

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Funkce předpokládaného auxinového transportéru
u houby *Claviceps purpurea***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michaela Hradilová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Josef Vrabka
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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 bakaláře*

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Mgr. Josefu Vrabkovi za odbornou pomoc, věnovaný čas, vysvětlení dané problematiky a připomínky při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala všem zaměstnancům Oddělení molekulární biologie za cenné rady a ochotu kdykoliv pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Hradilová
Název práce	Funkce předpokládaného auxinového transportéru u houby <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Josef Vrabka
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Claviceps purpurea patří mezi tzv. námellové houby, které parazitují na více než 600 jednoděložných rostlinách, zejména na žitě, pšenici a ječmeni. Tato houba je biotrofním parazitem, ale na rozdíl od ostatních biotrofů může být kultivována v axenické kultuře. Vzhledem k tomu, že napadená hostitelská tkáň nevykazuje hypersenzitivní reakci ani zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku, je možné, že se tato houba snaží během infekce maskovat a napodobit rostlinné pletivo. Tato práce se zabývá studiem předpokládaného auxinového přenašeče *CpAUX*, který byl identifikován v sekvenci transkriptomu *C. purpurea* a který vykazuje homologii s rostlinnými PIN proteiny.

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše na téma biologie *C. purpurea* a na téma rostlinných hormonů auxinů se zaměřením na auxiny u houbových organismů. V experimentální části byly provedeny transformace *C. purpurea* 20.1 za účelem delece genu *CpAUX*, byl připraven konstrukt a byly provedeny transformace *Arabidopsis thaliana* Col-0.

Primární transformanti *C. purpurea* byly ověřeny pomocí diagnostické PCR a Southern blotu, poté byla u těchto delečních mutantů zkoumána změna fenotypu oproti WT. Pro ověření funkce genu *CpAUX* byl připraven cDNA transkript tohoto genu, který byl ligován do *pER8* plasmidu s promotorem inducibilním pomocí estradiolu. Takto připravený plasmid byl použit na transformace *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101. Kultura *A. tumefaciens*, u které byla potvrzena přítomnost *pER8* plasmidu s vloženým *CpAUX*, byla použita na transformace *A. thaliana* metodou „floral dip“.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , auxin, <i>Claviceps purpurea</i>
Počet stran	61
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Michaela Hradilová
Title	Function of putative auxin transporter in fungus <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Josef Vrabka
The year of presentation	2014

Abstract

Claviceps purpurea belongs to group of ergot fungi that parasitize on more than 600 monocots particularly on rye, wheat and barley. This fungus is a biotroph, but in contrast to other biotrophs, it can be grown in axenic culture. In view of the fact, that the infected host tissue does not exhibit hypersensitivity or increased production of reactive oxygen species, it is possible that this fungus is trying to mask itself during the infection and imitate a plant tissue. This work investigates the putative auxin transporter *CpAUX*, which was identified in sequencing of *C. purpurea* transcriptome and which has homology to plant PIN proteins.

In the theoretical part of this work a review on *C. purpurea* biology and plant hormones auxins with a focus on fungal auxins was written. In the experimental part transformation of *C. purpurea* 20.1 for the purpose of *CpAUX* gene deletion, preparation of construct and transformation of *Arabidopsis thaliana* Col-0 were performed.

Primary *C. purpurea* transformants were confirmed by diagnostic PCR and Southern blot and then deletion mutants were examined for changes in their phenotype compared to WT. To verify the function of *CpAUX* gene, cDNA transcript of this gene was ligated into *pER8* plasmid with promoter inducible by estradiol. Prepared plasmid was used for transformation of *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101. The culture of *A. tumefaciens* with the confirmed presence of *pER8* plasmid with inserted *CpAUX* was used for transformation of *A. thaliana* using „floral dip“ method.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , auxin, <i>Claviceps purpurea</i>
Number of pages	61
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	1
2 Současný stav řešené problematiky	2
2.1 <i>Claviceps purpurea</i>	2
2.1.1 Taxonomické zařazení	2
2.1.2 Houba <i>C. purpurea</i>	2
2.1.3 Životní cyklus	3
2.2 Auxiny	5
2.2.1 Chemická struktura	6
2.2.2 Metabolismus IAA u rostlin	6
2.2.2.1 Biosyntéza	6
2.2.2.2 Konjugace a degradace	9
2.2.3 Transport IAA	9
2.2.3.1 Chemiosmotická hypotéza	9
2.2.3.2 PIN proteiny	10
2.2.4 Auxiny u hub	12
2.2.4.1 Geny zapojené do biosyntézy IAA	12
2.2.4.2 Předpokládané biosyntetické dráhy IAA	12
2.2.4.3 Fyziologické účinky	13
3 Experimentální část	19
3.1 Materiál	19
3.1.1 Biologický materiál	19
3.1.2 Chemikálie a pomůcky	19
3.1.3 Roztoky a média	21
3.1.4 Použité kity a návody	24
3.1.5 Přístroje	24
3.2 Metody	25
3.2.1 Transformace <i>C. purpurea</i> 20.1	25
3.2.1.1 Příprava protoplastů	25
3.2.1.2 Transformace protoplastů	25
3.2.1.3 Izolace genomické DNA	26
3.2.1.4 Diagnostická PCR	26
3.2.1.5 Elektroforéza v agarosovém gelu	27
3.2.2 Příprava RNA próby	28
3.2.2.1 Restrikce enzymem <i>HindIII</i>	28
3.2.2.2 Purifikace naštěpené DNA	28
3.2.2.3 <i>In vitro</i> transkripce	29
3.2.2.4 Elektroforéza ve formaldehydovém gelu	29
3.2.3 Southern blot	29
3.2.3.1 Restrikce gDNA enzymem <i>Sall</i> , ethanolová precipitace	29
3.2.3.2 Elektroforéza v agarosovém gelu, promývání gelu	30
3.2.3.3 Kapilární přenos gDNA	30
3.2.3.4 Prehybridizace a hybridizace	31
3.2.3.5 Detekce	31
3.2.4 Příprava cDNA <i>C. purpurea</i> 20.1	31
3.2.4.1 Izolace RNA	31
3.2.4.2 Reverzní transkripce	33
3.2.5 Ligace cDNA transkriptu genu <i>CpAUX</i> do <i>pDRIVE</i> plasmidu	33

3.2.5.1 PCR, elektroforéza v agarosovém gelu	33
3.2.5.2 Izolace a purifikace DNA z agarosového gelu	34
3.2.5.3 Ligace <i>do pDRIVE</i> plasmidu	34
3.2.5.4 Transformace elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10	35
3.2.5.5 Alfa komplementace	36
3.2.5.6 Izolace plasmidu alkalickou lyzí	36
3.2.5.7 Restrikce enzymem <i>EcoRI</i>	36
3.2.5.8 Izolace plasmidu pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu	37
3.2.6 Ligace genu <i>CpAUX</i> do <i>pER8</i> plasmidu	38
3.2.6.1 Restrikce <i>pDRIVE</i> plasmidu enzymy <i>AscI</i> a <i>SpeI</i>	38
3.2.6.2 Izolace a purifikace insertu a <i>pER8</i> plasmidu	38
3.2.6.3 Ligace do <i>pER8</i> plasmidu	39
3.2.6.4 Elektroporace <i>E. coli</i> TOP10, izolace plasmidu s insertem	40
3.2.7 Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
3.2.8 Ověření transformace <i>A. tumefaciens</i>	40
3.2.9 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> metodou „floral dip“	41
4 Výsledky a diskuze	42
4.1 Transformace <i>C. purpurea</i> 20.1	43
4.2 Southern blot	44
4.3 Fenotyp mutantu $\Delta CpAUX$ 45	47
4.4 Ligace <i>CpAUX</i> do <i>pER8</i> plasmidu	48
4.5 Transformace <i>A. tumefaciens</i>	54
4.6 Transformace <i>A. thaliana</i> metodou „floral dip“	54
5 Závěr	55
6 Literatura	56
7 Seznam použitých zkratk	61

1 ÚVOD

Claviceps purpurea je biotrofní fytopatogenní houba z třídy Ascomycetes, parazitující na jednoděložných rostlinách. Infekce je v pozdní fázi charakteristická tvorbou černofialových sklerocií, označovaných jako námel. Napadená rostlina, nejčastěji žito (*Secale cereale*), nedokáže odlišit rostlinné pletivo od houbového mycelia. Hostitelská rostlina při infekci neodpovídá hypersenzitivní reakcí ani zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku. Podle dosud nepublikovaných výsledků Oddělení molekulární biologie, CRH byly u houby *Claviceps purpurea* (kmen 20.1) nalezeny rostlinné hormony auxiny a cytokininy. Přítomnost obou druhů hormonů napovídá, že se houba snaží napodobit rostlinné pletivo pro svoje maskování. Sekvenování transkriptomu *C. purpurea* z časné fáze infekce odhalila vysoce exprimovaný gen kódující potencionální auxinový přenašeč s homologií na rostlinné PIN proteiny. Transportní proteiny auxinů byly charakterizovány pouze u cévnatých rostlin, nejlépe prostudovány jsou u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Aktivní transport auxinů u vláknitých hub nebyl do současné doby studován.

Cílem této bakalářské práce je v teoretické části zpracovat literární rešerši na téma biologie *C. purpurea* a rostlinných hormonů auxinů, se zaměřením na auxiny u houbových organismů. Praktická část je rozdělena na transformace *C. purpurea* (20.1) za účelem delece genu pro pravděpodobný auxinový přenašeč označený *CpAUX*, přípravu konstruktů a transformaci *Arabidopsis thaliana* (Col-0). Primární mutanti *C. purpurea* byli ověřeni pomocí Southern blotu a pozorování na změny v houbovém fenotypu. Pro transformaci *A. thaliana* byl zvolen konstrukt s inducibilním promotorem pomocí estradiolu. V případě, že by exprese genu *CpAUX* byla pro rostlinu letální, bude tento fakt jednoznačně průkazný.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea*

2.1.1 Taxonomické zařazení

Říše:	houby (<i>Fungi</i>)
Oddělení:	houby vřeckovýtrusné (<i>Ascomycota</i>)
Třída:	vřeckovýtrusné houby (<i>Ascomycetes</i>)
Řád:	masenkotvaré (<i>Hypocreales</i>)
Čeleď:	paličkovicovité (<i>Clavicipitaceae</i>)
Rod:	paličkovice (<i>Claviceps</i>)
Druh:	paličkovice nachová (<i>Claviceps purpurea</i>)

2.1.2 Houba *C. purpurea*

Zástupci rodu *Claviceps* parazitují na více než 600 jednoděložných rostlinách, zejména na žitě, pšenici a ječmeni (Bové, 1970). *C. purpurea*, která napadá více než 400 rostlinných druhů (Taber, 1985) patří mezi biotrofní parazity, k získání živin tedy potřebuje živého hostitele. Na rozdíl od většiny ostatních biotrofů může být tato houba kultivována v axenické kultuře, což usnadňuje experimentální přístup (Tudzynski a Scheffer, 2004).

Námel - sklerocium *C. purpurea* - obsahuje vysoké koncentrace ergoidních (námelových) alkaloidů (až 2 % suché váhy sklerocia), které při požití mohou vyvolat otravu zvanou ergotismus. Vzhledem k tomu, že se žito začalo pěstovat až s nástupem křesťanství, epidemické otravy námelem se začaly objevovat až ve středověku. Vzájemný vztah mezi symptomy ergotismu a konzumací námele objevil až v 50. letech 19. století francouzský mykolog Louis René Tulasne, který jako první popsal životní cyklus námele (Tulasne, 1853).

Vystavení organismu vysokým hladinám námelových alkaloidů má letální účinky. Riziko otravy ergoidními alkaloidy po konzumaci pečiva je však v našich podmínkách, při dodržování zásad správné zemědělské praxe, minimální. Ochrana proti otravě námelem spočívá v dodržování systému kontrol toxické nezávadnosti kvality potravin připravovaných z žitné mouky. V dnešní době jsou otravy ergoidními alkaloidy

výhradně spojeny s předávkováním léky, jejichž účinná látka je derivátem ergoidních alkaloidů.

Námelové alkaloidy lze obecně rozdělit do tří skupin – klavinové alkaloidy, alkaloidy kyseliny lysergové a její jednoduché deriváty a ergopeptiny. Biologická aktivita námelových alkaloidů spočívá ve strukturní podobnosti derivátů kyseliny D-lysergové s neurotransmitéry noradrenalinem, adrenalinem a serotoninem, přičemž alkaloidy reagují s receptory pro tyto neurotransmitery. Terapeuticky významné jsou především alkaloidy odvozené od kyseliny lysergové, z polosyntetických derivátů jsou významné dihydroderiváty peptidových alkaloidů. Mnohé námelové alkaloidy našly uplatnění především v porodnictví při zastavení poporodního krvácení, při léčbě Basedowovy nemoci, klimakterických potíží a rakovině prsu (Jirásek a Starý, 1989). Ergotamin a jeho deriváty jsou součástí léčiv indikovaných v případech akutní migrény (Moskowitz, 1992). Bromokriptin, agonista dopaminových receptorů, reguluje uvolňování hormonu prolaktinu, čímž ovlivňuje laktaci. Ve výsledku tento alkaloid působí jako inhibitor prolaktinu a proto našel využití při léčbě problémů souvisejících s prolaktinem, jako jsou hyperprolaktinémie, akromegalie nebo galaktorea (Thorner *et al.*, 1974).

2.1.3 Životní cyklus

C. purpurea infikuje výlučně mladá, obvykle neoplozená ovaria trav a obilovin. Tato houba během první fáze infekce napodobuje růst pylové láčky, přičemž s největší pravděpodobností využívá specifických signálních komponent interakce pylu s bliznou. To nejspíše vysvětluje i fakt, že v hostitelské tkáni nelze během první fáze infekce pozorovat žádné obranné reakce (Haarmann *et al.*, 2009).

K primární infekci (Obr. 1) dochází během jara, kdy jsou askospory uvolňovány z perithecia. Poté, co se askospory zachytí na blizně (1), houba penetruje rostlinnou kutikulu (bez zjevného fyzického tlaku či vytváření speciálních struktur) a sleduje cestu pylové láčky. Dochází k formaci nevětvených svazků hyf, které, jakmile prorostou k bazální části ovaria, opouští cestu pylové láčky a pronikají do cévní tkáně (2). Následně se hyfy větví a vytváří mycelium (tzv. sfacelium), které kolonizuje celé ovarium a produkuje konidie, které jsou sekretovány (přibližně 7 dní po infekci) společně s floémovou šťávou jako medovice (3). Medovice láká hmyz, který ji na svých tělních částech roznáší na další kvetoucí klasy žita nebo květenství trav (4), dochází

k sekundární infekci. V infikovaných klasech se místo obilek tvoří černá nebo červenofialová růžkatá sklerocia námele (5). Když tráva dozraje, sklerocia opadávají na zem, zde přezimují a na jaře při dostatečné vlhkosti a teplotě klíčí (7). Z každého sklerocia vyrůstá několik hlavičkovitých stromat. Stroma má bělavou část sterilní (stopka), která nese kulovitou purpurovou fertilní část. V té vznikají perithecia. Pod jejím povrchem se vytváří drobné dutinky, do nichž pronikají hyfy diferencované jako askogon a anteridium. Během vývoje vřecek se vytváří morfologicky rozlišená stěna perithecia, oddělující perithecium od ostatního pletiva stromatu. Perithecia jsou vyplněna vřečky, ta obsahují po 8 nit'ovitých askosporách. Askospory jsou vystřelovány (8), unášeny vzdušnými proudy směrem nahoru a přichycují se na bliznách.



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

2.2 Auxiny

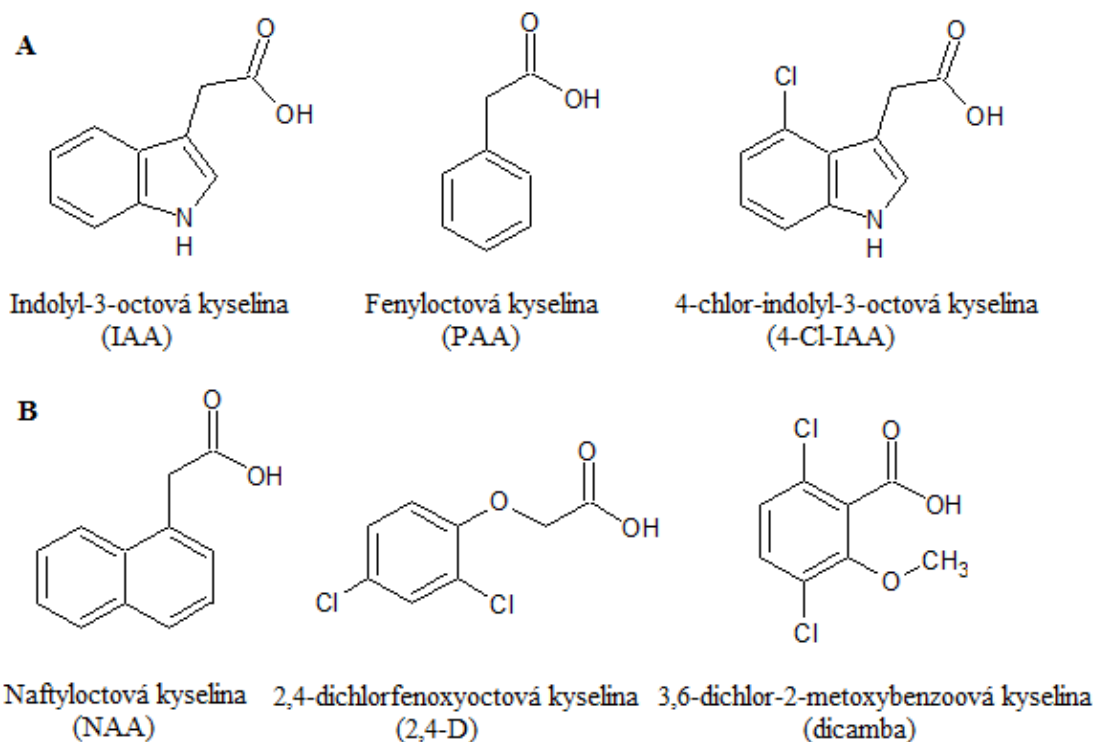
Auxiny jsou nejdéle známé rostlinné hormony, které byly objeveny jak u vyšších rostlin (Haagen-Smit *et al.*, 1946), tak v řasách (Jacobs *et al.*, 1985), bakteriích (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993) a dokonce i u hub (Maor *et al.*, 2004).

Existenci auxinů předpověděl již v 19. století Darwin (1880), který si všiml, že koleoptile trávy *Phalaris canariensis* se ohýbá za světlem (fototropismus). Když však zakryl špičku koleoptile, tak k ohybu nedošlo. Z toho Darwin usoudil, že ve vrcholu koleoptile vzniká nějaká látka, která je transportována na neosvětlené místo, kde následně dochází k rychlejšímu růstu. Později existenci této látky potvrdil Went (1926), který ji převedl z vrcholku koleoptile *Avena sativa* do želatiny, kterou následně rozřezal na malé krychličky. Když poté přiložil takto připravenou krychličku na jednu stranu koleoptilního pahýlu, došlo k jeho jednostrannému ohybu. Sloučenina, která přešla do želatiny, byla pojmenována jako auxin (*auxein* = růst, zvětšovat se). Ve 30. letech 20. století byla tato látka identifikována jako indolyl-3-octová kyselina (IAA).

Fyziologické účinky auxinů závisí především na jejich koncentraci v rostlinném pletivu, neboť při vyšších koncentracích mohou být stimulační účinky vystřídány účinky inhibičními.

Mezi hlavní fyziologické účinky auxinů patří stimulace buněčného prodlužování a diferenciací vodivých pletiv, oddálení senescence či regulace tropismů, především fototropismu a gravitropismu (Friml *et al.*, 2002a). Vzhledem k tomu, že auxiny podporují dělení buněk pericyklu, stimulují tyto hormony ve vysokých koncentracích také zakládání adventivních a laterálních kořenů (Benková *et al.*, 2003). To je také důvod, proč jsou auxiny součástí mnoha zakořeňovacích stimulatorů. Významné je i zapojení auxinů ve vývoji květních pupenů, fylotaxi (Vernoux *et al.*, 2000; Reinhart *et al.*, 2003) a v apikální dominanci, kdy vzrostný vrchol potlačuje růst postranních úžlabních pupenů. Auxiny se též podílí na regulaci buněčného cyklu a stimulaci buněčného dělení.

Díky svým fyziologickým účinkům jsou auxiny, jak přirozené tak syntetické, již přes padesát let využívány zejména v zemědělství a zahradnictví. V posledních několika letech našly také uplatnění v biotechnologiích např. k množení či regeneraci rostlin *in vitro*. Navíc, některé syntetické auxiny jako dicamba a 2,4-D jsou hojně využívány jako herbicidy dvouděložných rostlin, přičemž na jednoděložné rostliny téměř nepůsobí, neboť tyto rostliny jsou schopné syntetické auxiny inaktivovat konjugací.



Obr. 2 Chemická struktura některých přirozených (A) a syntetických auxinů (B).

2.2.1 Chemická struktura

Auxiny (Obr. 2) jsou nízkomolekulární látky, pro které je typický aromatický kruh s karboxylovou funkční skupinou v postranním řetězci. Nejvýznamnějším zástupcem přirozených auxinů je indolyl-3-octová kyselina (IAA). Mezi další přirozené auxiny patří fenyloctová kyselina (PAA), indolyl-3-máselná kyselina (IBA) a 4-chlor-indolyloctová kyselina (4-Cl-IAA). Bylo připraveno i mnoho syntetických sloučenin, které vykazují auxinovou aktivitu. Jedná se například o naftyloctovou kyselinu (NAA), 3,6-dichloro-2-methoxybenzoovou kyselinu (dicamba) a 2,4-dichlorfenoxyoctovou kyselinu (2,4-D).

2.2.2 Metabolismus IAA u rostlin

2.2.2.1 Biosyntéza

Auxiny jsou syntetizovány především ve vrcholu koleoptile, primárních kořenech, semenech a v mladých listech (Ljung *et al.*, 2001). Biosyntézu IAA u rostlin (Obr. 3) lze rozdělit na dvě základní dráhy – Trp-dependentní, která vychází z L-Trp a Trp-independentní, kdy prekurzorem IAA může být např. indol-3-glycerolfosfát

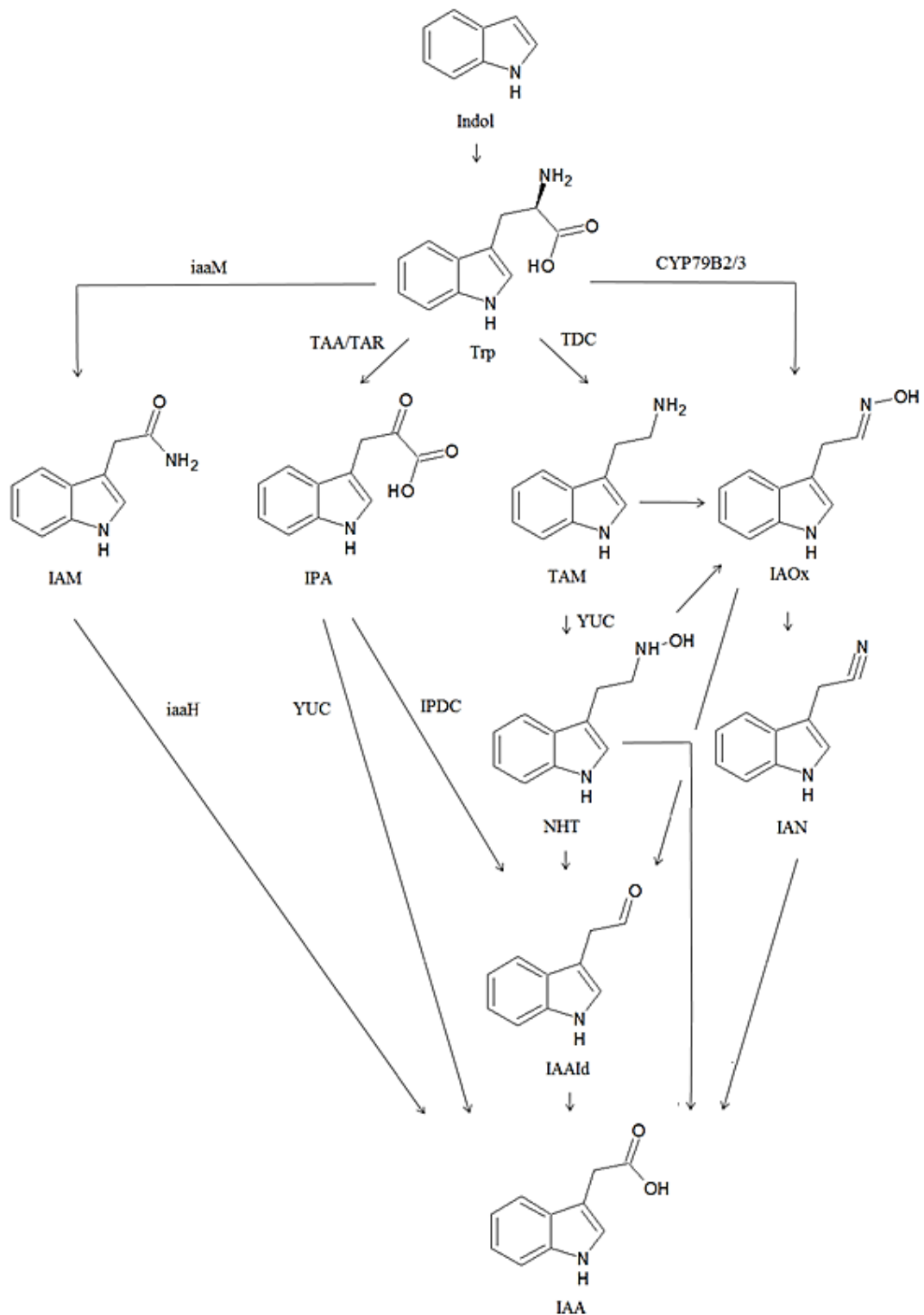
(Ouyang *et al.*, 2000). Pro Trp-dependentní dráhu biosyntézy IAA byly navrženy čtyři cesty – TAM (tryptaminová), IPA (indolyl-3-pyruvátová), IAOx (indolyl-3-acetaldoximová) a IAM (indolyl-3-acetamidová).

Dráha TAM byla pozorována u dvouděložných i jednoděložných rostlin. Pro tuto dráhu je důležitý cytosolární enzym Trp dekarboxylasa katalyzující přeměnu Trp na TAM (Di Fiore *et al.*, 2002), který je s největší pravděpodobností dále hydroxylován na *N*-hydroxytryptamin flavinmonooxygenasou (Zhao *et al.*, 2001).

Dráha IPA byla pozorována u *Arabidopsis thaliana*, u které byly detekovány tři geny *TAA1* (Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis1), *TAR1* a *TAR2* (Tryptophan Aminotransferase Related1,2) kódující Trp aminotransferasy, které katalyzují přeměnu Trp na IPA (Štěpánová *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008). Následná přeměna IPA na IAAid (indolyl-3-acetaldehyd) pomocí IPA dekarboxylasy byla pozorována např. u hrachu setého nebo u *A. thaliana* (Seo *et al.*, 1998; Zdunek-Zastocka, 2008). U *A. thaliana* byla detekována i dvoukroková syntéza IAA. Ta spočívá v přeměně Trp na IPA pomocí Trp aminotransferasy a v následné přeměně IPA na IAA pomocí flavinmonooxygenasových enzymů (Won *et al.*, 2011).

Dráha IAOx byla detekována především u rostlin z čeledi *Brassicaceae*. Tato dráha je katalyzovaná cytochrom P450 monooxygenasou, která převádí Trp na IAOx. Ten může být následně převeden na indolyl-3-acetonitril (IAN) (Sugawara *et al.*, 2009).

U rostlin byla pozorována i bakteriální IAM dráha, která zahrnuje přeměnu Trp na IAM pomocí Trp monooxygenasy (*iaaM*) a následnou přeměnu IAM na IAA prostřednictvím IAM hydrolasy (*iaaH*). Trp monooxygenasy byly charakterizovány u bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a *Pseudomonas savastanoi* (Comai a Kosuge, 1982; Yamada *et al.*, 1985). Zatímco u *A. thaliana* bylo prokázáno, že IAM je syntetizován zejména z IAOx, ostatní rostliny např. rýže, kukuřice a tabák postrádají enzymy CYP79B2/3 nutné pro syntézu IAOx z Trp (Sugawara *et al.*, 2009). Předpokládá se proto, že přeměnu Trp na IAM u těchto rostlin katalyzují enzymy typu *iaaM*, nicméně geny kódující tyto enzymy nebyly u rostlin dosud charakterizovány. Homology *iaaH* byly identifikovány jak u *A. thaliana* (*AtAMII*), tak i u tabáku (*NtAMII*) (Pollmann *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2009).



Obr. 3 Předpokládaná Trp-dependentní dráha biosyntézy IAA u rostlin. Trp – tryptofan, IAM – indolyl-3-acetamid, IPA – indolyl-3-pyruvátová kyselina, TAM – tryptamin, IAox – indolyl-3-acetaldoxim, NHT – *N*-hydroxytryptamin, IAN – indolyl-3-acetonitril, IAAld – indolyl-3-acetaldehyd, IAA – indolyl-3-octová kyselina, TDC – Trp dekarboxylasa, TAA/TAR – Trp aminotransferasy, YUC – flavinmonooxygenasa, iaaM – Trp monooxygenasa, CYP79B2/3 – cytochrom P450 monooxygenasa, iaaH – IAM hydrolasa, IPDC – IPA dekarboxylasa (Tivendale *et al.*, 2014, upraveno).

2.2.2.2 Konjugace a degradace

Rostliny mohou IAA skladovat ve formě různých konjugátů a to zejména s aminokyselinami a cukry (Venis, 1972; Szerszen *et al.*, 1994). Konjugace je proces reverzibilní. Ireverzibilní cesty degradace IAA mohou být dekarboxylační, které jsou katalyzované peroxidasami (Gazaryan *et al.*, 1996) nebo nedekarboxylační, které spočívají buď v oxidaci IAA na kyselinu oxindol-3-octovou nebo v konjugaci IAA s aspartátem a v následné oxidaci vzniklého konjugátu (Bandurski *et al.*, 1992).

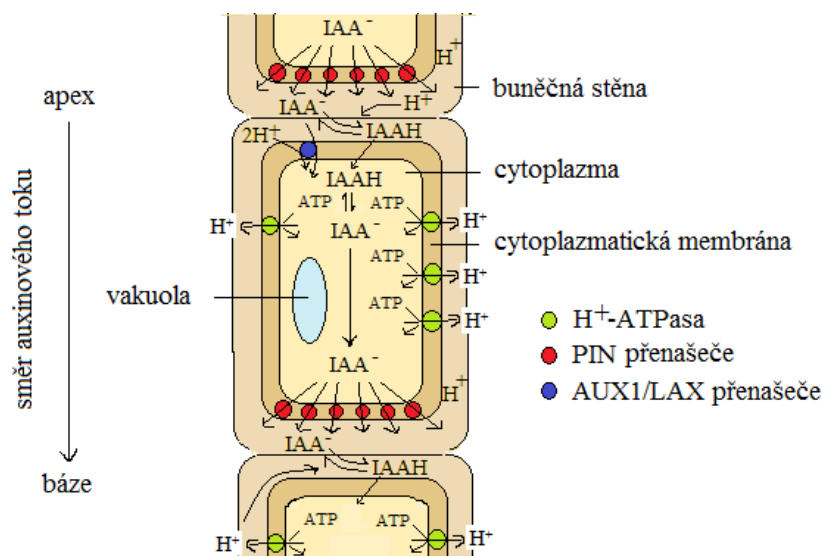
2.2.3 Transport IAA

IAA může být v rostlině transportována dvěma způsoby. První možností je pasivní transport na dlouhé vzdálenosti, kdy je IAA unášena společně s ostatními asimiláty lýkovou částí vodivých pletiv – floémem z biosynteticky aktivních částí rostliny na místa spotřeby nebo do zásobních orgánů (Rashotte *et al.*, 2000). Druhou možností transportu IAA je mnohem méně efektivní a asi desetkrát pomalejší polární transport, který v rostlině probíhá především na krátké vzdálenosti (z buňky do buňky). Tento transport závisí na přítomnosti auxinových přenašečů v cytoplazmatické membráně, které zprostředkovávají export IAA do apoplastu (tzv. auxin efflux carriers) a jeho import do cytoplazmy následující buňky (tzv. auxin influx carriers).

U *A. thaliana* byly identifikovány auxinové přenašeče Aux1/Lax (angl. *auxin resistant 1/like AUX1*) transportující IAA do cytoplazmy (Péret *et al.*, 2012) a PIN proteiny (angl. *pin-formed proteins*) zajišťující transport IAA do apoplastu a homeostázi (Gälweiler *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2012). Auxinového transportu u rostlin se účastní i proteiny ABCB/PGP/MDR, které obsahují ATP vazebnou kazetu (Noh *et al.*, 2001).

2.2.3.1 Chemiosmotická hypotéza

V 70. letech 20. století byla formulována tzv. chemiosmotická hypotéza (Obr. 4), která popsala způsob, jakým je dosaženo jednosměrného auxinového toku při polárním transportu IAA (Rubery a Sheldrake, 1974; Raven 1975). Tato hypotéza vychází z předpokladu, že IAA je slabá organická kyselina, která se může v závislosti na okolním pH vyskytovat ve dvou formách – disociované (IAA^-) a nedisociované (IAAH), přičemž transport IAA závisí na rozdílných hodnotách pH v cytoplazmě a apoplastu (gradient pH je generován H^+ -ATPasou).

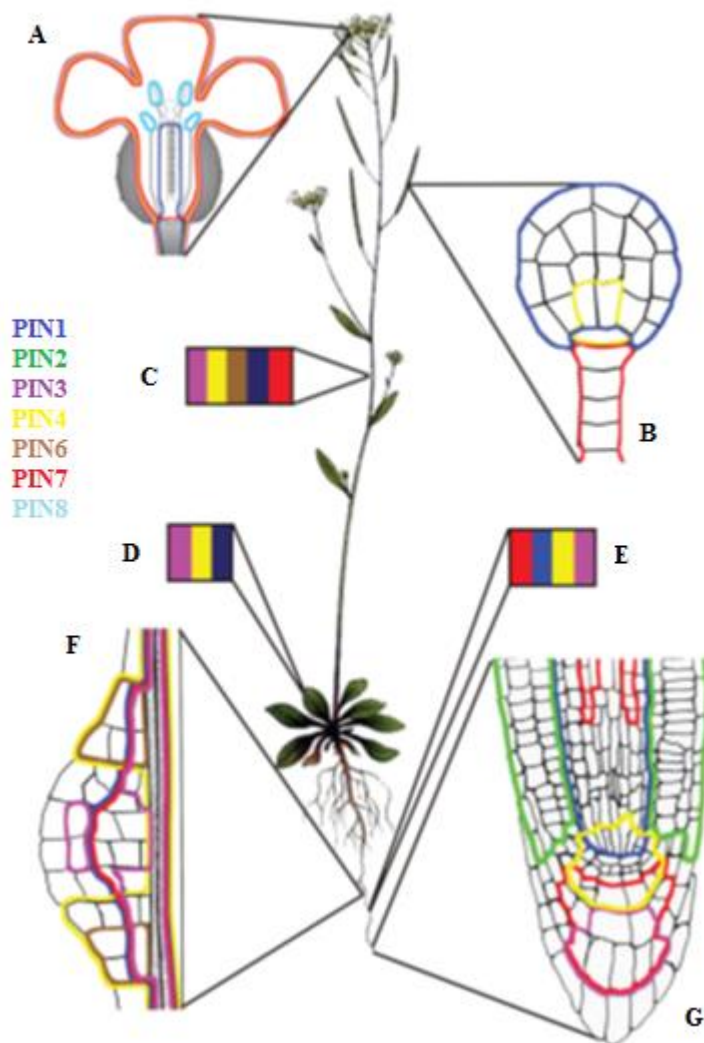


Obr. 4 Chemiosmotický model polárního transportu IAA (Taiz a Zeiger, 2010, upraveno)

V apoplastu, kde se pH pohybuje kolem 5,5, je přibližně 83% molekul IAA disociováno a zbylých 17% molekul se nachází v nedisociované formě. Zatímco disociovaná forma IAA díky negativnímu náboji karboxylové skupiny přes membránu neprochází a musí tedy být do buňky transportována pomocí auxinových přenašečů, nedisociované molekuly IAA se přes membránu dostávají pasivně na základě difúze. V cytoplasmě, kde je neutrální pH, převažuje disociovaná forma IAA nad formou nedisociovanou. Disociované molekuly IAA se v cytoplasmě díky zápornému náboji nemohou dostat přes membránu, a proto musí být ven z buňky transportovány opět pomocí auxinových přenašečů.

2.2.3.2 PIN proteiny

PIN proteiny (Obr. 5) byly detekovány pouze u suchozemských rostlin. U *A. thaliana* bylo dosud objeveno 8 PIN proteinů (PIN1-8). Tyto transmembránové proteiny jsou složeny ze dvou hydrofobních domén tvořených pěti transmembránovými helixy, přičemž obě domény jsou navzájem odděleny centrální hydrofilní doménou. Podle délky této domény rozlišujeme „krátké“ PIN proteiny s částečně nebo úplně redukovanou centrální doménou a „dlouhé“ PIN proteiny, které obsahují celou centrální doménu (Křeček *et al.*, 2009).



Obr. 5 Expres PIN proteinů u *A. thaliana* – květ (A), embryo (B), prýt (C), listová růžice (D), zralá část primárního kořene (E), primordium laterálního kořene (F), kořenová špička (G) (Křeček *et al.*, 2009, upraveno)

Mezi „dlouhé“ PIN proteiny patří PIN1-4, PIN6 a PIN7. Jedná se o auxinové vnašeče lokalizované na plazmatické membráně, které regulují auxinový transport v pletivech během vývojových procesů jako jsou embryogeneze, organogeneze, buněčná diferenciace či tropismy. Funkce PIN1 byla demonstrována na mutantovi *pin1* *A. thaliana*. Tento mutant vykazoval nerozvětvenou strukturu stonku podobnou jehlici. Následně bylo prokázáno, že se tento protein nachází na spodní straně buněk xylémového parenchymu v prýtu, kde zajišťuje transport auxinu z apikálních částí rostliny do kořenové špičky (Gälweiler *et al.*, 1998). PIN2 je lokalizován na horní straně epidermálních buněk kořene, kde reguluje gravitropní růst kořene (Abas *et al.*, 2006). PIN3 je lokalizován na boční straně endodermálních buněk stonku, kde má

zásadní význam při prodlužování, fototropické a gravitropické odpovědi (Friml *et al.*, 2002a). PIN4 se nachází v kořenové špičce, kde zajišťuje správnou funkci kořenového meristému (Friml *et al.*, 2002b). PIN7 se účastní regulace auxinového toku v raném embryonálním vývoji (Friml *et al.*, 2003).

Mezi „krátké“ PIN proteiny patří PIN5 a PIN8. Tyto proteiny jsou lokalizovány na endoplazmatickém retikulu, přičemž nezajišťují transport auxinů mezi sousedními buňkami, ale zprostředkovávají intracelulární auxinovou homeostázi a metabolismus. PIN5 a PIN8 jsou silně exprimovány v samčích gametofytech *A. thaliana*, jejich hlavní funkcí je regulace tvorby a vývoje pylové láčky (Ding *et al.*, 2012).

2.2.4 Auxiny u hub

Produkce IAA u hub byla zkoumána již ve 30. letech 20. století (Dolk a Thimann, 1932). Ačkoliv byla IAA detekována již u mnoha fytopatogenních, saprofytických i symbiotických hub, její význam u těchto organismů není dodnes přesně známý.

2.2.4.1 Geny zapojené do biosyntézy IAA

Geny kódující aromatické aminotransferasy (*Aro8* a *Aro9*) byly identifikovány u *Saccharomyces cerevisiae*, geny kódující indolyl-3-acetaldehyddehydrogenasy (*iad1* a *iad2*) a Trp aminotransferasy (*tam1* a *tam2*) byly charakterizovány u *Ustilago maydis* a *Piriformospora indica*, u *P. indica* byl identifikován i gen *Ldh1*, který je nejspíše zodpovědný za tvorbu ILA (indolyl-3-mléčná kyselina) (Basse *et al.*, 1996; Reineke *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2010; Hilbert *et al.*, 2012). U čtyř zástupců rodu *Fusarium* – *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi* a *F. oxysporum* byly detekovány homology genů *iaaM* a *iaaH* (Tsavkelova *et al.*, 2012).

2.2.4.2 Předpokládané biosyntetické dráhy IAA

Bylo prokázáno, že biosyntéza IAA u hub může probíhat stejně jako u rostlin buď Trp-dependentní nebo Trp-independentní drahou (Rao *et al.*, 2010). V případě Trp-dependentní dráhy byly pozorovány tři možné biosyntetické cesty – IPA, TAM a IAM (Chung *et al.*, 2003; Reineke *et al.*, 2008).

Dráhy obsahující IAAId a IAM byly detekovány u fytopatogenních hub *Colletotrichum acutatum* (Chung *et al.*, 2003) a *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* (Maor *et al.*, 2004). Homology bakteriálních genů pro IAM dráhu byly

nedávno identifikovány i u čtyř zástupců rodu *Fusarium* – *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi* a *F. oxysporum*, nicméně tato dráha je plně funkční pouze u *F. verticillioides* a *F. proliferatum* (Tsavkelova *et al.*, 2012).

U rostlinného patogenu *Fusarium delphinooides* byla pomocí plynové chromatografie zjištěna přítomnost tří IAA biosyntetických drah – IPA, IAM a TAM. V případě, kdy byl z média odstraněn Trp, nebyla v této kultuře detekována žádná IAA, což naznačuje přítomnost pouze Trp-dependentní dráhy (Kulkarni *et al.*, 2013).

Dráha IPA byla také pozorována u patogenních hub *U. maydis* (Reineke *et al.*, 2008) a *Rhizoctonia solani*, u které bylo detekováno i velké množství meziprojektu TOL (tryptofol). Malá množství tohoto meziprojektu byla pozorována i u hub *Fusarium fujikuroi* a *Venturia nashicola* (Furukawa *et al.*, 1996). Schramm *et al.* (1987) naznačili, že by TOL mohl sloužit jako skladovací látka, která je nejdříve oxidována na IAAid a poté převedena na IAA.

U hub *C. acutatum* a *P. indica* byla pozorována produkce ILA (Chung *et al.*, 2003; Hilbert *et al.*, 2012). Tato látka je přirozeně se vyskytujícím indolovým derivátem, který byl dosud detekován např. u *A. tumefaciens*. Funkce ILA není dosud známa, ale vzhledem k podobné struktuře k IAA se předpokládá, že se jedná buď o auxinový analog (Sprunck *et al.*, 1995) nebo o antagonistu IAA (Körber *et al.*, 1991).

2.2.4.3 Fyziologické účinky

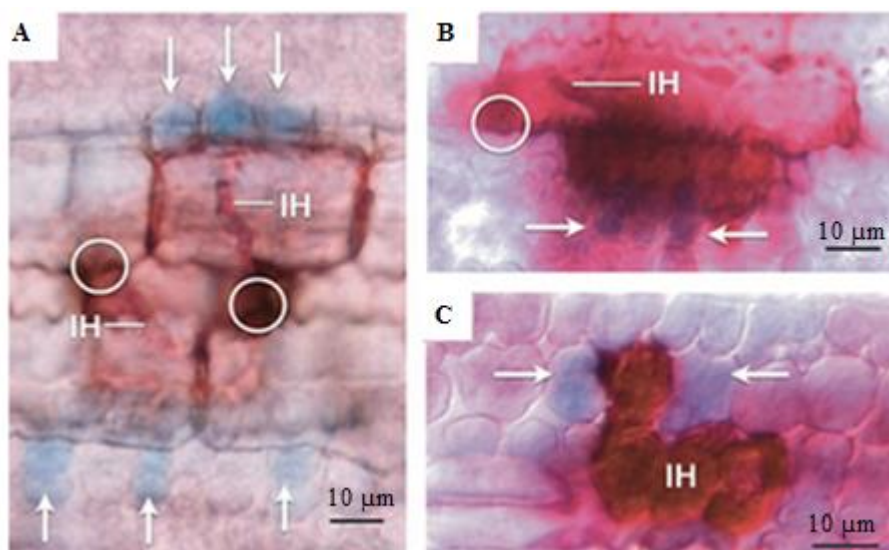
Vzhledem k tomu, že jsou auxiny s největší pravděpodobností zapojeny v interakci houby s hostitelem, je IAA považována za patogenní faktor. Mnohé studie se proto zabývají produkcí IAA u hub během napadení hostitelské tkáně.

Maor *et al.* (2004) testovali účinky Trp a IAM na akumulaci IAA v axenické kultuře *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. Výsledky ukázaly, že v přítomnosti exogenního Trp i IAM došlo ke zvýšení hladiny IAM oproti kontrole (v případě Trp 5krát, v případě IAM 4,5krát). Pokud měla houba k dispozici exogenní Trp došlo i ke zvýšení hladiny IAA (2,7krát oproti kontrole), zatímco přítomnost exogenního IAM k výrazné změně hladiny IAA nevedla. Maor *et al.* (2004) se proto dále zaměřili na produkci IAM a IAA *in planta*. V rostlinách *Aeschynomene virginica* infikovaných *C. gloeosporioides* byla detekována vyšší hladina IAA oproti neinfikovaným rostlinám. Následná detekce aktivit tryptofan-2-monooxygenasy a IAM hydrolasy poukázala na to, že *C. gloeosporioides* je schopná produkovat *in planta* IAM i IAA, neboť

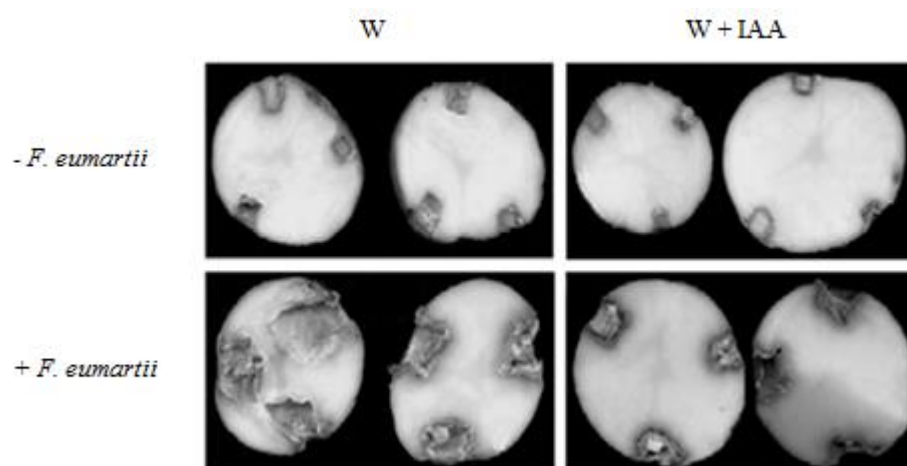
A. virginica enzymy IAM dráhy postrádá. Z výsledků této studie také vyplývá, že patogenní houba *C. gloeosporioides* je schopná syntetizovat IAA pouze v případě, kdy má k dispozici exogenní Trp, který získává během biotrofní fáze od svého hostitele.

Tanaka *et al.* (2011) se zabývali možnostmi zapojení auxinů v prvotní fázi infekce a v kolonizaci hostitelské tkáně. IAA byla v hostitelské rostlinné tkáni pozorována pomocí auxin-inducibilního reportérového konstruktů *DR5::GUS*. V případě rostlin rýže transformovaných tímto konstruktem byla po inokulaci patogenní houbou *Magnaporthe oryzae* pozorována auxinová odpověď pouze v okolí infekčních hyf (Obr. 6). Tyto výsledky naznačily, že *M. oryzae* produkuje během biotrofní fáze malá množství IAA, na která následně reaguje napadená rostlinná tkáň.

Auxiny by také mohly indukovat vznik tumorů na kukuřici, neboť Reineke *et al.* (2008) detekovali v rostlinné tkáni infikované fytopatogenní houbou *U. maydis* množství IAA. Tyto vyšší hladiny by podle nich mohly být důsledkem zvýšené biosyntézy IAA zprostředkované hostitelem a/nebo patogenem. U delečních mutantů *Δiad1Δiad2Δtam1* a *Δiad1Δiad2Δtam1Δtam2* *U. maydis* však tvorba nádorů ovlivněna nebyla, pouze došlo k výraznému snížení volných IAA v rostlinné tkáni. Zvýšené hladiny IAA (až 140krát oproti neinfikované kontrole) byly také detekovány u citrusových květů infikovaných cizopasnou houbou *C. acutatum* a u vodní rostliny *Zizania latifolia* inokulované patogenní houbou *Ustilago esculenta* (Li *et al.*, 2003; Chung a Tzeng, 2004).



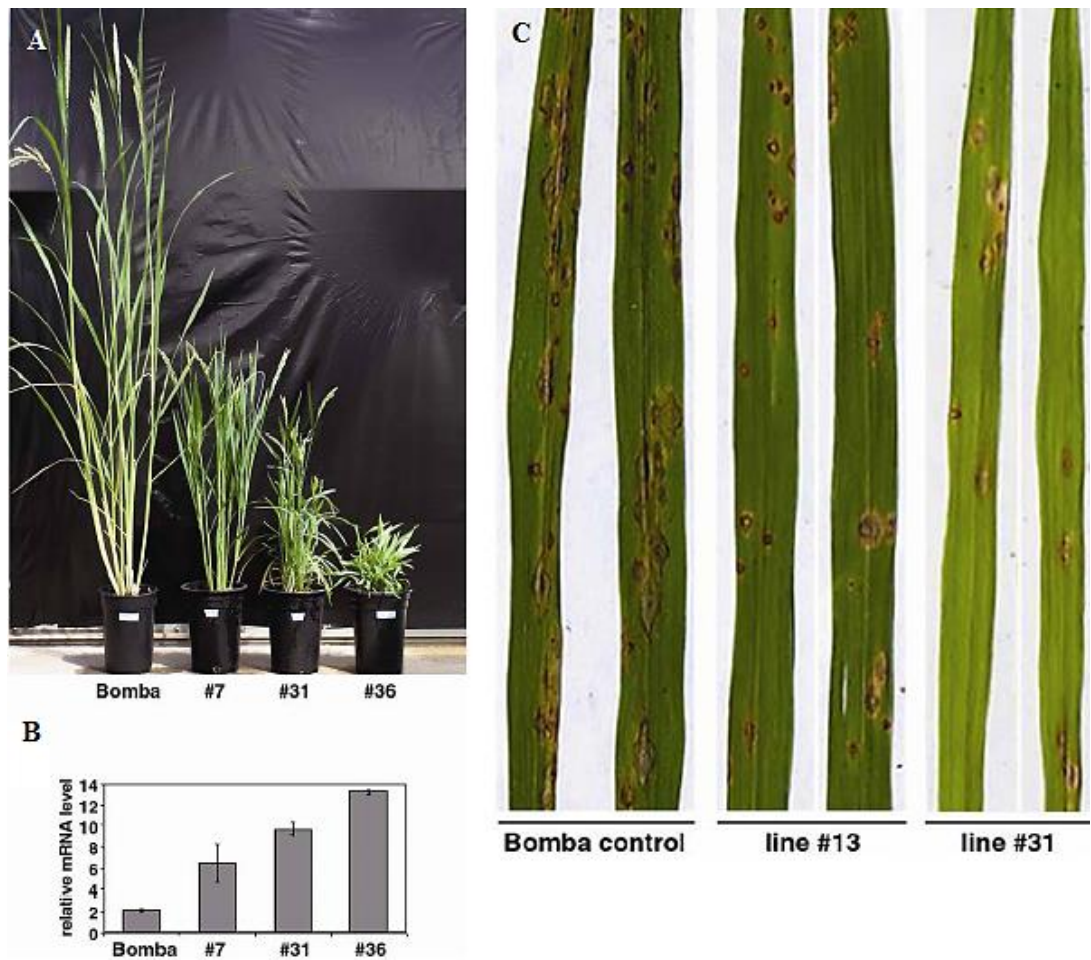
Obr. 6 Aktivita *GUS* (modré zbarvení) v rostlinné tkáni během biotrofní fáze patogenní houby *Magnaporthe oryzae* (A-C). Infekční hyfy (IH) byly nabarveny červeně, bílé kruhy ukazují ohniska apresorií (Tanaka *et al.*, 2011).



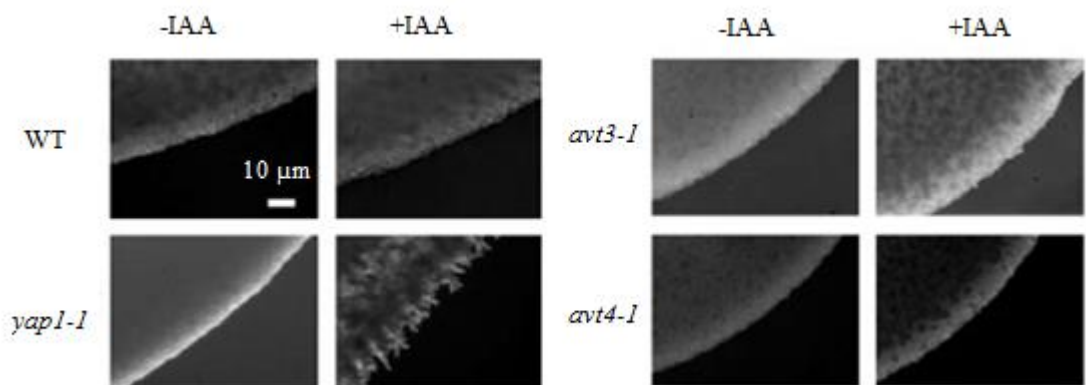
Obr. 7 Bramborové hlízy předem ošetřené exogenními IAA a inokulované *Fusarium eumartii*. Hlízy byly předem ošetřeny kontrolním roztokem (W) nebo kontrolním roztokem společně s IAA (W + IAA) (Terrile *et al.*, 2006).

Pomocí exogenních IAA lze také zvýšit rezistenci rostlin vůči některým houbovým patogenům. Bramborové hlízy, které byly předem ošetřeny exogenními IAA, vykazovaly po inokulaci houbovým patogenem *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* menší poškození tkáně než hlízy předem neošetřené (Obr. 7) (Terrile *et al.*, 2006). Rezistence rostlin vůči houbovým patogenům může být vyvolána i snížením hladiny endogenních IAA v rostlině. Bylo objeveno, že nadexprese genu *OsGH3.1* (gen kódující IAA-amidosynthasy, které kontrolují hladinu endogenních IAA konjugací s aminokyselinami) způsobuje u transformovaných rostlin rýže dwarfismus a zároveň u těchto rostlin dochází k redukci hladiny volných IAA. Následné patogenní studie s *Magnaporthe grisea* ukázaly, že tyto auxin-deficitní rostliny vykazují zvýšenou rezistenci vůči tomuto houbovému patogenu (Obr. 8) (Domingo *et al.*, 2009).

Prusty *et al.* (2004) prokázali, že IAA také stimuluje adhezi a filamentaci u kvasinky *S. cerevisiae*. Výsledky této studie ukázaly, že mutant postrádající houbově specifický transkripční faktor Yap1 (*yap1-1*) je mnohem více citlivý na IAA než WT, neboť tento mutant vykazoval filamentaci již při 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ koncentraci IAA, zatímco WT až při 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Při vyšších hladinách IAA však byl růst kvasinky inhibován. Podobně byl vysokými koncentracemi IAA inhibován i růst fytopatogenní houby *U. maydis*, což naznačuje, že rostlinné patogeny jsou schopné získávat informace z hostitelského obranného systému. Následná delece homologů *AUX1* - předpokládaných transportérů IAA z rostlin – vedla u mutanta *yap1-1* ke zvýšení rezistence vůči IAA a to snížením jejího příjmu. Tito mutanti (*avt3-1* a *avt4-1*) byli defektní jak v percepci IAA, tak ve filamentaci (Obr. 9).



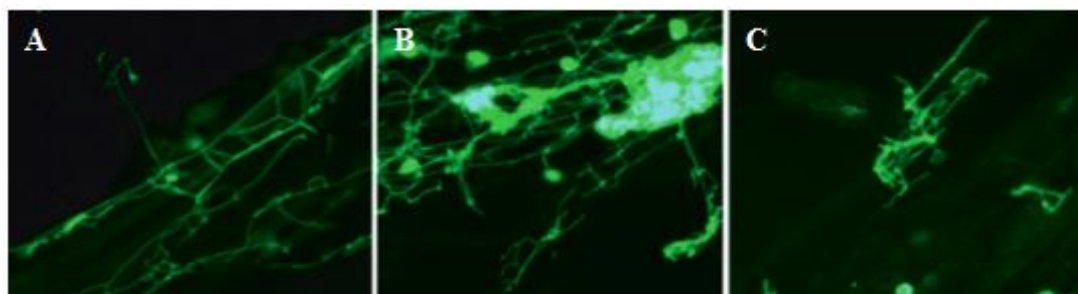
Obr. 8 Fenotypy netransformované kontrolní rostliny rýže a transgenních linií 7, 31 a 36 (A). Expres *OsGH3.1* v kontrolní rostlině a transformovaných liniích 7, 31 a 36 (B). Zvýšená rezistence transgenních rostlin vůči houbovému patogenu *Magnaporthe grisea* (C) (Domingo *et al.*, 2009, upraveno).



Obr. 9 Filamentace a povrchová adheze mutantů *yap1-1*, *avt3-1* a *avt4-1* *S. cerevisiae* v přítomnosti IAA oproti WT (Prusty *et al.*, 2004, upraveno)

Auxiny nejsou zapojeny jen v patogenezi hub, ale hrají také významnou roli v symbiotických interakcích houby s hostitelem. Contreras-Cornejo *et al.* (2009) ukázali, že při inokulaci semen *Arabidopsis* symbiotickými houbami *Trichoderma virens* a *Trichoderma atroviride* dochází k ovlivnění růstu a vývoje laterálních kořenů, což by mohlo být způsobeno právě auxiny (Casimiro *et al.*, 2001). Následné expresní studie auxin-inducibilního markeru *DR5::uidA*, kterým byla transformována semena *A. thaliana*, ukázaly, že po inokulaci transgenních semen houbou *T. virens* dochází v rostlinné tkáni ke zvýšení auxinové odpovědi. Pro objasnění některých aspektů auxinového transportu/percepce zapojených v interakci *A. thaliana* s *T. virens* byly vytvořeny mutanti *A. thaliana* defektní v přenosu auxinového signálu. Auxin-transportní mutanti *aux1-7*, *eir1* a *doc1* vykazovali sníženou odpověď na houbu, což se týče růstu a vývoje laterálních kořenů. Tyto výsledky naznačily, že pro odpověď rostlinné tkáně na *T. virens* je tedy nezbytný normální auxinový transport (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

Hilbert *et al.* (2012) se zabývali produkcí IAA během kolonizace kořenů ječmene houbou *P. indica*. V kořenech ječmene 3 dny po inokulaci houbou *P. indica* byly detekovány výrazně vyšší hladiny IAA oproti kořenům neinfikovaným. Avšak v pozdějším stádiu infekce (5 dní a 14 dní po inokulaci) již výrazný rozdíl v hladinách IAA mezi inokulovanými a neinokulovanými kořeny pozorován nebyl. Bylo zjištěno, že v přítomnosti nízkých koncentrací IAA ($1-10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) dochází ke zvýšení kolonizace hostitelské tkáně, avšak vyšší koncentrace IAA ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) již růst *P. indica* inhibují (Obr. 10). Následné RT qPCR studie ukázaly, že během kolonizace dochází k expresi *piTam1*. Umlčení tohoto genu vedlo ke snížení hladin IAA a ILA v rostlinné tkáni a též k redukci kolonizace během biotrofní fáze infekce.



Obr. 10 Vliv exogenní IAA na kolonizaci kořenů ječmene houbou *P. indica*. Při koncentracích IAA $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (A) a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (B) došlo ke zvýšení kolonizace hostitelské tkáně, při koncentraci IAA $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (C) byl růst *P. indica* inhibován (Hilbert *et al.*, 2012, upraveno)

Niemi *et al.* (2002) se zaměřili na schopnost ektomykorhizních hub *Pisolithus tinctorius* a *Paxillus involutus* produkovat IAA a ovlivňovat tak tvorbu a růst kořenů borovice *in vitro*. Zajímavé je, že tyto houby byly schopné produkovat IAA i v případě, kdy v médiu nebyl přítomen exogenní tryptofan. Inokulace hypokotylových řízků těmito houbami vedla ke zvýšení tvorby kořenů, přičemž tento účinek byl patrnější u *P. involutus*, což naznačuje, že do tvorby ektomykorhízy jsou kromě IAA zapojeny ještě i další faktory.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Agrobacterium tumefaciens GV 3101

Arabidopsis thaliana Col-0

Claviceps purpurea 20.1

Elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)

Chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)

3.1.2 Chemikálie a pomůcky

K přípravě médií a roztoků byly použity následující chemikálie: agar (HiMedia, Indie), agarosa (Amresco, USA), anti-digoxigenin-AP (Roche, Švýcarsko), BAP (Duchefa, Nizozemí), blokovací reagent (Roche, Francie), CDP Star (Roche, Švýcarsko), citrát sodný dihydrát (Lach:ner, ČR), DEPC (Sigma, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (AppliChem, Německo), dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema, ČR), D-sorbitol (Duchefa, Nizozemí), EDTA (Penta, ČR), ethanol (Lach:ner, ČR), ethidium bromid (NeoLab, Německo), fixační roztok (Kodak, USA), formaldehyd (Lach:ner, ČR), formamid (Fluka, Německo), gentamycin (Duchefa, Nizozemí), hydrogenfosforečnan sodný (Lach:ner, ČR), hydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner, ČR), hydroxid draselný (Lach:ner, ČR), hydroxid sodný (Penta, ČR), 25 mmol.l⁻¹ chlorid hořečnatý (New England Biolabs/NEB, Velká Británie), chlorid sodný (Lach:ner, ČR), chlorid vápenatý (Penta, ČR), IPTG (Duchefa, Nizozemí), isopropanol (Lach:ner, ČR), kanamycin (Duchefa, Nizozemí), kvasinkový extrakt (Sigma, USA), kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR), L-asparagin monohydrát (Sigma, USA), maleinová kyselina (Roth, Německo), MOPS (Duchefa, Nizozemí), MS médium s vitamíny (Duchefa, Nizozemí), N-laurosylsarkosin (Sigma, USA), 5 mol.l⁻¹ octan amonný (Ambion, USA), octan draselný (Penta, ČR), octan sodný (Penta, ČR), phleomycin (Duchefa, Nizozemí), PEG 6000 (AppliChem, Německo), rifampicin (Duchefa, Nizozemí), RNase-free voda (Qiagen, Německo), sacharosa (Lach:ner, ČR), SDS (Penta, ČR), Silwet L-77 (AgroBio, ČR), síran hořečnatý heptahydrát (Penta, ČR), spektinomycin (Duchefa,

Nizozemí), Tris (Duchefa, Nizozemí), Tween20 (Sigma, USA), Xgal (Duchefa, Nizozemí).

Při horizontální elektroforéze byl ke vzorkům napipetován 6x vzorkovací pufr (Thermo Scientific, USA). V případě agarosové elektroforézy byl jako standard použit 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA) nebo 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Kanada), v případě formaldehydové elektroforézy byl použit DIG-labeled DNA molecular weight marker II (Roche, Švýcarsko).

Pro restriční analýzy byly použity restriční endonukleasy *AscI* (NEB, Velká Británie), *EcoRI* (Fermentas, Kanada), *HindIII* (TaKaRa, Japonsko), *SalI* (NEB, Velká Británie) a *SpeI* (NEB, Velká Británie). K uvedeným enzymům byly použity 10x *EcoRI* pufr (Fermentas, Kanada), 10x M pufr (TaKaRa, Japonsko), CutSmart pufr (NEB, Velká Británie) a NEB 3.1 pufr (NEB, Velká Británie).

Insert *CpAUX* byl ligován do *pDRIVE* plasmidu (Qiagen, Německo). Na ligaci insertu *CpAUX* do *pER8* plasmidu (Chang *et al.*, 2005) byla použita T4 DNA ligasa (NEB, Velká Británie) společně s 10x pufrem pro T4 DNA ligasu (NEB, Velká Británie). Před ligací byl plasmid *pER8* ošetřen alkalickou fosfatasou Antarctic (NEB, Velká Británie) v prostředí 10x reakčního pufru pro fosfatasu Antarctic (NEB, Velká Británie).

K přípravě protoplastizačního roztoku byl použit lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* (Sigma, USA). Protoplasty *C. purpurea* byly transformovány lineárním konstruktem pRS426:: Δ *CpAUX* obsahujícím 3' a 5' okrajové sekvence genu *CpAUX* *C. purpurea* 20.1 a kazetu s rezistencí na Phleomycin (Christianson *et al.*, 1992).

Při PCR byly použity enzymy GoTaq G2 Flexi polymerasa (Promega, USA) společně s 5x GoTaq pufrem (Promega, USA) a Phusion DNA polymerasa (NEB, Velká Británie) s 5x Phusion HF pufrem (NEB, Velká Británie). Na PCR byla použita 10 mmol.l⁻¹ směs dNTP (Fermentas, Kanada).

RNA byla přečištěna Turbo DNasou (Ambion, USA) v prostředí 10x Turbo pufru (Ambion, USA). Reverzní transkripce byla RNA přepsána na cDNA pomocí RevertAid H Minus reverzní transkriptasy (Thermo Scientific, USA), 5x reakčního pufru pro reverzní transkriptasu (Thermo Scientific, USA) a Oligo(dT) primeru (Sigma, USA).

Lyofilizované primery byly rozpuštěny podle návodu v předem stanovených množstvích nuclease-free vody nebo TE pufru na konečnou koncentraci 100 mmol.l⁻¹. Pro PCR byly použity primery o koncentraci 10 mmol.l⁻¹, na sekvenaci byly použity primery o koncentraci 5 mmol.l⁻¹.

V experimentální části byly dále použity Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo), nylonová membrána (Fluka, Německo), Miracloth membrána (Calbiochem, Česká republika) a další pomůcky Oddělení molekulární biologie, CRH.

Sekvence primerů použitých v experimentální části

CpAUX_AscI_fw	AGGCGCGCCATGGATATCGCTGG
CpAUX_SpeI_rev	GACTAGTTTAGCGCGCCCATTC
dia_CpAUX_fw	ATGACGGCTTATGCATCTTGG
dia_CpAUX_WT_fw	GTCAAATCAAGCGGTGGCG
dia_CpAUX_rev	AACACCATGCACATCTCCG
pER8_F4372	CGACTCTAGGATCTTCGCAAG
pER8_R4559	TTGACGAACGTTGTCGAAACC
Phleo Hefi3	GAGCTCGGTATAAGCTCTCC
Phleo Hi3F2	GTGTTCAAGATCTCGATAAGATACG
SP6 promotor	ATTTAGGTGACACTATAGAA
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG

3.1.3 Roztoky a média

<u>1% agarosový gel</u>	1 g agarosy ve 100 ml TAE pufru
<u>10x blokovací reagent</u>	2 g blokovacího prášku ve 20 ml pufru kyseliny maleinové, autoklávováno
<u>1% formaldehydový gel</u>	1 g agarosy, 5,4 ml 37% formaldehydu, rozpuštěno v 94,6 ml 1x MOPS pufru
<u>0,2 mol.l⁻¹ malát draselný</u>	600 ml 0,2 mol.l ⁻¹ hydroxid draselný, k tomuto roztoku bylo přilito 200 ml 0,2 mol.l ⁻¹ pufru kyseliny maleinové, pH = 5,2, autoklávováno
<u>10x MOPS pufr</u>	200 mmol.l ⁻¹ MOPS, 50 mmol.l ⁻¹ octan sodný, 20 mmol.l ⁻¹ EDTA, pH = 7,0, autoklávováno
<u>20x SSC pufr</u>	3 mol.l ⁻¹ chlorid sodný, 300 mmol.l ⁻¹ citrát sodný dihydrát, pH = 7,0, autoklávováno
<u>Blokovací roztok</u>	1 ml 10x blokovací reagent a 10 ml pufru kyseliny maleinové

<u>Denaturační roztok</u>	0,5 mol.l ⁻¹ hydroxid sodný, 1,5 mol.l ⁻¹ chlorid sodný, autoklávováno
<u>DEPC voda</u>	0,1% DEPC v ddH ₂ O, inkubováno při pokojové teplotě přes noc, autoklávováno
<u>Detekční pufr</u>	0,1 mol.l ⁻¹ Tris, 0,1 mol.l ⁻¹ chlorid sodný, pH = 9,5, autoklávováno
<u>Pufr s vysokou stringencí</u>	0,1% SDS, 0,1x SSC pufr, rozpuštěno v DEPC vodě
<u>Infiltrační roztok</u>	50 g sacharosa, 1,07 g MS médium s vitamíny, 20 µl BAP (1 mg.ml ⁻¹), 500 µl Silwet L-77, rozpuštěno v 1 l destilované vody
<u>Kultivační BII agar</u>	12 g agar, 100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-Asparagin monohydrát, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2, autoklávováno
<u>Kultivační BII médium</u>	100 g sacharosa, 5 g pepton, 5 g L-Asparagin monohydrát, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2, autoklávováno
<u>LB agar</u>	10 g trypton, 10 g chlorid sodný, 5 g kvasinkový extrakt, 15 g agar, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,1, autoklávováno
<u>LB médium</u>	10 g trypton, 10 g chlorid sodný, 5 g kvasinkový extrakt, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 7,1, autoklávováno
<u>Pufr s nízkou stringencí</u>	0,1% SDS, 2x SSC pufr, rozpuštěno v DEPC vodě
<u>Lyzační pufr</u>	200 mmol.l ⁻¹ Tris, 250 mmol.l ⁻¹ chlorid sodný, 25 mmol.l ⁻¹ EDTA, 0,5% SDS, pH = 8,5, autoklávováno
<u>Na⁺ fosfátový pufr</u>	8,74 g hydrogenfosforečnan sodný, 2,14 g dihydrogenfosforečnan sodný, rozpuštěno ve 40 ml destilované vody, autoklávováno

<u>Neutralizační roztok</u>	0,5 mol.l ⁻¹ Tris, 1,5 mol.l ⁻¹ chlorid sodný, pH = 7,5, autoklávováno
<u>PEG roztok</u>	25% PEG 6000, 0,1 mol.l ⁻¹ Tris, 0,05 mol.l ⁻¹ chlorid vápenatý, pH = 7,5, sterilizováno přes 0,22 µm filtr
<u>Prehybridizační roztok</u>	10 ml formamid, 5 ml 20 x SSC, 1,4 g SDS, 0,2 ml N-laurosylsarkosin, 1 ml Na ⁺ fosfátový pufr, 4 ml blokovací roztok
<u>Promývací pufr</u>	0,1 mol.l ⁻¹ maleinová kyselina, 0,15 mol.l ⁻¹ chlorid sodný, 0,3% (v/v) Tween1, pH = 7,5, autoklávováno
<u>Protoplastizační roztok</u>	5 mg.ml ⁻¹ lyzační enzym z <i>Trichoderma harzianum</i> , 20 ml SMaC pufr, pH = 5,2, sterilizováno přes 5 µm a 0,22 µm filtry
<u>Pufr kyseliny maleinové</u>	0,1 mol.l ⁻¹ maleinová kyselina, 0,15 mol.l ⁻¹ chlorid sodný, pH = 7,5, autoklávováno
<u>Roztok P1</u>	50 mmol.l ⁻¹ Tris, 10 mmol.l ⁻¹ EDTA, 100 µg.ml ⁻¹ RNAsa A, pH = 8, autoklávováno
<u>Roztok P2</u>	200 mmol.l ⁻¹ hydroxid sodný, 1% SDS, autoklávováno
<u>Roztok P3</u>	3 mol.l ⁻¹ octan draselný, pH = 5,5, autoklávováno
<u>SMaC pufr</u>	0,05 mol.l ⁻¹ chlorid vápenatý, 0,85 mol.l ⁻¹ D-sorbitol, 0,2 mol.l ⁻¹ malát draselný, autoklávováno
<u>SOC médium</u>	20 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu a 0,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 950 ml destilované vody. Poté bylo do roztoku přidáno 10 ml 250 mmol.l ⁻¹ chloridu draselného, pH = 7. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l. Po autoklávování bylo do roztoku přidáno 20 ml 1 mol.l ⁻¹ glukosy a 5 ml 2 mol.l ⁻¹ chloridu hořečnatého.
<u>STC pufr</u>	0,85 mol.l ⁻¹ D-Sorbitol, 0,01 mol.l ⁻¹ Tris, 0,05 mol.l ⁻¹ chlorid vápenatý, pH = 7,5, autoklávováno

<u>TAE pufr</u>	40 mmol.l ⁻¹ Tris-acetát, 1 mmol.l ⁻¹ EDTA, pH = 8
<u>Transformační BII agar</u>	2,4 g agar, 40 g sacharosa, 1 g pepton, 1 g L-Asparagin, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 0,5 g síran hořečnatý heptahydrát, doplněno do 200 ml destilovanou vodou, pH = 8, autoklávováno

3.1.4 Použité kity a návody

DIG RNA labeling Kit (Roche, Švýcarsko)

Qiagen PCR cloning kit (Qiagen, Německo)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo)

QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Německo)

RNAqueous Total RNA Isolation Kit (Ambion, USA)

Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche, Švýcarsko)

3.1.5 Přístroje

Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko)

Centrifuga ROTANTA 460R (Hettich, Německo)

Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)

Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)

Flowbox (MERCİ, ČR)

Inkubátor (Memmert, Německo)

Magnetický stojánek (Alpaqua, USA)

Mikroskop Olympus CX21FS3 (Olympus, Japonsko)

PC s dokumentačním systémem AlphaDigi a programem Alpha DigiDoc RT

Spektrofotometr NanoDrop NAS 99 (ACT gene, USA)

Termoblok (BIOER, Čína)

Termocykler T – gradient (Biometra, Německo)

Třepačka Orbit 1000 (Labnet, USA)

UV transiluminátor (East Port Scientific, ČR)

Vortex (Labnet, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Transformace *C. purpurea* 20.1

3.2.1.1 Příprava protoplastů

50 ml kultivačního BII média ve 250 ml Erlenmayerově baňce bylo inokulováno houbou *C. purpurea* 20.1. Baňky byly umístěny na třepačku (180 rpm, 28°C, 48 h).

Po dvou dnech byla mycelia v BII médiu centrifugována 10 min (RT, 5600 g). Pelet mycelia byl promyt SMaC puforem, centrifugace 10 min (RT, 5600 g). Poté byl pelet pomocí pipety opatrně resuspendován v protoplastizačním roztoku a po 1 hod inkubaci (28°C, 80 rpm) byl vzniklý roztok zfiltrován přes Nytexovou membránu do Erlenmayerovy baňky, ze které byl následně přelit do 50 ml zkumavky Falcon, centrifugace 10 min (RT, 800 g). Pelet byl 2x promyt STC puforem, centrifugace vždy 10 min (RT, 1000 g). Protoplasty byly rozpuštěny v 1 ml STC pufru a pomocí Bürkerovy komůrky byla zkontrolována jejich hustota (optimální hodnota - $5 \cdot 10^8$ protoplastů v 1 ml pufru).

3.2.1.2 Transformace protoplastů

Ve 12 ml zkumavce Falcon byla připravena transformační směs. Do zkumavky bylo napipetováno 90 μ l STC pufru, 100 μ l protoplastů, 50 μ l PEG a 10 μ l DNA (5-10 μ g fragmentu obsahujícího 3' a 5' okrajové sekvence genu *CpAUX* *C. purpurea* 20.1 a kazetu s rezistencí na Phleomycin získaného restrikcí enzymy *Xba*I a *Eco*RI konstruktu pRS426:: Δ *CpAUX*). Po 20 min inkubaci při laboratorní teplotě byly do zkumavky přidány 2 ml roztoku PEG. Po uplynutí dalších 5 min byly do zkumavky napipetovány ještě 4 ml STC pufru.

Ve flowboxu bylo nachystáno 10 Petriho misek a 200 ml BII transformačního agarů (50°C). Do první misky bylo nalito 20 ml agarů a přidáno 11 μ l protoplastů. Tato miska sloužila ke kontrole protoplastizace - zda jsou protoplasty schopné růst i po odstranění buněčné stěny. Do druhé misky bylo nalito 20 ml agarů a 690 μ l připravené transformační směsi. Tato miska sloužila jako kontrola transformace – zda nebyly protoplasty během transformace usmrceny. Do zbylých 160 ml agarů bylo napipetováno 52,8 μ l zásobního roztoku Phleomycinu (100 mg.ml⁻¹, výsledná koncentrace byla

33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Agar byl rozlit po 20 ml do zbývajících 8 misek, přičemž do každé misky bylo napipetováno 690 μl připravené transformační směsi.

Po 4 dnech byla narostlá mycelia *C. purpurea* 20.1 přenesena na BII transformační agar (pH = 8) s vyšším obsahem Phleomycinu (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

3.2.1.3 Izolace genomické DNA

Den před zahájením izolace gDNA byly ve flowboxu z BII transformačního agaru a Phleomycinem (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vyřezány části mycelií transformantů *C. purpurea* 20.1. Mycelia byla přenesena do 2 ml mikrozkušavek, jejichž víčko bylo následně propíchnuto sterilní jehlou. Mikrozkušavky byly umístěny do společné kádinky, zality tekutým dusíkem a lyofilizovány přes noc.

Lyofilizované mycelium bylo z každé mikrozkušavky přeneseno do nové 2 ml mikrozkušavky, zalito tekutým dusíkem a pomocí špachtle rozdrceno. Všechny následující centrifugace probíhaly při 21 000 g a 4°C. K myceliu bylo napipetováno 600 μl Lyzačního pufru. Po 10 min inkubaci na vortexu bylo do každé mikrozkušavky přidáno 400 μl 5 mol.l⁻¹ roztoku octanu draselného, centrifugace 20 min. Supernatant byl společně s 1 ml isopropanolu přepipetován do nových 2 ml mikrozkušavek, obsah mikrozkušavky byl promíchán. Po 30 min centrifugaci byl pelet promyt 300 μl 70% ethanolu (-20°C), centrifugace 5 min. Pelet byl vysušen 30 min v digestoři a poté byl rozpuštěn v 50 μl nuclease-free vody. Následně byla na NanoDropu NAS 99 změřena koncentrace získané DNA.

3.2.1.4 Diagnostická PCR

Analýza získaných primárních transformantů *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpAUX* byla provedena pomocí diagnostické PCR. Se vzorky gDNA z *C. purpurea* 20.1 byly provedeny tři PCR. Jednotlivé reakční směsi (Tab. 1) se lišily pouze v přidáných primerech, nastavení podmínek v termocycleru bylo vždy stejné (Tab. 2).

První reakční směs obsahovala primery dia_CpAUX_WT_fw a dia_CpAUX_rev, do druhé reakční směsi byly přidány primery dia_CpAUX_fw a Phleo Hi3F2, třetí směs obsahovala primery Phleo Hefi3 a dia_CpAUX_rev (Obr. 11).

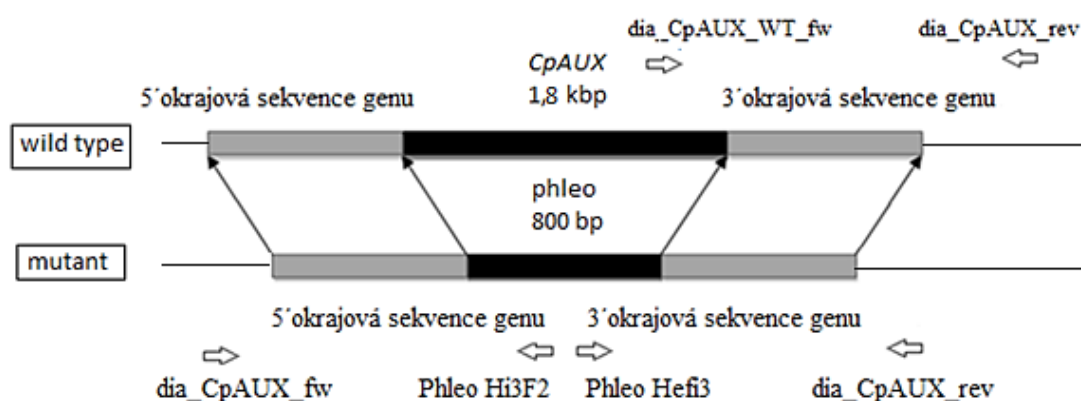
Tab. 1 Složení PCR směsi s GoTaq G2 Flexi polymerasou

Složka	Objem [μl]
5x GoTaq pufr	2,5
GoTaq G2 Flexi polymerasa	0,07
Chlorid hořečnatý (25 mmol.l ⁻¹)	0,75
dNTP (10 mmol.l ⁻¹)	0,25
Fw primer (10 mmol.l ⁻¹)	0,25
Rev primer (10 mmol.l ⁻¹)	0,25
H ₂ O	7,43
gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1 (100 ng)	1
Celkový objem	12,5

Tab. 2 Nastavení podmínek diagnostického PCR za použití GoTaq G2 Flexi polymerasy

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	95	120
2. Denaturace	95	30
3. Annealing	62	30
4. Elongace	72	110
5. Konečná elongace	72	300

Cyklus 2-4 byl opakován 32x.



Obr. 11 Schéma nasedání primerů při diagnostickém PCR (wild type a mutant, oblast genu *CpAUX*)

3.2.1.5 Elektroforéza v agarosovém gelu

PCR směsi byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Ke vzorkům byl napipetován vzorkovací pufr 6x Loading Dye, jako standard byl použit 1kb Plus DNA Ladder. Po nanesení vzorků na 1% agarosový gel, ke kterému bylo napipetováno 10 μl 0,5% ethidium bromidu, byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při konstantním napětí 120 V po dobu 20 min. Následně byl gel přenesen na UV-transiluminátor a byl pořízen snímek pomocí dokumentačního systému AlphaDigi a programu Alpha DigiDoc RT.

3.2.2 Příprava RNA próby

3.2.2.1 Restrikce enzymem *HindIII*

Templátem pro vytvoření RNA próby byl *pDRIVE* plasmid obsahující 3' okrajovou sekvenci genu *CpAUX* *C. purpurea* 20.1. 2 µg tohoto plasmidu byly naštěpeny enzymem *HindIII* (Tab. 3). Inkubace restrikční směsi probíhala do dalšího dne při 37°C.

3.2.2.2 Purifikace naštěpené DNA

Následující den byla restrikční směs purifikována za použití QIAquick Gel Extraction kitu (Qiagen, Německo). Všechny následující centrifugace probíhaly při 18 000 g a při laboratorní teplotě. Podle návodu byl k restrikční směsi napipetován 5x větší objem PB pufru. Roztok byl přepipetován do QIAquick kolonky, centrifugace 1 min. Směs, která kolonkou protekla, byla odstraněna. Na kolonku bylo napipetováno 500 µl QC pufru, centrifugace 1 min. Směs, která kolonkou protekla, byla opět odstraněna. Na kolonku bylo napipetováno 750 µl PE pufru, centrifugace 1 min. Směs, která protekla, byla odstraněna. Aby došlo k úplnému odstranění PE pufru, byla prázdná kolonka se sběrnou mikrozkuvkou stočena po dobu 1 min. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkuvky a bylo na ni napipetováno 18 µl vody. Po 1 min inkubaci následovala centrifugace 1 min. Kolonka byla odstraněna a na NanoDropu NAS 99 byla změřena koncentrace získané DNA.

Tab. 3 Restrikce *pDRIVE* plasmidu s 3' okrajovou sekvencí genu *CpAUX* enzymem *HindIII*

Složka	Objem [µl]
<i>HindIII</i>	3
NEB 2.1 pufr	4
<i>pDRIVE</i> obsahující 3' okrajovou sekvencí genu <i>CpAUX</i> (2 µg)	8
H ₂ O	25
Celkový objem	40

Tab. 4 Vytvoření RNA próby značené digoxigeninem *in vitro* transkripcí z DNA templátu

Složka	Objem [µl]
Purifikovaný DNA templát (konc.)	13
10x dNTP (10 mmol.l ⁻¹ ATP, 10 mmol.l ⁻¹ CTP, 10 mmol.l ⁻¹ GTP, 6,5 mmol.l ⁻¹ UTP, 3,5 mmol.l ⁻¹ DIG-11-UTP)	2
10x transkripční pufr	2
Inhibitor RNasy	1
RNA polymerasa T7	2
Celkový objem	20

3.2.2.3 *In vitro* transkripce

K vytvoření RNA próby značené digoxigeninem *in vitro* transkripcí z DNA templátu byl použit DIG RNA labeling kit (Roche, Švýcarsko). 1 µg purifikovaného DNA templátu byl pomocí nuclease-free vody doplněn na objem 13 µl a na ledu byly do reakční směsi přidány další reagenty (Tab. 4). Směs byla pomocí pipety opatrně promíchána a inkubována 2 hod při 37°C. Reakce byla zastavena přidáním 2 µl 0,2 mol.l⁻¹ EDTA (pH = 8,0).

3.2.2.4 Elektroforéza ve formaldehydovém gelu

RNA transkript byl analyzován pomocí elektroforézy v 1% formaldehydovém gelu. Ke 3 µl vzorku RNA próby byl přidán vzorkovací pufr 6x Loading dye. Směs byla inkubována po dobu 10 min při 65°C, poté byla okamžitě přenesena na led.

Po nanesení vzorku na 1% formaldehydový gel s 10 µl 0,5% ethidium bromidem, byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala v 1x MOPS pufru při konstantním napětí 120 V po dobu 30 min. Následně byl gel přenesen na UV-transiluminátor a byl pořízen snímek pomocí dokumentačního systému AlphaDigi a programu Alpha DigiDoc RT.

3.2.3 Southern blot

Southern blot (Southern, 1975) byl proveden podle Roche Molecular Biochemicals DIG Application Manual for Filter Hybridization (Roche, Švýcarsko).

3.2.3.1 Restrikce gDNA enzymem *SalI*, ethanolová precipitace

Podle postupu 3.2.1.3 byly izolovány vzorky gDNA ze čtyř předpokládaných transformantů *C. purpurea* 20.1 a z WT *C. purpurea* 20.1. S 10 µg gDNA a 7 µg gDNA bylo následně provedeno pět restrikcí enzymem *SalI* (Tab. 5). Restrikční směsi byly inkubovány do dalšího dne při 37°C.

Tab. 5 Restrikce gDNA z *C. purpurea* 20.1 restrikční endonukleasou *SalI*

Složka	Množství
<i>SalI</i>	8 µl
NEB 3.1 pufr	5 µl
gDNA	10 µg nebo 7 µg
Směs byla doplněna vodou na objem 50 µl	

Následující den byla gDNA přečištěna a zakoncentrována ethanolovou precipitací. K 50 μl restrikční směsi bylo přidáno 5 μl 5 mol.l^{-1} roztoku octanu amonného, směs byla promíchána na vortexu. Následně bylo do mikrozkušavky přidáno 137,5 μl 96% ethanolu (-20°C), následovala inkubace 30 min při -20°C . Po 15 min centrifugaci (21 000 g, 4°C) byl k peletu napipetován 1 ml 70% ethanolu (-20°C), centrifugace 5 min (21 000 g, 4°C). Pelet byl vysušen 30 min ve flow-boxu a poté byl rozpuštěn v 15 μl nuclease-free vody.

3 μl gDNA před a po restrikci byly podle postupu 3.2.1.5 separovány v 1% agarosovém gelu. Jako marker byl použit 1 kb DNA Ladder. Elektroforéza probíhala 1 h při konstantním napětí 90 V.

3.2.3.2 Elektroforéza v agarosovém gelu, promývání gelu

12 μl štěpené a zakoncentrované gDNA *C. purpurea* 20.1 bylo elektroforeticky separováno v 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru podle postupu 3.2.1.5. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 90 V po dobu 1 h. Jako standard byl použit DIG-labeled DNA molecular weight marker II.

Po elektroforetické separaci byl gel, umístěný na třepačce, ponořen do Denaturačního roztoku 2 x 15 min. Poté byl gel omyt sterilní vodou a inkubován s Neutralizačním roztokem 2 x 15 min. Na závěr byl gel ponořen na 10 min do 20x SSC pufru. Vše probíhalo při laboratorní teplotě.

3.2.3.3 Kapilární přenos gDNA

Byl proveden kapilární přenos gDNA z 1% agarosového gelu na pozitivně nabitou nylonovou membránu. Na horní plochu gelu byla přiložena nylonová membrána, dolní plocha gelu byla prostřednictvím filtračního papíru spojena se zásobníkem přenosového pufru. Jako přenosový pufr byl použit 20x SSC pufr. Na horní plochu membrány byly naskládány 3 MM Whatman papíry a stoh papírových ubrousků. Pro lepší kontakt všech vrstev byla soustava zatížena závažím. Transfěr gDNA probíhal při laboratorní teplotě do dalšího dne.

Následující den byla membrána umístěna na filtrační papír, ozářena UV světlem (100 s, 500 J) a přenesena do 50 ml zkumavky Falcon.

3.2.3.4 Prehybridizace a hybridizace

K membráně v 50 ml zkumavce Falcon bylo nalito 20 ml Prehybridizačního roztoku (50°C). Po 30 min inkubaci při 50°C v hybridizační peci byl prehybridizační roztok vyměněn za roztok hybridizační, který byl připraven následujícím způsobem: 5 µl značené RNA próby bylo smícháno s 50 µl nuclease-free vody, směs byla inkubována 7 min při 100°C a poté byla okamžitě přenesena na led. Takto připravená směs byla napipetována k 5 ml prehybridizačního roztoku. Membrána byla s takto připraveným roztokem inkubována do následujícího dne v hybridizační peci při 50°C.

Další den byla membrána v 50 ml zkumavce Falcon inkubována při laboratorní teplotě na třepačce 2 x 15 min s Pufrem s nízkou stringencí a poté s Pufrem s vysokou stringencí 2 x 15 min při 68°C. Poté byla membrána, umístěná na třepačce, ponořena do Promývacího pufru po dobu 2 min a poté byla ještě inkubována s Blokovacím roztokem po dobu 30 min.

3.2.3.5 Detekce

K detekci hybridizovaných fragmentů DNA byla použita protilátka Anti-digoxigenin-AP, která byla centrifugována po dobu 5 min (11 000 g, 4°C). 2 µl této protilátky byly napipetovány k 20 ml Blokovacího roztoku, přičemž membrána byla s tímto roztokem inkubována 30 min. Následně byla membrána, umístěná na třepačce, ponořena do Promývacího pufru 2 x 15 min a poté do Detekčního pufru po dobu 3 min. Vše probíhalo při laboratorní teplotě.

10 µl chemiluminiscenčního substrátu CDP Star bylo přidáno k 990 µl Detekčního pufru. Tento roztok byl napipetován na membránu umístěnou mezi plastovými listy. Po 5 min inkubaci byl roztok z membrány odstraněn a ta byla zafixována pomocí lepicí pásky do vyvolávací kazety. Film byl 15 min exponován s membránou a poté byl vyvolán v temné místnosti.

3.2.4 Příprava cDNA *C. purpurea* 20.1

3.2.4.1 Izolace RNA

Podle postupu 3.2.1.1 bylo 50 ml kultivačního BII média ve 250 ml Erlenmayerově baňce inokulováno houbou *C. purpurea* 20.1. Po dvou dnech bylo mycelium zfiltrováno přes Miracloth membránu, poté bylo opatrně přeneseno do Petriho misky, kde bylo

zalito tekutým dusíkem. Petriho miska byla umístěna do lyofilizátoru, lyofilizace probíhala do následujícího dne.

Pomocí RNAqueous Total RNA Isolation kitu (Ambion, USA) byla z lyofilizovaného mycelia izolována RNA. Mycelium bylo nejdříve ve třetí misce zalito tekutým dusíkem a pomocí tloučku bylo rozdrceno. Poté bylo 100 mg mycelia přeneseno do 2 ml mikrozkušavky, kde k němu byl přidán 1 ml Lyzačního pufru. Po 10 min inkubaci na vortexu při laboratorní teplotě byla směs centrifugována 2 min (21 000 g, 4°C). Supernatant byl společně se stejným objemem 64% ethanolu přepipetován do nové 2 ml mikrozkušavky, směs byla promíchána otočením 2-3x. Všechny následující centrifugace probíhaly při 13 000 g a při laboratorní teplotě. Reakční směs ve 2 ml mikrozkušavce byla postupně po 700 µl napipetována na kolonku ve sběrné mikrozkušavce, centrifugace vždy 30 s. Směs, která kolonkou protekla, byla odstraněna. K promytí bylo na kolonku napipetováno 700 µl Promývacího pufru 1, centrifugace 30 s. Směs, která protekla, byla odstraněna. Následně bylo na kolonku napipetováno 2 x 500 µl Promývacího pufru 2/3, centrifugace vždy 30 s. Směs, která kolonkou protekla, byla opět odstraněna. Po další 30 s centrifugaci byla kolonka přenesena do nové sběrné mikrozkušavky. RNA byla eluována 60 µl Elučního pufru (80°C), centrifugace 30 s. Poté bylo na kolonku napipetováno ještě dalších 40 µl Elučního pufru (80°C), centrifugace 30 s.

Získaná RNA byla přečištěna Turbo DNAsou. K 50 µl RNA bylo napipetováno 6 µl 10x Turbo pufru a 2 µl Turbo DNasy. Po 45 min inkubaci při 37°C byly k reakční směsi napipetovány ještě další 2 µl Turbo DNasy, následovala opět inkubace 45 min při 37°C.

RNA byla přečištěna a zakoncentrována pomocí magnetických kuliček AGENCOURT RNACLEAN XP. K 60 µl RNA bylo napipetováno 30 µl magnetických kuliček a 25 µl isopropanolu. Směs byla promíchána na vortexu a po 10 min inkubaci při laboratorní teplotě byla umístěna na 5 min na magnetický stojánek. Supernatant byl opatrně odpipetován. Mikrozkušavka byla zaplněna RNase free 70% ethanolem a po 1 min inkubaci byl supernatant opatrně odstraněn. K RNA bylo napipetováno 200 µl RNase free 70% ethanolu, po 1 min inkubaci byl supernatant opět odpipetován. Tento krok byl ještě jednou zopakován. Pelet byl následně vysušen 10 min ve flowboxu. RNA byla eluována do 20 µl RNase free vody. Směs byla inkubována 5 min na magnetickém stojánku a poté byla RNA opatrně přepipetována do čisté mikrozkušavky. Na NanoDropu NAS99 byla změřena koncentrace získané RNA.

Tab. 6 Reverzní transkripce

Složka	Objem [μl]
Reakční směs	13
dNTP (10 mmol.l ⁻¹)	2
5x reakční pufr	4
RevertAid H Minus reverzní transkriptasa	1
Celkový objem	20

3.2.4.2 Reverzní transkripce

Ke 2 μg RNA byl napipetován 1 μl Oligo(dT) primeru a směs byla pomocí RNase free vody doplněna na objem 13 μl. Reakční směs byla inkubována 5 min při 65°C a poté okamžitě přenesena na led. Na ledu byly přidány další reagenty (Tab. 6) a reverzní transkripce probíhala při 42°C 1h v termocycleru. Reakce byla ukončena inkubací 10 min při 70°C.

3.2.5 Ligace cDNA transkriptu genu *CpAUX* do *pDRIVE* plasmidu

3.2.5.1 PCR, elektroforéza v agarosovém gelu

Amplifikace cDNA transkriptu genu *CpAUX* byla provedena pomocí PCR (Tab. 7) za použití Phusion DNA polymerasy a primerů prodloužených o přidaná restrikční místa *CpAUX_AscI_fw* a *CpAUX_SpeI_rev*. Po skončení elongace bylo k reakční směsi (Tab. 8) napipetováno 0,3 μl GoTaq G2 Flexi polymerasy pro získání nespecifických adenosinů na koncích ampliconů pro TA klonování. PCR s GoTaq G2 Flexi polymerasou probíhala 10 min při 72°C.

PCR směs byla následně analyzována pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu podle postupu 3.2.1.5. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 30 min. Jako standard byl použit 1kb Plus DNA Ladder.

Tab. 7 Nastavení PCR s Phusion DNA polymerasou

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	98	30
2. Denaturace	98	7
3. Annealing	57	20
4. Elongace	72	60

Cyklus 2-4 byl opakován 35x.

Tab. 8 Složení PCR směsi s Phusion DNA polymerasou

Složka	Objem [μ l]
5x HF pufr	4
Phusion DNA polymerasa	0,2
dNTP (10 mmol.l ⁻¹)	0,4
CpAUX_AscI_fw (10 mmol.l ⁻¹)	1
CpAUX_SpeI_rev (10 mmol.l ⁻¹)	1
H ₂ O	12,4
cDNA templát	1
Celkový objem	20

3.2.5.2 Izolace a purifikace DNA z agarosového gelu

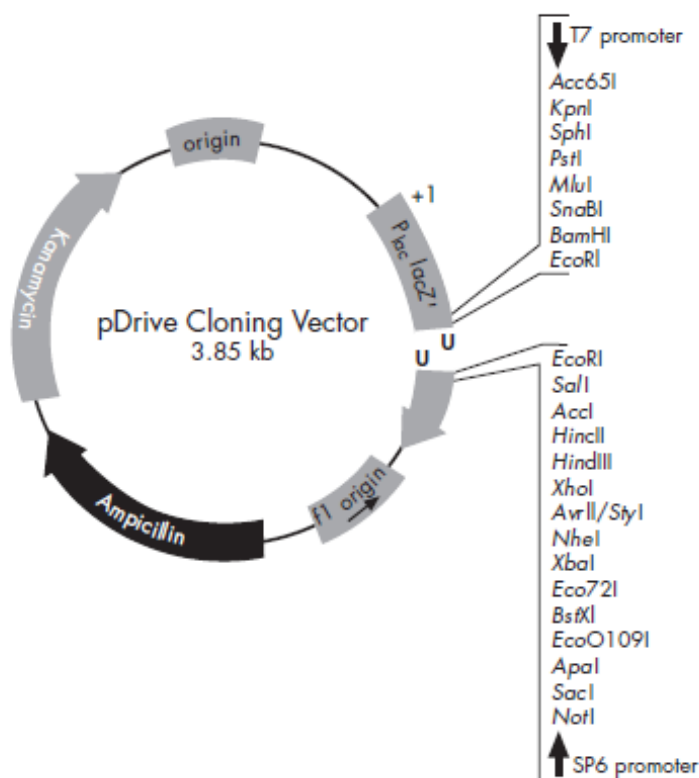
Fragment odpovídající velikosti genu *CpAUX* (1683 bp) byl z agarosového gelu pomocí sterilního skalpelu vyříznut a přenesen do 1,5 ml mikrokumavky. K izolaci DNA amplikonů byl použit QIAquick Gel Extraction kit. Všechny následující centrifugace probíhaly při 18 000 g a laboratorní teplotě. Podle návodu byl k agarosovému gelu napipetován 3x větší objem QC pufru (100 mg gelu ~ 300 μ l QC pufru). Aby došlo k rozpuštění gelu byla směs inkubována 10 min při 50°C. Následně byl k roztoku přidán isopropanol ve stejném množství jako byl objem gelu. Roztok byl přepipetován do QIAquick kolonky a další postup probíhal podle 3.2.2.2. DNA byla eluována 18 μ l nuclease-free vody, na NanoDropu NAS 99 byla změřena koncentrace získané DNA.

3.2.5.3 Ligace do *pDRIVE* plasmidu

Byla provedena ligace (Tab. 9) insertu *CpAUX* do *pDRIVE* plasmidu (Obr. 12). Ligační směs byla inkubována při 8°C do následujícího dne. Další den byla T4 DNA ligasa inaktivována 10 min při 70°C.

Tab. 9 Ligace insertu *CpAUX* do *pDRIVE* plasmidu

Složka	Objem [μ l]
DNA insert (21 ng)	4
2x ligační master mix	5
<i>pDRIVE</i> klonovací vektor (50 ng)	1
Celkový objem	10



Obr. 12 *pDRIVE* klonovací vektor

(<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1016726hbdnypcrcloning401ww.pdf>, staženo 4.5. 2014)

3.2.5.4 Transformace elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10

Plasmid s insertem byl pomocí elektroporace transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10. Do 1,5 ml mikrozkušavky s buňkami *E. coli* (50 μ l) na ledu byl ve flow-boxu napipetován 1 μ l ligační směsi. Směs byla opatrně pomocí pipety promíchána a přepipetována do předem vychlazené elektroporační kyvety. Po 5 min inkubaci na ledu byla elektroporační kyveta vložena do elektroporátoru, kde byl buňkám udělen elektrický impuls 1800 V po dobu 5 ms. Ihned po impulsu bylo do kyvety napipetováno 250 μ l SOC média. Směs byla přepipetována do nové 1,5 ml mikrozkušavky, následovala inkubace 30 min na třepačce při 37°C.

Ve flow-boxu byly připraveny dvě Petriho misky s LB agarem a kanamycinem (50 μ g.ml⁻¹). Na agar bylo napipetováno 40 μ l 0,1 mol.l⁻¹ xGal a 10 μ l 0,1 mol.l⁻¹ IPTG, které byly pomocí sterilní hokejky rozetřeny. Poté bylo na jednu Petriho misku napipetováno 100 μ l a na druhou misku 200 μ l transformovaných buněk *E. coli*. Petriho misky byly zalepeny parafilmem a inkubovány do dalšího dne při 37°C.

3.2.5.5 Alfa komplementace

Vzhledem k tomu, že součástí *pDRIVE* plasmidu je kromě rezistencí na kanamycin a ampicilin ještě i *lacZ* gen obsahující tzv. multiklonovací místo, je možné selektovat kolonie *E. coli* na základě tzv. modrobílé selekce (alfa komplementace). *LacZ* kóduje β -galaktosidasu štěpící substrát Xgal na galaktosu a 5-brom-4-chlor-3-hydroxyindol, který je dále oxidován na modrý produkt. Pokud tedy dojde úspěšnému vložení insertu do multiklonovacího místa v *LacZ* genu, není *E. coli* schopná produkovat β -galaktosidasu, kolonie jsou tudíž zbarveny bíle. IPTG funguje jako induktor *lacZ* operonu.

Další den byly bílé kolonie *E. coli* přeneseny pomocí sterilního párátko do 3 ml tekutého LB média s kanamycinem ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Následovala inkubace na třepačce při 37°C do dalšího dne.

3.2.5.6 Izolace plasmidu alkalickou lyzí

K izolaci plasmidů byly použity P1, P2 a P3 roztoky. 2 ml bakteriální kultury byly postupně centrifugovány 1 min v 1,5 ml mikrozkuhavce ($18\,000 \text{ g}$, RT). Pelet byl resuspendován ve $300 \mu\text{l}$ P1 roztoku. Poté bylo k roztoku přidáno $300 \mu\text{l}$ lyzačního roztoku P2, směs byla promíchána otočením mikrozkuhavky 6x. Po 5 min inkubaci bylo do mikrozkuhavky přidáno $300 \mu\text{l}$ roztoku P3. Následovala inkubace 5 min na ledu, centrifugace 10 min ($18\,000 \text{ g}$, 4°C). Supernatant byl společně s $500 \mu\text{l}$ 70% ethanolu (-20°C) přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkuhavky. Směs byla promíchána převrácením mikrozkuhavky 6x, centrifugace 30 min při ($18\,000 \text{ g}$, RT). Pelet byl vysušen 30 min ve flow-boxu a poté byl resuspendován v $15 \mu\text{l}$ sterilní vody.

3.2.5.7 Restrikce enzymem *EcoRI*

Pro ověření úspěšnosti ligace *CpAUX* do *pDRIVE* plasmidu byly provedeny restrikce plasmidů enzymem *EcoRI* (Tab. 10). Restrikční směs byla inkubována při 37°C do dalšího dne.

Následující den byly restrikční směsi analyzovány pomocí agarosové elektroforézy v 1x TAE pufru podle postupu 3.2.1.5. Jako standard byl použit 1kb Plus DNA Ladder. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 30 min.

Tab. 10 Restrikce plasmidu restrikční endonukleasou *EcoRI*

Složka	Objem [μl]
10x <i>EcoRI</i> pufr	2
<i>EcoRI</i>	0,5
H ₂ O	7,5
Plasmid	10
Celkový objem	20

K izolaci plasmidové DNA bylo napipetováno 20 μl bakteriální kultury obsahující *pDRIVE* s insertem do 4 ml LB média s kanamycinem (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Inkubace probíhala na třepačce při 37°C do dalšího dne.

3.2.5.8 Izolace plasmidu pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu

K izolaci *pDRIVE* plasmidu s insertem *CpAUX* byl použit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Německo). Všechny následující centrifugace probíhaly při 18 000 g a při laboratorní teplotě. 4 ml bakteriální kultury byly postupně po dobu 3 min stočeny v 1,5 ml mikrozkuhavce. Pelet byl resuspendován ve 250 μl pufru P1. Následně bylo ke směsi přidáno 250 μl pufru P2 a obsah mikrozkuhacek byl promíchán jejich převrácením 4-6x. Po 5 min inkubaci při laboratorní teplotě bylo ke směsi napipetováno 350 μl pufru N3. Obsah mikrozkuhacek byl promíchán jejich převrácením 4-6x, centrifugace 10 min. Supernatant byl přepipetován do QIAprep spin kolonky, centrifugace 30 s. Směs, která kolonkou protekla, byla odlita. Na kolonku bylo napipetováno 500 μl PB pufru, centrifugace 1 min. Směs, která protekla byla opět odstraněna. Na kolonku bylo napipetováno 750 μl PE pufru, centrifugace 1 min. Směs, která protekla byla odstraněna. Aby došlo k úplnému odstranění promývacího pufru byla prázdná kolonka stočena ještě 1 min. Kolonka byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrozkuhavky, kde na ni bylo napipetováno 40 μl nuclease-free vody. Po 1 min inkubaci při laboratorní teplotě následovala centrifugace 1 min. Poté byla na NanoDropu NAS 99 změřena koncentrace získané DNA.

Přítomnost insertu *CpAUX* v *pDRIVE* plasmidu byla ověřena sekvenací za použití primerů nasedajících na úseky plasmidu *pDRIVE* odpovídající SP6 a T7 promotoru.

3.2.6 Ligace genu *CpAUX* do *pER8* plasmidu

3.2.6.1 Restrikce *pDRIVE* plasmidu enzymy *AscI* a *SpeI*

Byly provedeny restrikce *pDRIVE* plasmidu s vloženým insertem *CpAUX* a plasmidu *pER8* (Obr. 13) restrikčními endonukleasami *AscI* a *SpeI* (Tab. 11). Restrikční směsi byly inkubovány do dalšího dne při 37°C.

Následující den bylo 20 µl restrikční směsi s *pDRIVE* plasmidem a 5 µl restrikční směsi s *pER8* plasmidem, který využívá XVE systém indukovaný pomocí estradiolu, analyzováno pomocí agarosové elektroforézy podle 3.2.1.5. Jako standard byl použit 1kb Plus DNA Ladder. Elektroforéza probíhala 20 min při konstantním napětí 120 V.

3.2.6.2 Izolace a purifikace insertu a *pER8* plasmidu

Fragment odpovídající velikosti genu *CpAUX* (1683 bp) byl z agarosového gelu vyříznut a přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky. K izolaci insertu *CpAUX* z agarosového gelu byl použit QIAquick Gel Extraction kit - postup dle 3.2.5.2. DNA byla eluována 20 µl nuclease-free vody a na NanoDropu NAS 99 byla změřena koncentrace získané DNA.

Na agarosovém gelu byla také zkontrolována velikost naštěpeného *pER8* plasmidu (11522 bp). Plasmid byl izolován z 15 µl restrikční směsi, přičemž nejdříve byla restrikční směs ošetřena alkalickou fosfátasou Antarctic (Tab. 12). Po 1 h inkubaci při 37°C byla směs přečištěna podle 3.2.2.2. DNA byla eluována 20 µl nuclease-free vody, získaná koncentrace byla změřena na NanoDropu NAS 99.

Tab. 11 Restrikce *pDRIVE* plasmidu s insertem *CpAUX* a *pER8* plasmidu restrikčními endonukleasami *AscI* a *SpeI*

Složka	Množství
CutSmart pufr	2 µl
<i>AscI</i>	0,5 µl
<i>SpeI</i>	0,5 µl
<i>pDRIVE</i> plasmid s insertem nebo <i>pER8</i>	1 µg
Doplněno vodou na celkový objem 20 µl	

Tab. 12 Ošetření *pER8* plasmidu alkalickou fosfátasou Antarctic

Složka	Objem [µl]
Restrikční směs	15
Alkalická fosfátasa Antarctic	1
10x pufr pro alkalickou fosfátasu	1,5
Celkový objem	17,5

3.2.6.4 Elektroporace *E. coli* TOP10, izolace plasmidu s insertem

Plasmid s insertem byl pomocí elektroporace podle 3.2.5.4 transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10, selekce buněk probíhala na LB agaru se spektinomycinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Narostlé kolonie *E. coli* byly přeneseny do 3 ml tekutého LB média se spektinomycinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Podle postupu 3.2.5.6 byla ze 2 ml bakteriální kultury pomocí alkalické lyze izolována plasmidová DNA, která byla následně podrobena restriční analýze enzymy *AscI* a *SpeI* (Tab. 14), přičemž restriční směsi byly analyzovány agarosovou elektroforézou v 1x TAE pufru podle 3.2.1.5. 20 μl pozitivní bakteriální kultury bylo kultivováno ve 4 ml LB média se spektinomycinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z bakteriální kultury byl následně podle 3.2.5.8 pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu izolován plasmid s insertem.

Správnost sekvence insertu *CpAUX* v *pER8* plasmidu byla ověřena sekvenací za použití primerů pER8_F4372 a pER8_R4559.

3.2.7 Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Plasmid *pER8* s vloženým *CpAUX* byl pomocí elektroporace transformován do buněk *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101. Do 1,5 ml mikrozkušavky s buňkami *A. tumefaciens* (50 μl), umístěné na ledu, byl ve flow-boxu napipetován 1 μl plasmidu. Směs byla opatrně pomocí pipety promíchána a přepipetována do předem vychlazené elektroporační kyvety. Po 15 min inkubaci na ledu byla elektroporační kyveta vložena do elektroporátoru, kde byl buňkám udělen elektrický impuls 1800 V po dobu 5 ms. Ihned po impulsu bylo do kyvety napipetováno 200 μl SOC média. Směs byla přepipetována do nové 1,5 ml mikrozkušavky, následovala inkubace 3 h na třepačce při 28°C.

Ve flow-boxu byly připraveny tři Petriho misky s LB agarem, který obsahoval gentamycin ($25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), rifampicin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a spektinomycin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Na misky bylo napipetováno 10 μl , 15 μl a 20 μl transformovaných buněk *A. tumefaciens*. Petriho misky byly zalepeny parafilmem a inkubovány 48 h při 28°C.

3.2.8 Ověření transformace *A. tumefaciens*

Transformovaná kolonie *A. tumefaciens* byla pomocí párátko přenesena z LB agaru do 5 ml LB média s gentamicinem ($25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), rifampicinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a spektinomycinem ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), inkubace 24 h (28°C, 180 rpm). 1 ml narostlé kultury

A. tumefaciens byl kultivován ve 4 ml LB média s příslušnými antibiotiky, opět inkubace 24 h při 28°C na třepačce. Ze zbylých 4 ml bakteriální kultury byla izolována plasmidová DNA alkalickou lyzí podle 3.2.5.6. Pelet DNA byl rozpuštěn v 10 µl nuclease-free vody.

Izolovaný plasmid byl pomocí tepelného šoku transformován do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10. K buňkám umístěným na ledu byly napipetovány 3 µl plasmidu, obsah mikrozkuřavky byl opatrně pomocí pipety promíchán. Po 30 min inkubaci na ledu byl buňkám udělen tepelný šok (42°C) po dobu 30 s. Směs byla okamžitě umístěna na led a po 5 min inkubaci bylo do mikrozkuřavky přidáno 950 µl SOC média, inkubace 1 h (37°C, 200 rpm). Obsah mikrozkuřavky byl napipetován do 5 ml LB média se spektinomycinem (100 µg.ml⁻¹), inkubace do dalšího dne (37°C, 200 rpm). Z 5 ml transformované bakteriální kultury *E. coli* byl alkalickou lyzí podle 3.2.5.6 izolován plasmid, který byl poté podroben restrikční analýze enzymy *AscI* a *SpeI* podle 3.2.6.4.

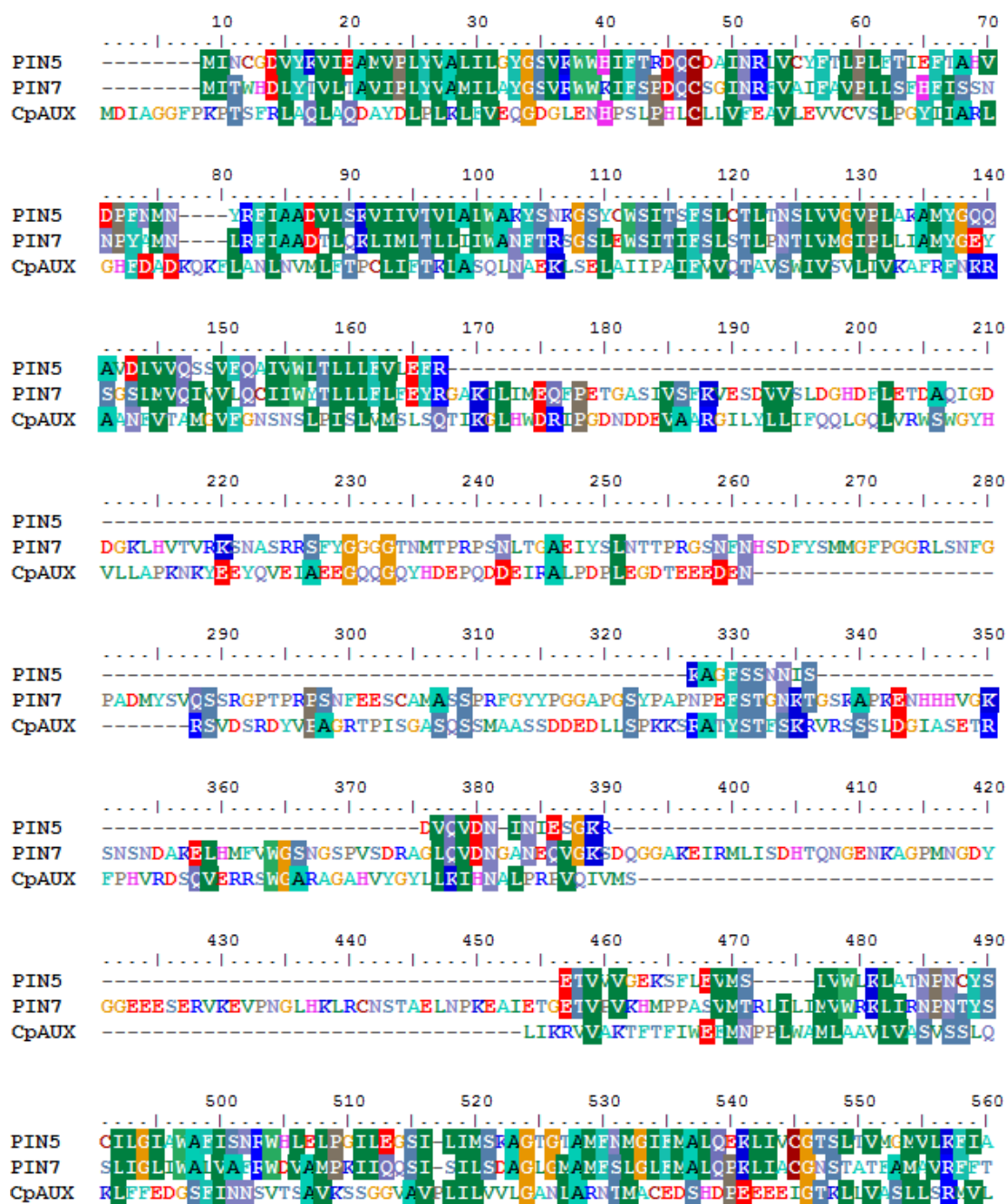
3.2.9 Transformace *Arabidopsis thaliana* metodou „floral dip“

Na transformaci *A. thaliana* metodou „floral dip“ byly 2 ml kultury *A. tumefaciens*, obsahující plasmid *pER8* s *CpAUX*, napipetovány do 400 ml LB média s gentamicinem (25 µg.ml⁻¹), rifampicinem (50 µg.ml⁻¹) a spektinomycinem (100 µg.ml⁻¹), inkubace ve tmě 24 h (28°C, 180 rpm).

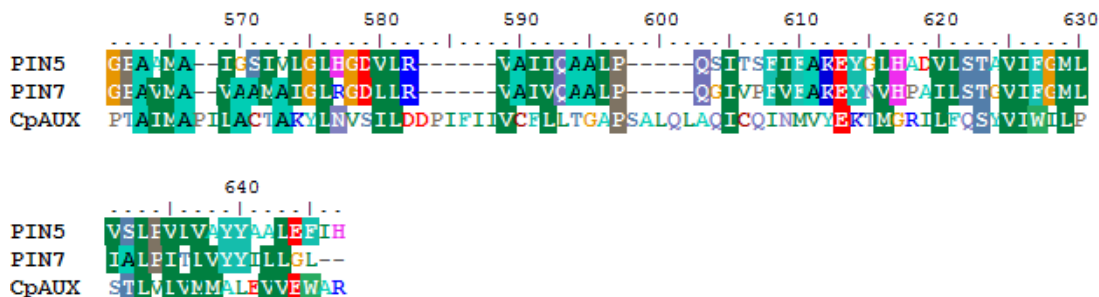
Následující den bylo 400 ml kultury *A. tumefaciens* stočeno po dobu 10 min (3600 g, RT). Pelet byl resuspendován v takovém množství infiltračního média, aby byla výsledná optická hustota při 600 nm v rozmezí 0,8 – 1,0. Do takto připravené kultury *A. tumefaciens* bylo postupně po dobu 30 s namočeno 9 rostlin *A. thaliana* Col-0 ve fázi kvetení. Jakmile rostliny oschly, byly do roztoku *A. tumefaciens* ponořeny znovu na 30 s. Takto transformované rostliny *A. thaliana* byly zakryty fólií a po dobu dalších 24 h udržovány ve tmě a ve vlhku. Po 24 h byla fólie odstraněna.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Podle dosud nepublikovaných výsledků Oddělení molekulární biologie, CRH (Galuszka, osobní komunikace) byly v myceliích z axenické kultury i ve sklerociích *C. purpurea* detekovány auxiny. V sekvenaci transkriptomu *C. purpurea* Gal404 byl identifikován potenciální auxinový přenašeč (NCBI accession number: CPUR 08219), který byl pojmenován jako *CpAUX* (Obr. 14).



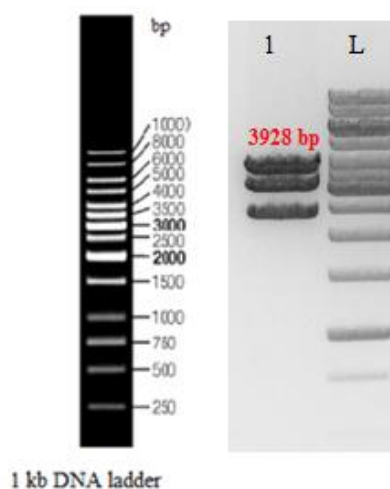
Obr. 14 Porovnání AMK sekvenace PIN 5 a PIN7 *A. thaliana* a potenciálního auxinového přenašeče *CpAUX* (1. část)



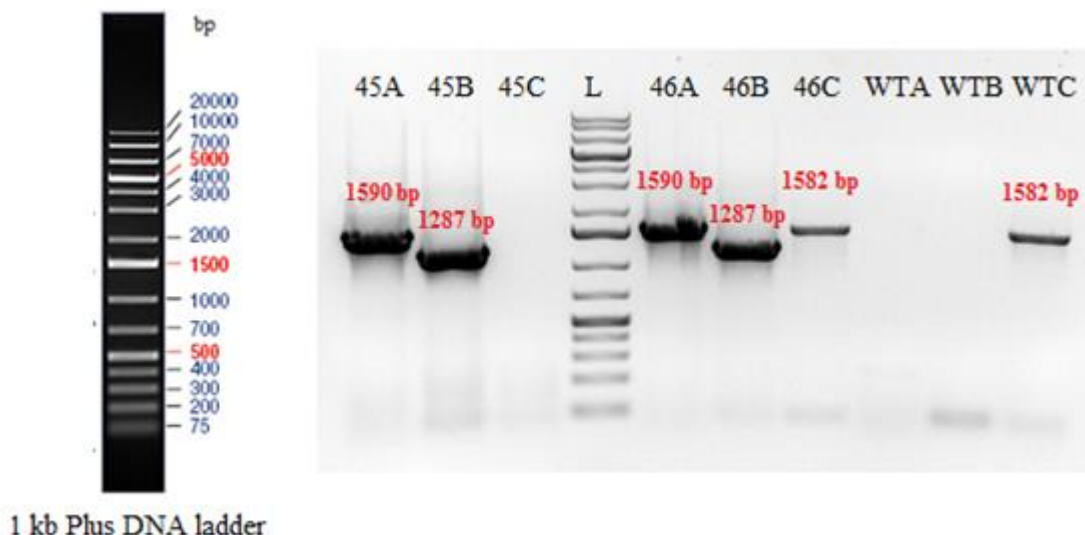
Obr. 14 Porovnání AMK sekvence PIN 5 a PIN7 *A. thaliana* a potenciálního auxinového přenašeče *CpAUX* (2. část)

4.1 Transformace *C. purpurea* 20.1

Protoplasty *C. purpurea* 20.1 (3.2.1.1) byly transformovány (3.2.1.2) lineárním konstruktem vyštěpeným z plasmidu *pRS426::ΔCpAUX* (Obr. 15). Z předpokládaných knock-out mutantů *C. purpurea* 20.1 byla izolována genomická DNA (3.2.1.3). Přes 250 primárních transformantů bylo zkontrolováno metodou diagnostické PCR na správnou integraci delečního konstruktů (3.2.1.4), PCR směsi byly analyzovány elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.1.5). V případě, kdy do PCR směsi byly přidány primery *dia_CpAUX_fw* a *Phleo Hi3F2* byla očekávaná velikost DNA amplikonu 1590 bp, pokud byly do PCR směsi přidány primery *dia_CpAUX_rev* a *Phleo Hefi3* byla očekávaná velikost DNA amplikonu 1287 bp a v případě, kdy PCR směs obsahovala *dia_CpAUX_WT_fw* a *dia_CpAUX_rev* byla očekávaná velikost DNA amplikonu 1582 bp.



Obr. 15 Elektroforetogram restrikce *pERS426::ΔCpAUX* restrikčními endonukleasami *XbaI* a *EcoRI*. 1 - *pERS426::CpAUX*, L - 1 kb DNA ladder, na transformaci byl použit band o velikosti 3928 bp



Obr. 16 Elektroforetogram vzorků z diagnostického PCR. L – 1 kb Plus DNA ladder, 45, 46 – transformanti *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpAUX*, WT – *C. purpurea* 20.1, A – primery dia_CpAUX_fw a Phleo Hi3F2, B – primery dia_CpAUX_rev a Phleo Hefi3, C – primery dia_CpAUX_WT_fw a dia_CpAUX_rev

Z elektroforetogramu PCR reakcí (Obr. 16) je patrné, že u transformanta 45 došlo k amplifikaci pouze dvou DNA amplikonů s kombinací primerů nasedajících jedním z páru primerů do rezistenční kazety na phleomycin (1590 bp a 1287 bp), což naznačilo, že by se mohlo jednat o mutant, který má knock-out na obou alelách genu *CpAUX* a postrádá WT alelu genu *CpAUX*. U ostatních získaných transformantů byly na gelu přítomny buď tři DNA amplikony (1590 bp, 1287 bp a 1582 bp) nebo pouze amplikon odpovídající WT (1582 bp). V těchto případech byla homologní rekombinací deletována jen jedna alela genu *CpAUX* nebo došlo ke vložení rezistenční kazety náhodně do genomu *C. purpurea*.

Mycelia *C. purpurea* rostou jako heterokaryonti – buňky obsahují dvě haploidní jádra. Pokud by nebyl potvrzen mutant s delecí v obou alelách již u primárních transformantů, bylo by možné použít mutanty s delecí v jedné alele a metodou monosporické izolace získat homokaryotického mutantu (Schürmann *et al.*, 2013).

4.2 Southern blot

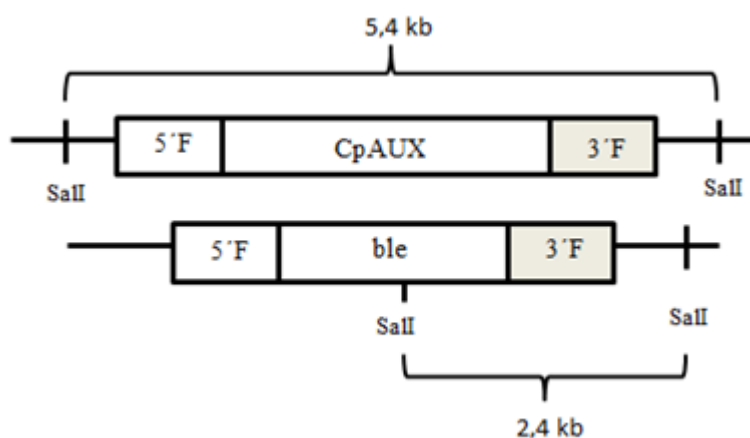
Pro další ověření získaných mutantů $\Delta CpAUX$ *C. purpurea* 20.1 byl proveden Southern blot ve dvou opakováních. Nejdříve byla připravena RNA próba. DNA templát, kterým byl *pDRIVE* plasmid obsahující 3' okrajovou sekvenci genu *CpAUX* *C. purpurea* 20.1, byl naštěpen restriční endonukleasou *HindIII* (3.2.2.1), restriční směs byla přečištěna

(3.2.2.2). Z naštěpené DNA byla *in vitro* transkripcí vytvořena RNA próba značená digoxigeninem (3.2.2.3). RNA transkript byl analyzován elektroforézou ve formaldehydovém gelu (3.2.2.4). Úspěšnost transkripce byla potvrzena přítomností bandu v gelu (Obr. 17) a vytvořená RNA próba byla použita k detekci fragmentů gDNA na membráně.

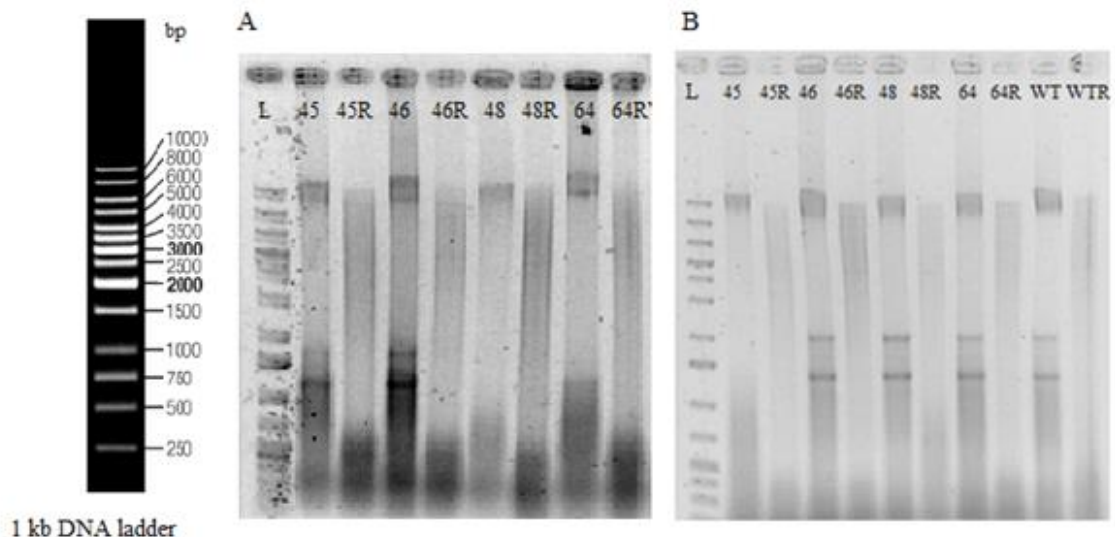
Na Southern blot byly použity gDNA izolované ze čtyř předpokládaných mutantů Δ *CpAUX* *C. purpurea* 20.1 (vzorky 45, 46, 48, 64) a z WT *C. purpurea* 20.1, které byly naštěpeny restriční endonukleasou *SalI*. Enzym byl vybrán na základě znalosti sekvence gDNA v okolí genu *CpAUX* a sekvence rezistenční kazety tak, aby bylo možné jednoduše zkontrolovat přítomnost WT a deletované alely *CpAUX* na základě rozdílných velikostí štěpených fragmentů (Obr. 18). Southern blot byl proveden dvakrát pro ověření, zda byla gDNA dostatečně naštěpena a zda se výsledky shodují. Naštěpená DNA byla zakoncentrována ethanolovou precipitací.



Obr. 17 Elektroforetogram vizualizované RNA próby v 1% formaldehydovém gelu. Šipka ukazuje na připravenou RNA próbu.



Obr. 18 Schéma restrikce gDNA restričním enzymem *SalI* pro Southern blot u WT *C. purpurea* 20.1 a mutantu s delecí genu. 5'F a 3'F - okrajové sekvence genu *CpAUX*, ble – rezistenční kazeta na phleomycin

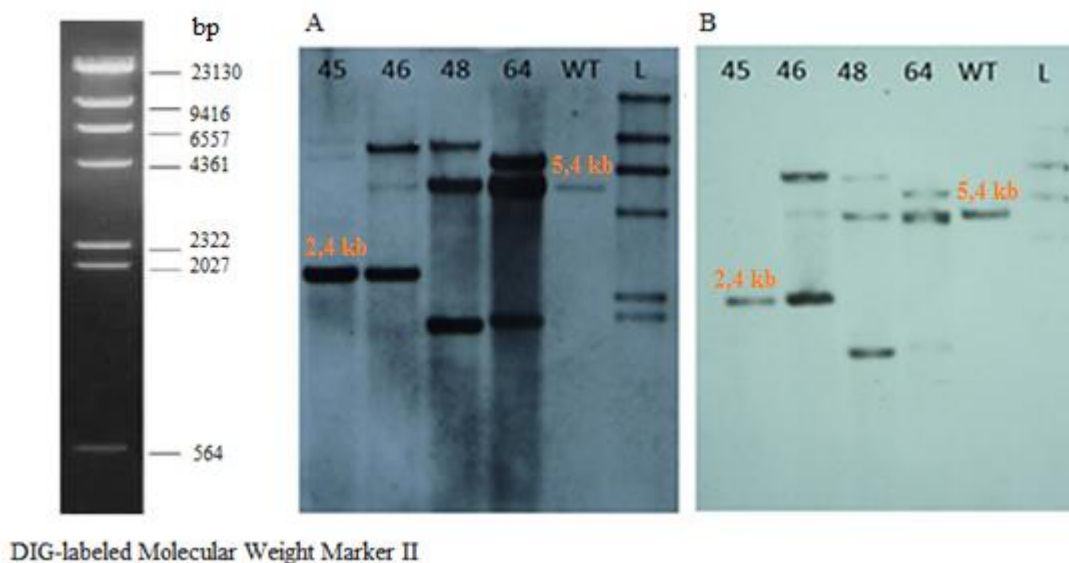


Obr. 19 Elektroforetogram vzorků před a po restrikci enzymem *SalI*. Na restrikci bylo použito 10 μg (A) a 7 μg (B) gDNA. L – 1 kb DNA ladder, 45, 46, 48, 64 – gDNA z předpokládaných knock-out mutantů ΔCpAUX *C. purpurea* 20.1 před restrikcí, WT – gDNA z WT *C. purpurea* 20.1 před restrikcí, 45R, 46R, 48R, 64R - gDNA z předpokládaných knock-out mutantů ΔCpAUX *C. purpurea* 20.1 po restrikci, WTR – gDNA z WT *C. purpurea* 20.1 po restrikci

V případě prvního Southern blotu bylo na restrikci použito 10 μg gDNA, v případě druhého Southern blotu bylo naštěpeno 7 μg gDNA *C. purpurea* 20.1. V obou případech bylo použito stejné množství enzymu *SalI*. Se vzorky gDNA před a po restrikci byly provedeny kontrolní elektroforézy v agarosovém gelu (3.2.3.1). DNA byla lépe naštěpena v případě, kdy bylo na restrikci použito méně gDNA (Obr. 19).

Naštěpené a zakoncentrované vzorky gDNA byly separovány elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.3.2), byl proveden kapilární přenos gDNA z gelu na pozitivně nabitou nylonovou membránu (3.2.3.3). Po prehybridizaci a hybridizaci (3.2.3.4) byly hybridizované fragmenty DNA detekovány pomocí protilátky Anti-digoxigenin-AP a chemiluminiscenčního substrátu CDP Star (3.2.3.5).

Na Southern blotu, u kterého bylo na restrikci enzymem *SalI* použito 10 μg gDNA (Obr 20A) i na Southern blotu, na který bylo při restrikci použito 7 μg gDNA *C. purpurea* 20.1 (Obr. 20B) lze pozorovat u vzorků 46, 48 a 64 více než dva bandy lišící se od očekávaných velikostí. Jedná se o ektopické inserce rezistenční kazety, vložené náhodně do genomu. Tyto vzorky nelze použít pro monosporickou izolaci, neboť může dojít k inserci kazety do jiného genu, čímž může být ovlivněn fenotyp získaného mutantu.



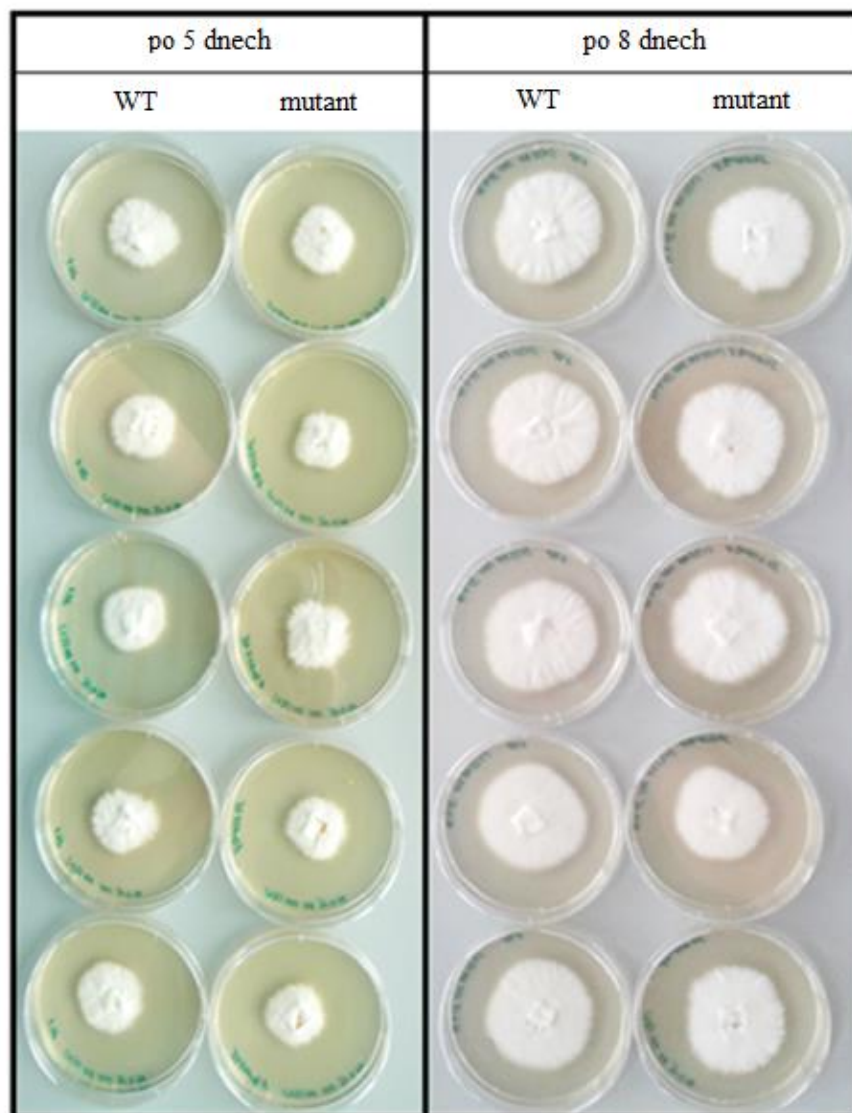
Obr. 20 Southern blot - 10 μ g (A) a 7 μ g (B) gDNA. L – DIG-labeled Molecular Weight Marker II, 45, 46, 48, 64 – gDNA z předpokládaných knock-out mutantů Δ CpAUX *C. purpurea* 20.1, WT – gDNA z wild typu *C. purpurea* 20.1.

V případě WT *C. purpurea* 20.1 je na obou Southern blotech přítomen pouze jeden band o předpokládané velikosti 5,4 kb. Tento band je také přítomen u vzorků 46, 48 a 64, avšak není přítomen u vzorku 45. Vzorky 45 a 46 mají band o velikosti 2,4 kb odpovídající deletované alele genu *CpAUX*, avšak pouze vzorek 45 nemá bandy pro WT alelu nebo pro ektopickou inzerci. V případě mutantu Δ CpAUX 45 se tak podařilo připravit mutantu v obou jádrech protoplastu a získat homokaryotickou delecí již u primárního transformanta. Tyto výsledky se shodují s předpoklady z diagnostické PCR.

4.3 Fenotyp mutantu Δ CpAUX 45

Mutant Δ CpAUX 45 byl testován, zda má odlišné růstové vlastnosti a morfologii hyf oproti WT *C. purpurea* 20.1, z čehož by se dalo usoudit na důležitost deletovaného genu *CpAUX*. Nicméně, mutant Δ CpAUX 45 nebyl v rychlosti růstu nijak narušen (Obr. 21). Četnost větvení a přítomnost sept nebyla oproti WT nijak změněna.

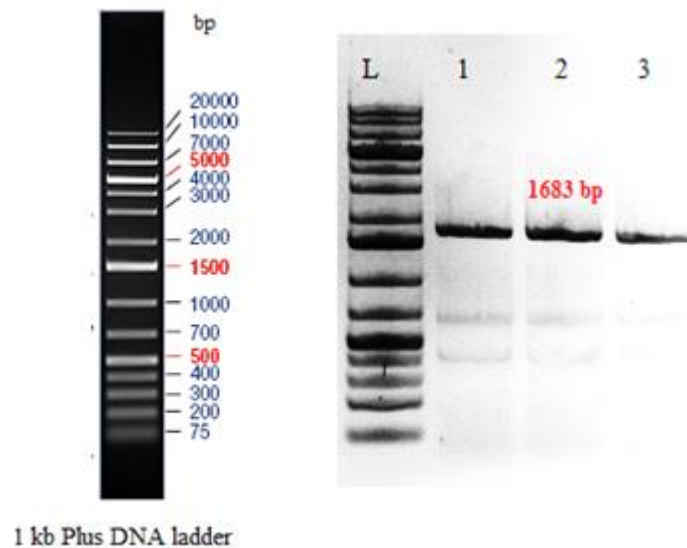
Mycelia Δ CpAUX 45 a WT *C. purpurea* společně s médiem, ve kterém byly kultivovány, byla odevzdána na změření obsahu auxinů, měření nebylo v době psaní této práce dokončeno. Mutant Δ CpAUX 45 bude infikován na žito a bude zkontrolován průběh a rychlost infekce ve srovnání s WT *C. purpurea* 20.1.



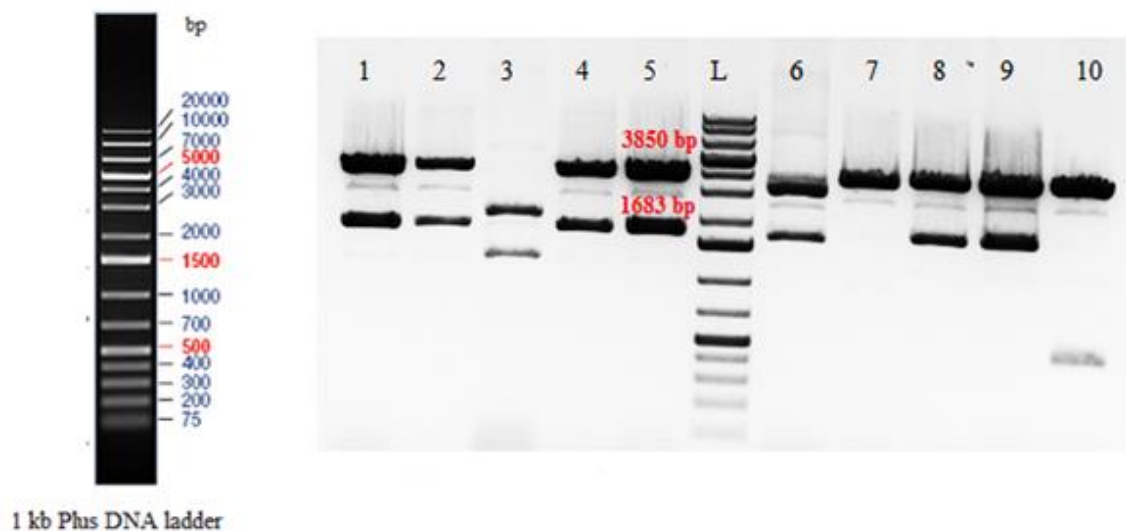
Obr. 21 WT a mutant ΔC_{pAUX} 45 *C. purpurea* 20.1 na BII kultivačním médiu (pH = 5,2)

4.4 Ligace *CpAUX* do *pER8* plasmidu

Z mycelia *C. purpurea* 20.1 byla izolována RNA (3.2.4.1), která byla reverzní transkripčí přepsána na cDNA (3.2.4.2). Metodou PCR byl cDNA transkript genu *CpAUX* amplifikován, PCR směs byla analyzována elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.5.1). DNA amplicon odpovídající velikosti genu *CpAUX* (1683 bp) byl z agarosového gelu (Obr. 22) vyřezán a izolován (3.2.5.2). Získaný DNA insert byl ligován (3.2.5.3) do *pDRIVE* plasmidu (3850 bp).

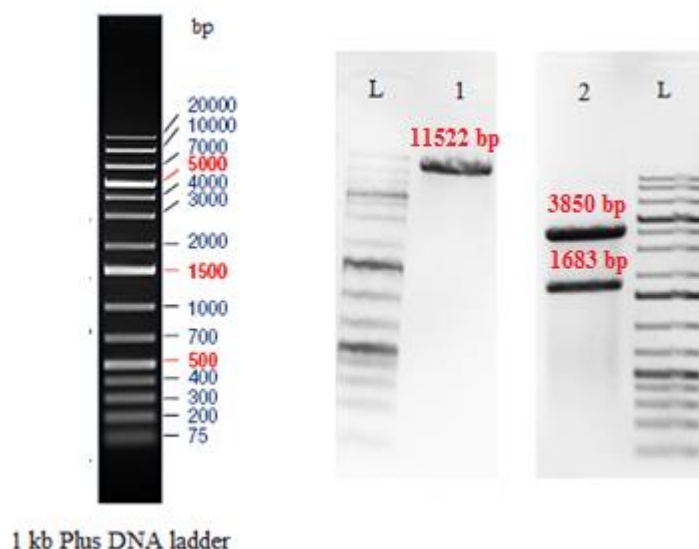


Obr. 22 Elektroforetogram cDNA transkriptu genu *CpAUX*. L – 1 kb Plus DNA ladder, 1,2,3 – amplikony genu *CpAUX*.



Obr. 23 Elektroforetogram plasmidů po restrikci enzymem *EcoRI*. L – 1 kb Plus DNA ladder, 1-10 – plasmidy naštěpené restrikční endonukleasou *EcoRI*.

Plasmid s insertem byl transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 (3.2.5.4), selekce buněk probíhala na LB agaru s kanamycinem. Pozitivní kolonie byly kultivovány v tekutém LB médiu s kanamycinem (3.2.5.5). Z bakteriálních kultur *E. coli* byly alkalickou lyzí izolovány plasmidy (3.2.5.6), které byly následně podrobeny restrikční analýze (3.2.5.7) enzymem *EcoRI* (Obr. 23).



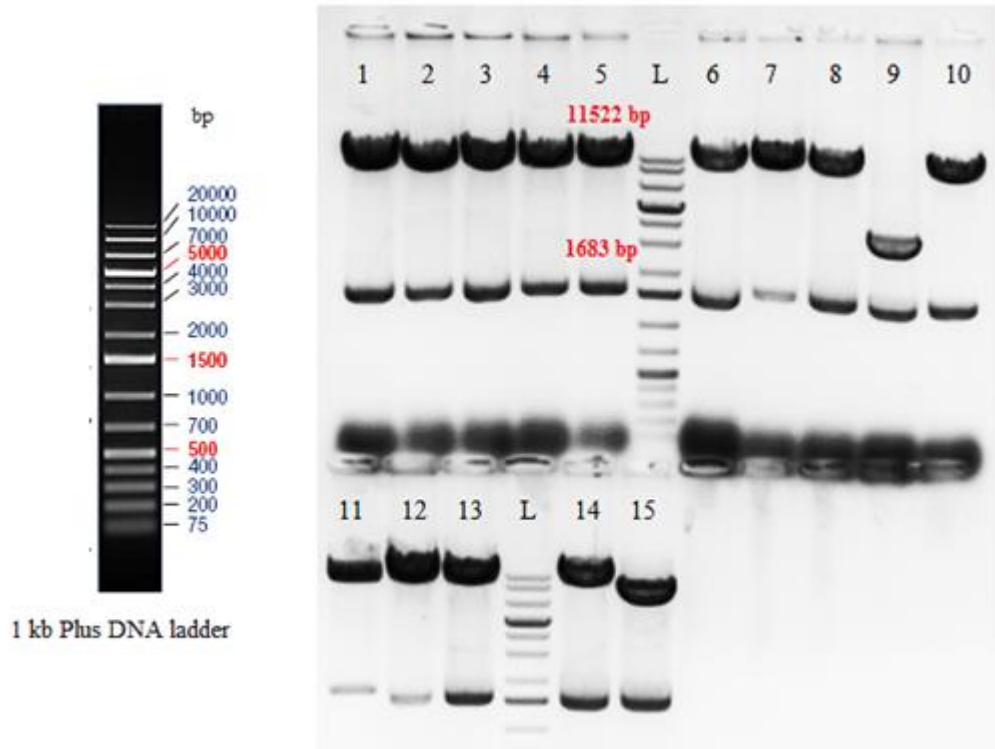
Obr. 24 Elektroforetogram plasmidů po restrikci enzymy *AscI* a *SpeI*. L – 1 kb Plus DNA ladder, 1 - *pER8* plasmid, 2 – *pDRIVE* plasmid s insertem *CpAUX*

Pozitivní kolonie byly namnoženy v tekutém LB médiu s kanamycinem a poté z nich byly pomocí kitu izolovány plasmidy. Přítomnost insertu *CpAUX* v *pDRIVE* plasmidu byla ověřena sekvenací (3.2.5.8).

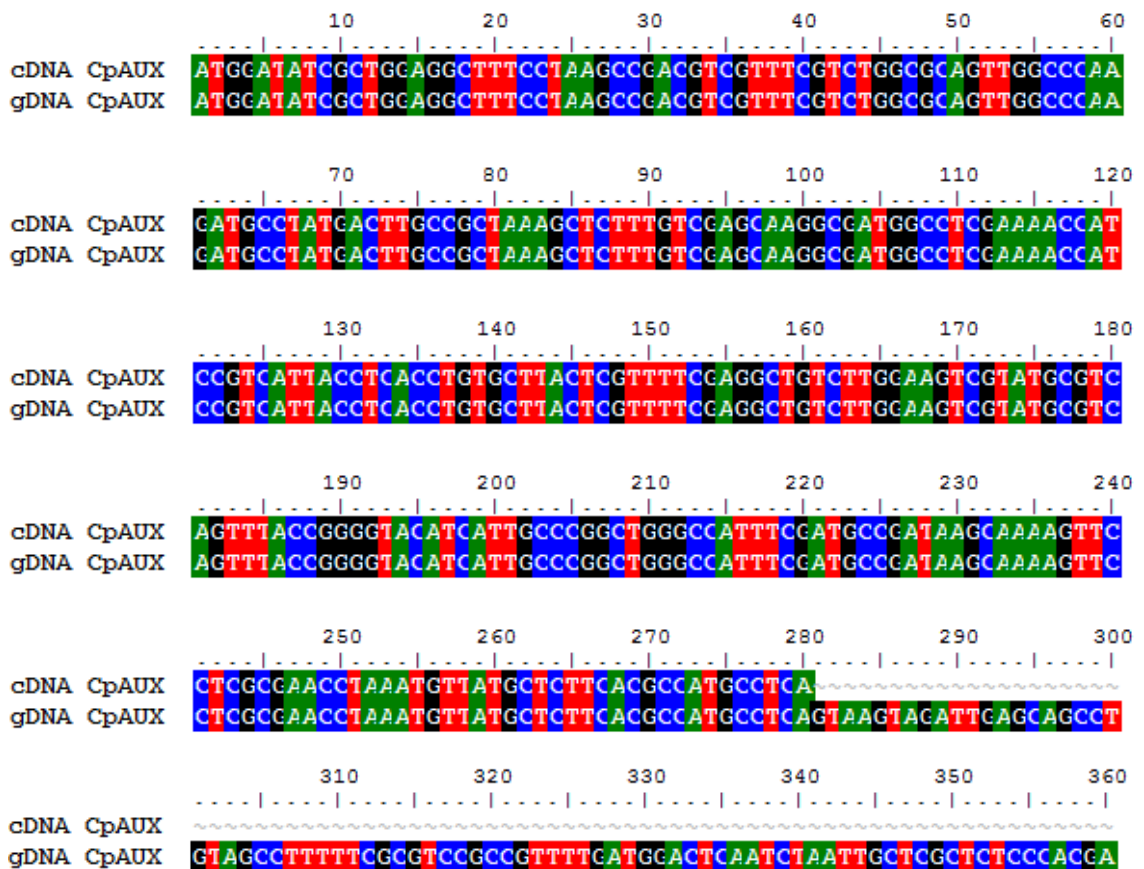
Plasmidy *pER8* (11522 bp) a *pDRIVE* s *CpAUX* byly naštěpeny restričními endonukleasami *AscI* a *SpeI* (3.2.6.1). Restriční směsi byly analyzovány elektroforézou v agarosovém gelu (Obr. 24).

Fragment odpovídající velikosti genu *CpAUX* (1683 bp) byl z agarosového gelu vyřezán a izolován. Plasmid *pER8* byl izolován přímo z restriční směsi, která byla ošetřena alkalickou fosfatasou (3.2.6.2). *CpAUX* byl ligován do *pER8* plasmidu (3.2.6.3). Plasmid *pER8* s *CpAUX* byl transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10, selekce buněk probíhala na LB agaru se spektinomycinem. Narostlé kolonie byly přeneseny do tekutého LB média se spektinomycinem. Z bakteriálních kultur byly alkalickou lyzí izolovány plasmidy, které byly podrobeny restriční analýze enzymy *AscI* a *SpeI* (Obr. 25).

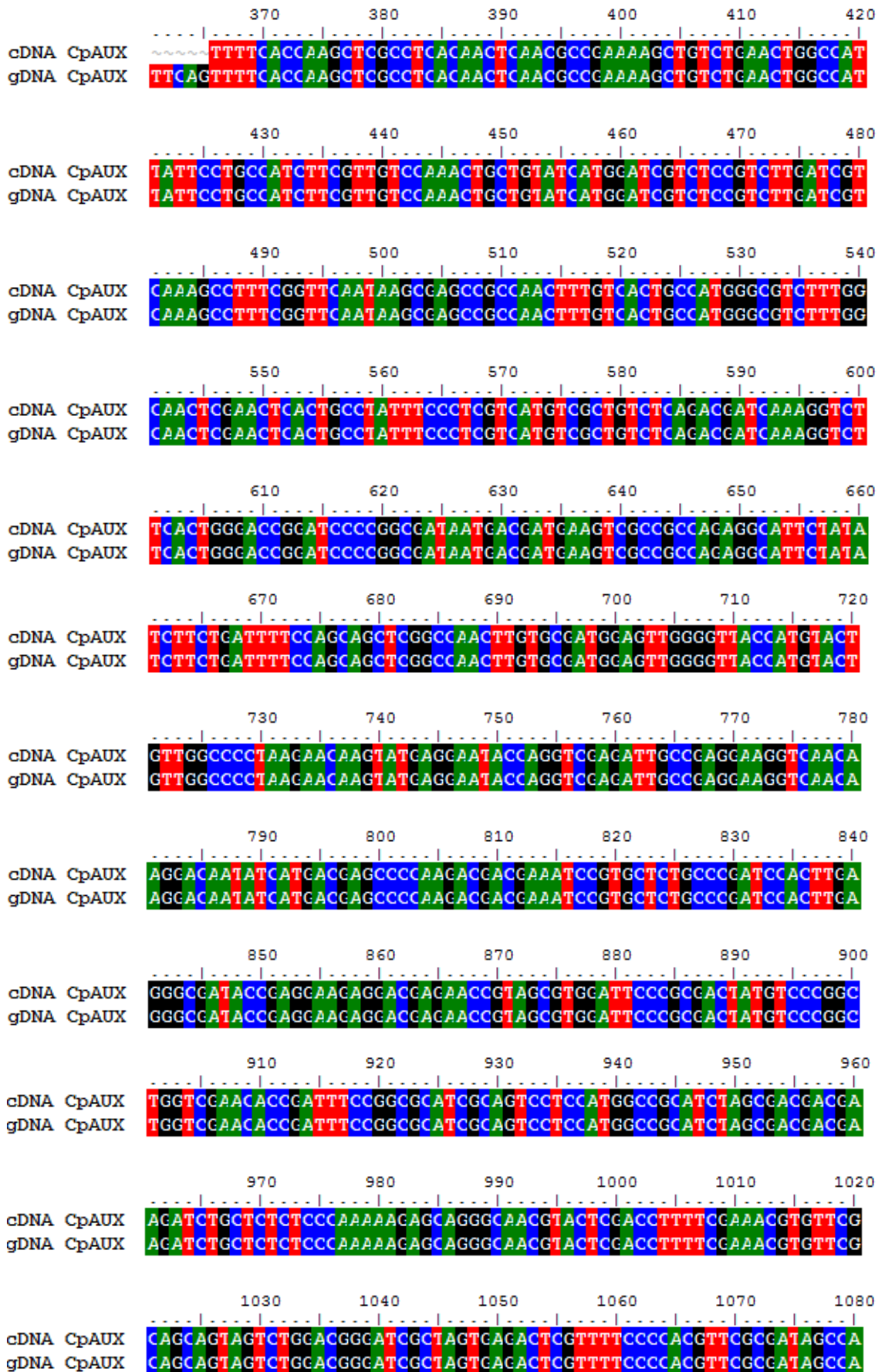
Pozitivní kolonie byly namnoženy v tekutém LB médiu se spektinomycinem a poté byly z těchto bakteriálních kultur pomocí kitu izolovány plasmidy. Orientace a správnost sekvence genu *CpAUX* v *pER8* plasmidu byla ověřena sekvenací (3.2.6.4) (Obr. 26).



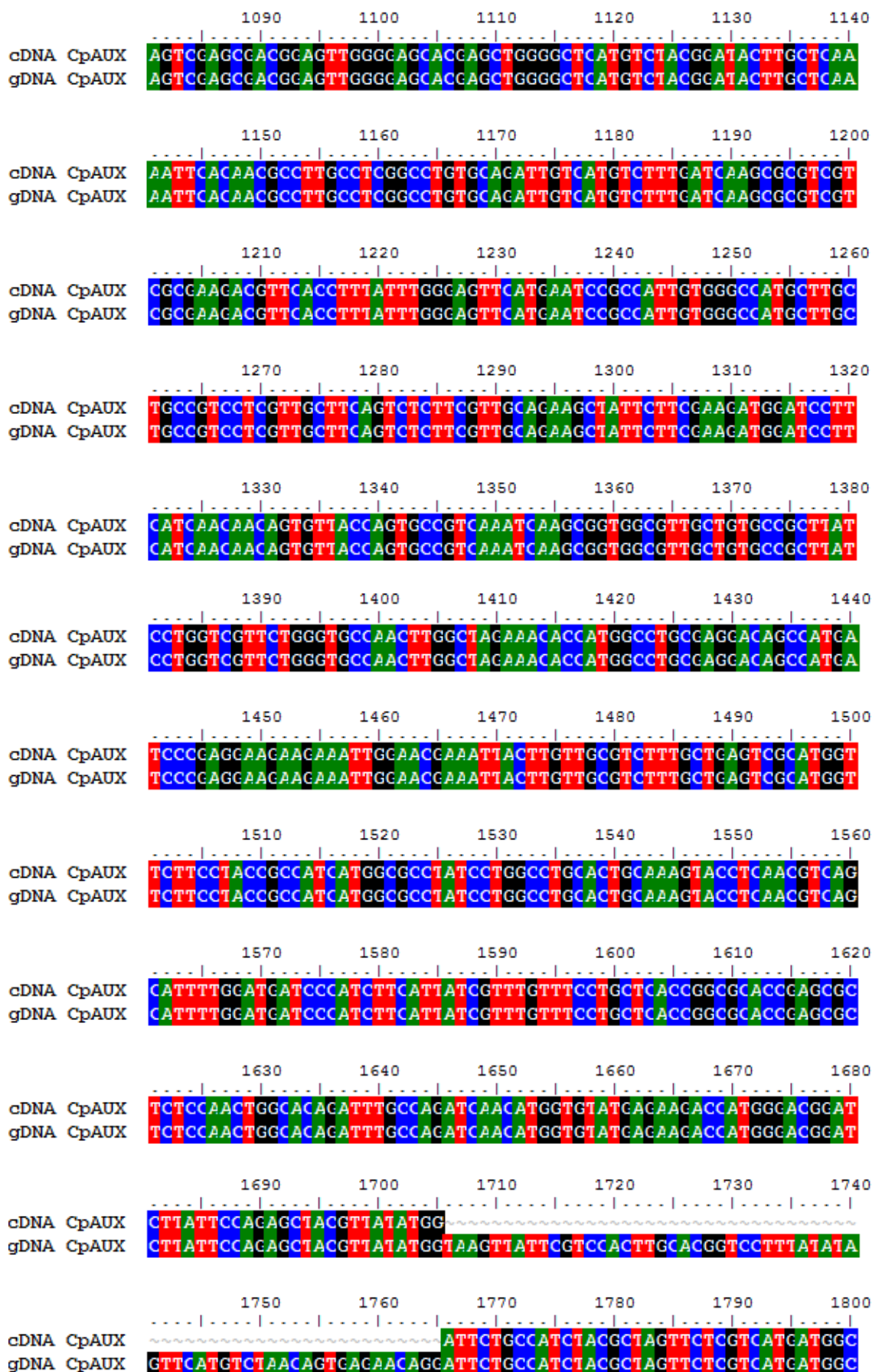
Obr. 25 Elektroforetogram plasmidů po restriktci enzymy *AscI* a *SpeI*. 1-15 – plasmidy naštěpené restrikčními endonukleasami *AscI* a *SpeI*, L – 1 kb Plus DNA ladder



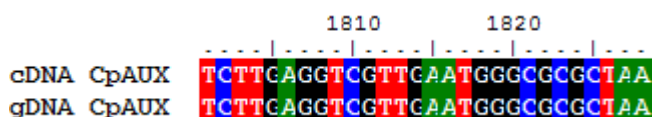
Obr. 26 Porovnání nukleotidové sekvence cDNA a gDNA *CpAUX C. purpurea* 20.1 (1. část)



Obr. 26 Porovnání nukleotidové sekvence cDNA a gDNA *CpAUX* *C. purpurea* 20.1 (2. část)



Obr. 26 Porovnání nukleotidové sekvence cDNA a gDNA CpAUX *C. purpurea* 20.1 (3. část)



Obr. 26 Porovnání nukleotidové sekvence cDNA a gDNA *CpAUX C. purpurea* 20.1 (4. část)

4.5 Transformace *A. tumefaciens*

Plasmid *pER8* s *CpAUX* byl elektroporací transformován do buněk *A. tumefaciens* GV 3101, selekce buněk probíhala na médiu s rifampicinem, gentamycinem a spektinomycinem (3.2.7). Úspěšnost transformace byla ověřena izolací plasmidu z narostlých kolonií *A. tumefaciens* a jeho vložením do chemicky kompetentních *E. coli* TOP10, selekce buněk probíhala v médiu se spektinomycinem. Z bakteriální kultury *E. coli* byl izolován plasmid, který byl následně podroben restriční analýze enzymy *AscI* a *SpeI* (3.2.8). Vzhledem k přítomnosti dvou bandů v gelu odpovídajících velikostí genu *CpAUX* a *pER8* plasmidu, byla transformace *A. tumefaciens* úspěšná.

4.6 Transformace *A. thaliana* metodou „floral dip“

Pro ověření funkce genu *CpAUX* byly provedeny transformace *A. thaliana* Col-0 metodou „floral dip“ (Clough a Bent, 1998). Na transformaci *A. thaliana* byl připraven *pER8* plasmid, který využívá XVE systém indukovaný pomocí estradiolu (Zuo *et al.*, 2000), do kterého byl vložen gen *CpAUX*.

A. tumefaciens obsahující *pER8* s *CpAUX* bylo namnoženo ve větším objemu LB média a použito na transformaci *A. thaliana* Col-0 (3.2.9).

Z časových důvodů bude T0 generace vyhodnocena v budoucnosti, kdy budou sterilní semena transformovaných *A. thaliana* vyseta na selekční misky s hygromycinem. Transformanti budou potvrzeni metodou PCR na gen rezistence na hygromycin. Transformované rostliny budou zafixovány do homozygotního stavu během několika generací a poté u nich bude pomocí estradiolu (Zuo *et al.*, 2000) indukována exprese genu *CpAUX*. Pokud je tento gen auxinovým přenašečem, mělo by dojít ke změně fenotypu transformované rostliny. Očekává se, že semena transformovaných rostlin budou vykazovat redukovaný růst kořene i hypokotylu (Mravec *et al.*, 2009).

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla vypracována literární rešerše na téma biologie *Claviceps purpurea* a na téma rostlinných hormonů auxinů se zaměřením na auxiny u houbových organismů.

V experimentální části byly provedeny transformace houby *C. purpurea* 20.1 lineárním konstruktem vyštěpeným z plasmidu pRS426::*CpAUX*, který obsahoval 3' a 5' okrajové sekvence genu předpokládaného auxinového transportéru *CpAUX* a kazetu s rezistencí na phleomycin. Primární mutanti rostoucí na selekčním médiu byli testováni diagnostickou PCR na správnou integraci konstruktu homologní rekombinací. Vybraní mutanti byli dále ověřeni pomocí Southern blotu. Southern blot potvrdil homokaryotickou delecí genu *CpAUX* u mutanta s označením $\Delta CpAUX$ 45. Tento deleční mutant však neprojevoval žádnou viditelnou změnu ve svém fenotypu. Pro ověření funkce genu *CpAUX* byla cDNA sekvence tohoto genu ligována do *pER8* plasmidu s promotorem inducibilním pomocí estradiolu. S takto připraveným plasmidem byly provedeny transformace buněk *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101. Ověřená transformovaná kultura *A. tumefaciens* byla použita k transformaci *Arabidopsis thaliana* Col-0 metodou „floral dip“. Z časových důvodů budou výsledky této transformace vyhodnoceny v budoucnosti.

6 LITERATURA

- Abas L., Benjamins R., Malenica N., Paciorek T., Wiśniewska J., Moulinier-Anzola J. C., Sieberer T., Friml J., Luschnig C. (2006): Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology*, **8**, 249-256.
- Bandurski R. S., Desrosiers M. F., Jensen P., Pawlak M., Schulze A. (1992): Genetics, chemistry and biochemical physiology in the study of hormonal homeostasis. *Progress in Plant Growth Regulation*, **13**, 1-12.
- 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.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003): Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115**, 591-602.
- Bové F. J. (1970): *The story of ergot*. S. Karger, New York, USA, 297 stran.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P. J., Bennett M. (2001): Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell*, **13**, 843-852.
- Clough S. J. a Bent A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Comai L. a Kosuge T. (1982): Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, **149**, 40-46.
- Contreras-Cornejo H.A., Marcías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J. (2009): *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **149**, 1579-1592.
- Darwin C. (1880) *The power of movement in plants*. Murray, London, UK, 286 stran.
- Di Fiore S., Li Q., Leech M. J., Schuster F., Emans N., Fischer R., Schillberg S. (2002): Targeting tryptophan decarboxylase to selected subcellular compartments of tobacco plants affects enzyme stability and *in vivo* function and leads to a lesion-mimic phenotype. *Plant Physiology*, **129**, 1160-1169.
- Ding Z., Wang B., Moreno I., Dupláková N., Simon S., Carraro N., Reemmer J., Pěňčík A., Chen X., Tejos R., Skůpa P., Pollmann S., Mravec J., Petrášek J., Zažímalová E., Honys D., Rolčík J., Murphy A., Orellana A., Geisler M., Friml J. (2012): ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, **3**: 941.
<http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n7/abs/ncomms1941.html>.
- Dolk H. E. a Thimann K. V. (1932): Studies on the growth hormone of plants: I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **18**, 30-46.
- Domingo C., Andrés F., Tharreau D., Iglesias D. J., Talón M. (2009): Constitutive expression of *OsGH3.1* reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 201-210.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002a): Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415**, 806-809.
- Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jürgens G., Palme K. (2002b): AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, **108**, 661-673.
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003): Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, **426**, 147-153.
- Fuentes-Ramirez L. E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I. R., Caballero-Mellado J. (1993): *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, **154**, 145-150.

- Furukawa T., Koga J., Adachi T., Kishi K., Syöno K. (1996): Efficient conversion of L-tryptophan to indole-3-acetic acid and/or tryptophol by some species of *Rhizoctonia*. *Plant Cell Physiology*, **37**, 899-905.
- Gazaryan I. G., Lagrimini L. M., Ashby G. A., Thorneley R. N. F. (1996): Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal*, **313**, 841-847.
- Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998): Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**, 2226-2230.
- Haagen-Smith A. J., Dandliker W. B., Wittwer S. H., Murneek A. E. (1946): Isolation of 3-indoleacetic acid from immature corn kernels. *American Journal of Botany*, **33**, 118-120.
- Haarmann T., Rolke Y., Geisbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular Plant Pathology*, **10**, 563-577.
- Hilbert M., Voll L. M., Ding Y., Hofmann J., Sharma M., Zuccaro A. (2012): Indole derivate production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytologist*, **196**, 520-534.
- 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.
- Chang F. R., Hayashi K., Chua N. H., Kamio S., Huang Z. Y., Nozaki H., Wu Y. C. (2005): The transgenic *Arabidopsis* plant system, *pER8-GFP*, as a powerful tool in searching for natural product estrogen-agonists/antagonists. *Journal of Natural Products*, **68**, 971-973.
- Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H., Hieter P. (1992): Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, **110**, 119-122.
- Chung K. R., Shilts T., Ertürk Ü., Timmer L. W., Ueng P. P. (2003): Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters*, **226**, 23-30.
- Chung K. R. a Tzeng D. D. (2004): Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. *Journal of Biological Sciences*, **4**, 744-750.
- Jacobs W. P., Falkenstein K., Hamilton R. H. (1985): Nature and amount of auxin in algae IAA from extracts of *Caulerpa paspaloides* (Siphonales). *Plant Physiology*, **78**, 844-848.
- Jirásek V. a Starý F. (1989): *Atlas léčivých rostlin*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, Česká republika, 112 stran.
- Körber H., Strizhov N., Staiger D., Feldwisch J., Olsson O., Sandberg G., Palme K., Schell J., Koncz C. (1991): T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *The EMBO Journal*, **10**, 3983-3991.
- Křeček P., Skůpa P., Libus J., Tejos R., Friml J., Zažímalová E. (2009): The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, **10**: 249.
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/gb-2009-10-12-249.pdf>
- 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.
- Li W., Yuan R., Burns J. K., Timmer L. W., Chung K. R. (2003): Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128**, 578-583.
- Ljung K., Bhalerao R. P., Sandberg G. (2001): Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, **28**, 465-474.
- 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.
- Moskowitz M. A. (1992): Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends in Pharmacological Sciences*, **13**, 307-311.

- Mravec J., Skůpa P., Bailly A., Hoyerová K., Křeček P., Bielach A., Petrášek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y. D., Dobrev P. I., Schwarzerová K., Rolčik J., Seifertová D., Luschnig C., Benková E., Zažímalová E., Geisler M., Friml J. (2009): Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**, 1136-1140.
- Nemoto K., Hara M., Suzuki M., Seki H., Muranaka T., Mano Y. (2009): The NtAMII1 gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of indole-3-acetamide. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, **583**, 487-492.
- Niemi K., Vuorinen T., Ernstsén A. (2002): Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings *in vitro*. *Tree Physiology*, **22**, 1231-1239.
- Noh B., Murphy A. S., Spalding E. P. (2001): *Multidrug resistance*-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell*, **13**, 2441-2454.
- Ouyang J., Shao X., Li J. (2000): Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **24**, 327-334.
- Péret B., Swarup K., Ferguson A., Seth M., Yang Y., Dhondt S., James N., Casimiro I., Perry P., Syed A., Yang H., Reemmer J., Venison E., Howells C., Perez-Amador M. A., Yun J., Alonso J., Beemster G. T. S., Laplaze L., Murphy A., Bennett M. J., Nielsen E., Swarup R. (2012): *AUX/LAX* genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, **24**, 2874-2885.
- 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.
- Prusty R., Grisafi P., Fink G. R. (2004): The plant hormone indolacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**, 4153-4157.
- 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.
- Rashotte A. M., Brady S. R., Reed R. C., Ante S. J., Muday G. K. (2000): Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **122**, 481-490.
- Raven J. A. (1975): Transport of indoleacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist*, **74**, 163-172.
- Reineke G., Heinze B., Schirawski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C. W. (2008): Indole-3-acetic (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 P., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. (2003): Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, **426**, 255-260.
- Rubery P. H. a Sheldrake A. R. (1974): Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, **118**, 101-121.
- 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.
- Schramm P., Rausch T., Hilgenberg W. (1987): Indole-3-ethanol oxidase in *Phycomyces blakesleeanus*. Is indole-3-ethanol a "storage pool" for IAA? *Physiologia Plantarum*, **69**, 99-104.
- Schürmann J., buttermann D., Herrmann A., Geiesbert S., Tudzynski P. (2013): Molecular characterization of the NADPH oxidase complex in the ergot fungus *Claviceps purpurea*: *CpNOX2* and *CpPls1* are important for a balanced host-pathogen interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 1151-1164.

- Southern E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**, 503-508.
- Sprunck S., Jacobsen H. J., Reinard T. (1995): Indole-3-lactic acid is a weak auxin analogue but not an anti-auxin. *Journal of Plant Growth Regulation*, **14**, 191-197.
- 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*, **106**, 5430-5435.
- Szerszen J. B., Szczyglowski K., Bandurski R. S. (1994): *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science*, **265**, 1699-1701.
- Štěpánová A. N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L. M., Xie D. Y., Doležal K., Schlereth A., Jürgens G., Alonso J. M. (2008): *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, **133**, 177-191.
- Taber W. A. (1985): Biology of *Claviceps*. In: *Biotechnology Series*. Vol. 6, *Biology of Industrial Microorganisms* (Demain A. L. a Nadine A. S., eds.), The Benjamin Cummings Publishing Co., New York, 449-486.
- Taiz a Zeiger (2010): *Plant physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts, USA, 782 stran.
- Tanaka E., Koga H., Mori M., Mori 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., Pojer F., Hong F., Long J. A., Li L., Moreno J. E., Bowman M. E., Ivans L. J., Cheng Y., Lim J., Zhao Y., Ballaré C. L., Sandberg G., Noel J. P., Chory J. (2008): Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164-176.
- Terrile M. C., Olivieri F. P., Bottini R., Casalougué C. A. (2006): Indole-3-acetic acid attenuates the fungal lesions in infected potato tubers. *Physiologia Plantarum*, **127**, 205-211.
- Thorner M. O., McNeilly A. S., Hagan C., Besser G. M. (1974): Long-term treatment of galactorrhoea and hypogonadism with bromocriptine. *British Medical Journal*, **2**, 419-422.
- Tivendale N. D., Ross J. J., Cohen J. D. (2014): The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, **19**, 44-51.
- Tudzynski P. a Scheffer J. (2004): *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology*, **5**, 377-388.
- Tulasne LR. (1853): Mémoire sur l'ergot des glumacées. *Annales des Sciences Naturelles Botanique*, **3**, 5-56.
- 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.
- Venis M. A. (1972): Auxin-induced conjugation systems in peas. *Plant Physiology*, **49**, 24-27.
- Vernoux T., Kronenberger J., Grandjean O., Laufs P., Traas J. (2000): *PIN-FORMED 1* regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development*, **127**, 5157-5165.
- Went F. W. (1926) On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, **30**, 10-19.
- 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 of Sciences of the United States of America*, **108**, 18518-18523.
- Yamada T., Palm C. J., Brooks B., Kosuge T. (1985): Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indolic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**, 6522-6526.
- Zdunek-Zastocka E. (2008): Molecular cloning, characterization and expression analysis of three aldehyde oxidase genes from *Pisum sativum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 19-28.

- Zhao Y., Christensen S. K., Fankhauser C., Cashman J. R., Cohen J. D., Weigel D., Chory J. (2001): A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, **291**, 306-309.
- Zuo J., Niu Q. W., Chua N. H. (2000): An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*, **24**, 265-273.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

4-Cl-IAA	4-chlor-indolyl-3-octová kyselina
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
bp	pár basí
BAP	benzo(a)pyren
cDNA	komplementární DNA
CDP Star	2-chloro-5-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5-chlorotricyklo[3.3.1.1 ^{3,7}]dekan]-4-yl]-1-fenylfosfát sodný
CYP79B2/3	cytochrom P450 79B2/3
DEPC	diethylpyrokarbonát
Dicamba	3,6-dichlor-2-metoxybenzoová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
gDNA	genomová DNA
GUS	β-glukuronidasa
IAA	indolyl-3-octová kyselina
IAAid	indolyl-3-acetaldehyd
IAM	indolyl-3-acetamid
IAN	indolyl-3-acetonitril
IAOx	indolyl-3-acetaldoxim
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
ILA	indolyl-3-mléčná kyselina
IPA	indolyl-3-pyruvátová kyselina
IPDC	indolyl-3-pyruvát dekarboxylasa
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
MOPS	3-morfolinpropansulfonová kyselina
NAA	naftyloctová kyselina
NHT	<i>N</i> -hydroxytryptamin
PAA	fenyloctová kyselina
PEG	polyethylenglykol
SDS	dodecylsírán sodný
TAM	tryptamin
TDC	tryptofan dekarboxylasa
TOL	tryptofol
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
v/v	objem na objem
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
YUC	YUCCA (flavinmonooxygenasa)