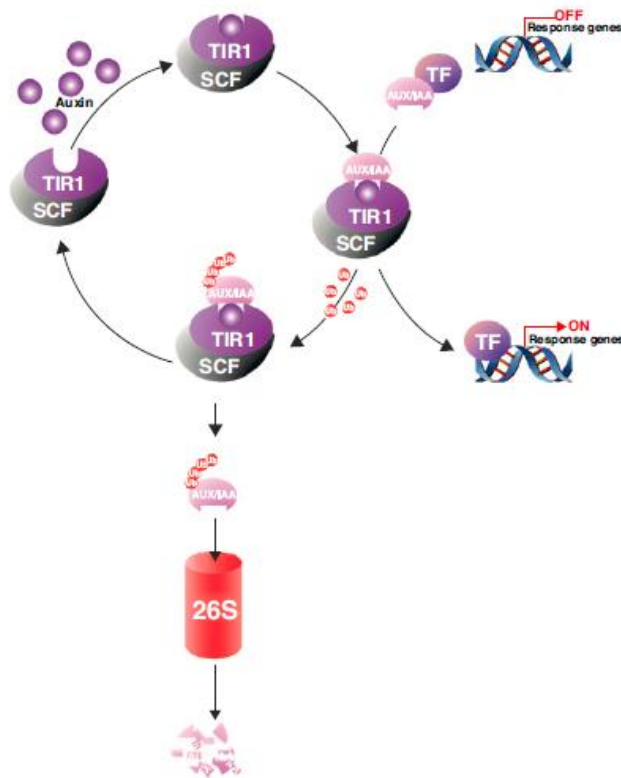
Aby byla spuštěna biologická odpověď, rostlina musí být schopna vnímat auxin a převést ho na signál. V současné době jsou známy tři nezávislé auxinové receptory a jejich signální systémy. Rozmanitost ve způsobech vnímání auxinu je pravděpodobně klíčovým faktorem veliké pestrosti způsobů, jakými rostlina na auxin reaguje.

2.2.3.1 TIR1/AFB

První receptor, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1/AFB), je z rodiny F-box proteinů (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski and Leyser, 2005). Je součástí komplexu Skp1-Cullin-F-box (SCF) E3 ubiquitinligasy (Ruegger *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 1999). Po navázání auxinu na TIR1 je tento receptor schopen interagovat s rodinou proteinů AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) (Obr. 6). Interakce TIR1 s Aux/IAA spouští ubiquitinilaci proteinu Aux/IAA, čímž je tento protein označen pro degradaci v 26S proteasomu (Sauer *et al.*, 2013).

Pokud jsou koncentrace auxinu nízké nebo není auxin přítomen vůbec, proteiny Aux/IAA se váží na transkripční faktory z rodiny AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), a tím potlačují jejich aktivitu (Chapman and Estelle, 2009). Při vzrůstu koncentrace auxinů dojde k navázání TIR1 na Aux/IAA, který je následně ubiquitinilován a degradován, což vede k uvolnění transkripčních faktorů ARF, které tak mohou indukovat transkripci genů odpovídajících na auxinový signál (Zenser *et al.*, 2001; Dreher *et al.*, 2006).

Tento systém je však mnohem komplexnější, než by se na první pohled mohlo zdát. Jednotlivé komponenty této signální dráhy zahrnují velké proteinové rodiny. *Arabidopsis* má pět homologů TIR1, které se označují AFB1 – AFB5. Všechny AFB proteiny váží auxin, liší se však afinitou k němu (Calderón-Villalobos *et al.*, 2012). Rodina proteinů Aux/IAA má 29 členů. Všechny jsou tvořeny čtyřmi doménami, označovanými I – IV. Doména II se přímo účastní interakce s TIR1 – molekula auxinu se naváže na auxinové vazebné místo proteinu TIR1 a doména II proteinu Aux/IAA interaguje s auxinem i s TIR1 proteinem, čímž se vytvoří struktura, kdy je auxin „chycen“ mezi těmito dvěma proteiny (Tan *et al.*, 2007). Protože se Aux/IAA přímo podílí na interakci receptor-ligand,



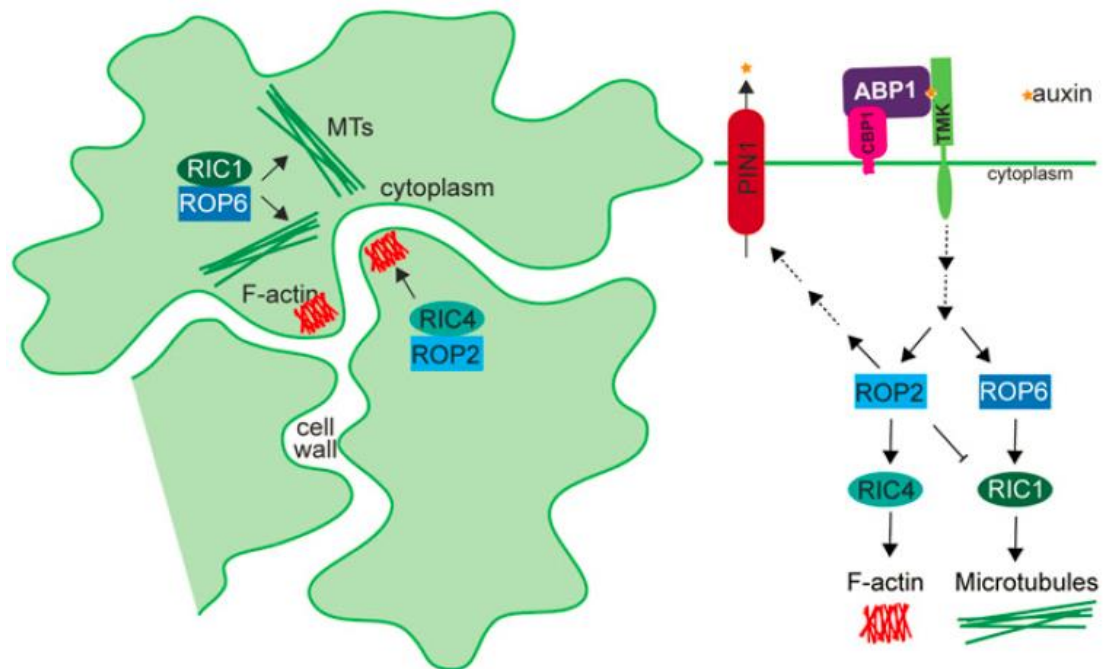
Obr. 6 Schéma auxinové signální dráhy TIR1/AFB. Auxin se váže na receptor TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1), který je součástí SCF (komplex Skp1-Cullin-F-box E3 ubiquitinligasy). Díky tomu se na TIR1 může navázat protein Aux/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID), který je jinak vázaný na TF (transkripční faktory včetně ARF – AUXIN RESPONSE FACTOR). Aux/IAA je označen ubiquitinem (symbolizován malými červenými kolečky) a degradován v 26S proteasomu. Uvolněné TF se mohou vázat na DNA a spustit transkripci genů reagujících na auxinový signál (Shan *et al.*, 2011, upraveno).

jsou tyto dva proteiny považovány za auxinový ko-receptor. Vazebná místa pro auxin obou těchto proteinů (TIR/AFB a Aux/IAA) nejsou striktně konzervována, což dává možnost vzniku různých kombinací TIR/AFB-Aux/IAA ko-receptorových párů s různými afinitami jak k sobě, tak k auxinu (Sauer *et al.*, 2013). Tato variabilita umožňuje rostlině doladit auxinovou odezvu v závislosti na konkrétním páru proteinů Aux/IAA a TIR/AFB, a také na typu auxinu přítomného v buňce. Je to také pravděpodobně důvod toho, proč je auxin schopen regulovat tolik různých odpovědí rostliny a odlišné aspekty rostlinného vývoje (Enders and Strader, 2015). Další úrovní komplexity tohoto systému je represe transkripčních faktorů ARF proteiny Aux/IAA. *Arabidopsis* má 23 transkripčních faktorů ARF s konzervovanou doménou, která umožňuje vazbu na proteiny Aux/IAA. Pět z nich aktivuje transkripci, zatímco ostatní ARF s nimi soutěží o navázání na *cis*-element genu regulovaného auxiny, a tím jim brání v aktivaci transkripce, což dává další možnosti regulace této dráhy (Guilfoyle and Hagen, 2007; Sauer *et al.*, 2013).

2.2.3.2 ABP1

ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN1) je nejdéle známý auxinový receptor. Ačkoli je tento protein z větší části lokalizován na ER, v určité míře je přes plasmatickou membránu sekretován do extracelulárního prostoru, kde působí jako auxinový receptor. Jeho afinita k auxinu se liší v závislosti na pH. Nejsilnější je ve slabě kyselém pH o hodnotě přibližně 5,5, což je i pH extracelulárního prostoru. Naopak při pH lumenu endoplasmatického retikula o hodnotě 7,0 je afinita ABP1 k auxinu prakticky nulová (Tian *et al.*, 1995).

ABP1 je ukotven v plasmatické membráně interakcí s C-TERMINAL PEPTIDE-BINDING PROTEIN1 (CBP1, Obr. 7) (Shimomura, 2006) a při působení auxinového signálu interaguje s TRANSMEMBRANE KINASE (TMK) proteiny (Xu *et al.*, 2014). Tyto TMK kinasy jsou podobné receptoru a pravděpodobně slouží k přenosu ABP1 signálu. ABP1 a auxin zodpovídají za aktivaci dvou antagonistických RHO-LIKE



Obr. 7 Schéma auxinové signální dráhy ABP1. Extracelulárně lokalizovaný receptor ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN1), ukotvený v membráně pomocí CBP1 (C-TERMINAL PEPTIDE-BINDING PROTEIN1), interaguje s TMK (TRANSMEMBRANE KINASE) za účasti auxinu. Tím dochází k aktivaci dvou ROP (RHO-LIKE GTPASES OF PLANTS) a následně dvou RIC (ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN). V epidermálních dlaždicovitých buňkách děložních listů *Arabidopsis* regulují ROP2 a RIC4 polymerizaci aktinu a dochází tak k formování laloků, a také ovlivňují lokalizaci PIN proteinů. Naproti tomu ROP6 a RIC1 regulují polymerizaci mikrotubulů, čímž dochází k zúžení a tvorbě vroubků na povrchu buněk. Výsledkem je morfologie buněk připomínající puzzle (Enders and Strader, 2016).

GTPASES OF PLANTS (ROP), ROP2 a ROP6. Ty jsou zapojeny při reorganizaci cytoskeletu prostřednictvím efektorů RIC4 a RIC1 (ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN), čímž dochází ke změnám tvarů buněk a formování laloků (Xu *et al.*, 2010). Také se účastní regulace klathrinem zprostředkované endocytosy, čímž následně ovlivňují distribuci PIN proteinů (Shi and Yang, 2011). Kroky mezi navázáním auxinu na ABP1, aktivitou TMK a aktivací ROP však zatím stále nejsou objasněny.

Díky této dráze je umožněno mnoho auxinových odpovědí, které se objevují příliš rychle na to, aby byly výsledkem dráhy TIR1, která probíhá na transkripční úrovni. Mezi tyto odpovědi patří změny v lokalizaci PIN proteinů, změny toku iontů a rozpínání buněk (Sauer and Kleine-Vehn, 2011).

2.2.3.3 SKP2A

SCF^{SKP2} E3 ubiquitinligasový komplex hraje důležitou roli při degradaci faktorů buněčného cyklu u savců (Carrano *et al.*, 1999; Tsvetkov *et al.*, 1999). V *Arabidopsis* se vyskytuje ortholog proteinu SKP2, S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A). Tento protein taktéž reguluje buněčný cyklus, a je zapojen při degradaci nejméně dvou faktorů buněčného cyklu, a to faktoru DBP a E2FC (Del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že auxin je schopen vázat se přímo a specificky na SKP2A. Pomocí strukturního modelování za použití TIR1 jako templátu bylo identifikováno jeho vazebné místo pro auxin. Mutanti proteinu SKP2A s pozměněnými aminokyselinami v tomto vazebném místě měli sníženou schopnost vázat auxin. Také byla zrušena biologická aktivita SKP2A proteinu, takže nebyl schopen degradovat DBP ani E2FC. Dále bylo zjištěno, že v nepřítomnosti auxinu spolu SKP2A a DPB interagují velmi málo, zatímco v přítomnosti auxinu se tato interakce významně zvýšila. Tyto výsledky ukazují, že interakce SKP2A s faktory DPB a E2FC probíhá přes auxinové vazebné místo (Jurado *et al.*, 2010).

SKP2A je degradován ubiquitin-proteasomovým systémem (UPS). Auxin přitom působí jako signální molekula, která tuto degradaci spouští. Není však známo, jestli je SKP2A degradován mechanismem autoubiquitinilace nebo prostřednictvím procesu závislého na E3 ubiquitinligase. Je zajímavé, že přítomnost auxinu podporuje degradaci faktorů buněčného cyklu, ale také podněcuje proteolýzu SKP2A. Je možné, že degradaci SKP2A je bráněno jeho nadměrné funkci (Del Pozo *et al.*, 2006; Jurado *et al.*, 2010).

Ačkoli signalizace SKP2A není zatím tak detailně prozkoumaná jako dráha TIR1/AFB, vypadá to, že SKP2A vyhovuje základním požadavkům, které musí splňovat auxinový receptor (Sauer *et al.*, 2013).

Kontrola buněčného cyklu je řízena přesně načasovanou degradací klíčových regulátorů. Dráha SKP2A vede k degradaci některých těchto regulátorů, což ukazuje, že auxin alespoň částečně prostřednictvím této dráhy reguluje buněčné dělení (Sauer *et al.*, 2013).

2.2.4 Auxiny ve fytopatogenních organismech

Biosyntéza auxinů se může podílet na vzniku symptomů některých onemocnění rostlin, ale stejně tak jsou auxiny nutné pro správný vývoj rostliny a její orientace v životním prostředí. Patogen může zneužít biosyntetický systém rostliny nebo může auxiny tvořit sám. Například půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* má geny pro tvorbu auxinů i cytokininů. Těmito geny transformuje rostlinné pletivo, což způsobuje vznik tumorů (Zupan and Zambryski, 1995). I další s rostlinami interagující bakterie, které ale netransformují svého hostitele, jsou schopny syntetizovat IAA různými drahami (Spaepen *et al.*, 2007).

Jiným příkladem je nádorové onemocnění, které způsobuje obligátně biotrofní prvok *Plasmodiophora brassicae* u čeledi brukvovitých. Při tomto onemocnění dochází taktéž ke zvýšení hladiny auxinů; ty jsou však produkovány rostlinou (Ludwig-Müller *et al.*, 2009). Naproti tomu houba *Ustilago maydis*, která způsobuje chorobu kukuřice (smut disease), je schopna produkovat auxiny sama o sobě. Zapojení auxinů při rozvoji nemoci však zatím nebylo jednoznačně prokázáno (Basse *et al.*, 1996; Guevara-Lara *et al.*, 2000; Reineke *et al.*, 2008). Houby z rodu *Taphrina*, které způsobují hypertrofii švestek nebo deformaci listů u broskvoní, jsou taktéž schopny syntetizovat auxiny. I při tomto onemocnění mohou být auxiny zapojeny v rozvoji symptomů (Bassi *et al.*, 1984; Yamada *et al.*, 1990). Dráha pro biosyntézu auxinů byla nalezena i v houbě *Fusarium proliferatum*, ovšem efekt tvorby auxinů na schopnost kolonizovat rostlinu testován nebyl (Tsavelkova *et al.*, 2012). I když rostliny mají způsoby, jak regulovat hladinu auxinů v daném pletivu (Ludwig-Müller, 2011), zdá se, že ve výše zmíněných případech tento systém selhává.

Některé hemibiotrofní a nekrotrofní houby také produkují IAA. Například hemibiotrofní houba *Magnaporthe oryzae*, která způsobuje plísňové onemocnění rýže, produkuje během biotrofní fáze malé množství auxinů. IAA se vyskytuje v infekčních

hyfách, které prorůstají pletivem rýže (Tanaka *et al.*, 2011). U dvou druhů rodu *Colletotrichum*, *C. acutatum* a *C. gloeosporioides*, byla biosyntéza auxinů také pozorována (Chung *et al.*, 2003; Maor *et al.*, 2004). Účelem biosyntézy auxinů může být udržení rostliny v růstové fázi, kdy je houba závislá na živinách z hostitelské rostliny, zatímco v nekrotrofní fázi, která se objevuje později, už patogen živou rostlinu nepotřebuje (Ludwig-Müller, 2015).

Zajímavá je také funkce IAA-Asp, konjugátu IAA s aminokyselinou aspartátem. Takto konjugovaná IAA v rostlinách je určena pro ireversibilní degradaci auxinu (Ludwig-Müller, 2011). Bylo však prokázáno, že IAA-Asp může napomáhat rozvoji rostlinného onemocnění. Při infekci *Arabidopsis thaliana* dvěma patogeny, houbou *Botrytis cinerea* a bakterií *Pseudomonas syringae*, byl obsah IAA-Asp v rostlině zvýšený. Přídavek IAA-Asp také zvýšil citlivost rostliny vůči onemocnění, takže se stala náchylnější. IAA-Asp navíc napomáhá rozvoji patogenu tím, že v rostlině reguluje transkripci genů, které souvisí s virulencí (González-Lamothe *et al.*, 2012). To ukazuje, že tento auxinový konjugát je induktorem pro rozvoj onemocnění v rostlinách.

Auxiny jsou produkovány nejen houbami, které interagují s rostlinami, ale i mnoho dalších druhů hub má schopnost auxiny tvořit a vylučovat, což naznačuje, že tyto hormony mohou mít endogenní roli v houbách samotných (Gruen, 1959; Ulrich, 1960). Ošetření auxinem podporuje prodlužování buněk a sporulaci v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a *S. ellipsoideus* (Kamisaka *et al.*, 1967; Yanagishima, 1965). U kvasinek *S. cerevisiae* a *Candida albicans* auxin spouští změnu morfologie – indukuje hyfální růst, což je známý rys virulence (Rao *et al.*, 2010). IAA také podporuje klíčení spor u vláknité houby *Neurospora crassa* (Nakamura *et al.*, 1978, 1982), kdežto u patogenu rajčat *Fusarium oxysporum lycopersici* klíčení spor redukuje (Sharaf and Farrag, 2004). Efekt auxinu může být závislý i na koncentraci. V případě houby *Fusarium delphinoides*, patogenu cizrny, zvýšily nízké koncentrace exogenně dodaného auxinu růst houby, kdežto vyšší koncentrace auxinu růst snížily (Kulkarni *et al.*, 2013). Účinek auxinu na fyziologii hub tedy může být specifický pro každý organismus.

2.3 Cytokininy

Další významnou skupinou rostlinných hormonů jsou cytokininy (CK). CK hrají důležitou roli v regulaci proliferace a diferenciaci rostlinných buněk, a také řídí rozličné procesy během růstu a vývoje rostlin, jako jsou oddálení senescence (Gan and Amasino, 1995), rovnováha mezi vývojem nadzemní a podzemní části rostliny (Werner *et al.*, 2001;

Werner *et al.*, 2003), transdukce nutričních signálů (Samuelson and Larsson, 1993; Takei *et al.*, 2001a; Sakakibara, 2005) a zvýšení produktivity plodin (Ashikari *et al.*, 2005).

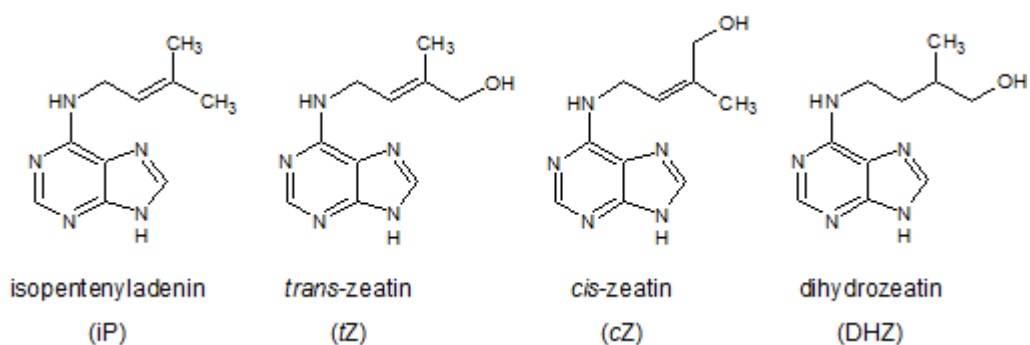
Po chemické stránce jsou to deriváty adeninu, které jsou substituované postranním řetězcem v N^6 poloze. Podle povahy postranního řetězce je můžeme rozdělit na isoprenoidní a aromatické. Mezi isoprenoidní CK patří isopentenyladenin (iP), *cis*- a *trans*-zeatin (*cZ* resp. *tZ*) a dihydrozeatin (DHZ) (Obr. 8). K aromatickým CK se řadí benzyladenin, *ortho*- a *meta*-topolin. Cytokininy se v buňkách mohou vyskytovat jako volné báze, které jsou biologicky aktivní, nebo také ve formě nukleosidů, nukleotidů, *O*-glukosidů a *N*-glukosidů, které slouží hlavně jako zásobní nebo transportní formy (Sakakibara, 2006).

Hladina aktivních CK v rostlinách je regulována pomocí *de novo* syntézy, vzájemných přeměn cytokininů, dočasné inaktivace konjugací, transportu a degradace.

2.3.1 Biosyntéza cytokininů v *Claviceps purpurea*

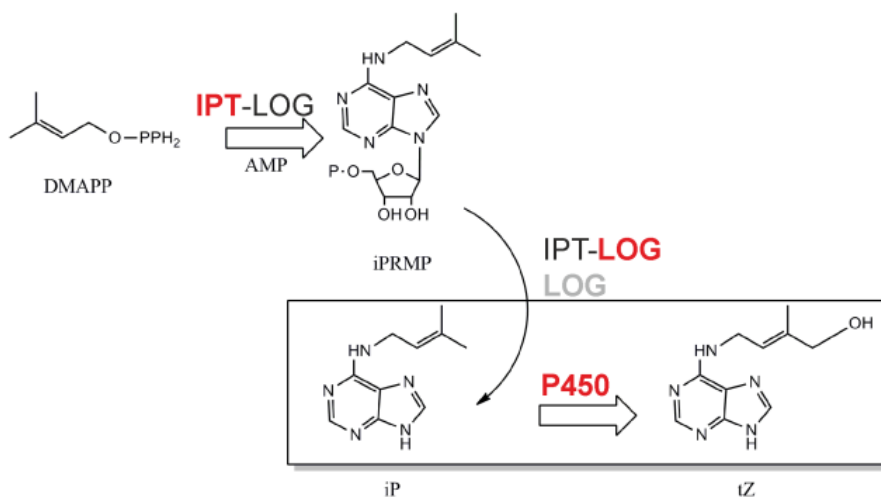
Cytokininy nejsou syntetizovány pouze rostlinami, také některé bakterie a houby interagující s rostlinami jsou schopny jejich produkce (Murphy *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2013; Hinsch *et al.*, 2015). *C. purpurea* je prvním houbovým organismem, u kterého byly popsány jednotlivé geny a enzymy, které jsou při biosyntéze CK zapojeny (Hinsch *et al.*, 2015; Hinsch *et al.*, 2016).

Biosyntéza cytokininů v houbě *C. purpurea* probíhá dvěma způsoby – buď *de novo* biosyntézou nebo degradací tRNA (Obr. 9). První dráha začíná z prekursorů AMP a dimethylallyldifosfátu (DMAPP), kdy je isoprenoidní řetězec DMAPP připojen na pozici N^6 adeninu, a vzniká tak isopentenyladenosinmonofosfát (iPRMP) (Hinsch *et al.*, 2015). V rostlinách je tato reakce katalyzována enzymem isopentenyltransferasou (IPT; EC 2.5.1.112) (Takei *et al.*, 2001b; Kakimoto, 2001). *C. purpurea* také obsahuje enzym s IPT doménou, enzym CpIPT-LOG. Zvláštností tohoto enzymu je, že má dvě funkční

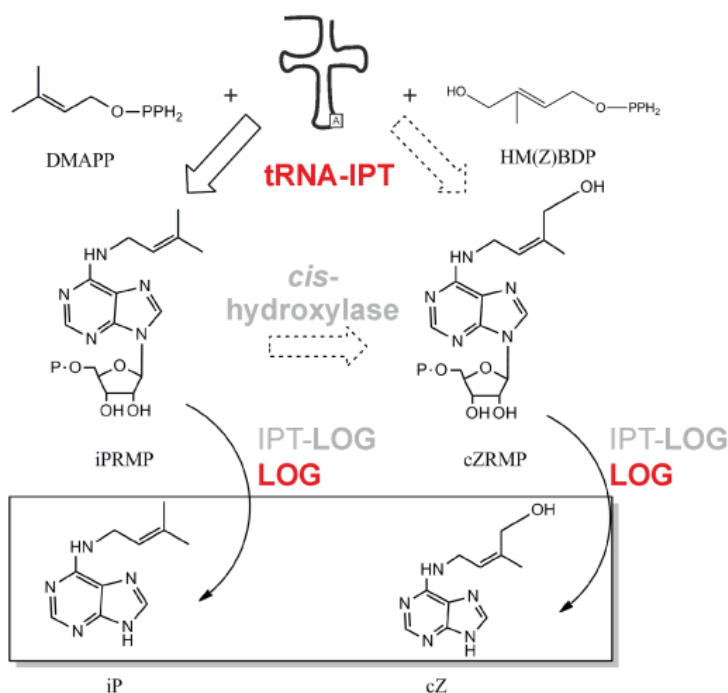


Obr. 8 Struktura isoprenoidních cytokininů.

A



B



Obr. 9 Biosyntetická dráha cytokininů v houbě *Claviceps purpurea*. Červenou barvou jsou vyznačeny enzymy, u kterých je prokázáno, že danou přeměnu katalyzují. Šedou barvou jsou značeny enzymy, které při dané přeměně mohou být zapojeny, ovšem zatím potvrzeny nejsou. Plné šipky popisují již známé reakce, šipky znázorněné přerušovanou čarou naznačují hypotetické přeměny, které zatím nejsou potvrzeny. (A) *De novo* biosyntéza cytokininů. IPT (isopentenyltransferasová) doména bifunkčního enzymu IPT-LOG přenáší DMAPP (dimethylallyldifosfát) na AMP (adenosinmonofosfát) za vzniku iPRMP (isopentenyladenosinmonofosfát). Volná báze cytokininu je uvolněna LOG (Lonely guy, enzym s fosforibohydrolasvou aktivitou) doménou enzymu IPT-LOG, čímž vzniká isopentenyladenin. Ten může být převeden na *trans*-zeatin pomocí enzymu cytochrom P450 monooxygenasa. (B) Biosyntéza cytokininů z tRNA. Enzym tRNA-IPT (tRNA-isopentenyltransferasa) přenáší DMAPP resp. HM(Z)BDP (hydroxymethylbutenyldifosfát) na adeninovou bázi v tRNA, vzniká iPRMP resp. cZRMP (*cis*-zeatinribosid). Volná báze cytokininu je poté uvolněna pomocí enzymu LOG a vzniká iP resp. cZ (*cis*-zeatin) (Hinsch *et al.*, 2015).

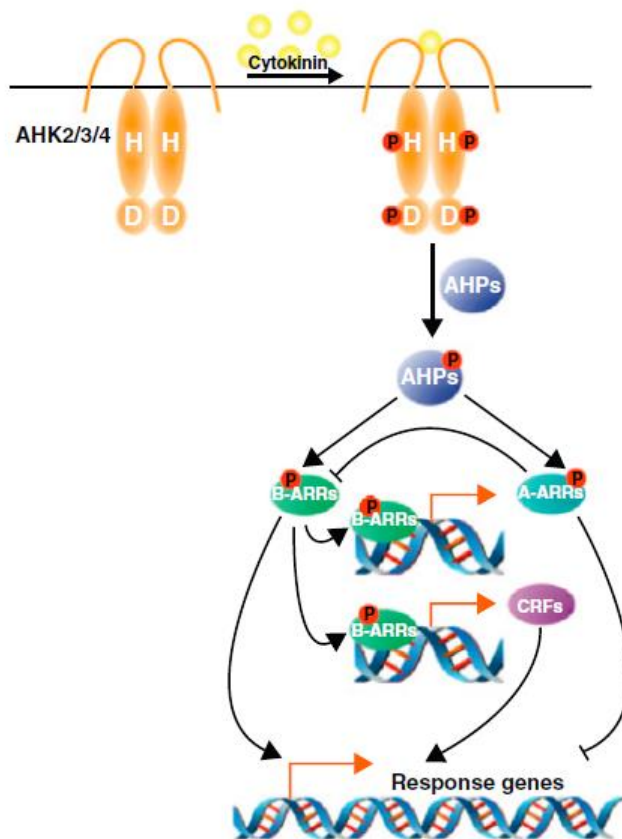
domény, a to IPT doménu na C-konci a LOG doménu na N-terminální části proteinu, proto je označován za bifunkční enzym. LOG doména tohoto enzymu („Lonely guy“) má fosforibohydrolasovou aktivitu. Po vytvoření iPRMP z něj odštěpí volnou bázi a vzniká tak isopentenyladenin. BLASTp analýzou bylo zjištěno, že gen *cipt-log* pro tento bifunkční enzym je konzervován pouze u rodů *Clavicipitaceae* a *Fusaria* a překvapivě byla IPT-LOG sekvence nalezena i v genomu patogenního kmene *Rhodococcus fascians* A21d2 (Creason *et al.*, 2014). iP může být dále přeměněn hydroxylací na isoprenoidním řetězci na *trans*-zeatin. Tuto přeměnu zajišťuje enzym cytochrom P450 monooxygenasa. Gen pro tento enzym, *cpp450*, tvoří spolu s genem *cipt-log* v genomech hub malý klastr (Hinsch *et al.*, 2015).

Druhá dráha vzniku cytokininů má počátek v tRNA, kdy je na adeninovou bázi v RNA řetězci připojen DMAPP za vzniku iPRMP nebo hydroxymethylbutenyldifosfát (HM(Z)BDP) za vzniku cZRMP. Reakce je katalyzována tRNA isopentenyltransferasou (tRNA-IPT; EC 2.5.1.75). Degradací tRNA jsou pak nukleotidy cytokininů uvolněny. Aktivní volná báze isopentenyladeninu je poté uvolněna enzymem CpLOG, popř. LOG doménou enzymu CpIPT-LOG (Hinsch *et al.*, 2015; Hinsch *et al.*, 2016).

U rostlin jsou předpokládány i další enzymy vzájemné přeměny cytokininů, a to enzym, který redukuje *trans*-zeatin na dihydrozeatin (zeatinreduktasa), a také enzym převádějící *trans*-zeatin na jeho *cis*-formu a naopak (zeatin-*cis-trans*-isomerasa) (Bassil *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1989). U houby *C. purpurea* byly tyto konverze mezi cytokininy také prokázány (Hloušková, 2015), takže je pravděpodobné, že oba enzymy náleží do metabolické dráhy tvorby a vzájemných přeměn cytokininů i v této houbě.

2.3.2 Percepce a transdukce cytokininového signálu

Cytokininový signál je předáván dvousložkovým signálním systémem, který se nazývá His-Asp fosfátový přenos. Cytokinin je vnímán receptory HISTIDINE KINASE (HK) (Obr. 10) (Inoue *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2004). Ty jsou u *Arabidopsis* lokalizovány převážně na endoplasmatickém retikulu (Wulfetange *et al.*, 2011). Cytokinin se naváže na CHASE (Cyclases/Histidine Kinases-Associated Sensing Extracellular) doménu (Mougel and Zhulin, 2001) histidin-kinasového receptoru, což vede k autofosforylaci receptoru. Ten následně vyvolá fosforylaci HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER (HP) proteinů v cytoplasmě (To and Kieber, 2008; Kieber and Schall, 2010). HP proteinů je v genomu *Arabidopsis* 5 a jsou lokalizovány jak v jádře, tak v cytosolu; změna jejich



Obr. 10 Schéma cytokininové signální dráhy. Cytokinin je vnímán receptory AHK2/3/4 (*ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE*), které se po navázání cytokininu autofosforylují. To vede k fosforylaci AHPs (*ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS*), které následně fosforylují ARRy (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS*) v jádře. ARR typu B aktivují další geny včetně CRFs (*CYTOKININ RESPONSE FACTORS*) a ARR typu A, které zpětně inhibují ARR typu B (Shan *et al.*, 2011).

lokalizace je řízena aktivním transportem (Punwani *et al.*, 2010). HP proteiny fungují jako pozitivní regulátory cytokininové dráhy. V jádře přenáší tyto fosforylované proteiny fosfát na třídu transkripčních faktorů CYTOKININ RESPONSE REGULATORS (RRs) typu A i B. Fosforylované RR typu B pak mohou aktivovat další geny, které podléhají jejich downstreamové, cytokininy regulované dráze. Mezi tyto geny patří RR typu A, a také CYTOKININ RESPONSE FACTORS (CRF), které jsou potřebné pro regulaci odpovědi rostliny na cytokininy. Fosforylované RR typu A jsou negativní regulátory, které mohou následně potlačit RR typu B (To and Kieber, 2008; Kieber and Schall, 2010).

Výše uvedený systém percepce cytokininového signálu byl zkoumán a popsán u rostlin. Přestože na cytokininy reagují i některé bakterie a houby (Gogala, 1991; Chanclud *et al.*, 2016b; Hinsch *et al.*, 2015), nejsou u nich zatím známy receptory ani signální dráhy, které by při předávání cytokininového signálu byly zapojeny. Hlenka *Dictyostelium discoideum* je jediný známý eukaryotní organismus, který kromě rostlin

kóduje protein histidin-kinasu obsahující CHASE doménu. Podle všeho používá isopentenyladenin a jeho 3-(3-amino-3-karboxypropyl) derivát discadenin k zahájení sporulace, což ukazuje, že je schopna vnímat cytokininový signál. Výše uvedené proteiny se nicméně na cytokininové signalizaci neúčastní (Anjard and Loomis, 2008).

2.3.3 Cytokininy ve fytopatogenních organismech

Během interakce rostliny s houbovým patogenem je obsah cytokininů v rostlině často ovlivněn (Devos *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2013). U mnoha různých druhů hub, ať už jsou to saprofyty, patogenní či symbiotické houby, byla prokázána schopnost produkovat cytokininy (Cooper and Ashby, 1998; Murphy *et al.*, 1997). Na rozdíl od biotrofních nebo hemibiotrofních hub, většina analyzovaných nekrotrofních hub není schopna produkce cytokininů, což ukazuje, že produkce a sekrece cytokininů houbou může záviset na jejím životním stylu (Chanclud *et al.*, 2016a). Cytokininy jsou zapojeny při mnoha onemocněních, kdy patogen indukuje tvorbu tumorů v hostitelské rostlině. Mezi takové patogeny patří například bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Barciszewski *et al.*, 2000) a *Rhodococcus fascians* (Petry *et al.*, 2009), a také houby *Ustilago maydis* (Mills and Staden, 1978) a *Claviceps purpurea* (Hinsch *et al.*, 2015). Obě biotrofní houby, *U. maydis* i *C. purpurea*, jsou schopny cytokininy samostatně syntetizovat (Stacey *et al.*, 2011; Hinsch *et al.*, 2015). Navíc, u dvojitého mutantu *C. purpurea* $\Delta\Delta$ ipt-log/tRNA-ipt, který nebyl schopen produkovat žádné cytokininy, byla pozorována vážně narušená schopnost virulence, což ukazuje, že cytokininy jsou pro interakci patogenu s rostlinou velmi důležité (Hinsch *et al.*, 2016). Mezi hemibiotrofní patogeny, které nevyvolávají tvorbu tumorů, ale taktéž produkují cytokininy, patří například houba *Pyrenopeziza brassicae* (Murphy *et al.*, 1997) a patogen rýže *Magnaporthe oryzae* (Jiang *et al.*, 2013). Při studiu interakce *M. oryzae* s rýží bylo zjištěno, že cytokininy, které tato houba produkuje, jsou potřebné pro celý průběh virulence tím, že tlumí obranný systém rýže a ovlivňují distribuci živin (Chanclud *et al.*, 2016b).

Předpokládá se také, že cytokininy mohou hrát roli v různých fyziologických procesech v houbách samotných, zejména při vývoji hyf a příjmu živin (LeJohn and Stevenson, 1973). Například podporují *in vivo* větvení ektomykorhizního mycelia (Barker and Tagu, 2000). V závislosti na dávce působí na viskozitu buněčných membrán u hyf, a tak ovlivňují transport vody a iontů (Gogala, 1991; LeJohn and Stevenson, 1973). Některé cytokininy také upravují obsah draslíku, vápníku, fosforu a sodíku v myceliu houby *Suillus variegatus* (Pohleven and Gogala, 1986; Gogala, 1991). Zdá se, že účinek

cytokininu na růst hyf závisí jak na koncentraci, tak i na typu použitého cytokininu (Gryndler *et al.*, 1998). Dále, exogenní i endogenní cytokininy jsou potřebné při toleranci vůči oxidativnímu stresu u houby *Magnaporthe oryzae* (Chanclud *et al.*, 2016b). V případě houby *C. purpurea* bylo zjištěno, že Δ cpp450 mutant vykazuje hypersporulující fenotyp, což naznačuje, že houba určitým způsobem vnímá cytokininový signál a reaguje na něj, takže cytokininy ovlivňují vývoj houby (Hinsch *et al.*, 2015).

2.4 Masivně paralelní sekvenování

Určení DNA sekvence je nejrozsáhlejší a nejdetailnější způsob, jak získat informace o genomu jakéhokoli živého organismu. Po několik desetiletí bylo pro určení DNA sekvence používáno Sangerovo sekvenování (Sanger *et al.*, 1997). Tato metoda využívá fluorescenčně značené terminační nukleotidy, jejichž sekvence je pak přečtena za použití elektroforesy. Díky Sangerově metodě byl v roce 1995 kompletně přečten první bakteriální genom, genom bakterie *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995). Také byl pomocí této metody přečten lidský genom, což trvalo více než 10 let (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

V posledních letech se rychle rozvíjí nová generace DNA sekvenování, což umožňuje jeho další použití v biologii a medicíně. Tyto metody jsou nazývány „masivně paralelní sekvenování“ nebo také „sekvenování druhé generace“. Jejich hlavní výhodou je, že oproti Sangerově metodě jsou schopny přečíst více molekul DNA naráz, což celkovou sekvenaci značně urychluje, a také se tím snižuje cena experimentu.

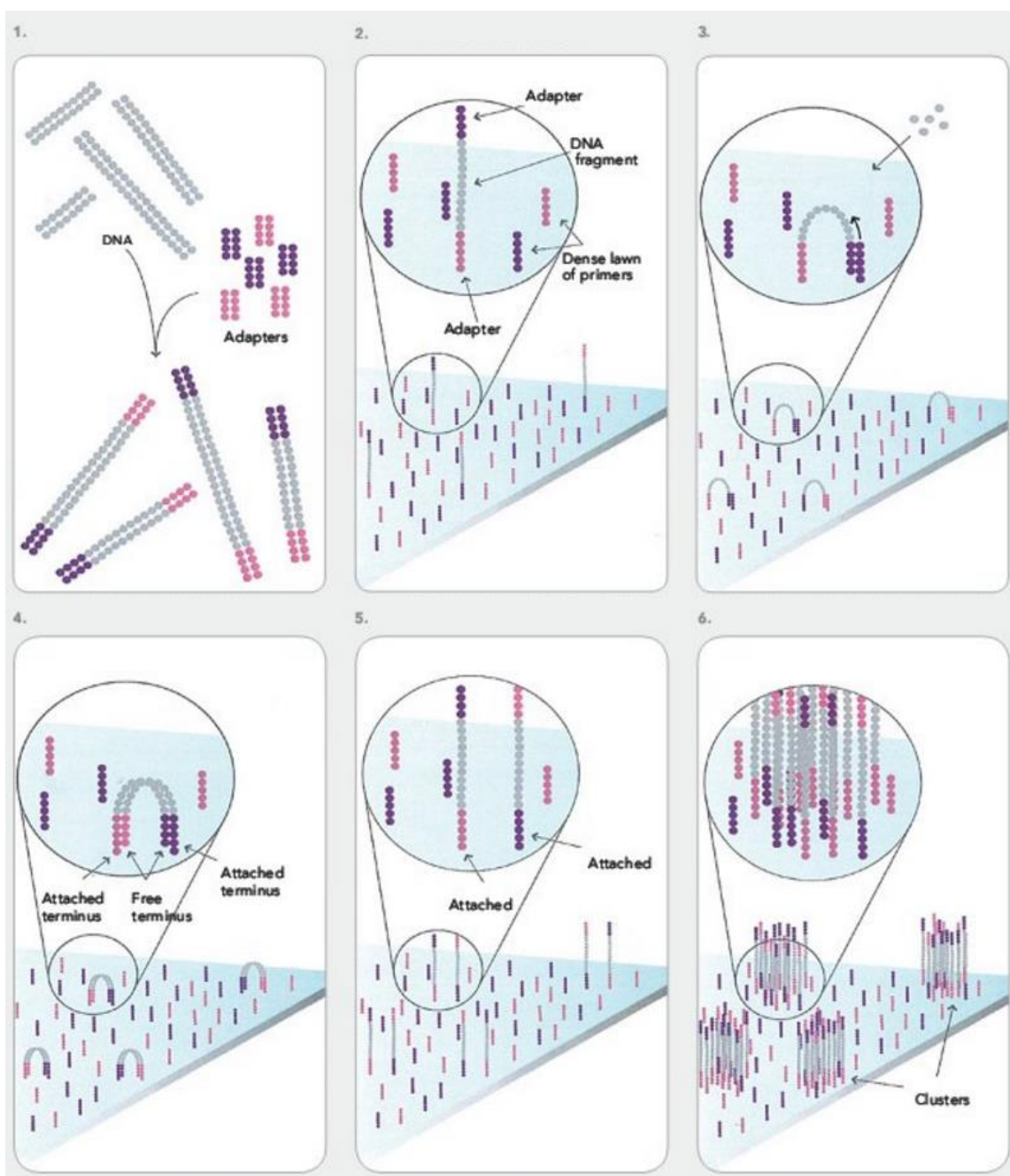
V současné době se v laboratořích běžně používají tři hlavní systémy. První systém, Genome Sequencer od firmy 454 Life Sciences (později získán společností Roche), je komerčně dostupný od roku 2005. Další systém, The Genome Analyzer, byl vytvořen firmou Solexa a dále vyvíjen firmou Illumina; na trh byl uveden v roce 2006. A od roku 2007 je dostupný systém SOLiD od firmy Applied Biosystems, která je nyní součástí Life Technologies. Všechny tyto technologie mají stejné klíčové kroky. DNA je napřed fragmentována na menší úseky, poté dochází k amplifikaci DNA templátu; ten je ukotven na pevný povrch a následně sekvenován. Z každého sekvenovaného fragmentu získáme jeden tzv. read (čtený úsek). Získané sekvence neboli ready procházejí kontrolou kvality. Posledním krokem je analýza dat.

Amplifikované fragmenty mohou být sekvenovány buď z jednoho (single-end) nebo z obou (paired-end) konců. Paired-end sekvenování umožňuje přesnější zarovnání

k referenčnímu genomu, pomáhá při řešení opakujících se sekvencí v genomu, a také přispívá k získání přesnějších výsledků při *de novo* sekvenování. Při sekvenaci za použití Illumina systému získáme ready stejné délky z obou konců sekvence. V případě SOLiD systému je druhý read o něco kratší. Systém 454 paired-end sekvenování nepodporuje.

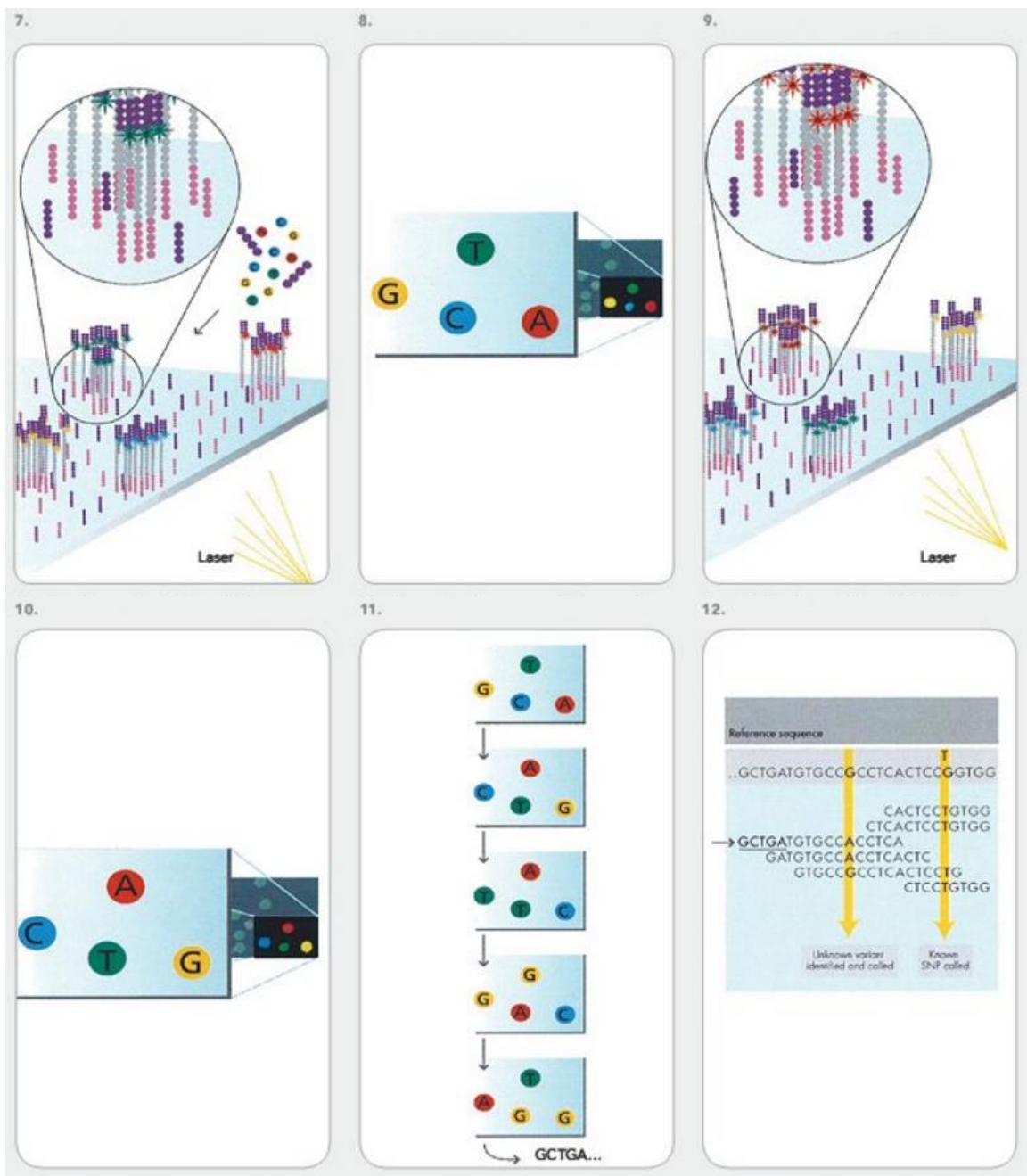
2.4.1 Princip sekvenace pomocí Illumina/Solexa

Princip sekvenace metodou Illumina/Solexa je znázorněn na Obr. 11 a 12. Prvním krokem při sekvenaci DNA je příprava fragmentační knihovny. DNA je naštěpena na menší úseky



Obr. 11 Princip sekvenace metodou Illumina/Solexa (zdroj: <http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>).

o velikosti menší než 800 bází, většinou pomocí sonifikace nebo nebulizace. Oba konce DNA fragmentů jsou zarovnány, fosforylovány, adenylvány na 3'-konci, a nakonec jsou na ně nalogovány specifické adaptory (1). Povrch reakční komůrky (flow cell, průtoková cely), ve které dochází k sekvenaci DNA, je hustě pokryt oligonukleotidovými sekvencemi, které jsou komplementární k sekvencím adaptorů (2). Hybridizací adaptorů s těmito sekvencemi dochází k uchycení denaturovaných DNA fragmentů na pevný povrch průtokové cely. Následně dochází k PCR. Oligonukleotidy na povrchu průtokové cely při tom slouží jako primery pro amplifikaci. Po vytvoření komplementárního vlákna,



Obr. 12 Princip sekvenace metodou Illumina/Solexa, pokračování.

kteře je kovalentně navázáno na adaptorovou sekvenci uchycenou k povrchu průtokové cely, dochází k denuraci dvouvláknové DNA a odmytí původního templátu (2). Nově syntetizované vlákno DNA poté hybridizuje svým volným koncem k adaptorovým primerům na povrchu průtokové cely, a dochází tak k ohnutí vlákna a vzniku můstku (3). Na tomto templátu proběhne nová PCR, čímž vzniká dvouvláknový můstek (4), proto je tato PCR označována jako můstková (bridge) PCR. DNA molekuly jsou opět denaturovány, čímž dochází k jejich linearizaci (5) a cyklus můstkové PCR se opakuje.

Po amplifikaci jsou DNA molekuly linearizovány a dochází k odštěpení a odmytí reversních řetězců. Na povrchu průtokové cely tak vznikají tzv. klastry. Každý klastř obsahuje cca 1000 identických kopií jednoho DNA fragmentu, díky čemuž je signál při následné sekvenaci dostatečně zesílen (6).

Systém Illumina je založen na sekvenaci syntézou. Do reakční komůrky je přidána polymerasa a fluorescenčně značené nukleotidy s inaktivovanou 3'-OH skupinou, což zajišťuje v každém cyklu začlenění jen jednoho nukleotidu ke každé molekule templátu (Bentley *et al.*, 2008). Každý nukleotid má jinou fluorescenční značku, takže všechny čtyři nukleotidy mohou být přidány ve stejnou dobu. Po začlenění nukleotidu do DNA řetězce (7) a zachycení fluorescenčního signálu CCD kamerou (8) jsou fluorescenční značky a terminační skupiny z nukleotidů odštěpeny, takže může proběhnout další sekvenační cyklus (9, 10).

Intenzity světelných signálů jsou poté převedeny na jednotlivé báze (11, 12). Každé bázi je také přiřazeno skóre, které je odhadem pravděpodobnosti chybného přiřazení báze. Po přiřazení bází jsou odfiltrovány ready, které vykazují smíšené signály nebo jiné chyby. Pro rozlišení problémů, které jsou způsobeny přístrojem či reagensy, od problémů se vzorkem slouží standardizovaná kontrolní DNA, která pochází z fága phiX. Kontrolní DNA je sekvenována při každém runu. Ready, které jsou z ní získány, jsou poté zarovnány k referenčnímu phiX genomu. Tím je zjištěna chybovost sekvenace, která je použita jako měřítko kvality daného runu (Berglund *et al.*, 2011).

2.4.2 Aplikace masivně paralelního sekvenování

Díky tomu, že jsou tyto techniky v současné době schopné poskytnout mnoho sekvenačních dat v relativně krátkém čase a za poměrně dostupnou cenu, nacházejí využití v mnoha oblastech. Lze je využít např. při genomovém sekvenování *de novo*, resekvenování celého genomu nebo určité jeho části pro objevování polymorfismů a mutací, při analýze transkriptomu a methylovaných oblastí v DNA. V praxi nacházejí

uplatnění při molekulární diagnostice dědičných chorob, infekčních onemocnění, v prenatální diagnostice, farmakogenomice, při molekulární diagnostice nádorů a jejich prognóze (Guan *et al.*, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

Claviceps purpurea kmen 20.1 (prof. Tudzynski; Universita v Muenstru, Německo)

Claviceps purpurea Δ *cpaec* (delece genu CPUR_08219, odpovídá proteinu CCE34287), ozn. jako Δ CpAEC (Mgr. Michaela Hradilová; Univesita Palackého v Olomouci, Česká republika)

3.2 Chemikálie

Acetonitril HPLC Plus: Sigma-Aldrich, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný: AppliChem, Německo

Dimethylsulfoxid: Duchefa, Holandsko

Dusičnan vápenatý tetrahydrát: Penta, Česká republika

Ethanol: Lach-Ner, Česká republika

Hydroxid draselný: Lach-Ner, Česká republika

Chlorid draselný: Lach-Ner, Česká republika

Isopentenyladenin: OlChemIm, Česká republika

Kvasinkový extrakt: Sigma-Aldrich, USA

Kyselina indol-3-octová: Sigma-Aldrich, USA

Kyselina octová: Sigma-Aldrich, USA

L-aspargin monohydrát: Sigma-Aldrich, USA

L-cystein hydrochlorid: Lachema, Česká republika

Methanol HPLC grade: Fluka, Německo

RNase-free voda: Qiagen, USA

Sacharosa: Lach-Ner, Česká republika

Síran hořečnatý heptahydrát: Penta, Česká republika

Síran zinečnatý monohydrát: Sigma-Aldrich, USA

Spe-ed SPE Cartridges, Octadecyl C18/18%: Applied Separations, USA

Tryptofan: Lachema, Česká republika

3.3 Enzymy, příslušné pufrы a komponenty pro molekulární biologii

DNasa Turbo: Thermo Scietific, USA

10× reakční pufr pro DNasu Turbo: Thermo Scietific, USA

RevertAid H Minus reversní transkriptasa: Thermo Scientific, USA
5× reakční pufr pro reversní transkriptasu: Thermo Scientific, USA
dNTP mix 10 mmol·l⁻¹: Fermentas, Litva
Oligo(dT) primer: Sigma-Aldrich, USA
Taqman Universal PCR Master Mix, Thermo Scientific, USA

Primery byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich a jejich sekvence jsou následující:

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| CpGPD_SYBR_fw | 5'-TGTCTTCACCACCACCGA |
| CpGPD_SYBR_rev | 5'-GCCGTCATAGGTCTTCTCGT |
| CpTUB_SYBR_fw | 5'-ATGATGGCTGCTTCCGATT |
| CpTUB_SYBR_rev | 5'-GGACGAGTTCTTGGTCTGT |
| CpAEC_SYBR_fw | 5'-AGGCTGTCTTGGAAGTCGTA |
| CpAEC_SYBR_rev | 5'-TTGTGAGGCGAGCTTGGT |
| CpYUCCA_SYBR_fw | 5'-CATCCCGCCTACCAGCAA |
| CpYUCCA_SYBR_rev | 5'-TTTCCACTCGCCGTCTTCA |
| CPUR_00449_SYBR_fw | 5'-TTAAAGGAAGATGCACATGGAGATT |
| CPUR_00449_SYBR_rev | 5'-GGAGCTGCTGGTGTCTCTGAT |
| CPUR_00544_SYBR_fw | 5'-ACGGCGACTTGAAGCTCTTC |
| CPUR_00544_SYBR_rev | 5'-TGGGCAATGCTTCCTTGTG |
| CPUR_03763_SYBR_fw | 5'-GTGACGTGATGTTTACCAATTGC |
| CPUR_03763_SYBR_rev | 5'-CATGTAGAGACATTACCCAAGAACCTT |
| CPUR_06729_SYBR_fw | 5'-CAAGAGGGTACAGAGGTAACGAGAA |
| CPUR_06729_SYBR_rev | 5'-ACCTTGCGGTTGAATGAACAG |

3.4 Použité kity

Agencourt AMPure XP: Beckman Coulter, USA

Agilent DNA 1000 Kit: Agilent Technologies, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit: Agilent Technologies, USA
Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit: Illumina, USA
KAPA Library Quantification Kit: Illumina, USA
MiSeq Reagent Kit: Illumina, USA
RNAqueous Total RNA Isolation Kit: Thermo Scientific, USA

3.5 Přístroje

Agilent 2100 Bioanalyzer: Agilent Technologies, Německo
Analytické váhy: Nahita, Španělsko
Autokláv: BMT Medical Technology, Česká republika
Centrifuga Rotanta: Hettich, Německo
Centrifuga Scanspeed: LaboGene, Dánsko
Flowbox: Merci, Česká republika
Fluorescenční detektor FP-2020: JASCO, USA
Lyofilizátor: LaboGene ApS, Dánsko
MiSeq Desktop Sequencer: Illumina, USA
Mlýn kulový vibrační: Retsch, Německo
NanoDrop: Thermo Fisher Scientific, USA
Pipetovací robotická stanice Bravo: Agilent, USA
Speedvac: Thermo Electron Corporation, USA
Ultrazvuk Elmasinic P: Elma Schmidbauer GmbH, Německo
UPLC systém NEXERA: Shimadzu, Japonsko
Velkokapacitní třepačka: Kühner, Švýcarsko
VIA7 Real-Time PCR Systém: Applied Biosystems, USA
Visiprep SPE Vacuum Manifold: Sigma-Aldrich, USA
Vortex Combi-spin: Biosan, Litva
Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 2.1 mm i.d. × 150 mm, 1.8 μm: Agilent, USA

3.6 Roztoky

Mantle medium

5 g sacharosy, 10 g L-asparginu, 1,44 g dusičnanu vápenatého tetrahydrátu, 0,25 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,25 g síranu hořečnatého heptahydrátu, 0,125 g chloridu draselného, 0,027 g síranu zinečnatého heptahydrátu, 0,01 g L-cysteinu, 0,1 g

kvasničného extraktu, doplněno destilovanou vodou do 1 l, upraveno na pH 5,2 hydroxidem draselným, autoklávováno

3.7 Postupy

3.7.1 Kultivace *C. purpurea* pro tvorbu knihovny, experiment 1

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml bylo nalito 50 ml Mantle media; baňky s médiem byly autoklávovány. Media byla inokulována kousky *Claviceps purpurea* 20.1, která byla pěstována na agarové plotně. Houba byla kultivována na velkokapacitní třepačce (Kühner) při teplotě 26 °C po dobu 6 dní. Poté byl do media přidán iP resp. IAA, tak, aby jejich koncentrace v mediu činila 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Jako kontrola byl přidán stejný objem DMSO. Všechny přídavky byly provedeny ve 4 replikátech. Houby byly kultivovány dalších 24 hod a mycelia poté oddělena od media filtrací. Nakonec byla zamrazena v tekutém dusíku a uchovávána při teplotě – 80 °C.

3.7.2 Kultivace *C. purpurea* pro tvorbu knihovny, experiment 2

Baňky s médiem byly připraveny a zaočkovány houbou *Claviceps purpurea* 20.1 stejně jako v předchozím případě. *Claviceps* byla kultivována na třepačce (Kühner) při teplotě 26 °C po 6 dní. Poté byla přidána IAA nebo IAA-Asp na finální koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v mediu, resp. Trp na finální koncentraci 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v mediu; jako kontrola bylo přidáno 50 μl DMSO; každý přídavek byl proveden v 6 replikátech. Mycelia byla odebrána po 24 hod od přídavku látek, zmrazena tekutým dusíkem a uchovávána při teplotě -80 °C.

3.7.3 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí RNAqueous Total RNA Isolation kitu (Ambion, USA). Zamražené mycelium bylo rozetřeno v třecí misce s tekutým dusíkem. Na analýzu bylo použito 100 – 150 mg čerstvé hmoty vzorku. Ke vzorkům byl přidán 1 ml lyzačního pufru a vzorky byly 10 min inkubovány při laboratorní teplotě. Poté byly centrifugovány 3 min (14 000 \times g, 4 °C) a k čistému supernatantu byl přidán stejný objem 64% ethanolu. Směs byla promíchána a zfiltrována. RNA, která se zachytila na filtru, byla promyta a vymyta dvěma podíly elučního roztoku (60 a 40 μl), který byl vytemperován na teplotu 80 °C.

K 100 μl RNA bylo přidáno 10 μl 10 \times Turbo DNAsového pufru a 2 μl Turbo DNAsy; směs byla inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Poté byly přidány znovu 2 μl enzymu a

inkubace probíhala dalších 20 min. Reakce byla inaktivována při teplotě 60 °C po dobu 10 min.

Po ošetření DNAsou byl ke vzorkům RNA přidán poloviční objem precipitačního roztoku chloridu lithného o koncentraci 7,5 mol·l⁻¹. Vzorky byly inkubovány při teplotě – 20 °C po dobu 45 min, poté centrifugovány 15 min (14 000 × g, laboratorní teplota). Supernatant byl odlit, zbytek supernatantu odpipetován a pelet byl promyt 70% ethanolem. Vzorky byly znovu centrifugovány (14 000 × g, laboratorní teplota), ethanol odlit a odpařen do sucha. Pelet byl rozpuštěn ve 20 µl elučního pufru.

3.7.4 Měření čistoty a koncentrace RNA

Čistota RNA byla měřena pomocí Agilent RNA 6000 Nano Kitu. Do čipu byl napipetován a vtlačen podle protokolu mix gelu a barviva, poté bylo do všech jamek napipetováno 5 µl RNA markeru. Do označené jamky byl napipetován 1 µl RNA žebříku, do ostatních jamek bylo napipetováno po 1 µl vzorku. Čip byl 1 min vortexován a poté umístěn do přístroje Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer. Po proběhnutí analýzy byla zjištěna čistota izolované RNA. Její koncentrace byla změřena pomocí NanoDropu.

3.7.5 Reversní transkripce a qPCR vybraných genů

Na reversní transkripci bylo použito 0,5 – 2 µl vyizolované RNA tak, aby její koncentrace byla přibližně stejná ve všech vzorcích, a vzorky byly doplněny na 12 µl nuclease-free vodou. K takto připraveným vzorkům byl přidán 1 µl Oligo(dT) primeru a vzorky byly umístěny na 5 min do inkubátoru na teplotu 65 °C. Po inkubaci byly vzorky okamžitě umístěny do ledu. Poté byly ke každému vzorku přidány 4 µl 5× reakčního pufru, 2 µl dNTP mixu o koncentraci 10 mmol·l⁻¹ a 1 µl reversní transkriptasy RevertAid H Minus. Vzorky byly inkubovány při teplotě 42 °C po dobu 1 hod; reakce byla ukončena při teplotě 70 °C po dobu 10 min. Takto připravená cDNA byla naředěna nuclease-free vodou na objem 60 µl.

qPCR byla provedena pro 6 genů (CpAEC, CpYUCCA, CPUR_00449, CPUR_00544, CPUR_03763, CPUR_06729) a dva provozní geny (CpGDP a CpACT). Byly připraveny jejich primer mixy tak, že do 100 µl vody bylo napipetováno 1,25 µl fw primeru a 1,25 µl rev primeru daného genu. Na PCR reakci bylo použito 1,25 µl zředěného temmplátu cDNA, k tomu bylo přidáno 1,25 µl připraveného mixu primerů a 2,5 µl Taqman Universal PCR Master Mixu. Jednotlivé komponenty byly rozpipetovány do 384-jamkové destičky pomocí pipetovací stanice Bravo tak, že v každé jamce byl

celkový objem reakce 5 μ l. Každá reakce byla provedena ve 3 technických replikátech. qPCR reakce proběhla na PCR systému VIIA7 ve standardně nastaveném programu (2' - 50 °C; 8' - 95 °C, 40 cyklů - 30'' - 95 °C a 1' - 60 °C) a výsledné Ct hodnoty byly vyhodnoceny pomocí softwaru DataAssist (Applied Biosystems, USA). Z každé sady vzorků byly poté vybrány tři nejvhodnější replikáty, z nichž byly připraveny knihovny pro sekvenaci.

3.7.6 Příprava sekvenační cDNA knihovny

Příprava sekvenační knihovny byla provedena pomocí Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kitu.

3.7.6.1 Purifikace a fragmentace mRNA

Na přípravu knihovny byly použity 3 μ g vyizolované RNA. RNA byla doplněna nuclease-free vodou na objem 50 μ l. K RNA bylo přidáno 50 μ l RNA *Purification Beads*, které mají na svém povrchu navázány krátké polyT řetězce, díky čemuž specificky vážou mRNA obsahující polyA konec; vše bylo promícháno pipetováním. Mikrozkušavky s RNA byly dány do termocykleru na teplotu 65 °C po dobu 5 min, aby došlo k denuraci RNA a bylo usnadněno navázání RNA na kuličky; poté byly zchlazeny na teplotu 4 °C. Dále byly inkubovány 5 min při laboratorní teplotě, aby došlo k navázání RNA na kuličky.

Mikrozkušavky byly umístěny na 5 min na magnetický stojánek, aby došlo k oddělení magnetických kuliček od roztoku. Poté byl supernatant odpipetován, kuličky byly promyty od nenavázané RNA pomocí 200 μ l *Bead Washing Bufferu* a rozsuspendovány pipetováním. Kuličky byly od promývacího pufru opět odděleny stáním na magnetickém stojánku po dobu 5 min, supernatant obsahující většinu ribosomální a jiné nežádoucí RNA byl odpipetován. Ke kuličkám bylo přidáno 50 μ l *Elution Bufferu* a vše promícháno pipetováním. Vzorky byly dány do termocykleru na 80 °C po dobu 2 min, aby se uvolnily všechny specificky i nespecificky navázané RNA, poté byly zchlazeny na 25 °C.

Do zkumavek bylo přidáno 50 μ l *Bead Binding Bufferu*, který umožňuje specifičtější navázání mRNA na kuličky, zatímco je redukováno množství nespecificky navázaných RNA; vše bylo promícháno pipetováním a inkubováno při laboratorní teplotě 5 min. Poté byly vzorky opět umístěny na magnetický stojánek a po 5 min byl odpipetován supernatant. Kuličky byly promyty 200 μ l *Bead Washing Bufferu*, rozsuspendovány a opět umístěny na magnetický stojánek na 5 min. Supernatant obsahující zbytkovou rRNA

a další kontaminující látky byl odpipetován a kuličky byly rozsuspendovány v 19,5 μ l *Fragment, Prime, Finish Mixu*, který obsahuje náhodné hexamery a slouží jako reakční pufr pro syntézu prvního řetězce cDNA. Vzorky byly dány do termocykleru na 94 °C po dobu 8 min, aby došlo k eluci mRNA z kuliček, její fragmentaci a navázání primerů. Poté byly zchlazeny na 4 °C, dány do magnetického stojánku na 5 min a 17 μ l supernatantu bylo přeneseno do nových mikrozkuvek.

3.7.6.2 Syntéza prvního řetězce cDNA

Byl připraven mix reversní transkriptasy *SuperScript II* a *First Strand Synthesis Act D Mixu* v poměru 1:9. Ke vzorkům bylo přidáno 8 μ l mixu a promícháno pipetováním. Poté byly mikrozkuvky umístěny do termocykleru, 10 min na 25 °C, 15 min na 42 °C a 15 min na 70 °C. Nakonec byly zchlazeny na 4 °C.

3.7.6.3 Syntéza druhého řetězce cDNA

Ke vzorkům bylo přidáno 5 μ l *Resuspension Bufferu* a 20 μ l *Second Strand Marking Master Mixu* a promícháno pipetováním. Mikrozkuvky byly dány do termocykleru na teplotu 16 °C na 1 hod. Poté, když vzorky dosáhly laboratorní teploty, bylo přidáno 90 μ l rozsuspendovaných *AMPure XP* kuliček a vše bylo promícháno pipetováním. Vzorky byly inkubovány 15 min při laboratorní teplotě, poté byly umístěny na magnetický stojánek až do vyčeření kapaliny. Po 5 min na magnetickém stojánku bylo odpipetováno 135 μ l supernatantu, přidáno 200 μ l 80% ethanolu a po 30 s byl ethanol odpipetován. Promytí ethanolem bylo zopakováno podruhé a nakonec byly otevřené mikrozkuvky ponechány 15 min na vzduchu, aby se veškerý ethanol odpařil. Mikrozkuvky byly odebrány z magnetického stojánku a kuličky byly rozsuspendovány v 17,5 μ l *Resuspension Bufferu*. Po 2 min inkubace při laboratorní teplotě byly mikrozkuvky opět umístěny na magnetický stojánek a po 5 min bylo 15 μ l supernatantu obsahujícího dvouřetězcovou DNA přeneseno do nových mikrozkuvek.

3.7.6.4 Adenylace 3' konců

Ke vzorkům bylo přidáno 2,5 μ l *Resuspension Bufferu* a 12,5 μ l *A-Tailing Mixu* a promícháno pipetováním. Mikrozkuvky byly umístěny do termocykleru, 30 min na 37 °C, 5 min na 70°C a nakonec byly zchlazeny na 4 °C.

3.7.6.5 Ligace adaptorů

Do mikrozkušavek bylo přidáno 2,5 µl *Resuspension Bufferu* a 2,5 µl *Ligation Mixu*. Dále bylo přidáno 2,5 µl *RNA Adapter Indexu* tak, aby v každém vzorku byl jiný *RNA Adapter Index*. *Adapter Indexy* slouží k rozlišení jednotlivých vzorků při závěrečné sekvenaci, kdy jsou vzorky smíchány po třech vzorcích na jeden run. Sekvence použitých *Adapter Indexů* jsou uvedeny v Tab.1. Vše bylo promícháno pipetováním a vzorky dány do termocykleru na 30 °C. Po 10 min byly mikrozkušavky vytaženy a ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl *Stop Ligation Bufferu*. Vzorky byly promíchány pipetováním.

Dále bylo ke vzorkům napipetováno 42 µl *AMPure XP* kuliček a promícháno pipetováním. Vzorky byly inkubovány 15 min při laboratorní teplotě. Poté byly umístěny na 5 min na magnetický stojánek. Ze vzorků bylo odpipetováno 79,5 µl supernatantu, a následně k nim přidáno 200 µl ethanolu. Po 30 s byl ethanol odpipetován, a promytí ethanolom bylo zopakováno ještě jednou. Nakonec byly otevřené mikrozkušavky ponechány 15 min při laboratorní teplotě, aby došlo k odpaření veškerého ethanolu. Mikrozkušavky byly odebrány z magnetického stojánku, kuličky byly rozsuspendovány v 52,5 µl *Resuspension Bufferu* a inkubovány při laboratorní teplotě 2 min. Poté byly mikrozkušavky umístěny opět na 5 min na magnetický stojánek. Nakonec bylo 50 µl supernatantu přeneseno do nových mikrozkušavek.

Vzorky byly znovu přečištěny pomocí kuliček. Do mikrozkušavek bylo přidáno 50 µl rozsuspendovaných *AMPure XP* kuliček a promícháno pipetováním. Vzorky byly inkubovány 15 min při laboratorní teplotě a poté umístěny na magnetický stojánek po dobu 5 min. Bylo odebráno 95 µl supernatantu a poté byly kuličky promyty 200 µl ethanolu. Po 30 s byl ethanol odpipetován, kuličky byly znovu promyty 200 µl ethanolu a zkušavky ponechané 15 min při laboratorní teplotě, aby došlo k odpaření veškerého ethanolu. Kuličky byly rozsuspendovány ve 22,5 µl *Resuspension Bufferu* a inkubovány 2 min při laboratorní teplotě. Poté byly mikrozkušavky přeneseny na magnetický stojánek na 5 min. Nakonec bylo 20 µl supernatantu přeneseno do nových mikrozkušavek.

Tab. 1 Sekvence použitých *Adapter Indexů*. Čísla označují jednotlivé runy, při kterých byla daná trojice adaptorů použita.

| 1 | | 2 | | 3 | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| <u>Adaptor</u> | <u>Sekvence</u> | <u>Adaptor</u> | <u>Sekvence</u> | <u>Adaptor</u> | <u>Sekvence</u> |
| AD008 | ACTTGA(A) | AD005 | ACAGTG(A) | AD002 | CGATGT(A) |
| AD010 | TAGCTT(A) | AD020 | GTGGCC(T) | AD004 | TGACCA(A) |
| AD011 | GGCTAC(A) | AD027 | ATTCCT(T) | AD023 | GAGTGG(A) |

3.7.6.6 Obohacení DNA fragmentů

Ke vzorkům bylo přidáno 5 μl *PCR Primer Cocktailu* a 25 μl *PCR Master Mixu* a promícháno pipetováním. Mikrozkušavky byly umístěny do termocyklu, kde byly nejprve vystaveny teplotě 98 °C po dobu 30 s, poté proběhlo 15 cyklů teplot: 98 °C po dobu 10 s, 60 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 30 s. Nakonec byly vzorky inkubovány 5 min při teplotě 72 °C, zchlazeny na 4 °C a odebrány z termocyklu.

Ke každému vzorku bylo napipetováno 50 μl rozsuspendovaných *AMPure XP* kuliček a promícháno pipetováním. Mikrozkušavky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 min a poté umístěny na magnetický stojánek na 5 min až do vyčerení roztoku. 95 μl supernatantu bylo odpipetováno. Do zkumavek bylo přidáno 200 μl 80% ethanolu; po 30 s byl odpipetován. Promytí ethanolom bylo provedeno ještě jednou, poté byly otevřené zkumavky ponechány 15 min při laboratorní teplotě až do úplného odpaření ethanolu. Do zkumavek bylo přidáno 32,5 μl *Resuspension Bufferu* a promícháno pipetováním. Zkušavky byly inkubovány 2 min při laboratorní teplotě, poté umístěny na 5 min na magnetický stojánek. 30 μl supernatantu bylo přeneseno do nových mikrozkušavek.

3.7.6.7 Validace knihovny

Kontrola kvality a kvantifikace templátů DNA knihovny byla provedena pomocí Agilent DNA 1000 Kitu. Na čip byl nanesen mix gelu s barvivem a vtlačen do čipu, poté bylo do každé jamky na čipu napipetováno 5 μl markeru. Do označené jamky byl napipetován 1 μl DNA žebříčku, a do ostatních dvanácti jamek bylo napipetováno po 1 μl vzorku. Čip byl zvortexován 1 min a poté umístěn do Agilent Technologies 2100 bioanalyzeru. Vzorky, které měly požadovanou čistotu i dostatečnou koncentraci, byly použity na sekvenaci.

3.7.7 Kvantifikace sekvenační cDNA knihovny pomocí qPCR

Vzorky připravené cDNA byly přesněji kvantifikovány pomocí qPCR za použití KAPA Library Quantification Kitu. Měření probíhalo ve dvou ředěních – 10 000 \times a 100 000 \times . Na každou PCR reakci bylo použito 10 μl mixu KAPA SYBR FAST qPCR Master Mixu, 2 μl Primer Premixu, 0,4 μl ROX high, 3,6 μl PCR-grade vody a 4 μl zředěného vzorku cDNA. Pro kvantifikaci byly použity DNA standardy o koncentracích 0,2 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 0,02 $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Každá reakce byla provedena ve 3 technických replikátech. qPCR reakce proběhla na PCR systému VIIA7 ve standardně nastaveném programu (5' - 95 °C;

35 cyklů - 30'' - 95 °C a 45'' - 60 °C). Výsledné Ct hodnoty byly odečteny a koncentrace vypočítány za použití Ct standardů.

3.7.8 Sekvence cDNA knihoven

Všechny vzorky sekvenačních cDNA knihoven byly naředěny na stejnou koncentraci, poté zpoolovány (po třech vzorcích na jeden run) a sekvenovány za použití MiSeq Reagent Kitu v3 (2×75 cyklů) na sekvenátoru MiSeq Desktop Sequencer (Illumina, USA). Ready získané sekvenováním byly zarovnány k referenčnímu genomu *Claviceps purpurea*, kmen Cp20.1 (Schardl *et al.*, 2013) za použití programu pro zarovnání Tophat v.2.0.10 (Kim *et al.*, 2013), který povoluje maximálně pět *mismatches/INDELS* na jeden read.

Ready, které byly zarovnány k anotovaným transkriptům v referenčním genomu, byly kvantifikovány za použití FeatureCounts (Liao *et al.*, 2014) s ohledem na paired-end sekvenaci knihovny DNA fragmentů. Porovnání změn genové exprese bylo provedeno softwarem DESeq2 (Love *et al.*, 2015) realizovaným v prostředí programovacího jazyka R (R Development Core Team 2008).

3.7.9 Kultivace *C. purpurea* pro analýzu auxinů

Do sterilních 250 ml Erlenmeyerových baněk bylo odlito po 70 ml sterilního Mantle media. Baňky byly zaočkovány houbou *Claviceps purpurea* 20.1 resp. Δ CpAEC rostoucích na agaru na Petriho miskách. Houby byly kultivovány na třepačce (Kühner) při teplotě 26 °C po dobu 6 dnů. Poté byla k houbám přidána IAA tak, aby její koncentrace v mediu byla 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a houby byly kultivovány 24 hod. Poté byla mycelia zfiltrována a propláchnuta od zbytků media s přidavkem auxinu. Část mycelií byla odebrána a lyofilizována; druhá část mycelií byla umístěna do nových baněk s čistým mediem. Z těchto nově připravených baněk s houbou byly odebírány vzorky media o objemu 5 ml v časových intervalech od vnesení houby v čase 0, 1, 2, 4, 6 a 8 hod. Po 8 hod bylo odebráno i mycelium. Všechny odebrané vzorky byly odpařeny na SpeedVacu a poté uchovávány při teplotě -80 °C.

3.7.10 Analýza auxinů

Pro izolaci auxinů bylo použito 60 – 80 mg suché hmoty mycelií. Ke vzorkům bylo přidáno 1,5 ml methanolu, vzorky byly homogenizovány na kuličkovém mlýnku při 27 Hz po dobu 3 min, poté 30 min protřepávány a nakonec centrifugovány 10 min (14 000 × g, laboratorní teplota). Supernatant byl odebrán do nových zkumavek.

K sedimentu bylo opět přidáno 1,5 ml methanolu, vzorky byly zvortexovány, sonifikovány 5 min v ultrazvukové lázni při 37 kHz a protřepávány a centrifugovány stejně jako v předchozím případě. Supernatant byl odebrán, oba podíly extraktu spojeny a odpařeny na SpeedVacu do sucha.

Pro izolaci auxinů z medií bylo odpařeno vždy 5 ml media. K lyofilizovaným vzorkům byly přidány 4 ml methanolu, vzorky byly protřepávány 25 min a poté centrifugovány 10 min ($14\,000 \times g$, laboratorní teplota). Supernatant byl odebrán a odpařen na SpeedVac do sucha.

Odparek byl rozpuštěn v 1 ml 1% kyseliny octové a 15 min protřepáván. Vzorky byly nanесeny na aktivované Speed SPE Octadecyl C18/18% kolonky (Applied Separation) pro zachycení nepolárních látek včetně auxinů. Kolonky byly aktivovány 2 ml methanolu a 2 ml kyseliny octové o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po nanесení vzorku byly kolonky propláchnuty $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselinou octovou. Nakonec byly vzorky vymyty 2 ml methanolu a odpařeny na SpeedVacu do sucha.

Pelet byl rozsuspendován v 60 μl mobilní fáze A (5% acetonitril, 0,1% kyselina octová, pH 3,6). Vzorky byly separovány vysokotlakou kapalinovou chromatografií (Shimadzu Nexera) na reverzní fázi na C₁₈ koloně (Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 2.1 mm i.d. \times 150 mm, 1.8 μm) spojené s fluorescenčním detektorem (JASCO) při emisi 360 nm a excitaci při 280 nm. Kolona byla promývána lineárním gradientem mobilní fáze A a mobilní fáze B (40% acetonitril, 0,1% kyselina octová, pH 3,6): 5-35 min – 0-65% B, 35-36 min – 65-100% B, 36-38 min – 100% B, 38-42 min 100-0% B; průtok $0,40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota kolony 40 °C. Píky byly porovnány se standardy a koncentrace byla odečtena z plochy píků za použití LabSolution softwaru (Shimadzu).

4 VÝSLEDKY

4.1 Efekt auxinů a cytokininů na expresi genů v *Claviceps purpurea*

Claviceps purpurea rostoucí 6 dní v tekutém mediu byla ošetřena iP resp. IAA o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v mediu. Kontrolní vzorky byly ošetřeny stejným objemem DMSO. Po 24 hod kultivaci v přítomnosti hormonu byla mycelia sesbírána. Z mycelií byla vyizolována RNA a přepsána do cDNA. Byla provedena qPCR pro 6 vybraných genů (Tab. 2), jejichž exprese byla vztažena ke dvěma provozním genům (CpGDP a CpACT). Poté byly vybrány vždy tři nejvhodnější replikáty, ze kterých byly připraveny sekvenční cDNA knihovny, takže bylo vytvořeno celkem 9 cDNA knihoven. Knihovny byly sekvenovány pomocí masivně paralelního sekvenování. Ze sekvenace bylo získáno celkem 102 247 400 paired-end readů, které byly namapovány na referenční genom *Claviceps purpurea* 20.1 s průměrným přiřazením 63,33 %.

Po ošetření cytokininem došlo pouze u 21 genů z předpokládaných 8 308 k významné změně exprese ($p\text{value} \leq 0,01$), ať už byla zvýšená či snižená (viz Přílohy, Tab. 5). Žádný z těchto genů nicméně nevykazoval expresi dvakrát vyšší nebo nižší než kontrola ($\text{Log}_2\text{FoldChange} < -1$ a > 1). Většina z těchto genů jsou necharakterizované proteiny.

Naproti tomu ošetření auxinem mělo za následek významnou ($p\text{value} \leq 0,01$) změnu exprese 253 genů (viz Přílohy, Tab. 6). U většiny z nich byla exprese dvojnásobně vyšší nebo nižší než kontrola ($\text{Log}_2\text{FoldChange} < -1$ a > 1). Mezi geny s významně zvýšenou expresí byly mimo jiné dva klastry, z nichž každý zahrnuje tři geny (CPUR_03761 až CPUR_03763 a CPUR_00542 až CPUR_00544).

Ve druhém experimentu byly vzorky *C. purpurea* ošetřeny IAA-Asp resp. Trp o koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ resp. $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v mediu, v jejichž přítomnosti byla houba

Tab. 2 Změna exprese 6 vybraných genů ve vzorcích *C. purpurea* 20.1 ošetřených isopentenyladeninem (iP), kyselinou indol-3-octovou (IAA), konjugátem IAA s aspartátem (IAA-Asp) a tryptofanem. Výsledky byly získány metodou qPCR. Expese těchto genů byla vztažena k provozním genům CpGDP a CpACT.

| | iP | IAA | IAA-Asp | Trp |
|------------|------|------|---------|------|
| CpAEC | 1,73 | 1,57 | 0,90 | 0,79 |
| CpYUCCA | 0,94 | 2,24 | 1,14 | 1,02 |
| CPUR_00449 | 1,77 | 3,26 | 1,04 | 1,04 |
| CPUR_00544 | 0,99 | 2,11 | 0,96 | 0,90 |
| CPUR_03763 | 1,49 | 3,29 | 1,05 | 0,95 |
| CPUR_06729 | 1,79 | 1,22 | 1,24 | 1,10 |

kultivována 24 hod. Stejně jako v předchozím experimentu byla provedena qPCR (Tab. 2), a poté byly vybrány tři vhodné replikáty, z nichž byly připraveny sekvenační cDNA knihovny. Ani v jednom z těchto vzorků však nebyly zjištěny žádné významné změny v expresi genů.

4.2 Vylučování auxinů do media houbami Cp20.1 a Δ CpAEC

Houby *Claviceps purpurea* 20.1 a mutant Δ CpAEC s inaktivovaným genem pro hypotetický auxinový transportér byly kultivovány v tekutém mediu po dobu 6 dní. Poté k nim byla přidána IAA tak, aby její koncentrace v mediu činila $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a houby byly kultivovány dalších 24 hod. Mycelia byla oddělena od media s přídavkem auxinu filtrací, důkladně promyta a dána do nového media bez přídavku hormonu. Část mycelií přitom byla odebrána, aby bylo zjištěno, kolik auxinu houby absorbovaly. Pro sledování schopnosti hub vylučovat auxin zpět do media byly sbírány vzorky media v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 6 a 8 hod. Vzorky media byly odebírány po 5 ml. Po 8 hod kultivace v čistém mediu bylo nakonec sesbíráno i zbylé mycelium, aby bylo zjištěno, jaké množství auxinu v něm zůstalo. Kultivace obou hub a odběry vzorků probíhaly ve třech replikátech. Media i mycelia byla lyofilizována, byly z nich vyizolovány auxiny a kvantifikovány pomocí UPLC.

Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulkách. Tab. 3 uvádí průměrný obsah IAA a Trp v myceliích ošetřených auxinem. Hodnoty jsou uvedeny v pmol na 0,078 g suché hmoty mycelia, což bylo množství mycelia *C. purpurea* 20.1 a Δ CpAEC obsaženého v kultivační baňce. V experimentu byl zjišťován i obsah IAA-Asp, ten se však v myceliích ani v mediích nevyskytoval. Pro porovnání byl obsah IAA a Trp měřen i v myceliu *C. purpurea* 20.1 rostoucí v mediu bez přídavku auxinu. Toto auxinem neošetřené mycelium obsahovalo $3068 \pm 602,1$ pmol Trp v 0,078 g mycelia. IAA byla taktéž v myceliu detekována, její množství však bylo pod mezí kvantifikace (obsah v jednotkách pmol). Z tabulky je vidět, že obsah Trp byl v myceliu wild typu *C. purpurea* 20.1 i mutantu Δ CpAEC po 24 hod kultivace v přítomnosti IAA zvýšený, a to přibližně dvojnásobně oproti myceliu bez přídavku IAA. Po 8 hod kultivace v čistém mediu obsah Trp v myceliu poklesl, ovšem jeho obsah byl stále o něco vyšší než v neošetřeném myceliu. Je možné, že při delší době kultivace by došlo k dalšímu vylučování Trp a jeho obsah by poklesl na hladinu obsaženou v neošetřeném myceliu. V případě obsahu IAA lze vidět, že mutant Δ CpAEC byl schopen přijmout vyšší množství IAA než WT. Obě

Tab. 3 Obsah IAA (indol-3-octové kyseliny) a Trp v pmol na 0,078 g suché hmoty, což je množství mycelia *C. purpurea* 20.1 a Δ CpAEC obsaženého v kultivační baňce. Hodnoty jsou průměrem ze třech biologických replikátů, \pm vyjadřuje směrodatnou odchylku. Mycelia byla odebrána před vylučováním auxinu do čistého media (0 hod) a po 8 hod kultivace v tomto mediu.

| hod | Cp20.1 | | | | Δ CpAEC | | | |
|-----|--------|-------|------|-------|----------------|-------|------|-------|
| | Trp | \pm | IAA | \pm | Trp | \pm | IAA | \pm |
| 0 | 5909 | 151,3 | 512 | 149,4 | 5989 | 248,1 | 1459 | 874,5 |
| 8 | 3971 | 431,1 | n.q. | | 3658 | 347,6 | n.d. | |

Tab. 4 Obsah IAA a Trp v mediu v pmol na objem media v baňce (v čase 0 hod – 70 ml; v čase 8 hod – 45 ml). Hodnoty jsou průměrem ze třech biologických replikátů, \pm vyjadřuje směrodatnou odchylku.

| hod | Cp20.1 | | | | Δ CpAEC | | | |
|-----|--------|--------|------|-------|----------------|--------|------|-------|
| | Trp | \pm | IAA | \pm | Trp | \pm | IAA | \pm |
| 0 | 5521 | 902,9 | n.d. | | 6918 | 2659,7 | n.d. | |
| 1 | 7801 | 1557,4 | 573 | 122,5 | 7423 | 2068,2 | 2360 | 660,0 |
| 2 | 8555 | 2617,9 | 615 | 203,7 | 8233 | 2200,7 | 2599 | 816,5 |
| 4 | 7365 | 1074,3 | 513 | 98,6 | 7400 | 2783,3 | 2113 | 953,4 |
| 6 | 7055 | 1637,7 | 514 | 206,3 | 9994 | 1547,5 | 1538 | 197,0 |
| 8 | 7693 | 95,1 | 482 | 153,1 | 9551 | 1218,3 | 1452 | 318,4 |

houby pak v podstatě veškerou absorbovanou IAA vyloučily do media. V případě WT bylo v myceliu po 8 hod detekováno malé nekvantifikovatelné množství IAA, u Δ CpAEC nebyla IAA po 8 hod detekována vůbec.

Tab. 4 ukazuje průměrný obsah IAA a Trp v mediích bez přídavku IAA, v nichž byla kultivována houba Cp20.1 resp. Δ CpAEC po ošetření IAA trvajícím 24 hod. Hodnoty jsou uvedeny v pmol na objem media v baňce. Protože v průběhu kultivace bylo odebíráno vždy 5 ml media na analýzu, bylo v baňce na počátku kultivace, tedy v čase 0 hod, 70 ml media, a na konci kultivace v čase 8 hod zůstalo v baňce 45 ml media. Obsah Trp i IAA v čase 0 hod lze v podstatě považovat za obsah těchto látek v čistém mediu. Trp je v čistém mediu obsažen, jeho koncentrace se pohybuje kolem $6 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jeho obsah v mediu v průběhu kultivace v čistém mediu stoupá, takže její houba do media vylučuje.

IAA se však v čistém mediu nevyskytuje. V mediu byla naměřena až po první hodině kultivace s houbou. Vzhledem k tomu, že její koncentrace v průběhu další kultivace nijak výrazně nestoupá, ale stále se pohybuje na přibližně stejné hladině, je pravděpodobné, že během první hodiny kultivace houba vyloučila do media v podstatě veškerou IAA.

Konkrétní množství vyloučené IAA opět potvrzuje, že mutant Δ CpAEC byl schopen absorbovat vyšší množství tohoto hormonu než WT.

5 DISKUZE

5.1 *Claviceps purpurea* neodpovídá na cytokininový signál

Claviceps purpurea je schopna produkce cytokininů (Hinsch *et al.*, 2015). V experimentu, kdy byly CK přidány do kultivačního media axenické kultury této houby, reagovala *Claviceps* na přídavek hormonů tak, že cytokininy absorbovala, a poté je začala metabolizovat. Metabolity se v mediu vyskytovaly už po 24 hod od aplikace CK. Navíc *Claviceps* během kultivace v přítomnosti CK produkovala další cytokininy *de novo* ve velmi velkém množství (Hloušková, 2015). Také bylo zjištěno, že mutant $\Delta cpp450$ vykazuje hypersporulující fenotyp, což ukazuje, že cytokininy ovlivňují vývoj této houby (Hinsch *et al.*, 2015). Oba výše uvedené případy tedy naznačují, že *C. purpurea* reaguje na cytokininový signál. Proto byla provedena sekvenace celého transkriptomu houby, která byla kultivována 24 hod v prostředí iP, aby bylo zjištěno, jestli houba vnímá cytokininový signál a které geny na aplikaci cytokininu reagují. Desetimikromolární koncentrace iP v mediu však nevyvolala žádné významné změny na úrovni transkriptomu, což naznačuje, že iP neaktivuje žádnou transdukční dráhu, která by vedla k aktivaci nebo represi genů.

Aktivita enzymu tRNA-IPT, zapojeného v dráze tvorby cytokininů z tRNA, a následná tRNA degradace, je konzervovaný mechanismus produkce cytokininů, a je také hlavní drahou, která přispívá k produkci cZ v *Arabidopsis thaliana* a *Physcomitrella patens* (Miyawaki *et al.*, 2006; Lindner *et al.*, 2014). Homologní proteiny byly nalezeny ve všech živých organismech kromě archebakterií (Spíchal, 2012), a tedy se nacházejí i ve všech fytopatogenních houbách. Je proto možné, že cZ hraje při interakci patogenu s rostlinou důležitější roli než iP, a tedy by na něj *C. purpurea* reagovala více. Podobně i tZ by mohl v houbě vyvolat větší změnu exprese než iP, protože mutant *C. purpurea* defektní v tvorbě tZ vykazuje změnu fenotypu. To je ovšem málo pravděpodobné, protože bylo zjištěno, že při ošetření houby hormonem iP dochází k jeho rapidní konverzi na tZ už po prvním dni kultivace houby v přítomnosti hormonu (Hloušková, 2015). Je tedy pravděpodobné, že i v experimentu popsaném v této práci, kdy byla houba ošetřena hormonem iP, došlo k jeho přeměně na tZ. Protože však žádná významná změna v expresi genů v *C. purpurea* nebyla pozorována, je pravděpodobné, že iP ani tZ nevyvolávají v houbě žádnou reakci na úrovni transkripce.

5.2 *Claviceps purpurea* reaguje na auxinový signál

Dále bylo zkoumáno, jestli je *Claviceps purpurea* schopna nějak vnímat auxinový signál. Po 24 hod kultivaci houby v mediu s přidavkem IAA byla provedena analýza celého transkriptomu houby, a bylo zjištěno, že došlo ke významnému ($p\text{-value} \leq 0,01$) zvýšení exprese 87 genů, jejichž exprese byla minimálně $2,5\times$ vyšší oproti kontrole. To ukazuje, že na rozdíl od cytokininu jsou auxiny pravděpodobně schopny regulovat genovou expresi v *C. purpurea*.

Mezi geny se zvýšenou expresí byly také dvě skupiny genů, z nichž každá zahrnovala tři geny ležící těsně vedle sebe. Tyto geny pravděpodobně tvoří malé klastry, které jsou společně regulovány auxiny. První klastr, CPUR_03761 až CPUR_03763, zahrnuje tři necharakterizované geny. Gen CPUR_03762.1 obsahuje ARID (AT-rich interaction domain), která se vyskytuje v mnoha eukaryotických transkripčních faktorech regulujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a vývoj (Iwahara and Clubb, 1999). Je zajímavé, že v genomu *Claviceps* jsou kódovány další dva paralogní geny (CPUR_08588 a CPUR_08354), které nemají žádné orthology v rodu *Saccharomyces*, a dokonce ani v rodu *Fusaria*, který je s rodem *Claviceps* blíže příbuzný. Orthologní geny byly nalezeny v houbě *Ustilaginoidea virens*, která způsobuje chorobu rýže (smut disease), a také v některých druzích rodu *Metarhizium*, které také produkují námelové alkaloidy (Tanaka *et al.*, 2008; Kepler *et al.*, 2012). V pozdní fázi infekce *Claviceps*, kdy jsou produkovány námelové alkaloidy ve sklerociích, byla také pozorována nadměrná produkce auxinů (Vrabka, nepublikované výsledky). Je proto možné, že tento pravděpodobný transkripční faktor, který je aktivován auxinem, je zahrnut v regulaci produkce námelových alkaloidů. Další gen z tohoto klastru, gen CPUR_03763, kóduje necharakterizovaný protein. V genomu *Claviceps* je taktéž zastoupen vícekrát, ale nemá ortholog v rodech *Saccharomyces* ani *Aspergillus*. To může znamenat, že tento protein má specifickou roli při interakci houby s hostitelskou rostlinou. Poslední gen tohoto klastru, CPUR_03761, nejspíš kóduje zkrácený hypotetický transkripční faktor.

Druhý hypotetický klastr zahrnuje geny CPUR_00542 až CPUR_00544. Gen CPUR_00543 kóduje obecný transkripční faktor. Gen CPUR_00542 kóduje pravděpodobně zkrácený protein modulárního komplexu, který předává regulační signály z transkripčních faktorů, které se váží na DNA, na RNA polymerasu II. Poslední gen, CPUR_00544, je analogem k sorting nexin proteinu. Tyto proteiny jsou konzervovány mezi eukaryoty a podílí se na regulaci endocytosy a třídění proteinů. Vyskytují se

v cytoplasmě a mohou také asociovat s cytoplasmatickou membránou. Bylo zjištěno, že v *Arabidopsis thaliana* se sorting nexin podílí na transportu některých AEC transportérů prostřednictvím systému endosomů (Jaillais *et al.*, 2006). Aktivace tohoto proteinu auxinem tedy může hrát podobnou roli při kompartmentalizaci AEC v *Claviceps*. U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* bylo zjištěno, že homolog sorting nexinu je odpovědný za správné formování membrány prekursorů spor během sporulace (Koga *et al.*, 2004). Produkce auxinů tedy může prostřednictvím tohoto procesu zahrnujícího aktivaci sorting nexinu přispívat k procesu sporulace, podobně jako to dělají cytokininy u *Claviceps* (Hinsch *et al.*, 2015) a *Dictyostelium discoideum* (Anjard and Loomis, 2008).

5.3 Transport auxinů v *Claviceps purpurea*

Genom *Claviceps purpurea* obsahuje gen (CPUR_008219) kódující protein s vysokou homologií ke skupině PILS proteinů, které patří do skupiny transportérů sekretujících auxin (auxin efflux carrier, AEC). Podobně jako je tomu u rostlinných PILS transportérů (Barbez *et al.*, 2012), Δ CpAEC je pravděpodobně také lokalizován v buňce na struktuře připomínající endoplasmatické retikulum (Vrabka, nepublikované výsledky).

Aby bylo zjištěno, jak tento protein ovlivňuje vylučování auxinu ven z buňky, byl mutant Δ CpAEC kultivován v přítomnosti IAA 24 hod, a poté byl dán do čistého media, kde byla sledována koncentrace vyloučeného auxinu v čase. Stejný postup byl proveden i s wild typem *C. purpurea* 20.1. Bylo zjištěno, že Δ CpAEC je schopen vstřebat více auxinu než WT, což je možná způsobeno tím, že WT v průběhu kultivace v přítomnosti auxinu absorbovaný auxin v určité míře zase vylučoval zpátky do media, a tedy v myceliu zůstalo auxinu méně, zatímco mutant s knockoutovaným auxinovým transportérem si většinu pohlceného auxinu v myceliu ponechal.

Během první hodiny kultivace v čistém mediu však byla většina auxinu z mycelií vyloučena ven u obou hub. Je možné, že obdobný experiment, v němž by byly vzorky media odebírány v kratších časových intervalech v průběhu první hodiny kultivace, by ukázal nějaké rozdíly mezi vylučováním auxinu z WT a mutantu Δ CpAEC. WT, který má transportér pro auxin, by mohl auxin vylučovat rychleji než mutant s deletovaným transportérem, pokud by tento transportér fungoval jako transportér pro sekreci auxinu ven z buňky. Pokud by protein AEC fungoval podobně jako PILS, což je orthologní protein pro transport auxinů u *Arabidopsis thaliana*, transportoval by IAA do ER a mohli bychom pozorovat větší zadržování auxinu v buňce.

Bylo také zjištěno, že kultivace houby v přítomnosti auxinu měla za následek zvýšení koncentrace Trp v myceliu, a po umístění houby do čistého media docházelo k jeho vylučování do media. Je možné, že IAA aktivovala nějakou dráhu přispívající k vzniku Trp v myceliu *C. purpurea* 20.1 i mutantu Δ CpAEC. Při analýze transkriptů v houbě *C. purpurea* 20.1 ošetřené IAA však žádný zvýšený biosyntetický gen pro Trp nalezen nebyl. Došlo ovšem ke zvýšení exprese mnoha necharakterizovaných proteinů a je možné, že se některé z nich se na biosyntéze Trp podílí.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma *Claviceps purpurea*, auxiny a cytokininy, konkrétně jejich biosyntéza, signální dráhy a role těchto hormonů ve fytopatogenních organismech, a v poslední části byla popsána metoda masivně paralelního sekvenování.

V praktické části byly připraveny sekvenační cDNA knihovny houby *C. purpurea* ošetřené cytokininem isopentenyladeninem a auxinem kyselinou indol-3-octovou. Knihovny byly sekvenovány pomocí masivně paralelního sekvenování. Bylo zjištěno, že ošetření iP nevyvolalo v houbě žádnou významnou změnu v expresi genů, houba tedy na cytokininový signál nereaguje. Naproti tomu ošetření auxinem mělo za následek významné zvýšení či snížení exprese 253 genů, což ukazuje, že *C. purpurea* aktivně vnímá auxinový signál. Mezi geny se zvýšenou expresí byl i gen CPUR_00544 kódující analog nexinu. Protein nexin je zapojený při vesikulárním transportu. Jeho funkce v *C. purpurea* může souviset s kompartmentalizací auxinových transportérů. Auxinová regulace nexinu také může přispívat k ovlivnění procesu sporulace, podobně jako to u *Claviceps* dělají cytokininy.

Při porovnávání transportu auxinu v houbě *Claviceps purpurea* 20.1 a mutantovi Δ CpAEC s inaktivním hypotetickým auxinovým transportérem bylo zjištěno, že mutant absorbuje více auxinu než WT, pravděpodobně proto, že není schopen regulovat sekreci auxinu zpět do media. To, jestli a jak se liší rychlost vylučování auxinu do media v myceliích WT a Δ CpAEC, se zatím zjistit nepodařilo.

7 LITERATURA

- Anjard C. and Loomis W. F. (2008): Cytokinins induce sporulation in *Dictyostelium*. *Development* **135**, 819–827.
- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., *et al.* (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**, 741–745.
- Bainbridge K., Guyomarc'h S., Bayer E., Swarup R., Bennett M., Mandel T., Kuhlemeier C. (2008): Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes & Development* **22**, 810–823.
- Bak S., Tax F. E., Feldmann K. A., Galbraith D. W., Feyereisen R. (2001): CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 101–111.
- Barbez E., Kubes M., Rolčik J., Beziat C., Pencik A., Wang B., Rosquete M. R., *et al.* (2012): A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* **485**, 119–122.
- Barciszewski J., Siboska G., Rattan S. I. S., Clark B. F. C. (2000): Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin (N⁶-furfuryladenine). *Plant Growth Regulation* **32**, 257–265.
- Barker S. and Tagu D. (2000): The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *The Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 144–154.
- Bartling D., Seedorf M., Mithöfer A., Weiler E. W. (1992): Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *European Journal of Biochemistry* **205**, 417–424.
- Bartling D., Seedorf M., Schmidt R. C., Weiler E. W. (1994): Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**, 6021–6025.
- Basse C. W., Lottspeich F., Steglich W., Kahmann R. (1996): Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry* **242**, 648–656.
- Bassi M., Conti G. G., Barbieri N. (1984): Cell wall degradation by *Taphrina deformans* in host leaf cells. *Mycopathologia* **88**, 115–125.
- Bassil N. V., Mok D. W. S., Mok M. C. (1993): Partial purification of a cis-trans- isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* **102**, 867–872.
- Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., *et al.* (1996): *Arabidopsis AUX1* gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948–950.
- Bentley D. R., Balasubramanian S., Swerdlow H. P., Smith G. P., Milton J., Brown C. G., Hall K. P., Evers D. J., Barnes C. L., Bignell H. R., Boutell J. M., Bryant J., Carter R. J., Keira Cheetham R., Cox A. J., Ellis D. J., Flatbush M. R., Gormley N. A., Humphray S. J., Irving L. J., Karbelashvili M. S., Kirk S. M., Li H., Liu X., Maisinger K. S., Murray L. J., Obradovic B., Ost T., Parkinson M. L., Pratt M. R., *et al.* (2008): Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53–59.
- Berglund E. C., Kiialainen A., Syvänen A. C. (2011): Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investigative Genetics* **2**, 23.
- Bove F. J. (1970): *The Story of Ergot*. S. Karger, Basel, Švýcarsko, 298 stran.
- Carrano A. C., Eytan E., Hershko A., Pagano M. (1999): SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology* **1**, 193–199.
- Calderón-Villalobos L. I., Lee S., De Oliveira C., Ivetac A., Brandt W., Armitage L., Sheard L. B., *et al.* (2012): A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology* **8**, 477–485.
- Cooper S. J. and Ashby A. M. (1998): Comparison of cytokinin and cytokinin-O-glucoside cleaving beta-glucosidase production in vitro by *Venturia inaequalis* and other

- phytopathogenic fungi with differing modes of nutrition in planta. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**, 61–72.
- Creason A. L., Vandeputte O. M., Savory E. A., Davis E. W. II, Putnam M. L., *et al.* (2014): Analysis of Genome Sequences from Plant Pathogenic *Rhodococcus* Reveals Genetic Novelties in Virulence Loci. *PLoS ONE* **9**(7), e101996.
- Dal Bosco C., Dovzhenko A., Liu X., Woerner N., Rensch T., Eismann M., Eimer S., *et al.* (2012): The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant Journal* **71**, 860–870.
- De Jong M., Mariani C., Vriezen W. H. (2009): The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1523–1532.
- Del Pozo J. C., Diaz-Trivino S., Cisneros N., Gutierrez C. (2006): The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin–SCF^{SKP2A} pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**, 2224–2235.
- Devos S., Laukens K., Deckers P., Van Der Straeten D., Beeckman T., Inzé D., Van Onckelen H., Witters E., Prinsen E. (2006): A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmodiophora brassicae* infection on *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1431–1443.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005): The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441–445.
- Ding Z., Wang B., Moreno I., Duplakova N., Simon S., Carraro N., Reemmer J., *et al.* (2012): ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Communications* **3**, 941.
- Dreher K. A., Brown J., Saw R. E., Callis J. (2006): The *Arabidopsis* Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell* **18**, 699–714.
- Ellis M., Nagpal P., Young J. C., Hagen G., Guilfoyle T. J., Reed J. W. (2005): Auxin response factor1 and auxin response factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **132**, 4563–4574.
- Enders T. A. and Strader L. C. (2016): Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany* **102**(2), 180–196.
- Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., *et al.* (2002a): AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 661–673.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002b): Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**, 806–809.
- Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R., Bult C. J., Tomb J. F., Dougherty B. A., Merrick J. M., McKenney K., Sutton G., FitzHugh W., Fields C., Gocayne J. D., Scott J., Shirley R., Liu L. I., Glodek A., Kelley J. M., Weidman J. F., Phillips C. A., Spriggs T., Hedblom E., Cotton M. D., Utterback T. R., Hanna M. C., Nguyen D. T., Saudek D. M., Brandon R. C., *et al.* (1995): Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496–512.
- Fu J. and Wang S. (2011): Insights into auxin signaling in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* **2**, 74.
- Gan S. and Amasino R. M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986–1988.
- Gogala N. (1991) Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* **47**, 331–340.
- González-Lamothe R., El Oirdi M., Brisson N. and Bouaraba K. (2012): The Conjugated Auxin Indole-3-Acetic Acid–Aspartic Acid Promotes Plant Disease Development. *The Plant Cell* **24**, 762–777.
- Gray W. M., del Pozo J. C., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W. L., Yang M., Ma H., Estelle M. (1999): Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* **13**, 1678–1691.

- Grebe M., Friml J., Swarup K., Ljung K., Sandberg G., Terlou M., Palme K., *et al.* (2002): Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx Pathway. *Current Biology* **12**, 329–334.
- Gruen H. E. (1959): Auxins and fungi. *Annual Review of Plant Physiology* **10**, 405–440.
- Gryndler M., Hrselova H., Chvatalova I., Jansa J. (1998): The effect of selected plant hormones on in vitro proliferation of hyphae of *Glomus fistulosum*. *Biologia Plantarum* **41**, 255–263.
- Guan Y. F., Li G. R., Wang R. J. *et al.* (2012): Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chinese Journal of Cancer* **31**(10), 463 – 470.
- Guevara-Lara F., Valverde M. E., Paredes-Lopez O. (2000): Is pathogenicity of *Ustilago maydis* (huitlacoche) strains on maize related to in vitro production of indole-3-acetic acid? *The World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 481–490.
- Guilfoyle T. J. and Hagen G. (2007): Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 453–460.
- Hinsch J., Vrabka J., Oeser B., Novák, O., Galuszka P., Tudzynski P. (2015): De novo biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environmental Microbiology* **17**, 2935–2951.
- Hinsch J., Galuszka P., Tudzynski P. (2016): Functional characterization of the first filamentous fungal tRNAisopentenyltransferase and its role in the virulence of *Claviceps purpurea*. *New Phytologist* **211**(3), 980–992.
- Hloušková V. (2015): *Metabolismus cytokininů u patogenní houby Claviceps purpurea*. Bakalářská práce, Universita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Hoffman A. (1972): Ergot – a rich source of pharmacologically active substances. In: *Plants in the Development of Modern Medicine* (Swain T., ed.). Harvard University Press, Cambridge, MA, 235–260.
- Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I. (2012): Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances*, **31**, 79–89.
- Chanclud E., Morel J. B. (2016a): Plant hormones: A fungal point of view. *Molecular Plant Pathology* **17**(8), 1289–1297.
- Chanclud E., Kisiala A., Emery N. R. J., Chalvon V., Ducasse A., Romiti-Michel C., Gravot A., Kroj T., Morel J.-B. (2016b): Cytokinin production by the rice blast fungus is a pivotal requirement for full virulence. *PLOS Pathogens* **12**, e1005457.
- Chapman E. J. and Estelle M. (2009): Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual Review of Genetics* **43**, 265–285.
- Chung K.-R., Shilts T., Ertürk Ü., Timmer L. W., Ueng P. P. (2003): Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lyme anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters* **226**, 23–30.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060–1063.
- Iwahara J. and Clubb R. T. (1999): Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *The EMBO Journal* **18**, 6084–6094.
- Jaillais Y., Fobis-Loisy I., Miège C., Rollin C., Gaude T. (2006): AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature* **443**, 106–109.
- Jiang C.-J., Shimono M., Sugano S., Kojima M., Liu X., Inoue H., Sakakibara H., Takatsuji, H. (2013): Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 287–296.
- Jones A. R., Kramer E. M., Knox K., Swarup R., Bennett M. J., Lazarus C. M., Leyser H. M., Grierson C. S. (2009): Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nature Cell Biology* **11**, 78–84.
- Jurado S., Díaz-Triviño S., Abraham Z., Manzano C., Gutierrez C., Del Pozo C. (2008): SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *The Plant Journal* **53**, 828–841.

- Jurado S., Abraham Z., Manzano C., López-Torrejón G., Pacios L. F., Del Pozo J. C. (2010): The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *The Plant Cell* **22**, 3891–3904.
- Kakimoto, T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Kamimoto Y., Terasaka K., Hamamoto M., Takanashi K., Fukuda S., Shitan N., Sugiyama A., *et al.* (2012): *Arabidopsis* ABCB21 is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant & Cell Physiology* **53**, 2090–2100.
- Kamisaka, S., Yanagishima, N., Masuda, Y. (1967): Effect of auxin and gibberellin on sporulation in yeast. *Physiologia Plantarum* **20**, 90–97.
- Kazan K. and Manners J. M. (2009): Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **14**, 373–382.
- Keller U. (1999): Biosynthesis of ergot alkaloids. In: *Ergot – the Genus Claviceps*. (Křen V., Cvak L., eds.) Harwood Academic Publishers, London, 95–163.
- Kepinski S. and Leyser O. (2005): The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446–451.
- Kepler R. M., Sung G. H., Harada Y., Tanaka K., Tanaka E., Hosoya T., Bischoff J. F., Spatafora J. W. (2012): Host jumping onto close relatives and across kingdoms by *Tyrannicordyceps* (*Clavicipitaceae*) gen. nov. and *Ustilaginoidea* (*Clavicipitaceae*). *The American Journal of Botany* **99**, 552–561.
- Kieber J. J., Schall G. E. (2010): The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant Physiology* **154**, 487–492.
- Kim D., Pertea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S. L. (2013): TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**, R36, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- Koga T., Onishi M., Nakamura Y., Hirata A., Nakamura T., Shimoda C., Iwaki T., Takegawa K., Fukui Y. (2004): Sorting nexin homologues are targets of phosphatidylinositol 3-phosphate in sporulation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells* **9**(6), 561–574.
- Korasick D. A., Enders T. A., Strader L. C. (2013): Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2541–2555.
- Kubeš M., Yang H., Richter G. L., Cheng Y., Mlodzinska E., Wang X., Blakeslee J. J., *et al.* (2012): The *Arabidopsis* concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *Plant Journal* **69**, 640–654.
- Kulkarni G. B., Sanjeevkumar S., Kirankumar B., Santoshkumar M., Karegoudar T. B. (2013): Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Fusarium delphinoides* strain GPK, a causal agent of wilt in chickpea. *Applied biochemistry and biotechnology* **169**, 1292–1305.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczy J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J. P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., *et al.* (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- LeJohn H. B. and Stevenson R. M. (1973): Cytokinins and magnesium ions may control the flow of metabolites and calcium ions through fungal cell membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **54**, 1061–1066.
- Lee M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: From antiquity to 1900. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* **39**, 179–184.
- Liao Y., Smyth G. K., Shi W. (2014): featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–30.
- Lindner A. C., Lang D., Seifert M., Podlešáková K., Novák O., Strnad M., Reski R., von Schwartzenberg K. (2014): Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2533–2543.
- Love M. I., Huber W., Anders S. (2015): Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Ludwig-Müller J., Prinsen E., Rolfe S., Scholes J. (2009): Metabolism and plant hormone action during the clubroot disease. *The Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 229–244.

- Ludwig-Müller J. (2011): Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *The Journal of Experimental Botany* **62**, 1757–1773.
- Ludwig-Müller J. (2015): Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *The Journal of Plant Physiology* **172**, 4–12.
- Luttrell E. S. (1977): The disease cycle and fungus-host relationship in dallisgrass ergot. *Phytopathology* **67**, 1461–1468.
- Luttrell E. S. (1980): Host-parasite relationships and development of the ergot sclerotium in *Claviceps purpurea*. *Canadian Journal of Botany* **58**, 942–958.
- Maor R., Haskin S., Levi-Kedmi H., Sharon A. (2004): In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 1852–1854.
- Marchant A., Kargul J., May S. T., Muller P., Delbarre A., Perrotrechenmann C., Bennett M. J. (1999): AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal* **18**, 2066–2073.
- Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989): An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiology* **90**, 1630–1635.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., *et al.* (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 18512–18517.
- Mikkelsen M. D., Naur P., Halkier B. A. (2004): *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *The Plant Journal* **37**, 770–777.
- Mills L.J. and Van Staden J. (1978): Extraction of cytokinins from maize, smut tumors of maize and *Ustilago maydis* cultures. *Physiological Plant Pathology* **13**, 73–80.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 16598–16603.
- Mougel C. and Zhulin I. B. (2001): CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 582–584.
- Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., Petrášek J., *et al.* (2009): Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136–1140.
- Murphy A. M., Pryce-Jones E., Johnstone K., Ashby A. M. (1997): Comparison of cytokinin production in vitro by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 53–65.
- Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C. J., Glawischnig E., Olsen C. E., Halkier B. A., Glazebrook J. (2007): *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant Cell* **19**, 2039–2052.
- Nakamura T., Kawanabe Y., Takiyama E., Takahashi N., Murayama, T. (1978): Effects of auxin and gibberellin on conidial germination in *Neurospora crassa*. *Plant and Cell Physiology* **19**, 705–709.
- Nakamura T., Tomita K., Kawanabe Y., Murayama T. (1982): Effects of auxin and gibberellin on conidial germination in *Neurospora crassa* II: “conidial density effect” and auxin. *Plant and Cell Physiology* **23**, 1363–1369.
- Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004): Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 1365–1377.
- Normanly J., Grisafi P., Fink G. R., Bartel B. (1997): *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the *NIT1* gene. *Plant Cell* **9**, 1781–1790.
- Normanly J., Cohen J. D., Fink G. R. (1993): *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 10355–10359.

- Ouyang J., Shao X., Li J. (2000): Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **24**, 327–333.
- Park W. J., Kriechbaumer V., Müller A., Piotrowski M., Meeley R. B., Griel A., Glawischnig E. (2003): The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiology* **133**, 794–802.
- Peer W. A., Blakeslee J. J., Yang H., Murphy A. S. (2011): Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant* **4**, 487–504.
- Péret B., Swarup K., Ferguson A., Seth M., Yang Y., Dhondt S., James N., *et al.* (2012): AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **24**, 2874–2885.
- Petrášek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J. J., Abas M., Seifertova D., Wisniewska J., *et al.* (2006): PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914–918.
- Pertry I., Václavíková K., Depuydt S., Galuszka P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmöulling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009): Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 929–934.
- Pohleven E. and Gogala N. (1986): The influence of natural cytokinins on the content of K, P, Ca and Na in the mycelium of the mycorrhizal fungus *Suillus variegatus*. *Biol. Vestn.* **34**, 79–88.
- Pollmann S., Neu D., Weiler E. W. (2003): Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* **62**, 293–300.
- Punwani J. A., Hutchison C. E., Schaller G. E., Kieber J. J. (2010): The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal* **62**, 473–482.
- Quittenden L. J., Davies N. W., Smith J. A., Molesworth P. P., Tivendale N. D., Ross J. J. (2009): Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiology* **151**, 1130–1138.
- Rao R. P., Hunter A., Kashpur O., Normanly J. (2010): Aberrant synthesis of indole-3-acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* triggers morphogenic transition, a virulence trait of pathogenic fungi. *Genetics* **185**, 211–220.
- Reineke G., Heinze B., Schirawaski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C. W. (2008): Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular Plant Pathology* **9**, 339–355.
- Reinhardt D., Pesce E. R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., *et al.* (2003): Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255–260.
- Remy E. and Duque P. (2014): Beyond cellular detoxification: A plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants. *Frontiers in Physiology* **5**, 201.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W. M., Hobbie L., Turner J., Estelle M. (1998): The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes and Development* **12**, 198–207.
- Sakakibara H. (2005): Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitamins and Hormones* **72**, 271–287.
- Sakakibara, H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431–449.
- Samuelson M. E., Larsson C-M. (1993): Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barely roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. *Plant Science* **93**, 77–84.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463–5467.
- Sauer M., Kleine-Vehn J. (2011): AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *The Plant Cell* **23**, 2033–2043.

- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013): Auxin: Simply complicated. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2565–2577.
- Sawchuk M. G., Edgar A., Scarpella E. (2013): Patterning of leaf vein networks by convergent auxin transport pathways. *PLOS Genetics* **9**, e1003294.
- Shan X., Yan J., Xie D. (2011): Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **15** (1), 84–91.
- Sharaf E. F. and Farrag A. A. (2004): Induced resistance in tomato plants by IAA against *Fusarium oxysporum lycopersici*. *Polish Journal of Microbiology* **53**, 111–116.
- Shaw B. and Mantle P. G. (1980): Parasitic differentiation of *Claviceps purpurea*. *Transactions of the British Mycological Society* **75** (1), 117–121.
- Shi J. H. and Yang Z. B. (2011): Is ABP1 an auxin receptor yet? *Molecular Plant* **4**, 635–640.
- Shimomura S. (2006): Identification of a glycosylphosphatidylinositol anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: A photoaffinity crosslinking study. *Plant Molecular Biology* **60**, 663–677.
- Schardl C. L., Young C. A., Hesse U., Amyotte S. G., Andreeva K., et al. (2013): Plant-Symbiotic Fungi as Chemical Engineers: Multi-Genome Analysis of the *Clavicipitaceae* Reveals Dynamics of Alkaloid Loci. *PLoS Genetics* **9** (2), 1–26.
- Schiff P. L. (2006): Ergot and its alkaloids. *The American Journal of Pharmaceutical Education* **70**, 98–107.
- Schmidt R. C., Müller A., Hain R., Bartling D., Weiler E. W. (1996): Transgenic tobacco plants expressing the *Arabidopsis thaliana* nitrilase II enzyme. *The Plant Journal* **9**, 683–691.
- Seo M., Akaba S., Oritani T., Delarue M., Bellini C., Caboche M., Koshiba T. (1998): Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 687–693.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. *FEMS Microbiology Review* **31**, 425–448.
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**, 267–284.
- Stacey B. A., Saville B. J., Emery R. J. N. (2011): *Ustilago maydis* produces cytokinins and abscisic acid for potential regulation of tumor formation in maize. *The Journal of Plant Growth Regulation* **30**, 51–63.
- Stepanova A. N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L. M., Xie D. Y., Doležal K., Schlereth A., Jurgens G., Alonso J. M. (2008): TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177–191.
- Stepanova A. N., Yun J., Robles L. M., Novák O., He W., Guo H., Ljung K., Alonso J. M. (2011): The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* **23**, 3961–3973.
- Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y., Kasahara H. (2009): Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 5430–5435.
- Swan D. J. and Mantle P. G. (1991): Parasitic interactions between *Claviceps purpurea* strains in wheat and an acute necrotic host response. *Mycology* **95**, 807–810.
- Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., et al. (2004): Structure–function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell* **16**, 3069–3083.
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., et al. (2008): The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**, 946–954.
- Taber W. A. (1985): Biology of *Claviceps*. In: *Biotechnology Series*. Vol. 6, *Biology of Industrial Microorganisms*. (Demain A. L., Nadine A. S., eds.) The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., New York, USA, 449–486.
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T. (2001a): Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* **42**, 85–93.

- Takei, K., Sakakibara, H., Sugiyama, T. (2001b): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405–26410.
- Tan X., Calderon-Villalobos L. I. A., Sharon M., Zheng C., Robinson C. V., Estelle M., Zheng N. (2007): Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 640–645.
- Tanaka E., Ashizawa T., Sonoda R., Tanaka C. (2008): *Villosiclava virens* gen. nov., comb. nov., teleomorph of *Ustilaginoidea virens*, the causal agent of rice false smut. *Mycotaxon* **106**, 491–501.
- Tanaka E., Koga H., Mori M., Masashi M. (2011): Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. *Journal of Phytopathology* **159**, 522–530.
- Tao Y., Ferrer J. L., Ljung K., *et al.* (2008): Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164–176.
- Tenberge K. B. (1999): Ergot: the genus *Claviceps*. In: *Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles*. (Křen V, Cvak L, eds.) Harwood Academic Press, London, UK, 25–56.
- Tian H., Klämbt D., Jones A. M. (1995): Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26962–26969.
- Tivendale N. D., Ross J. J., Cohen J. D. (2014): The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* **19**, 44–51.
- To J. P. and Kieber J. J. (2008): Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Sciences* **13**, 85–92.
- Tsavkelova E., Oeser B., Oren-Young L., Israeli M., Sasson Y., Tudzynski B., Sharon A. (2012): Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology* **49**, 48–57.
- Tsvetkov L. M., Yeh K. H., Lee S. J., Sun H., Zhang H. (1999): p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Current Biology* **9**, 661–664.
- Tudzynski P., Tenberge K. B., Oeser B. (1995): *Claviceps purpurea*. In: *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular bases*. 56 Vol. II, *Eukaryotes* (Kohmoto K, Singh U. S., Singh R. P., eds.) Pergamon, Elsevier Science, Oxford, UK, 161–187.
- Ulrich J. M. (1960): Auxin production by mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **13**, 429–443.
- Vandenbussche F., Petrášek J., Žádníková P., Hoyerová P., Pešek B., Raz V., Swarup R., *et al.* (2010): The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development* **137**, 597–606.
- Vanneste S. and Friml J. (2009): Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**, 1005–1016.
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., Zhang Q., Kodira C. D., Zheng X. H., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas P. D., Zhang J., Gabor Miklos G. L., Nelson C., Broder S., Clark A. G., Nadeau J., McKusick V. A., Zinder N., *et al.* (2001): The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351.
- Wang S., Bai Y., Shen C., Wu Y., Zhang S., Jiang D., Guilfoyle T. J., Chen M., Qi Y. (2010): Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. *Functional and Integrative Genomics* **10**, 533–546.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10487–10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* **15**, 2532–2550.

- Won C., Shen X., Mashiguchi K., Zheng Z., Dai X., Cheng Y., Kasahara H., Kamiya Y., Chory J., Zhao Y. (2011): Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF *ARABIDOPSIS* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 18518–18523.
- Woodward A. W. and Bartel B. (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707–735.
- Wright A. D., Sampson M. B., Neuffer M.G., Michalczyk L., Slovin J. P., Cohen J. D. (1991): Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize *orange pericarp*, a tryptophan auxotroph. *Science* **254**, 998–1000.
- Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmulling T. (2011): The cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana* are locating mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **156**(4), 1808–1818.
- Xu T., Wen M., Nagawa S., Fu Y., Chen J. G., Wu M. J., Perrot-Rechenmann C., Friml J., Jones A. M., Yang Z. (2010): Cell surface and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell* **143**, 99–110.
- Xu T., Dai N., Chen J., Nagawa S., Cao M., Li H., Zhou Z., *et al.* (2014): Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling. *Science* **343**, 1025–1028.
- Yamada T., Tsukamoto H., Shirashi T., Nomura T., Oku H. (1990): Detection of indoleacetic acid biosynthesis in some species of *Taphrina* causing hyperplastic diseases in plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **56**, 532–540.
- Yanagishima N. (1965): Role of gibberellic acid in the growth response of yeast cells to auxin. *Physiologia Plantarum* **18**, 306–312.
- Yang Y., Hammes U. Z., Taylor C. G., Schachtman D. P., Nielsen E. (2006): High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology* **16**, 1123–1127.
- Yang H., and Murphy A. S. (2009): Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Journal* **59**, 179–191.
- Zažímalová E., Murphy A. S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P. (2010): Auxin transporters – Why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a001552.
- Zenser N., Ellsmore A., Leasure C., Callis J. (2001): Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 11795–11800.
- Zhao Y. (2012): Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant* **5**, 334–338.
- Zhao Y., Hull A. K., Gupta N. R., Goss K. A., Alonso J., Ecker J. R., Normanly J., Chory J., Celenza J. L. (2002): Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development* **16**, 3100–3112.
- Zupan J. R., Zambryski P. (1995): Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *The Journal of Plant Physiology* **107**, 1041–1047.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-----------|---|
| 2,4-D | 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina |
| 4-Cl-IAA | 4-chlor-indol-3-octová kyselina |
| ABCB | ATP-Binding Cassette Subfamily B protein |
| ABP1 | Auxin Binding Protein1 |
| AEC | Auxin Efflux Carrier |
| AFB | Auxin Signalling F-box protein |
| AMI1 | amidasa |
| ARF | Auxin Response Factor |
| Aux/IAA | Auxin/Indol-3-Acetic Acid protein |
| AUX1/LAX | Auxin Resistant1/Like AUX1 |
| CBP1 | C-Terminal Peptide-Binding Protein1 |
| CK | cytokinin |
| CRF | Cytokinin Response Factors |
| <i>cZ</i> | <i>cis</i> -zeatin |
| DHZ | dihydrozeatin |
| DMAPP | dimethylallyldifosfát |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| ER | endoplasmatické retikulum |
| HK | Histidine Kinase |
| HMBDP | hydroxymethylbutenyldifosfát |
| HP | Histidine Phosphotransfer |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| CHASE | Cyclases/Histidine Kinases-Associated Sensing Extracellular |
| IAA | kyselina indol-3-octová |
| IAA-Asp | konjugát kyseliny indol-3-octové a aspartátu |
| IAAld | indol-3-acetaldehyd |
| IAM | indolacetamin |
| IAN | indol-3-acetonitril |
| IAOx | indolacetaldoxim |
| IBA | indol-3-máselná kyselina |
| iP | isopentenyladenin |
| iPRMP | isopentenyladenosinmonofosfát |
| IPT | isopentenyltransferasa |
| IPyA | indol-3-pyrohroznová kyselina |
| LOG | „Lonely guy“, enzym s fosforibohydrolasovou aktivitou |
| MeIAA | methylester indol-3-octové kyseliny |
| NAA | 1-naftyloctová kyselina |
| NIT | nitrolasa |
| PAA | fenyloctová kyselina |
| PILS | PIN-Likes proteiny |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, polymerasová řetězová reakce |
| RIC1 | ROP-Interactive Crib Motif-Containing Protein |
| ROP | RHO-Like GTPases Of Plants |
| RR | Response Regulators |
| SCF | Skp1-Cullin-F-box |
| SKP2A | S-Phase Kinase-Associated Protein 2A |
| TAA | tryptofanaminotransferasa |
| TIR1 | Transport Inhibitor Response1 receptor |

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| TMK | Transmembrane Kinase |
| <i>tZ</i> | <i>trans</i> -zeatin |
| UPLC | ultraúčinná kapalinová chromatografie |
| WT | wild type, nemutovaný organismus |
| YUCCA | enzym flavinmonooxygenasa |

9 PŘÍLOHY

Tab. 5 Výsledky sekvenačních dat vzorků *C. purpurea* ošetřených iP o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v mediu. Výsledky byly získány ze tří nezávislých replikátů a porovnány s kontrolní houbou ošetřenou DMSO. V tabulce jsou uvedeny pouze hodnoty s $p\text{value} \leq 0,01$. Gen – číslo genu v databázi; baseMean – relativní počet transkriptů; log2FoldChange – změna exprese, kladná hodnota značí zvýšení, záporná značí snížení exprese, po odlogaritmování získáme informaci, kolikrát byla exprese změněna; pvalue – statistická hodnota – t-test.

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotace |
|--------------|----------|----------------|----------|--|
| CPUR_01210.1 | 643 | 0,80344026 | 0,000324 | related_to_dnase1_protein |
| CPUR_08330.1 | 51 | -0,62398550 | 0,000624 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04099.1 | 1957 | -0,64907987 | 0,003676 | uncharacterized_protein |
| CPUR_06441.1 | 55812 | 0,63887962 | 0,003802 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08635.1 | 367 | -0,63842062 | 0,003885 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05870.1 | 27 | -0,48728633 | 0,004134 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03108.1 | 12 | 0,53407065 | 0,005394 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03093.1 | 587 | 0,61699416 | 0,005765 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04923.1 | 120 | -0,52103974 | 0,005946 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07554.1 | 42 | 0,44563907 | 0,008765 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08722.1 | 19870 | 0,53731951 | 0,009546 | clock-controlled_pheromone_ccg-4_precursor |
| CPUR_00685.1 | 50 | 0,56593191 | 0,009761 | related_to_hsp70_protein |
| CPUR_00685.1 | 50 | 0,56593191 | 0,009761 | related_to_hsp70_protein |
| CPUR_02916.1 | 79 | -0,54586779 | 0,010451 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02570.1 | 197 | -0,52874651 | 0,010930 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05375.1 | 573 | -0,56669005 | 0,011028 | uncharacterized_protein |
| CPUR_06762.1 | 3105 | -0,41969880 | 0,011341 | Carboxyphosphoenolpyruvate_phosphonmutase |
| CPUR_04100.1 | 1559 | -0,55703286 | 0,011618 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05919.1 | 295 | 0,55762844 | 0,012550 | related_to_integral_membrane_protein_PTH11 |
| CPUR_05542.1 | 446 | 0,55159872 | 0,013431 | uncharacterized_protein |

Tab. 6 (str. 66 – 75) Výsledky sekvenačních dat vzorků *C. purpurea* ošetřených IAA o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v mediu. Výsledky byly získány ze tří nezávislých replikátů a porovnány s kontrolní houbou ošetřenou DMSO. V tabulce jsou uvedeny pouze hodnoty s pvalue $\leq 0,01$. Gen – číslo genu v databázi; baseMean – relativní počet transkriptů; log2FoldChange – změna exprese, kladná hodnota značí zvýšení, záporná značí snížení exprese, po odlogaritmování získáme informaci, kolikrát byla exprese změněna; pvalue – statistická hodnota – t-test.

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotace |
|--------------|----------|----------------|----------|--|
| CPUR_00544.1 | 5011 | 1,90246689 | 0,000179 | Related_to_vacuolar_protein_sorting-associated_protein_VPS5 |
| CPUR_00109.1 | 160 | 1,54766899 | 0,000215 | Related_to_S-adenosylmethionine:diacylglycerol_3-amino-3-carboxypropyl_transferase |
| CPUR_08626.1 | 38 | 1,77451898 | 0,000259 | Transposase |
| CPUR_08766.1 | 46 | 1,87041160 | 0,000283 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05113.1 | 397 | 1,51995690 | 0,000365 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05713.1 | 310 | 1,29287056 | 0,000398 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08840.1 | 30 | 1,68759971 | 0,000401 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04923.1 | 45 | -1,81184802 | 0,000404 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05176.1 | 2814 | 1,70742794 | 0,000487 | Sphingolipid_long_chain_base-responsive_protein_PIL1_ |
| CPUR_03761.1 | 126 | 1,67015234 | 0,000589 | Transcription_factor_TFIID_complex_subunit_Taf111_ |
| CPUR_08594.1 | 167 | 1,62080756 | 0,000735 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07730.1 | 33 | -1,75513186 | 0,000737 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08868.1 | 513 | 1,27605867 | 0,000752 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01288.1 | 242 | 1,71670773 | 0,000881 | related_to_SUC2_-_invertase_(sucrose_hydrolyzing_enzyme) |
| CPUR_03795.1 | 3230 | 1,44177157 | 0,000945 | Amine_oxidase_ |
| CPUR_04520.1 | 2710 | 1,35632771 | 0,000949 | MRT;_a_raffinose_family_of_oligosaccharides_transporter_ |
| CPUR_08853.1 | 3503 | 1,71037096 | 0,000949 | Transposase_InsO_and_inactivated_derivatives |
| CPUR_08853.1 | 3503 | 1,71037096 | 0,000949 | Transposase |
| CPUR_07408.1 | 648 | -1,67360348 | 0,000954 | probable_SIT1_-_Transporter_of_the_bacterial_siderophore_ferrioxamine_B |
| CPUR_04961.1 | 160391 | 1,64244000 | 0,001011 | Heat_shock_protein_101_ |
| CPUR_08033.1 | 842 | 1,60233591 | 0,001041 | related_to_PCF11_component_of_pre-mRNA_3`-end_processing_factor_CF_I |
| CPUR_05030.1 | 20755 | 1,69491051 | 0,001044 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00675.1 | 97 | 1,59028172 | 0,001046 | Uncharacterized_vacuolar_membrane_protein_YJR054W |
| CPUR_00601.1 | 151 | 1,48128969 | 0,001124 | uncharacterized_protein |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|----------|----------------|----------|--|
| CPUR_00835.1 | 42 | 1,56793239 | 0,001156 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08266.1 | 1307 | 1,61993770 | 0,001214 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02942.1 | 2135 | 1,45109376 | 0,001280 | Protein_MPE1 |
| CPUR_08203.1 | 84 | -1,65176739 | 0,001315 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08604.1 | 639 | 1,32253137 | 0,001315 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00382.1 | 272 | -1,65452272 | 0,001375 | SET_domain-containing_protein_(function_unknown) |
| CPUR_04127.1 | 268 | 1,58568430 | 0,001442 | Aminoglycoside_phosphotransferase_(Fragment)_ |
| CPUR_04563.1 | 101 | -1,50249259 | 0,001665 | Vitamin_B6_transporter,_putative_ |
| CPUR_06189.1 | 64 | 1,61641490 | 0,001675 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03636.1 | 195 | 1,60731114 | 0,001753 | related_to_WD_repeat_protein_WDR6 |
| CPUR_03636.1 | 195 | 1,60731114 | 0,001753 | related_to_WD_repeat_protein_WDR6 |
| CPUR_03636.1 | 195 | 1,60731114 | 0,001753 | related_to_WD_repeat_protein_WDR6 |
| CPUR_03636.1 | 195 | 1,60731114 | 0,001753 | related_to_WD_repeat_protein_WDR6 |
| CPUR_05675.1 | 29 | 1,51809142 | 0,001808 | related_to_ferric-chelate_reductase |
| CPUR_05675.1 | 29 | 1,51809142 | 0,001808 | related_to_ferric-chelate_reductase |
| CPUR_05613.1 | 962 | 1,61640139 | 0,001841 | Chromosome_segregation_ATPase |
| CPUR_02355.1 | 4 | 1,57501182 | 0,001936 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03763.1 | 405 | 1,54429921 | 0,001961 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08530.1 | 116 | 1,50101031 | 0,001966 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04831.1 | 79 | 1,59575062 | 0,002083 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00032.1 | 2025 | 1,53168870 | 0,002173 | uncharacterized_protein |
| CPUR_06814.1 | 2438 | 1,48156414 | 0,002213 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03478.1 | 1353 | 1,22577290 | 0,002301 | uncharacterized_protein |
| CPUR_06524.1 | 3132 | 1,56806152 | 0,002363 | Swim_zinc_finger_domain_protein_ |
| CPUR_07614.1 | 2878 | 1,12584610 | 0,002387 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08515.1 | 174 | 1,52535494 | 0,002399 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03762.1 | 239 | 1,45951706 | 0,002585 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01280.1 | 64 | 1,48013135 | 0,002602 | uncharacterized_protein |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|----------|----------------|----------|---|
| CPUR_02019.1 | 78 | -1,55290661 | 0,002663 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05797.1 | 155 | 1,41941166 | 0,002718 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05797.1 | 155 | 1,41941166 | 0,002718 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01625.1 | 10539 | 1,40879656 | 0,002729 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00136.1 | 2840 | 1,45402407 | 0,002759 | related_to_Ca2+/H+-exchanging_protein,_vacuolar |
| CPUR_00737.1 | 49 | 1,51672512 | 0,002787 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02118.1 | 17 | -1,54774816 | 0,002797 | Ubiquinone/menaquinone_biosynthesis_C-methylase_UbiE |
| CPUR_00839.1 | 155 | 1,39093578 | 0,002800 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07457.1 | 29 | 1,45593842 | 0,002912 | Thaumatococcus_cochinchinensis_Thaumatococcus_cochinchinensis |
| CPUR_04843.1 | 1133 | 1,48772892 | 0,002993 | related_to_epoxide_hydrolase |
| CPUR_08597.1 | 292 | 1,25469764 | 0,003213 | related_to_antiviral_protein_and_putative_helicase |
| CPUR_00838.1 | 120 | 1,38863359 | 0,003245 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08767.1 | 4166 | 1,41714407 | 0,003271 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03527.1 | 156 | 1,33079973 | 0,003290 | related_to_fructosyl_amino_acid_oxidase |
| CPUR_02406.1 | 578 | 1,41202086 | 0,003296 | SAGA-like_transcriptional_regulatory_complex_subunit_Spt3_ |
| CPUR_02392.1 | 72 | -1,31035582 | 0,003349 | related_to_phosphomevalonate_kinase |
| CPUR_03150.1 | 41 | 1,49411634 | 0,003372 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08593.1 | 241 | 1,44159024 | 0,003393 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04938.1 | 43 | 1,33566808 | 0,003435 | probable_alpha-L-arabinofuranosidase |
| CPUR_08086.1 | 171 | 1,46523559 | 0,003545 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04026.1 | 61 | -1,51069098 | 0,003570 | probable_carboxypeptidase |
| CPUR_00543.1 | 14973 | 1,51094685 | 0,003626 | Putative_transcription_initiation_factor_TFIID_100kDa_ |
| CPUR_00543.1 | 14973 | 1,51094685 | 0,003626 | Putative_transcription_initiation_factor_TFIID_100kDa_ |
| CPUR_00543.1 | 14973 | 1,51094685 | 0,003626 | Putative_transcription_initiation_factor_TFIID_100kDa_ |
| CPUR_00543.1 | 14973 | 1,51094685 | 0,003626 | Putative_transcription_initiation_factor_TFIID_100kDa_ |
| CPUR_04499.1 | 23447 | 1,31754251 | 0,003647 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01747.1 | 20527 | 1,45442251 | 0,003787 | related_to_AP-1-like_transcription_factor |
| CPUR_05947.1 | 243 | 1,38015526 | 0,003912 | Aquaglyceroporin_ |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|----------|----------------|----------|--|
| CPUR_05428.1 | 5 | 1,47935761 | 0,003916 | probable_scytalone_dehydratase |
| CPUR_02648.1 | 226435 | 1,34078111 | 0,003974 | probable_heat_shock_protein_70_(hsp70) |
| CPUR_08855.1 | 1773 | 1,28109841 | 0,004010 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08795.1 | 194 | 1,13542411 | 0,004079 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05114.1 | 572 | 1,10699783 | 0,004143 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05810.1 | 571 | -1,43015170 | 0,004212 | Sulfate_permease_II_ |
| CPUR_01365.1 | 163 | 1,09819773 | 0,004219 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08783.1 | 9 | -1,47884439 | 0,004301 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08783.1 | 9 | -1,47884439 | 0,004301 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03996.1 | 210 | 1,34543799 | 0,004395 | related_to_receptor-like_protein_kinase_5_precursor |
| CPUR_03996.1 | 210 | 1,34543799 | 0,004395 | related_to_receptor-like_protein_kinase_5_precursor |
| CPUR_03996.1 | 210 | 1,34543799 | 0,004395 | related_to_receptor-like_protein_kinase_5_precursor |
| CPUR_07998.1 | 17785 | 1,26789591 | 0,004440 | Heat_shock_protein_78_ |
| CPUR_05970.1 | 452 | 1,26435990 | 0,004642 | related_to_aspergillopepsin_II_precursor |
| CPUR_05712.1 | 270 | 1,11269440 | 0,004657 | MFS_family_permease |
| CPUR_05712.1 | 270 | 1,11269440 | 0,004657 | Predicted_arabinose_efflux_permease,_MFS_family |
| CPUR_04655.1 | 2493 | 1,19775705 | 0,004684 | EST/SMG-like_protein_1 |
| CPUR_08326.1 | 225 | 1,26114018 | 0,004833 | Chromosome_segregation_ATPase |
| CPUR_05686.1 | 253 | -1,13284403 | 0,004900 | Metal-dependent_hydrolase,_endonuclease/exonuclease/phosphatase_family |
| CPUR_03213.1 | 122 | 1,31061825 | 0,004919 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02038.1 | 12801 | 1,36854224 | 0,005044 | Vip1_ |
| CPUR_04959.1 | 564 | 1,40344627 | 0,005105 | Amino_acid/polyamine_transporter_I |
| CPUR_06133.1 | 10 | 1,45596817 | 0,005117 | related_to_xyloglucan_endo-transglycosylase-like_protein |
| CPUR_01272.1 | 238571 | 1,36255375 | 0,005234 | probable_heat_shock_protein_30 |
| CPUR_06002.1 | 135 | -1,11615684 | 0,005251 | related_to_pyrazinamidase/nicotinamidase |
| CPUR_03826.1 | 2814 | 1,32747773 | 0,005262 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01749.1 | 31 | 1,43101181 | 0,005306 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07074.1 | 119 | -1,39673354 | 0,005409 | Carbonic_anhydrase_ |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|-----------------|-----------------------|---------------|--|
| CPUR_01281.1 | 1441 | 1,23901981 | 0,005536 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01559.1 | 4636 | 1,37198626 | 0,005583 | probable_Ca2+-transport_(H+/Ca2+_exchange)_protein |
| CPUR_02748.1 | 376 | -1,28028401 | 0,005600 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02085.1 | 11891 | 1,41523237 | 0,005627 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03275.1 | 247749 | 1,37760012 | 0,005636 | probable_heat_shock_protein_30 |
| CPUR_00298.1 | 34 | -1,40451840 | 0,005694 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08874.1 | 28626 | 1,39633956 | 0,005711 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08144.1 | 957 | 1,41093849 | 0,005807 | related_to_choline_monooxygenase |
| CPUR_06377.1 | 932 | 1,29455240 | 0,006073 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01282.1 | 352049 | 1,37064365 | 0,006178 | probable_heat_shock_protein_30 |
| CPUR_08838.1 | 72045 | 1,39984078 | 0,006216 | Nadp-specific_glutamate_dehydrogenase |
| CPUR_02354.1 | 1010 | 1,35202470 | 0,006220 | related_to_CSI2_protein |
| CPUR_04128.1 | 4655 | 1,31047965 | 0,006273 | related_to_interferon-regulated_resistance_GTP-binding_protein |
| CPUR_05463.1 | 21 | 1,41493910 | 0,006316 | related_to_N-glycosyltransferase |
| CPUR_01897.1 | 989 | 1,13017602 | 0,006326 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05792.1 | 44 | 1,40499421 | 0,006363 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00092.1 | 2522 | -1,35847677 | 0,006365 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02157.1 | 36 | 1,29952082 | 0,006474 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04421.1 | 521 | 1,23229585 | 0,006613 | Anthranilate_phosphoribosyltransferase_ |
| CPUR_03915.1 | 1566 | 1,33790125 | 0,006701 | related_to_RAD57_protein |
| CPUR_02583.1 | 296 | -1,20751597 | 0,006739 | related_to_non-ribosomal_peptide_synthetase |
| CPUR_02583.1 | 296 | -1,20751597 | 0,006739 | related_to_non-ribosomal_peptide_synthetase |
| CPUR_02583.1 | 296 | -1,20751597 | 0,006739 | related_to_non-ribosomal_peptide_synthetase |
| CPUR_00465.1 | 849 | 1,39865395 | 0,006846 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08833.1 | 21936 | 1,30790145 | 0,006886 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02795.1 | 267 | -1,32733267 | 0,007086 | related_to_gamma-butyrobetaine,2-oxoglutarate_dioxygenase |
| CPUR_08743.1 | 39 | 1,38982614 | 0,007086 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01808.1 | 529 | 1,10142937 | 0,007228 | uncharacterized_protein |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|-----------------|-----------------------|---------------|---|
| CPUR_03131.1 | 113 | -1,26294839 | 0,007255 | related_to_general_amino_acid_permease |
| CPUR_01287.1 | 35 | 1,34244629 | 0,007291 | related_to_chitin_synthase |
| CPUR_04498.1 | 50 | 1,14765768 | 0,007300 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03646.1 | 12 | 1,37572494 | 0,007302 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04521.1 | 110 | 1,12862841 | 0,007392 | related_to_pisatin_demethylase_(cytochrome_P450) |
| CPUR_05906.1 | 532 | 0,99436152 | 0,007465 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03913.1 | 295 | 1,18277213 | 0,007784 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02129.1 | 43 | -1,36679304 | 0,007796 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03714.1 | 43 | -1,35520390 | 0,007891 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08832.1 | 512 | 1,13562563 | 0,007942 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00466.1 | 1150 | 1,30887546 | 0,008395 | Mitochondrial_import_inner_membrane_translocase_subunit_tim23_ |
| CPUR_08758.1 | 26 | 1,31542490 | 0,008418 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03803.1 | 131 | 1,14114726 | 0,008493 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03276.1 | 4539 | 1,32915823 | 0,008551 | DNA_repair_protein_RAD51_ |
| CPUR_07320.1 | 1850 | 1,24427363 | 0,008553 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03277.1 | 1671 | 1,18763263 | 0,008582 | uncharacterized_protein |
| CPUR_06527.1 | 52 | -1,36202914 | 0,008633 | related_to_hsp70_protein |
| CPUR_06527.1 | 52 | -1,36202914 | 0,008633 | related_to_hsp70_protein |
| CPUR_06915.1 | 55 | -1,30405830 | 0,008670 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00793.1 | 124 | -1,09461656 | 0,008703 | related_to_tyrosinase_precursor |
| CPUR_00294.1 | 484 | 1,32498193 | 0,008765 | Isoleucyl-tRNA_synthetase |
| CPUR_08228.1 | 354 | -1,12026309 | 0,008897 | Citrate_synthase_ |
| CPUR_06026.1 | 11 | -1,34048694 | 0,009025 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03863.1 | 5554 | 1,17674968 | 0,009106 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03885.1 | 176 | 1,26730356 | 0,009211 | related_to_mouse_KIN17_protein |
| CPUR_02560.1 | 708 | 1,07824650 | 0,009214 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05764.1 | 9861 | 1,14760821 | 0,009250 | related_to_quinate_transport_protein |
| CPUR_04275.1 | 6169 | 1,18659582 | 0,009279 | related_to_mismatched_base_pair_and_cruciform_dna_recognition_protein |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|-----------------|-----------------------|---------------|--|
| CPUR_00452.1 | 724 | 1,07531804 | 0,009793 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01180.1 | 501 | 1,11242932 | 0,009897 | related_to_nitrate_assimilation_regulatory_protein_nirA |
| CPUR_03410.1 | 16019 | 1,11939658 | 0,009928 | probable_RCO3_-_probable_glucose_transporter |
| CPUR_05992.1 | 134 | 1,19310790 | 0,010010 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05535.1 | 296 | 1,15227114 | 0,010079 | related_to_myosin_regulatory_light_chain_1 |
| CPUR_00394.1 | 2639 | 1,26200074 | 0,010106 | SNARE_complex_subunit_protein_ |
| CPUR_04271.1 | 45 | 1,25053095 | 0,010294 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07733.1 | 449 | 1,08815578 | 0,010399 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03108.1 | 6 | 1,32961727 | 0,010503 | Necrosis-and_ethylene-inducing_protein |
| CPUR_07682.1 | 93 | -1,22777734 | 0,010510 | related_to_diacylglycerol_pyrophosphate_phosphatase_DPP1 |
| CPUR_05458.1 | 17 | 1,31007982 | 0,010624 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03560.1 | 36 | -1,24065988 | 0,010706 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02633.1 | 76999 | 1,27117788 | 0,010917 | retrotransposon_HobS_hobase |
| CPUR_00369.1 | 39 | 1,29125106 | 0,010990 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07212.1 | 11 | 1,31660880 | 0,011065 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01181.1 | 310 | 1,19843579 | 0,011078 | related_to_NAD(P)H-dependent_oxidoreductase |
| CPUR_08353.1 | 101 | -1,31856047 | 0,011121 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08595.1 | 350 | 0,97376017 | 0,011183 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00183.1 | 39 | 1,23288367 | 0,011248 | related_to_trichodiene_oxygenase_cytochrome_P450 |
| CPUR_02627.1 | 404 | 1,14437487 | 0,011323 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07333.1 | 68 | -1,16016032 | 0,011429 | related_to_integral_membrane_protein |
| CPUR_06342.1 | 17 | 1,29591022 | 0,011432 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00343.1 | 9 | -1,31070831 | 0,011450 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00873.1 | 221 | 1,01727743 | 0,011494 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00559.1 | 215 | -1,25406790 | 0,011572 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00540.1 | 1462 | 0,92444335 | 0,011810 | Fumarate_hydratase_ |
| CPUR_01254.1 | 43 | -1,24776647 | 0,011818 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05862.1 | 64372 | 0,93442427 | 0,011835 | uncharacterized_protein |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|----------|----------------|----------|---|
| CPUR_05856.1 | 109 | -1,26699451 | 0,011885 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03201.1 | 34 | -1,23841016 | 0,011927 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08632.1 | 77 | -1,17726388 | 0,012003 | Ketosteroid_isomerase-related_protein |
| CPUR_04215.1 | 598 | 1,22853834 | 0,012024 | Putative_kinetochore_protein_ndc-80_ |
| CPUR_06235.1 | 329 | 1,10457945 | 0,012038 | ANK-repeat_protein_MBP1_ |
| CPUR_06235.1 | 329 | 1,10457945 | 0,012038 | ANK-repeat_protein_MBP1_ |
| CPUR_06235.1 | 329 | 1,10457945 | 0,012038 | ANK-repeat_protein_MBP1_ |
| CPUR_06235.1 | 329 | 1,10457945 | 0,012038 | ANK-repeat_protein_MBP1_ |
| CPUR_06235.1 | 329 | 1,10457945 | 0,012038 | ANK-repeat_protein_MBP1_ |
| CPUR_04518.1 | 1282 | 0,92143743 | 0,012074 | probable_alpha-glucosidase_(maltase) |
| CPUR_04518.1 | 1282 | 0,92143743 | 0,012074 | probable_alpha-glucosidase_(maltase) |
| CPUR_05120.1 | 127 | 1,11474532 | 0,012156 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05219.1 | 70 | 1,21701205 | 0,012223 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00085.1 | 908 | 1,23479580 | 0,012253 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01644.1 | 8 | 1,30261013 | 0,012269 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03138.1 | 35 | 1,17576670 | 0,012470 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00125.1 | 542 | 1,20029332 | 0,012490 | related_to_aldehyde_dehydrogenase |
| CPUR_03116.1 | 557 | 1,09659678 | 0,012592 | probable_benzoate_4-monooxygenase_cytochrome_P450 |
| CPUR_03116.1 | 557 | 1,09659678 | 0,012592 | probable_benzoate_4-monooxygenase_cytochrome_P450 |
| CPUR_04088.1 | 12 | 1,29493297 | 0,012708 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00296.1 | 120 | 1,26651071 | 0,012769 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02059.1 | 262 | -1,27699480 | 0,012903 | related_to_flavonol_synthase-like_protein |
| CPUR_00840.1 | 276 | 1,13175981 | 0,012983 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04063.1 | 72 | -1,14246237 | 0,013088 | Putative_uncharacterized_protein_ |
| CPUR_01045.1 | 1601 | 1,21272525 | 0,013089 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02967.1 | 131 | 0,93925811 | 0,013110 | uncharacterized_protein |
| CPUR_00512.1 | 1004 | 1,03357408 | 0,013141 | probable_ser/thr_protein_phosphatase |
| CPUR_02570.1 | 77 | -1,25052482 | 0,013246 | Methylase_of_polypeptide_chain_release_factors |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|----------|----------------|----------|---|
| CPUR_03204.1 | 24 | -1,22399555 | 0,013300 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07026.1 | 11 | -1,28273705 | 0,013469 | Beta-xylosidase_ |
| CPUR_00751.1 | 804 | 1,28135377 | 0,013543 | probable_acetylxylan_esterase_precursor |
| CPUR_02153.1 | 377 | -1,16689291 | 0,013769 | uncharacterized_protein |
| CPUR_02153.1 | 377 | -1,16689291 | 0,013769 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03117.1 | 146 | 1,16939807 | 0,013813 | related_to_quinate_transport_protein |
| CPUR_03212.1 | 199 | 1,18173900 | 0,013855 | uncharacterized_protein |
| CPUR_07729.1 | 33 | -1,23294901 | 0,013882 | uncharacterized_protein |
| CPUR_01623.1 | 80 | 1,12265592 | 0,014007 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08014.1 | 379 | 1,05301449 | 0,014100 | Sugar_phosphate_permease |
| CPUR_05875.1 | 75 | -1,19508086 | 0,014113 | probable_delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA_isomerase_precursor_(ech1) |
| CPUR_05542.1 | 208 | 1,00188090 | 0,014135 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05098.1 | 77 | 1,03482798 | 0,014138 | related_to_allantoate_permease |
| CPUR_00393.1 | 1559 | 1,10409477 | 0,014158 | related_to_SCD6_-_suppressor_of_clathrin_deficiency |
| CPUR_04255.1 | 4231 | 1,18482372 | 0,014249 | Calcipressin_family_protein_ |
| CPUR_01736.1 | 38 | -1,20844673 | 0,014303 | related_to_ethanolamine_kinase |
| CPUR_05840.1 | 2101 | 1,21388478 | 0,014391 | uncharacterized_protein |
| CPUR_03118.1 | 6748 | 0,92703262 | 0,014443 | MFS_quinate_transporter_ |
| CPUR_00621.1 | 10 | -1,27017048 | 0,014575 | related_to_plant_dihydroflavonol-4-reductases |
| CPUR_08733.1 | 331 | 1,24511330 | 0,014608 | uncharacterized_protein |
| CPUR_04943.1 | 5451 | 1,14045677 | 0,014614 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08695.1 | 10 | 1,26535424 | 0,014805 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05531.1 | 684 | 1,07864835 | 0,014829 | Related_to_polyadenylation_factor_I_subunit_2 |
| CPUR_05531.1 | 684 | 1,07864835 | 0,014829 | Related_to_polyadenylation_factor_I_subunit_2 |
| CPUR_05531.1 | 684 | 1,07864835 | 0,014829 | Related_to_polyadenylation_factor_I_subunit_2 |
| CPUR_05531.1 | 684 | 1,07864835 | 0,014829 | Related_to_polyadenylation_factor_I_subunit_2 |
| CPUR_05531.1 | 684 | 1,07864835 | 0,014829 | Related_to_polyadenylation_factor_I_subunit_2 |
| CPUR_05531.1 | 684 | 1,07864835 | 0,014829 | Related_to_polyadenylation_factor_I_subunit_2 |

| gen | baseMean | log2FoldChange | pvalue | anotation |
|--------------|-----------------|-----------------------|---------------|-------------------------|
| CPUR_05116.1 | 20 | 1,26657653 | 0,014842 | uncharacterized_protein |
| CPUR_05878.1 | 1979 | 0,98157309 | 0,014875 | uncharacterized_protein |
| CPUR_08863.1 | 132 | -1,10235653 | 0,014882 | uncharacterized_protein |
| CPUR_06659.1 | 59 | -1,09147256 | 0,014913 | uncharacterized_protein |