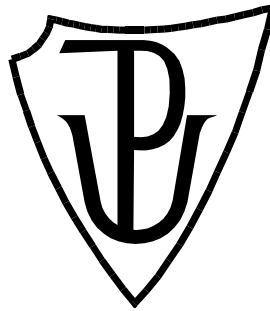


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Delece genu *CpaaH* u fytopatogenní houby *Claviceps purpurea*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eva Mlynarčíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Josef Vrabka
Rok:	2015

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

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu Mgr. Josefu Vrabkovi za odborné vedení, pozitivní přístup, neutuchající trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Mé poděkování patří též členům Laboratoře růstových regulátorů, CRH za analýzu auxinů pomocí HPLC/MS. Děkuji také zaměstnancům Oddělení molekulární biologie, CRH za cenné rady a vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Mlynářčíková
Název práce	Delece genu <i>CpialaH</i> u fytopatogenní houby <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Josef Vrabka
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Claviceps purpurea, fytopatogenní houba z oddělení Ascomycota, parazituje na více než 400 jednoděložných rostlinách. Mezi její hostitelské rostliny patří i ekonomicky významné obiloviny jako žito, ječmen či pšenice. U napadených rostlin se tvoří tzv. námel, tj. černofialová sklerocia, která obsahují námelové alkaloidy. Pro patogenезi tohoto biotrofního parazita je charakteristická absence hypersenzitivní reakce hostitele a orgánová specifita infekce, kdy *C. purpurea* napadá výlučně mladé, většinou neoplozené semeníky. Předmětem této práce je studium genu *CpialaH* kódující indolyl-3-acetamidhydrolasu (EC 3.5.1.4), enzym katalyzující druhou reakci indolyl-3-acetamidové dráhy biosyntézy auxinů, tj. konverzi indolyl-3-acetamidu (IAM) na kyselinu indolyl-3-octovou (IAA).

V teoretické části práce byly shrnuty poznatky týkající se biologie *C. purpurea* a rostlinných hormonů u hub, zvláště auxinů. Byl rozebrán i výskyt a role dalších skupin rostlinných regulátorů, a to cytokininů, gibberelinů, kyseliny abscisové, kyseliny salicylové, ethylenu a kyseliny jasmonové.

Cílem experimentální části byla transformace *C. purpurea* založená na strategii homologní rekombinace genu *CpialaH* s kazetou nesoucí rezistenci na phleomycin. Po ověření primárních transformantů diagnostickou PCR a Southern blotem byl charakterizován fenotyp mutanta. Metodami TLC a HPLC/MS byly změřeny odlišnosti produkce auxinů u WT *C. purpurea* a mutanta s delecí genu *CpialaH*.

Klíčová slova *Claviceps purpurea*, auxin, kyselina indolyl-3-octová (IAA), indolyl-3-acetamidhydrolasa (*iaaH*)

Počet stran	63
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eva Mlynarčíková
Title	The deletion of <i>CpiaaH</i> gene in the phytopathogenic fungus <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Josef Vrabka
The year of presentation	2015

Abstract

The phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* of the division Ascomycota parasites on more than 400 monocots. Host plants include also economic important cereals such as rye, barley and wheat. In infected plants, late stage of infection is characteristic by forming of the ergot, dark-violet sclerotia containing ergot alkaloids. Characteristic features of the pathogenesis of this biotrophic parasite are an absence of the hypersensitive reaction in the host plant and the organ specificity when *C. purpurea* attacks exclusively young, usually unfertilized ovaries. The subject of this work is a study of *CpiaaH* gene coding an enzyme indole-3-acetamide hydrolase (EC 3.5.1.4) which catalyzes a conversion of indole-3-acetamide (IAM) to indole-3-acetic acid (IAA), the second reaction of IAM pathway of auxin biosynthesis. Current knowledge of biology of *C. purpurea* and phytohormones, especially auxins, were summarized in the theoretical part of this thesis. Occurrence and functions of another groups of hormones in fungi, namely cytokinins, gibberellins, abscisic acid, ethylene and jasmonic acid are also discussed.

The aim of the experimental part was to transform *C. purpurea* 20.1 by homologous recombination of *CpiaaH* with the phleomycin resistance cassette. When primary transformants were confirmed by diagnostic PCR and Southern blot, the mutant phenotype was characterized. Auxin production in WT *C. purpurea* and deletion mutant $\Delta CpiaaH$ was compared using TLC and HPLC/MS analysis.

Keywords	<i>Claviceps purpurea</i> , auxin, indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-acetamide hydrolase (iaaH)
Number of pages	63
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 Taxonomie	2
2.1.2 Charakteristika rodu <i>Claviceps</i>	2
2.1.3 Životní cyklus <i>Claviceps purpurea</i>	4
2.2 Hormony u hub.....	6
2.2.1 Auxiny	7
2.2.1.1 Struktura auxinů	7
2.2.1.2 Biosyntéza IAA	8
2.2.1.3 Biosyntéza IAA u hub	10
2.2.1.4 Fyziologické účinky auxinů u hub	13
2.2.2 Cytokininy	17
2.2.3 Gibereliny	19
2.2.4 Kyselina salicylová	21
2.2.5 Kyselina abscisová.....	22
2.2.6 Ethylen	24
2.2.7 Kyselina jasmonová	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Biologický materiál.....	26
3.1.2 Chemikálie	26
3.1.3 Primery.....	28
3.1.4 Roztoky a média	28
3.1.5 Laboratorní pomůcky.....	30
3.1.6 Kity a návody.....	30
3.1.7 Programy a software	31
3.1.8 Přístroje.....	31
3.2 Metody.....	32
3.2.1 Příprava rezistenční kazety pro transformaci <i>C. purpurea</i> 20.1	32
3.2.1.1 Izolace plasmidové DNA	32
3.2.1.2 Restrikce <i>pRS426::ΔCpiaaH</i> plasmidu enzymem <i>XhoI</i>	32
3.2.1.3 Elektroforetická separace a purifikace DNA fragmentu z agarosového gelu.....	33

3.2.2 Transformace <i>C. purpurea</i> 20.1	33
3.2.2.1 Izolace protoplastů	33
3.2.2.2 Transformace protoplastů	34
3.2.3 Ověření transformace diagnostickou PCR.....	34
3.2.3.1 Izolace genomické DNA	34
3.2.3.2 Diagnostická PCR	35
3.2.3.3 Elektroforéza v agarosovém gelu.....	35
3.2.4 Příprava RNA próby pro Southern blot	36
3.2.4.1 Restrikce <i>pDRIVE</i> plasmidu s 3' okrajovou sekvencí genu <i>CpialH</i> enzymem <i>XhoI</i>	36
3.2.4.2 Purifikace naštěpené DNA z restrikční směsi.....	36
3.2.4.3 <i>In vitro</i> transkripce	36
3.2.5 Příprava vzorků gDNA pro Southern blot	37
3.2.5.1 Restrikce gDNA <i>C. purpurea</i> enzymem <i>ApaLI</i>	37
3.2.5.2 Ethanolová precipitace	37
3.2.6 Southern blot.....	37
3.2.6.1 Elektroforéza v agarosovém gelu, promývání gelu.....	37
3.2.6.2 Kapilární přenos gDNA	38
3.2.6.3 Prehybridizace a hybridizace, promývání membrány.....	38
3.2.6.4 Detekce.....	39
3.2.7 Fenotyp mutantu $\Delta CpialH$	39
3.2.8. TLC	39
3.2.9. HPLC/MS	40
4 VÝSLEDKY	41
4.1 Transformace <i>C. purpurea</i> 20.1	41
4.2 Southern blot	43
4.3 Fenotyp mutantu $\Delta CpialH$ 86.....	45
4.4 Identifikace a kvantifikace indolových sloučenin	47
5 DISKUZE.....	50
6 ZÁVĚR	52
7 LITERATURA.....	53
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	62

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše na téma biologie *Claviceps purpurea* a rostlinných hormonů u hub se zaměřením na auxiny.
- Transformace *Claviceps purpurea* za účelem delece genu *CpialaH*.
- Ověření transformantů metodami diagnostické PCR a Southern blot.
- Charakterizace mutanta *Claviceps purpurea* s delecí genu *CpialaH*.

1 ÚVOD

Fytopatogenní houba paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*) je biotrofní parazit, jenž parazituje na více než 400 druzích jednoděložných rostlin. Často se jedná o obiloviny, zvláště pak žito, jehož obilky bývají v pozdní fázi infekce nahrazovány černofialovými růžkatými sklerocii, tzv. námelem. Pro průběh samotné infekce je pak charakteristická absence obranných reakcí hostitelské rostliny. Důležitou roli v patogenezi *C. purpurea* mohou hrát rostlinné hormony produkované tímto parazitem. Kromě cytokininů, jejichž biosyntéza u *C. purpurea* je již částečně objasněna, se u houby zjistila i možnost produkce auxinů. Porovnáním genomových sekvencí *C. purpurea* a hub rodu *Fusarium* byl identifikován gen s pravděpodobnou funkcí indolyl-3-acetamidhydrolasy (*CpiaoH*), jež katalyzuje druhou reakci indolyl-3-acetamidové biosyntetické dráhy auxinů, tj. hydrolýzu indolyl-3-acetamidu (IAM) na kyselinu indolyl-3-octovou (IAA).

K cílům teoretické části této bakalářské práce patří zpracování literární rešerše na téma biologie *C. purpurea* a rostlinných hormonů u hub. Pozornost je zde věnována především auxinům, jejich syntéze a fyziologickým účinkům u hub. Dále je rozebírána problematika výskytu a role cytokininů, giberelinů, kyseliny abscisové, kyseliny salicylové, ethylenu a kyseliny jasmonové.

Experimentální část práce si kladla za cíl přípravu mutanta *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpiaoH*, úspěšnost transformace byla ověřena diagnostickou PCR a Southern blotem. Následně byl mutant charakterizován z pohledu změn v houbovém fenotypu a produkci auxinů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea*

2.1.1 Taxonomie

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

2.1.2 Charakteristika rodu *Claviceps*

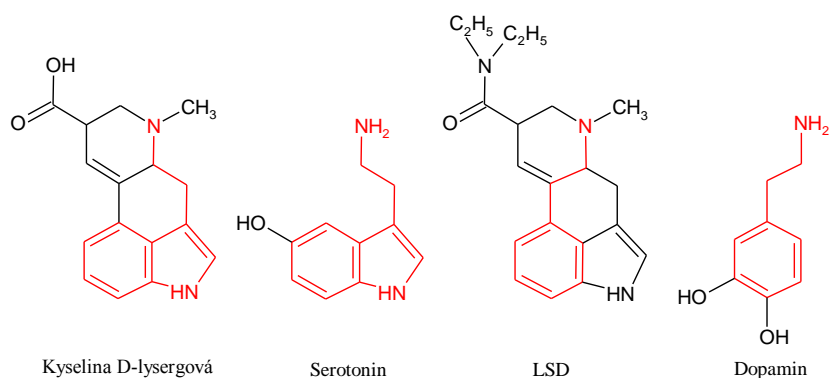
Houby z rodu *Claviceps* představují významné parazity více než 600 druhů jednoděložných rostlin. Mezi tyto hostitele se řadí mj. žito, pšenice, oves či rýže, a *Claviceps* tak představuje důležitý faktor ovlivňující výnos těchto ekonomicky významných plodin (Bové, 1970). Většina hub z rodu *Claviceps* infikuje omezený počet rostlin. Širokou škálou možných hostitelů pak vyniká *Claviceps purpurea*, která napadá až 400 rostlin (Taber, 1985).

C. purpurea je úzce spojena s onemocněním savců označovaným jako ergotismus. Jeho příčinou jsou alkaloidy obsažené v tzv. námelu, fialově až černě zbarvených sklerociích vyrůstajících místo napadených obilek. Pro tyto 3,4-substituované deriváty indolu je charakteristická přítomnost tetracyklického ergolinového kruhu (Tudzynski *et al.*, 2001). Podle substituentu na C8 uhlíku jsou námelové alkaloidy rozděleny do čtyř skupin: klavinové alkaloidy, kyselina D-lysergová a její deriváty, ergopeptiny a ergopeptamy (Mukherjee a Menge, 2000). Jejich struktura je analogická se strukturou neurotransmiterů noradrenalinu, dopaminu a serotoninu, což je příčinou jejich přímého působení na centrální nervovou soustavu savců (CNS; Loew *et al.*, 1978; Obr. 1).

První zmínky o účincích námelových alkaloidů pochází již z období Asyřanů (600 let př. n. l.), kteří pozorovali „škodlivé útvary na klasech obilovin“. Největší škody však ergotismus napáchal ve středověku, kdy tomuto onemocnění podlehl v době epidemie několik tisíc lidí. Příčinou bylo obvykle pozření chleba upečeného z žitné

mouky, která byla vyrobena ze zrn napadených rostlin. Označení „svatý oheň“ či „oheň sv. Antonína“ získalo toto onemocnění díky typickému pálení v končetinách, které je charakteristické pro gangrenosní formu tohoto onemocnění. Ta může vést až ke ztrátě poškozené tkáně. U konvulsivního typu pak dochází k záškubům a křečím, které mohou být doprovázeny paranoiou, popř. halucinacemi. Pohled na námel a jeho působení na lidský organismus se však v průběhu historie měnil a v Evropě se účinků v nich obsažených alkaloidů dlouhou dobu využívalo např. v porodnictví k urychlení porodu či vyvolání potratu (Haarmann *et al.*, 2009).

Námelové alkaloidy, konkrétně ergotamin, byly poprvé izolovány Arthurem Stollem v roce 1918. Mezi další alkaloidy vyprodukované *C. purpurea* patří ergokryptin a s ním příbuzné ergopeptinové alkaloidy, které lze spolu s amidy kyseliny lysergové převést na její D-formu alkalickou nebo kyselou hydrolýzou. Kyselina lysergová pak slouží jako výchozí substance pro přípravu léčiv, popř. drog. Dnes se používá především k přípravě farmaceutik pro léčbu onemocnění CNS (Haarmann *et al.*, 2009). Příkladem může být bromokryptin (2-bromoergokryptin), jenž působí jako agonista dopaminového receptoru, a využívá se tak při léčbě Parkinsonovy choroby (Thobois, 2006). Ovlivňuje však i hladinu prolaktinu, neboť inhibuje jeho uvolňování z adenohipofýzy. Své uplatnění tedy našel i při léčbě hyperprolaktinémie (Crosignani, 2006). Pro léčbu migrén se pak od počátku minulého století používá ergotamin, popř. dihydroergotamin (Tfelt-Hansen a Koehler, 2008). K nejznámějším představitelům dnes ilegálně syntetizovaných látek z námelových alkaloidů patří LSD (diethylamid kyseliny lysergové). Hofmann, který LSD v roce 1938 nasyntetizoval, později o své práci a vlastních zkušenostech s drogou napsal knihu „LSD – Mé problémové dítě“ (1980).



Obr. 1 Strukturální vzorce kyseliny D-lysergové, neurotransmiterů dopaminu a serotoninu, a LSD (diethylamid kyseliny D-lysergové). Červeně je vyznačena podobnost struktur (www.archive.bio.ed.ac.uk; upraveno)

2.1.3 Životní cyklus *Claviceps purpurea*

Infekce *C. purpurea* je charakteristická orgánovou specifitou, kdy houba napadá výlučně mladé, obvykle neoplozené semeníky travin a obilovin. Typickým znakem je absence obranných reakcí hostitele. Ta je pravděpodobně způsobena specifickým růstem hyf, jejichž směr i dráha jsou téměř identické jako u růstu pylové láčky. Navíc nebyla zjištěna tvorba žádných specifických struktur podobných apresoriím, pomocí kterých by spory pronikaly přes kutikulu (Tudzynski a Scheffer, 2004). Garre *et al.* (1998) se pak domnívají, že potlačení obranného mechanismu napadené rostliny je způsobeno katalasou (EC 1.11.1.6), kterou houba při infekci produkuje. Ta katalyzuje rozklad peroxidu vodíku, jenž hraje důležitou roli v obranné reakci rostliny, popř. signalizaci (Low a Merida, 1996).

C. purpurea patří mezi homotalické houby (Esser a Tudzynski., 1978), a proto může její cyklus začít vyklíčením jediné askospory. Primární infekce probíhá na jaře, kdy jsou tyto spory uvolňovány z perithecií a větrem přeneseny na bliznu hostitelské rostliny. Po překonání vrstvy kutikulárních buněk prorůstají tenká houbová vlákna bez výrazného větvení kolem ovaria až k rachille. Dále však růst hyf nepokračuje, což může být způsobeno inhibicí houbové pektinasy (EC 4.2.2.10; Tudzynski a Scheffer, 2004). Ta je svou schopností degradace buněčné stěny rostlinných buněk považována za jeden z klíčových enzymů houbové infekce (Shaw a Mantle, 1980; Rogers *et al.*, 2000; Oeser *et al.*, 2002). Od vzniklého rozhraní mezi infikovaným a neinfikovaným rostlinným pletivem se pak hyfy větví za tvorby tzv. sfacelia, jenž kompletně prorůstá stěnou semeníku. Asi týden po propuknutí infekce dochází k produkci velkého množství konidiospor, které jsou spolu s rostlinnou floémovou šťávou vylučovány jako lepkavá medovice. Ta je svým vysokým podílem sacharidů velmi atraktivní pro hmyz. Právě přenos spor hmyzem, popř. kapénkový přenos, zahajuje sekundární infekci dalších kvetoucích trav a obilovin. Asi po dvou týdnech infekce se produkce medovice zastavuje a dochází k rozvoji růžkatých sklerocií. Zrání těchto struktur, které ve finále nahradí původní obilky, trvá kolem 5 týdnů. Vytvořený námel, tj. plektenchymatické pletivo se speciálními zásobními buňkami a typicky pigmentovaným vnějším obalem (černý, popř. červenofialový), se poté z klasu uvolní. Zralé sklerocium umožňuje pohlavní rozmnožování houby a díky své konstituci je také schopno překonat podmínky nepříznivé zimy. Na jaře pak sklerocia vyklíčí za tvorby několika stromat. Na nich se vytvoří samičí askogonia a samčí antheridia, jejichž fúzí vzniká dvoujaderná askogenní hyfa.

Z oplozených askogonií vznikají perithecia. Meiózou jsou v nich vytvářeny askospory, které jsou větrem přeneseny na květy rostlin (Tudzynski a Scheffer, 2004; Obr. 2).

Během všech fází infekce nedochází k nekrotickému růstu houby, a proto lze *C. purpurea* charakterizovat jako biotrofního parazita, který získává živiny pouze z živých buněk hostitele (Tudzynski a Scheffer, 2004). Její studium je pak usnadněno možnostmi pěstování houby v axenické kultuře (Mantle a Nisbet, 1976).

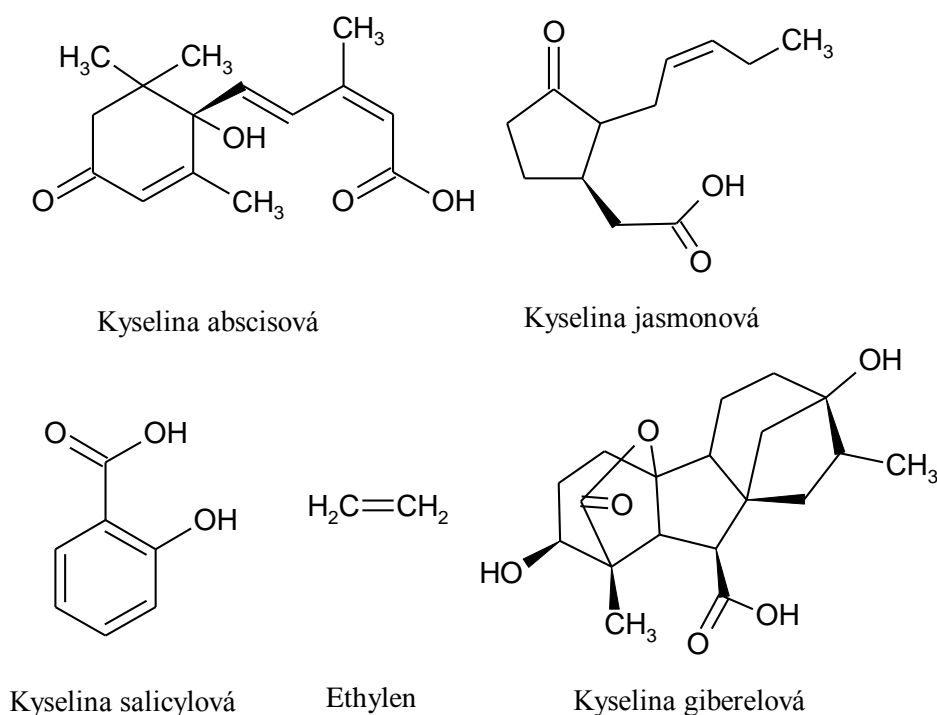


Obr. 2 Životní cyklus *C. purpurea*. (1) otevřený květ ječmene; (2) prorůstání hyf semeníkem; (3) produkce medovice; (4) přenos infekce hmyzem; (5) zrání sklerocií; (6) přezimování sklerocií; (7) klíčení sklerocií; (8) uvolnění askospor z perithecií (Hulvová *et al.*, 2012).

2.2 Hormony u hub

V závislosti na vztahu mezi houbou a rostlinou lze při jejich interakci pozorovat různé projevy. Pro mutualistické soužití – mykorhizu – je typická zvýšená tvorba rostlinné biomasy. Patogenní houby naopak způsobují různé nádory, hálky, rzi, skvrny na listech či jejich pokroucení, což může vést ke snížení výnosů hospodářských plodin (Isaac, 1992). Některé z těchto symptomů jsou pak způsobeny zvýšenou hladinou hormonů v infikovaném pletivu.

Během evoluce si rostliny vytvořily důmyslný obranný systém pro rozpoznání patogenního organismu a následnou obranu. Mezi klíčové signální molekuly aktivující obrannou reakci napadené rostliny patří hormony, především pak kyselina salicylová (SA), jasmonáty (JAs) a ethylen (ET). V posledních letech se však při studiu patogeneze rostlin věnuje pozornost i ostatním fytohormonům, a to kyselině abscisové (ABA), auxinům, cytokininům (CKs) či giberelinům (GAs; Obr. 3; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). U fytopatogenních hub se pak předpokládá sekrece fytohormonů jako virulentních faktorů (Tudzinski a Sharon, 2002).



Obr. 3 Strukturální vzorce vybraných rostlinných hormonů.

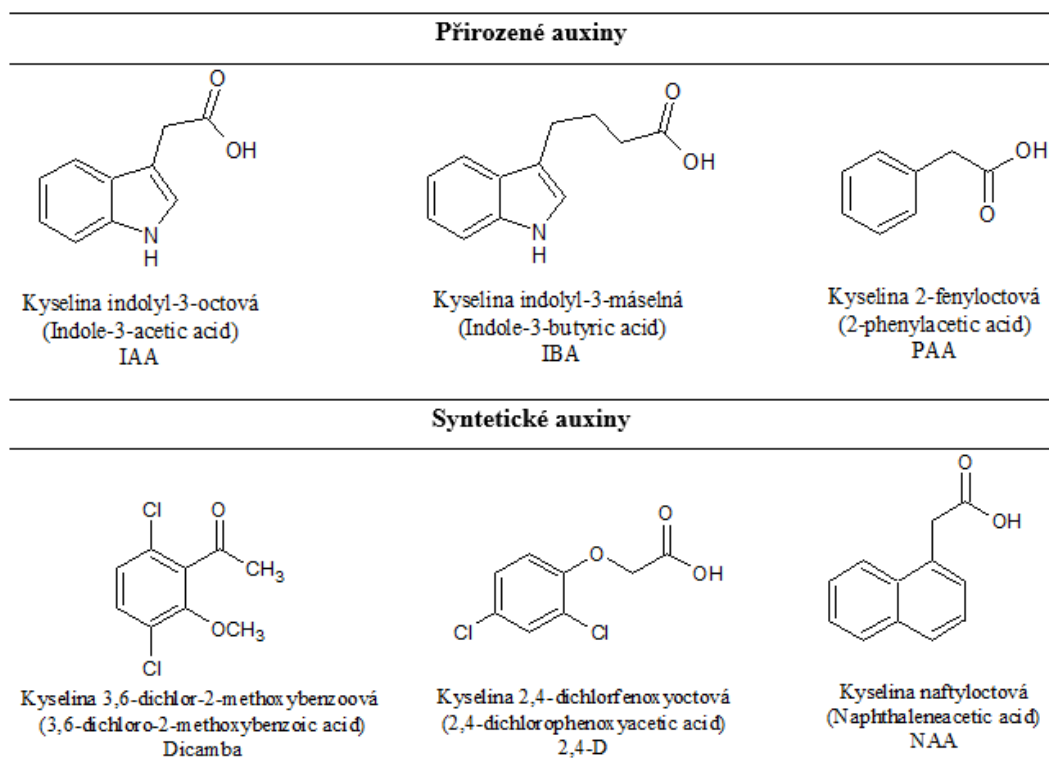
2.2.1 Auxiny

Přítomnost látky, která se významně uplatňuje v regulaci růstu rostliny, předpověděl již Darwin v roce 1880. Všiml si specifického prodlužování stonku umožňující orientovaný pohyb rostliny za světlem (fototropismus). Ve 30. letech 20. století byla tato látka identifikována jako indolyl-3-octová kyselina (IAA; Kögl a Kostermans, 1934) a dnes reprezentuje skupinu rostlinných hormonů auxinů.

Auxiny patří mezi významné rostlinné růstové regulátory, jež se uplatňují při mnoha fyziologických procesech rostlin. Podílejí se na elongaci buněk a prodlužování stonku, buněčném dělení a diferenciaci buněk v kambiu, či iniciaci růstu kořenů a zakládání postranních kořenů. Uplatňují se také v indukovaných pohybech rostlinných orgánů, zejména fototropismu a gravitropismu. Důležitou roli pak hrají v apikální dominanci, korelačním vztahu mezi vrcholovým pupenem rostliny, jehož růst je stimulován, a pupeny postranními, jež jsou inhibovány (Davies, 2004).

2.2.1.1 Struktura auxinů

Na molekulární úrovni lze auxiny charakterizovat jako látky obsahující aromatický skelet, které mají v postranním řetězci navázanou karboxylovou skupinu. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny fytohormonů je indolyl-3-octová kyselina (IAA), která stojí za většinou efektů, jimiž jsou auxiny zprostředkovávány. Mezi další přirozeně se vyskytující auxiny v rostlinách patří kyselina 4-chloroindolyl-3-octová (4-Cl-IAA), fenyl-octová (PAA) a indolyl-3-máselná (IBA; Davies, 2004). Auxinovou aktivitu z jejich syntetických analogů pak vykazují např. kyselina naftyl-octová (NAA), 2,4-dichlorfenyl-octová (2,4-D) či 3,6-dichlor-2-methoxybenzyl-octová (Dicamba; Obr. 4). Díky své vyšší citlivosti k dvouděložným rostlinám oproti jednoděložným našly tyto látky uplatnění v zemědělství, kde se používají jako selektivní herbicidy (Grossmann, 2009).



Obr. 4 Strukturální vzorce vybraných přirozených a syntetických auxinů.

2.2.1.2 Biosyntéza IAA

Biosyntéza IAA je velmi dobře popsána u rostlin, u kterých probíhá syntéza dvěma základními dráhami: Trp-dependentní, kdy je na začátku biosyntézy aminokyselina L tryptofan (L-Trp), a Trp-independentní, jež využívá jako prekurzory IAA jiné indolové sloučeniny (Obr. 5).

U dráhy vycházející z Trp byly zjištěny čtyři klíčové meziprodukty vedoucí ke kyselině indolyl-3-octové (IAA), podle kterých jsou tyto cesty pojmenovány: indolyl-3-acetamidová (IAM), indolyl-3-pyruvátová (IPA), tryptaminová (TAM) a indolyl-3-acetaldoximová dráha (IAOx; Woodward a Bartel, 2005). U Trp auxotrofních mutantů *Arabidopsis thaliana* pak bylo zjištěno, že klíčovou látkou pro syntézu IAA je indolyl-3-glycerolfosfát (IGP; Normanly *et al.*, 1993; Müller a Weiler, 2000). Ten je u mikroorganismů převáděn v dvoukrokové syntéze za katalýzy Trp synthasy (EC 4.2.1.20) přes indol na Trp (Demoss, 1961). U *A. thaliana* byl nalezen homologní protein k podjednotce α tohoto tetramerního enzymu, indolylysynthasa (INS; EC 4.1.2.8), jež katalyzuje přeměnu IGP na indol (Ouyang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008). INS tedy iniciuje Trp-independentní syntézu IAA, která hraje důležitou roli při zakládání polárního transportu auxinů v apikálně-bazální ose během rané embryogeneze.

Spolu s Trp-dependentní drahou tak společně regulují embryogenezi a apikální dominanci u *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2015). Konverze indolu na IAA však stále není zcela objasněna. Jedním z možných intermediátů této reakce může být kyselina indolyl-3-máselná (IBA), která je v procesu β -oxidace přeměněna na IAA (Strader *et al.*, 2011).

Syntéza IAA přes indolyl-3-pyruvát (IPA) představuje jednu z nejdůležitějších biosyntetických drah auxinů u rostlin. U *A. thaliana* je L-Trp převeden na IPA za katalýzy aminotransferasy (EC 2.6.1.27), jež je kódována genem *TAA1* (*Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis 1*; Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008). V dalším kroku je IPA většinou ihned konvertována na IAA reakcí katalyzovanou flavinmonooxygenasami (EC 1.14.13.8; Mashiguchi *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). Ty jsou kódovány rozsáhlou skupinou genů *YUCCA* (*YUC*), které se v případě *A. thaliana* vyskytují nejméně v 9 kopiích (Zhao *et al.*, 2001). Přeměna IPA na IAA je zřejmě možná i přes indolyl-3-acetaldehyd (IAAld), tedy drahou typickou spíše pro mikroorganismy (Koga *et al.*, 1991; Costacurta *et al.*, 1994; Brandi *et al.*, 1996). Nicméně přítomnost aldehydoxidas (EC 1.2.3.1) katalyzující oxidaci IAAld na IAA byla zjištěna pouze u některých rostlin, např. kukuřice (Koshiba *et al.*, 1996) či *A. thaliana* (Seo *et al.*, 1998).

TAM dráha je přítomná jak u jednoděložných tak dvouděložných rostlin. Trp dekarboxylasa (TDC; EC 4.1.1.28) katalyzuje v cytosolu přeměnu L-Trp na tryptamin (TAM; Noé *et al.*, 1984). Ten je dále pravděpodobně hydroxylován na *N*-hydroxytryptamin (NHT) za katalýzy flavinmonooxygenasy (Zhao *et al.*, 2001). Následuje přeměna na indolyl-3-acetaldehyd (IAAld), poslední meziproduct TAM dráhy. U hrachu pak dochází k přímé konverzi TAM na IAAld (Quittenden *et al.*, 2009).

Dvoukroková syntéza IAA přes IAM začíná oxidací L-Trp katalyzovanou enzymem tryptofan-2-monooxygenasa (*iaaM*; EC 1.13.12.3) na IAM, který je následně působením indolyl-3-acetamidhydrolasy (*iaaH*; EC 3.5.1.4) přeměněn na IAA. U této dráhy se dlouho předpokládalo, že se vyskytuje pouze u bakterií. Tvorba IAA přes IAM byla totiž objevena u fytopatogenních bakterií *Pseudomonas syringae* (Comai *et al.*, 1982) a *Agrobacterium tumefaciens* (Inzé *et al.*, 1984), u kterých jsou příslušné geny zakorporovány v plasmidové DNA. Přítomnost IAM však byla detekována i u mnoha rostlin, např. *A. thaliana* (Pollmann *et al.*, 2002) či kukuřici, rýži a tabáku (Sugawara *et al.*, 2009). U rýže (Kawaguchi *et al.*, 1991) pak byla zjištěna i přítomnost IAM hydrolasy. V genomu *A. thaliana* a *Nicotiana tabacum* byla objevena skupina genů z *AMII* rodiny mající taktéž funkci IAM hydrolasy (Mano *et al.*, 2009).

V IAOx dráze je L-Trp oxidován na IAOx za katalýzy dvou homologních cytochrom P450 monooxygenas, CYP79B2 a CYP79B3 (EC 1.14.13.125). Dráha je specifická pro rostliny čeledi brukvovitých, geny pro syntézu IAOx byly detekovány např. u *A. thaliana* (Mikkelsen *et al.*, 2000; Hull *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 2009) a *Brassica* (Ludwig-Müller a Hilgenberg, 1988). IAOx je dále pravděpodobně oxidován na indolyl-3-acetonitril (IAN) reakcí katalyzovanou CYP71A13 (EC 4.99.1.6; Nafisi *et al.*, 2007), který je působením nitrilas (EC 3.5.5.1) konvertován na IAA (Bartling *et al.*, 1992; Bartling *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2003).

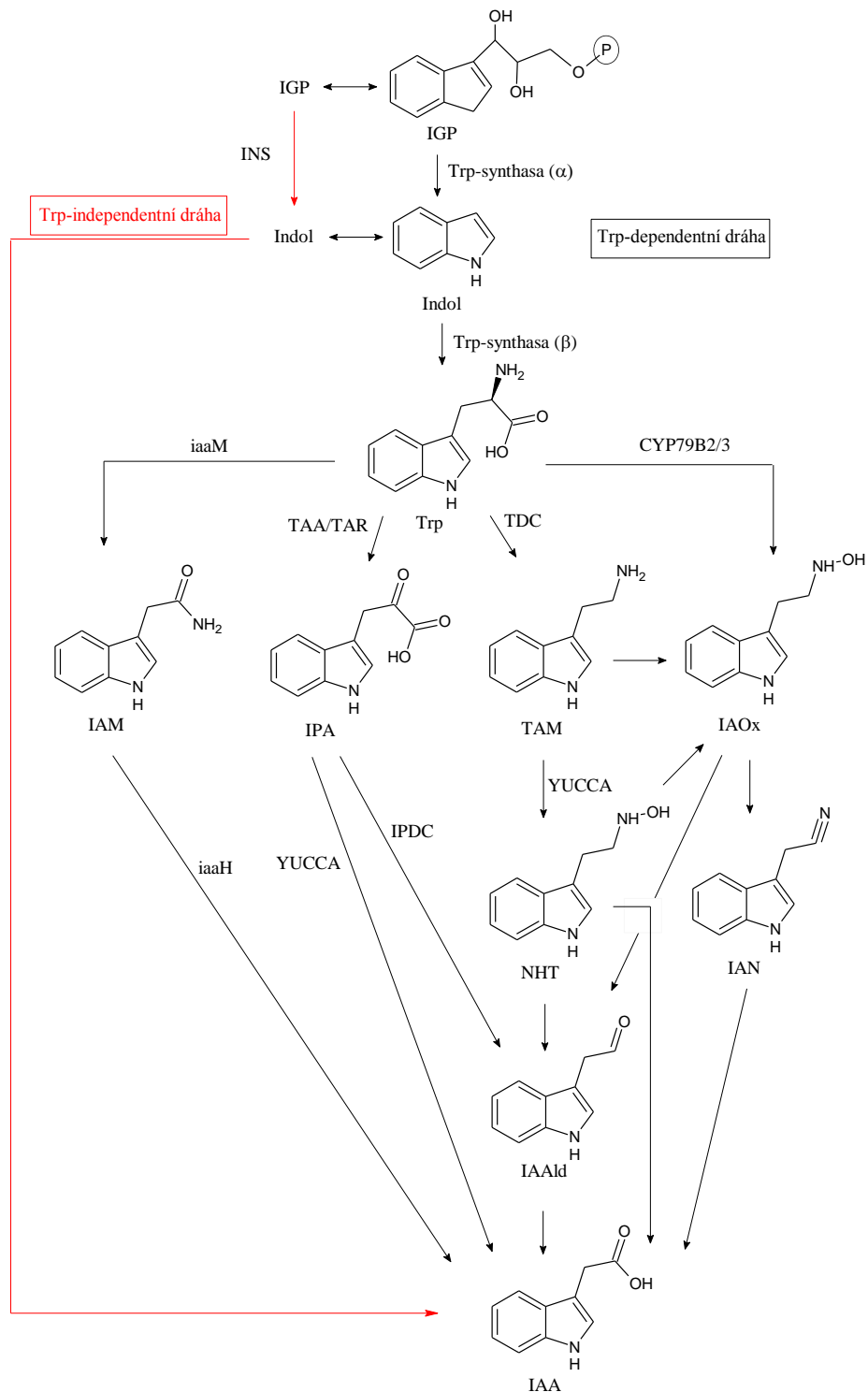
2.2.1.3 Biosyntéza IAA u hub

Přítomnost auxinů u hub, konkrétně u *Rhizopus suinus*, byla studována již ve 30. letech 20. století (Dolk a Thimann, 1932). Do dnešní doby pak byla produkce IAA zjištěna u mnoha nejen fytopatogenních, ale i saprofytických a symbiotických žijících hub. Otázka významu těchto fytohormonů u hub však stále zůstává částečně nezodpovězena.

Při studiu metabolických drah vedoucích k syntéze IAA byly detekovány především meziprodukty jednotlivých drah. U některých zástupců pak byly identifikovány i geny kódující enzymy katalyzující příslušné reakce těchto drah.

Zatímco možné dráhy biosyntézy IAA u rostlin a bakterií, včetně většiny zúčastněných enzymů, jsou dnes dobře známy (Spaepen *et al.*, 2007), o produkci auxinů u hub se toho ví velice málo. Podobně jako u rostlin se i u hub vyskytují jak Trp-dependentní tak Trp-independentní dráhy. V případě biosyntézy IAA z Trp jsou předpokládány 3 možné způsoby, a to IPA, TAM a IAM dráha. Přítomnost intermediátů IAOx dráhy zatím zjištěna nebyla.

Biosyntéza IAA přes IPA byla zjištěna u mnoha zástupců hub. Zvýšená produkce IAA byla pozorována při kultivaci *Ustilago esculenta* na mediu obsahujícím IAAlD nebo IPA (Chung a Tzeng, 2004). V genomu *Ustilago maydis* byly identifikovány geny kódující IAAlD dehydrogenasy (*iad1* a *iad2*; Basse *et al.*, 2004; Reineke *et al.*, 2008). IPA dráhy se pak účastní primárně *iad1* dehydrogenasa (*iad2* se uplatňuje spíše v TAM dráze; Basse *et al.*, 2004). Navíc byly u *U. maydis* identifikovány i geny s předpokládanou transaminasovou aktivitou (*tam1* a *tam2*; Reineke *et al.*, 2008). Vysokou homologii s geny *U. maydis* vykazují i 2 *iad* a 2 *tam* geny, které byly nalezeny u zástupců rodu *Taphrina*. V jejich genomu byl identifikován také gen s pravděpodobnou funkcí genu *YUC*, který kóduje rostlinnou flavinmonooxygenasu (Tsai *et al.*, 2014).



Obr. 5 Předpokládané biosyntetické dráhy IAA u rostlin. (CYP79B2/3) cytochrom P450 monoxygenasa; (IAA) indolyl-3-octová kyselina; (iaaH) IAM hydrolasa; (IAAlD) Indolyl-3-acetaldehyd; (iaaM) Trp monoxygenasa; (IAM) indolyl-3-acetamid; (IAN) indolyl-3-acetonitril; (IAOx) indolyl-3-acetaldoxim; (IGP) indolyl-3-glycerolfosfát; (INS) indolylsynthasa; (IPA) indolyl-3-pyruvátová kyselina; (IPDC) IPA dekarboxylasa; (NHT) *N*-hydroxytryptamin; (TAA/TAR) Trp aminotransferasy; (TAM) tryptamin; (TDC) Trp dekarboxylasa; (Trp) tryptofan; (YUCCA) flavinmonoxygenasa (Tivendale *et al.*, 2014; upraveno).

Screening genomické knihovny *Saccharomyces cerevisiae* identifikoval v genomu kvasinky tři možné geny IAA biosyntézy: *ALD2* (*Aldehyddehydrogenasa*; EC 1.2.1.3), *ARO9* (*Aromatická transaminasa*) a *ADH2* (*Alkoholdehydrogenasa*; Rao *et al.*, 2010). Proteiny Aro8 a Aro9 se svými katalytickými účinky podílejí na konverzi Trp na IPA (Chen a Fink, 2006), enzymatická aktivita ADH2 se pak zřejmě uplatňuje při přeměně IAAld na tryptofol (indolyl-3-ethanol, TOL; Rao *et al.*, 2010). Kultivace mutanta s oběma deletovanými geny *ALD*, *ALD2* a *ALD3*, na mediu bez Trp pak ukázala možnost syntézy IAA u *S. cerevisiae* také Trp-independetní drahou (Rao *et al.*, 2010).

IPA dráha a syntéza TOL byla zjištěna i u některých druhů fytopatogenní houby *Rhizoctonia*, zvláště u *R. solani* byla detekována zvýšená produkce TOL (Furukawa *et al.*, 1996). Ten zde pravděpodobně funguje jako zásobní látka, která může být v případě potřeby přeměněna na IAA. Těchto jeho vlastností si již dříve všimli Rayle a Purves (1967) při kultivaci sazeniček okurek v mediu obsahujícím TOL.

V případě *U. esculenta* byla jako možný prekurzor IAA v IPA dráze zjištěna i kyselina indolyl-3-mléčná (ILA; Chung a Tzeng, 2004). Využití ILA pro syntézu IAA je umožněno zřejmě díky rozvětvení IPA dráhy, popř. se může u *U. esculenta* nacházet jiná dráha využívající ILA (Kaper a Veldstra, 1958). Tvorba ILA byla zjištěna i u *Colletotrichum. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Robinson *et al.*, 1998).

ILA je přirozeně se vyskytující indolový derivát vznikající reverzibilně z IPA (Ernstsen *et al.*, 1987; García-Tabares *et al.*, 1987). Jeho role v metabolismu auxinů však dosud známa není. Sprunck *et al.* (1995) shledávají ILA na základě studia s *Pisum sativum* pouze jako analoga IAA, avšak Körber *et al.* (1991) dokumentoval u *A. tumefaciens* antagonistické chování.

Robinson *et al.* (1998) ve své studii jako první uvedli možnost syntézy IAA u hub IAM drahou, a to u *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. Delece enzymů IAM dráhy pak ukázala, že se jedná o hlavní dráhu biosyntézy IAA u této houby (Robinson *et al.*, 1998; Maor *et al.*, 2004).

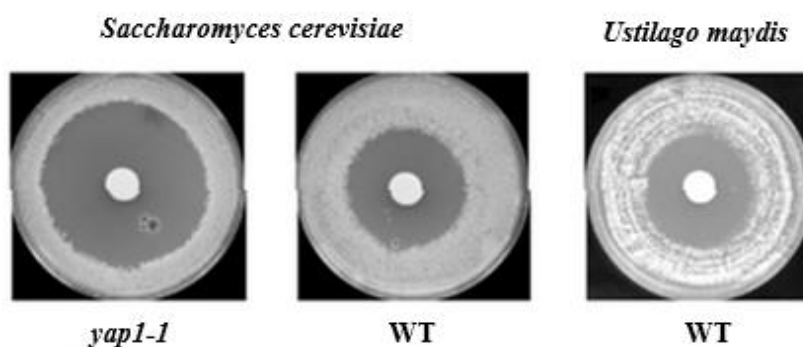
IAM dráha byla pozorována také u čtyř druhů rodu *Fusarium* – *F. proliferatum*, *F. verticillioides*., *F. fujikuroi* a *F. oxysporum*. U všech zástupců byly identifikovány geny homologní k bakteriálním genům kódujícím *iaaM* a *iaaH*. Nicméně dráha je plně funkční pouze u *F. proliferatum* a *F. verticillioides* (Tsavkelova *et al.*, 2012). U *F. delphinoides* pak byla zjištěna možnost syntézy IAA pouze z Trp, a to třemi možnými dráhami: IAM, IPA a TAM drahou (Kulkarni *et al.*, 2013).

V genomu *U. maydis* byly identifikovány i tři geny s předpokládanou funkcí nitrilas, kdy *nit1* vykazoval dokonce více než 40% identitu s geny kódující NIT1 a NIT2 u *A. thaliana*. Studium mutantů s tímto deletovaným genem však nakonec možnost tvorby IAA přes IAOx dráhu vyřadilo (Reineke *et al.*, 2008).

2.2.1.4 Fyziologické účinky auxinů u hub

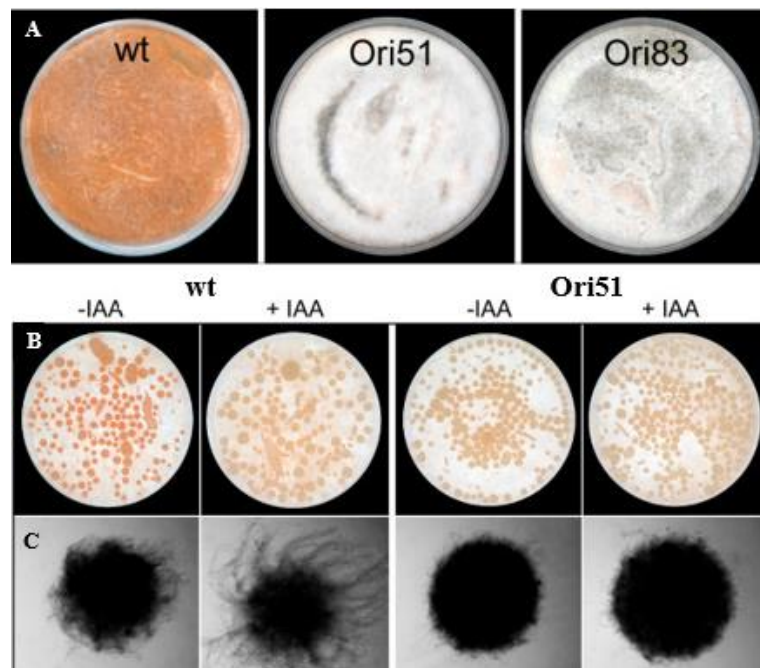
IAA zvyšuje haploidní invazi spor i diploidní růst pseudohyfy u *Saccharomyces cerevisiae* (Prusty *et al.*, 2004). Pro oba tyto invazivní aspekty je nutná správná funkce povrchového proteinu Flo11 (Lo a Dranginis, 1998). Studie ukázala, že v přítomnosti IAA dochází až k trojnásobnému zvýšení transkripce *FLO11*. U mutantů s redukovanou expresí *FLO11* pak byla pozorována snížena adheze i pseudohyfální růst. Vysoké koncentrace IAA však růst kvasinky inhibuje. Takovéto potlačení růstu bylo pozorováno i u *U. maydis* (Obr. 6; Prusty *et al.*, 2004).

O produkci auxinů u endofytních kvasinek se poprvé zmínili Nassar *et al.* (2005), kteří u *Williopsis saturnus* zjistili tvorbu IAA a IPA. Jejich hladiny se pak několikrát zvýšily při kultivaci kvasinky v mediu obohaceném o Trp. Studie se tak dále zaměřila na možnou účast IAA produkovaného *W. saturnus* v symbióze s kořeny *Zea mays* L. Po inokulaci rostlin došlo ke zvýšení tvorby biomasy, bylo pozorováno prodloužení kořenů a nadzemních výhonů. Tyto efekty byly spolu se zvýšenými hladinami IAA a IPA *in planta* opět nejvýraznější v přítomnosti Trp.



Obr. 6 Inhibice růstu IAA u *Saccharomyces cerevisiae* (kmen *yap1-1* a WT) a *Ustilago maydis* (WT). Kmen *yap1-1* je hypersenzitivní k IAA. Disky filtračního papíru saturované IAA byly položeny na souvislou vrstvu buněk. Inkubace 3 dny ve tmě. Čisté oblasti indikují zóny, ve kterých byl růst buněk inhibován (Prusty *et al.*, 2004; upraveno).

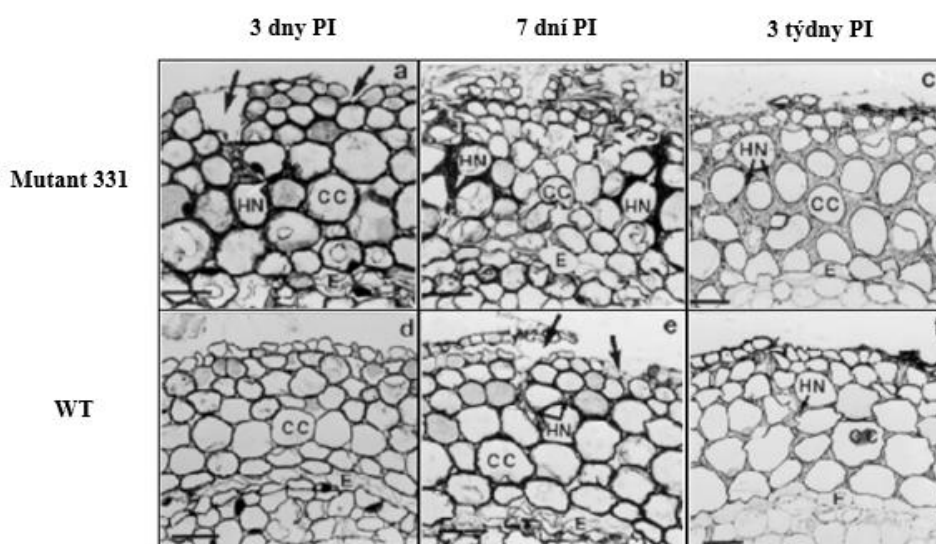
Tvorbu IAA v axenické kultuře *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* studovali Maor *et al.* (2004). Po zjištění, že v přítomnosti Trp a IAM došlo ke zvýšení hladiny IAM, v případě Trp pak i IAA, se studie dále zaměřila na produkci IAM a IAA *in planta*. Hladina IAA v napadených listech *Aeschynomene virginica* pak byla vyšší než u neinfikovaných rostlin. V napadených rostlinách, stejně jako v axenické kultuře, byla detekována aktivita enzymu katalyzující oxidaci Trp na IAM spolu s IAM hydrolasovou aktivitou. Jelikož u *A. virginica* IAM dráha zjištěna nebyla, je zřejmé, že *Col. gloeosporioides* je schopná produkce IAM a IAA nejen v axenické kultuře, ale i *in planta*. Další výsledky pak ukázaly, že pro produkci IAA *in planta* je limitním faktorem exogenní Trp, neboť vyšší hladiny IAA byly zjištěny během biotrofní fáze růstu houby, kdy jej *Col. gloeosporioides* získává z napadené rostliny. Chagué *et al.* (2009) pak dále ukázali, že se IAA podílí na sporulaci, klíčení spor a morfologii růstu u *Col. gloeosporioides* (Obr. 7). Zřejmě tak hraje důležitou roli ve vývoji a rozmnožování tohoto patogena.



Obr. 7 (A) Redukovaná pigmentace u mutantních kmenů Ori51 a Ori83 *Colletotrichum gloeosporioides* s delecí genu *CgOPT1*. Pěstováno na pevném regeneračním médiu (REG), vyfoceno 8. den po inokulaci. (B + C) vliv IAA na klíčení a morfologii růstu u WT a kmene Ori51 *C. gloeosporioides* (u kmene Ori83 podobné výsledky). Pěstováno v tekutém REG v přítomnosti (+) a nepřítomnosti (-) $500\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA po dobu 3 dnů. (B) kolonie *C. gloeosporioides*; (C) fotografie plaků získané pomocí stereoskopu (Chagué *et al.*, 2009; upraveno).

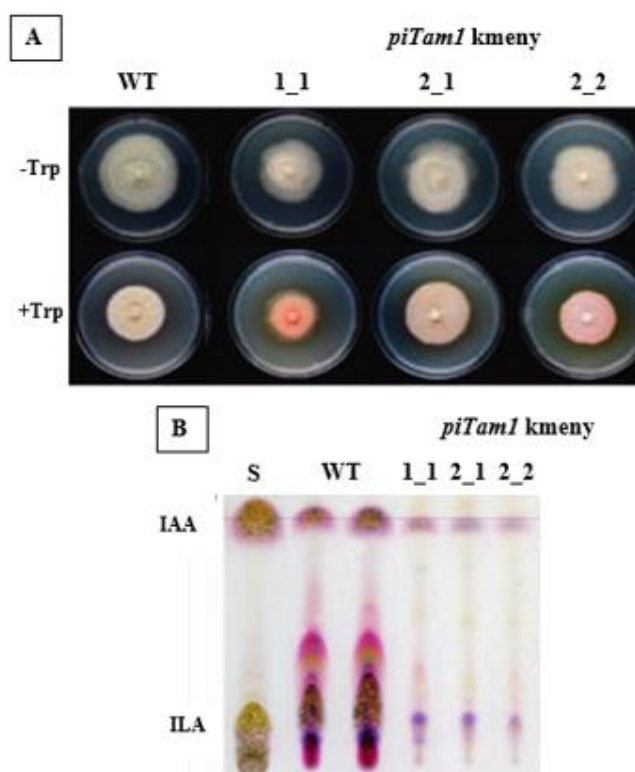
Yin *et al.* (2014) zjistili, že exprese genu *Pgt-IaaM* u *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* během rozvoje infekce rzi u pšenice byla v houbových buňkách rostoucích v infikovaných listech 200krát vyšší než ve sporách. Domnívají se tak, že exprese tohoto genu je indukována biotrofní fází růstu houby. Nejvyšší exprese genu pak byla zaznamenána v samotných buňkách haustorií, expresi *Pgt-IaaM* lze tak považovat za specifickou pro haustoria. Funkčnost genu *Pgt-IaaM* a jeho orgánová specifita byly potvrzeny zvýšenou hladinou IAA v buňkách infikovaných listů oproti neinfikovaným (koncentrace IAM zvýšeny nebyly).

Práce Tranvana *et al.* (2000) ukázala, že IAA produkované ektoparazitem *Hebeloma cylindrosporum* se podílí na mykorrhize s *Pinus pinaster*. U mutanta s nadprodukcí IAA byla pozorována třikrát větší tvorba mykorrhizy spojená se zvýšenou kolonizací houby a vytvářením Hartigovy sítě (Obr. 8). Její hyfy, které zasahují do kořenů napadených rostlin, pronikají do oblasti mezi epidermálními a kortikálními buňkami. Funkcí Hartigovy sítě je pak výměna nutrientů mezi houbou a hostitelskou rostlinou (Carlile *et al.*, 2001). Zvýšená produkce IAA byla také zjištěna u sazeniček *Litchi chinensis* Sonn., jež byly infikovány dvěma arbuskulárními houbami, *Glomus intraradices* a *Gigaspora margarita*. Koncentrace IAA byly u nadzemních výhonů napadených rostlin zvětšeny až sedmkrát, u kořenů pak dvakrát až pětkrát (Yao *e al.*, 2005).



Obr. 8 Tvorba Hartigovy sítě na příčných řezech kořenových špiček *Pinus pinaster* kolonizovaných mutantním kmenem 331 *Hebeloma cylindrosporum* s nadprodukcí IAA (A-C) a WT *H. cylindrosporum* h1(D-F). Foceno po 3 dnech, 7 dnech a 3 týdnech od inokulace. (CC) kortikální buňky; (E) endodermis; (HN) hartigova síť; (IAA) indoly-3-octová kyselina; (PI) po inokulaci; šipky ukazují na trhliny v epidermis (Tranvan *et al.*, 2000; upraveno).

Na důležitost koncentrace auxinů při růstu upozornili také Michniewicz a Rozej (1987), kteří pozorovali pozitivní vliv exogenního IAA na tvorbu mycelia, sporulaci a klíčení spor u *Fusarium culmorum* při koncentraci 10^{-9} mol·l⁻¹ IAA. Při vyšších hladinách IAA však došlo k jejich inhibici. Aplikace IAA má také pozitivní vliv na kolonizaci kořenů ječmene parazitem *Piriformospora indica*, avšak pouze v nízkých koncentracích (1-10 μmol·l⁻¹). Při vyšších koncentracích (100 μmol·l⁻¹) již dochází k inhibici růstu. V počátcích biotrofní infekce *P. indica* s ječmenem byla zjištěna zvýšená exprese genu *piTam1*. Jeho umlčení pak korelovalo s poklesem hladiny IAA, ILA a redukovanou kolonizací kořenů ječmene. Změna v samotném růstu houby oproti WT však pozorována nebyla. Hilbert *et al.* (2012) tedy předpokládají, že IAA hraje důležitou roli v indukci biotrofní interakce mezi *P. indica* a ječmenem, za stimulaci produkce biomasy u napadených kořenů však zodpovědná není. U mutantů s umlčeným genem *piTam1* byla také v případě růstu na mediu obohaceném o Trp pozorována výrazná změna ve fenotypu, která byla charakteristická prodloužením délky hyf či změnou pigmentace (Obr. 9).

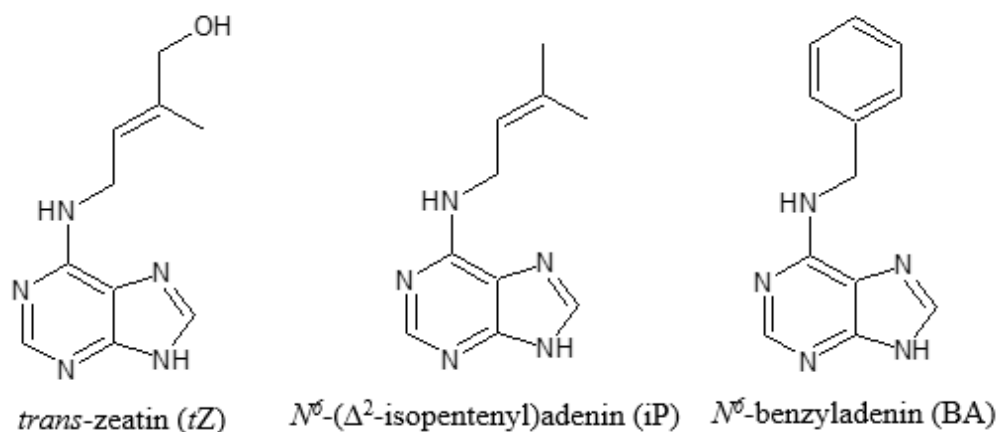


Obr. 9 (A) Vliv Trp na pigmentaci u WT a mutantních *piTam1* kmenů *Piriformospora indica*. Pěstováno na mediu v přítomnosti (+) a nepřítomnosti (-) $2,5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Trp. Kultivováno 14 dní při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve tmě. (B) TLC chromatogram extraktů tekutých CM médií WT a *piTam1* kmenů *P. indica*. Extrakce 3 dny po přidání Trp do média. (Trp) tryptofan; (IAA) indolyl-3-octová kyselina; (ILA) indolyl-3-mléčná kyselina; (S) standard (Hilbert *et al.*, 2012; upraveno).

2.2.2 Cytokininy

Přirozeně se vyskytující cytokininy (CKs) jsou skupinou adeninových sloučenin, které jsou v poloze N6 modifikovány isoprenoidním nebo aromatickým řetězcem. Účastní se regulace mnoha fyziologických procesů v rostlinách, mezi něž patří mj. buněčné dělení, růst stonku a postranních výhonů. Ovlivňují také produkci chlorofylu či senescenci listů (Davies, 2004). Účast cytokininů v patogenitě rostlin byla zjištěna např. při infekci bakterií *Rhodococcus fascians* (Murai *et al.*, 1980; Crespi *et al.*, 1992). Ta způsobuje charakteristické nádory na listech („leafy galls“) a fasciaci, tj. ztrátu apikální dominance u hlavního výhonu rostliny, která je provázena tvorbou nefunkčních výhonků v místě infekce. Kromě nejběžnějšího představitele této skupiny fytohormonů – zeatinu – se k látkám s cytokininovou aktivitou řadí také isopentenyladenin či benzyladenin (Obr. 10). Vedle volných forem cytokininů je lze nalézt také jako ribotidy či ribosidy (Davies, 2004).

U rostlin byly identifikovány dvě možné dráhy biosyntézy cytokininů. První zahrnuje prenylaci adenosin-5'-monofosfátů v tRNA katalyzovanou isopentenyltransferasou (EC 2.5.1.75; tRNA-IPT; Konevega *et al.*, 2006). V druhé dráze je pak působením adenylátisopentenyltransferasy (EC 2.5.1.112) katalyzován přenos isoprenoidního řetězce z dimethylallyldifosfátu na N6 pozici ATP či ADP za tvorby isopentenyladeninu (iP; Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001). Ten může být působením cytochrom P450 monooxygenas hydroxylován na *trans*-zeatin (*tZ*) ribosiddifosfát (trifosfát; Takei *et al.*, 2004). Závěrečný krok tvorby aktivních CK nukleotidů je katalyzován enzymem s CK specifickou fosforibohydrolasovou aktivitou, jenž je kódován genem *lonely guy* (*LOG*; Kurakawa *et al.*, 2007).

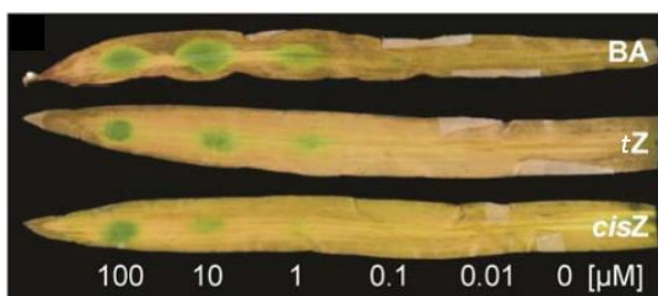


Obr. 10 Strukturální vzorce vybraných cytokininů.

Biosyntéza cytokininů byla zjištěna u několika druhů fytopatogenních hub. Jejich produkce je však zřejmě spojena pouze s obligátním parazitismem biotrofů, popř. hemibiotrofů, neboť u nekrotrofních hub *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* přítomnost cytokininů zjištěna nebyla (Murphy *et al.*, 1996).

U *Plasmodiophora brassicae*, houby parazitující na košťálovinách a způsobující zbytnění napadených orgánů, předpokládal syntézu cytokininů již Dekhuijzen (1981), který je izoloval nejen z plasmodií, ale i cytoplazmy hostitelských buněk. Tento obligátní biotrof je tedy zřejmě využívá ke stimulaci buněčného dělení napadené tkáně, což v konečném důsledku vede ke vzniku nádoru. Aplikací značeného adeninu na plasmodia a jeho následnou přeměnou na *trans*-zeatin pak byla biosyntéza cytokininů u *P. brassicae* potvrzena (Müller a Hilgenberg, 1986).

Cytokininy zřejmě hrají důležitou roli i při tvorbě tzv. zelených ostrůvků. López-Carbonell *et al.* (1998) uvažovali o možnosti jejich zapojení v procesu oddálení senescence, kdy zatímco v zelených ostrůvcích listů *Hedera helix*, *Pelargonium zonale*, *Prunus avium* a *Rubus ulmifolius* napadených *Colletotrichum trichellum*, *Puccinia pelargoinii-zonalis*, *Cercospora circumscissa* a *Phragmidium violaceum* byla hladina zeatinribosidu (ZR) srovnatelná s listy kontrolních rostlin, ve žlutých částech napadených listů bylo ZR oproti kontrole i 12x méně. Zvýšené hladiny cytokininů, zejména zeatinu a ZR, byly zjištěny u infekce *Hordeum vulgare* L. a *Zea mays* houbami *Pyrenophora teres*, resp. *Drechslera maydis* (Angra-Sharma a Sharma, 2000). Infikovaná místa zde zřejmě plní funkci zásobního pletiva, do kterého proudí živiny, a napomáhají tak proliferaci houbového patogena (Angra-Sharma a Sharma, 2000). Behr *et al.* (2012) pak aplikací cytokininů na listy kukuřice ukázali, že i *Colletotrichum graminicola* je schopná oddálit senescenci listů tvorbou zelených ostrůvků (Obr. 11). Největší efekt vykazoval benzyladenin (BA), následovaly *trans*- (tZ) a *cis*-zeatin (*cis*Z).



Obr. 11 Vliv cytokininů na senescenci a tvorbu zelených ostrůvků. Listy kukuřice byly ošetřeny kapkami *N*⁶-benzyladeninu (BA), *trans*-zeatinu (tZ) a *cis*-zeatinu (*cis*Z) v uvedených koncentracích. Fotografie byly pořízeny 3 dny po infekci (Behr *et al.*, 2012; upraveno).

Pro patogenezi rostlin nekrotrofními parazity je charakteristická snížená hladina CKs v infikovaném pletivu. Strategie *Verticillium longisporum* při kolonizaci *Arabidopsis thaliana* a *Brassica napus* je založená na indukované expresi genů kódujících různé isoformy enzymu cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12; Reusche *et al.*, 2013), který katalyzuje irreverzibilní degradaci cytokininů (Galuszka *et al.*, 2001). Jelikož nebyla zjištěna zvýšená exprese senescenčního markeru *SAG12*, uplatňují se CKX geny spíše až při rozvoji senescence než při jejím samotném spouštění (Reusche *et al.*, 2013). Role cytokininů v patogenezi rajčete byla zjištěna i při infekci *Botrytis cinerea*, kde naopak zvýšená hladina CKs u transgenních rostlin vedla k oddálení senescence a zvýšení rezistence rajčete k *B. cinerea* (Swartzberg *et al.*, 2008).

Produkcí cytokininů u *C. purpurea* se zabývali Hinsch *et al.* (2015), kteří identifikovali nejen samotné geny biosyntézy CKs, ale charakterizovali i jejich funkci. Jedná se o vůbec první *de novo* biosyntetickou dráhu cytokininů popsanou u hub. Studie se zabývala charakterizací bifunkčního enzymu cpIPT-LOG, který obsahuje jednak IPT doménu katalyzující první krok biosyntézy CK, tak LOG doménu s fosfoanhydridovou aktivitou enzymu závěrečné reakce. Druhým enzymem zájmu byl cytochrom P450 monooxygenasa (cpp450; EC 1.14.14.1) katalyzující tvorbu *trans*-zeatinu (Takei *et al.*, 2004). Geny *cpIPT-LOG* a *cpp450* se nacházejí v jednom klastru a podílí se na produkci aktivních cytokininů u *C. purpurea*. Experimenty s delečními mutanty těchto genů pak ukázaly, že cytokininy zřejmě hrají důležitou roli v rozvoji hub, neboť u mutantů se sníženou hladinou *trans*-zeatinu (Δ *cpp450*) byla pozorována zvýšená sporulace v axenické kultuře. Virulence na žitě však u obou mutantů (Δ *cpp450* a Δ *cpIPT-LOG*) zůstala nezměněna (Hinsch *et al.*, 2015).

2.2.3 Gibereliny

Již v 19. století byl pozorován abnormální růst sazeniček rýže, jež byly infikovány patogenní houbou *Gibberella fujikuroi*. Onemocnění dostalo později označení „bakanae“ (Obr. 12). Sloučenina, která tuto nemoc způsobuje, byla pojmenována podle jejího původce - giberelin (GA). Později se ukázalo, že se jedná o kyselinu giberelovou (GA₃; Curtis a Cross, 1954; Phinney, 1983).



Obr. 12 Projevy nemoci bakanae u rýže infikované *Gibberella fujikuroi*. (A) stimulovaný růst u infikovaných rostlin (vpravo) oproti neinfikovaným (vlevo; www.camtacgroup.com; upraveno). (B) tvorba kořenů z nodů stonků (www.forestryimages.org; upraveno).

Gibereliny, látky strukturně odvozené od diterpenoidních kyselin, se vyskytují u rostlin, hub i bakterií (MacMillan, 2002), jež syntetizují přes 120 různých GAs. Pouze některé z nich se však uplatňují jako rostlinné hormony, které se účastní dějů regulujících vývojové procesy jako klíčení semen, prodlužování stonku či indukce kvetení. Pro komerční využití se proto dnes GA₃ vyrábí fermentací *G. fujikuroi* (Tudzynski, 1999).

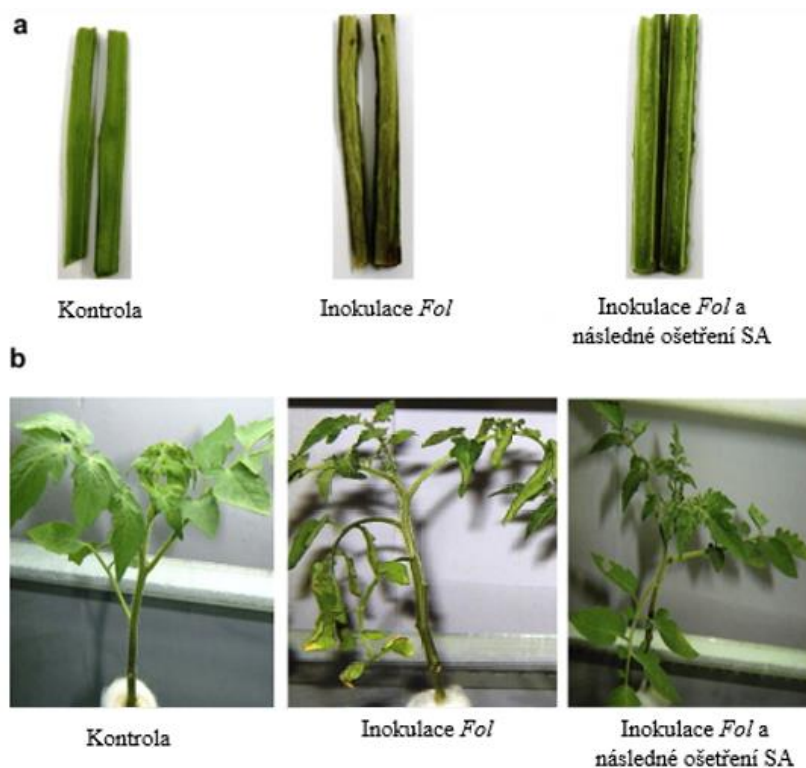
Biosyntéza giberelinů je nejvíce prostudována u *G. fujikuroi* (Tudzynski, 1999; Hedden *et al.*, 2001). Gibereliny však byly identifikovány i u dalších fytopatogenních hub, a to *Phaeosphaeria* sp. (Sassa *et al.*, 1989; Sassa *et al.*, 1994; Seto *et al.*, 1995), *Neurospora crassa* (Kawanabe *et al.*, 1983) a několika zástupců rodu *Sphaceloma* (Rademacher a Grabe, 1979; Zeigler *et al.*, 1980; Rademacher 1992).

Produkce biologicky aktivních giberelinů (GA₁, GA₃, GA₄ a GA₇), spolu s IAA, byla zjištěna také u endofytních hub *Phoma glomerata* a *Penicillium* sp. Aplikací houbové kultury na okurky došlo k výraznému zvětšení biomasy u hostitelské rostliny. V podmínkách solného stresu a stresu suchem byla navíc pozorována i intenzivnější asimilace draslíku, vápníku a hořčíku, tj. zvýšená tolerance vůči těmto abiotickým stresovým podmínkám oproti kontrolním rostlinám (Wagas *et al.*, 2012). Produkce GAs s pozitivním vlivem na růst okurek i v prostředí s vyšší salinitou byla detekována i u *Paecilomyces formosus* (Khan *et al.*, 2012). Tyto houby by tak mohly být využity pro zvýšení výnosu zemědělských plodin rostoucích na půdách s vysokými koncentracemi soli.

2.2.4 Kyselina salicylová

Rostliny si během evoluce vytvořily mechanismus indukované obrany, která jim poskytuje ochranu proti širokému spektru mikroorganismů. Signální molekulou této systémově získané rezistence (SAR) je kyselina salicylová (SA; Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Ta se podílí na indukcii exprese širokého spektra genů kódujících především tzv. PR-proteiny (pathogenesis related, tj. související s patogenitou) účastníci se obranné reakce rostliny vůči patogenům (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992). SA se dále uplatňuje v signalizaci během kvetení, termogeneze či ochraně před oxidativním stresem (Davies, 2004).

Rezistence indukovaná SA u rajčete byla zjištěna při infekci houbou *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Po sedmi dnech byla endogenní hladina SA v infikovaných listech ošetřených SA desetkrát vyšší oproti kontrolním neošetřeným listům. Došlo také ke zvýšení aktivit fenylalaninamoniaklyasy (PAL; EC 4.3.1.5) a peroxidasy (EC 1.11.1.7; Mandal *et al.*, 2009), typických obranných enzymů rostlin (Pallas *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997). U listů infikovaných rostlin ošetřených SA byla pozorována redukce hnědnutí žilnatiny a žloutnutí listů (Mandal *et al.*, 2009; Obr. 13)



Obr. 13 Efekt aplikace kyseliny salicylové (SA; $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a infekce *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) na hydroponický růst rajčat. (A) hnědnutí žilnatiny; (B) žloutnutí listů (Mandal *et al.*, 2009; upraveno).

U *Fusarium equiseti* GF19-1 byla studována symbióza s kořeny *Arabidopsis thaliana*. Houba zde rostlině nezajišťuje pouze nutrienty, ale aktivuje také SAR, a účastní se tak obrany proti různým patogenům. V listech těchto rostlin inokulovaných *Pseudomonas syringae* byla následně zjištěna vyšší hladina SA oproti kontrolním rostlinám infikovaným pouze *F. equiseti*, jež dosahovala maxima po 4 dnech infekce. Koncentrace SA v listech infikovanou pouze *F. equiseti* pak byla i po 24 hod srovnatelná s koncentrací v neinfikovaných rostlinách (Kojima *et al.*, 2013).

Produkce SA však vede i k indukci proteinů, které ji degradují. Rabe *et al.* (2013) identifikovali v genomu *Ustilago maydis* gen *shy1*, jenž pravděpodobně kóduje salicyláthydroxylasu (EC 1.14.13.1). Inokulace kukuřice mutanty s delecí genu *shy1* nicméně vedla k podobnému průběhu infekce jako u kontrolních hub. Nejvyšší exprese salicyláthydroxylasy byla zaznamenána během biotrofní fáze růstu, a tak ji zřejmě *U. maydis* využívá k degradaci SA jako možného zdroje uhlíku, což v konečném důsledku vede ke snížení hladiny SA a potlačení obranné reakce rostliny. Produkce salicyláthydroxylasy byla popsána také u *Aspergillus nidulans* (Graminha *et al.*, 2004), *Fusarium* sp. (Dodge a Wackett, 2005) či *Trichosporon moniliforme* (Iwasaki *et al.*, 2010).

2.2.5 Kyselina abscisová

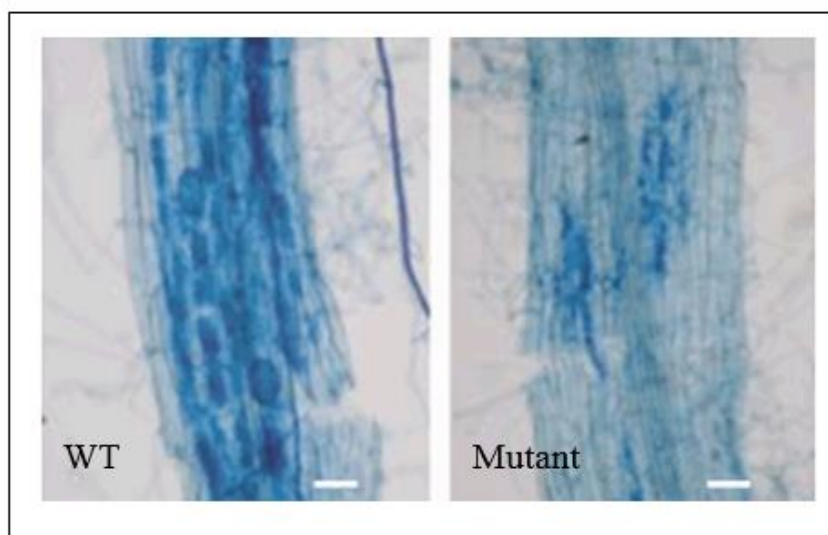
Produkce kyseliny abscisové (ABA), terpenoidu odvozeného od isopentenylu, byla pozorována u několika druhů vláknitých hub (Oritani a Kiyota, 2003). Mnohé z nich jsou zapojeny v symbióze či patogenezí rostlin, ABA tak zřejmě hraje důležitou roli v jejich interakci s rostlinným hostitelem.

Biosyntéza ABA u hub byla studovaná především u *Botrytis cinerea* a zástupců rodu *Cerospora*. Pomocí radioaktivně značené D-glukosy bylo zjištěno, že u hub, na rozdíl od rostlin, kde je výchozí sloučeninou pro tvorbu ABA methylerythritolfosfát, probíhá tvorba ABA drahou přes mevalonát (Hirai *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000).

Bylo zjištěno, že ABA inhibuje aktivitu fenylalaninamoniaklyasy (PAL; Ward *et al.*, 1989; Audenaert *et al.*, 2002), klíčového enzymu metabolismu fenolických látek, které se uplatňují v obranné reakci rostliny (Nicholson, 1992). ABA tak působí proti kyselině salicylové, která naopak stimuluje syntézu PAL proteinu a zvyšuje jeho aktivitu (Wen *et al.*, 2005).

ABA zřejmě potlačuje obrannou reakci *Beta vulgaris* L. při infekci *Cercospora beticola*. V infikovaných listech byla detekována zvýšená hladina ABA 3-9 dní po inokulaci, tj. v době iniciace penetrace a kolonizace *C. beticola*. Po 15 dnech se pak na listech vytvořily nekrotické léze doprovázené vysokými hladinami ABA, které byly srovnatelné s lézemi rostlin stresovaných suchem. Navíc bylo zjištěno, že infekce *C. beticola* stimuluje expresi *BvAREB1* (Schmidt *et al.*, 2008), který vykazuje vysokou homologii s *AtAREB1* genem, jehož exprese zvyšuje u *Arabidopsis thaliana* toleranci k suchu (Fujita *et al.*, 2005).

Důležitá je však i role ABA v arbuskulární mykorrhize (AM). Herrera-Medina *et al.* (2007) studovali průběh infekce *Glomus intraradices* parazitující na WT a mutantech *Lycopersicon esculentum* s deficitem aldehydoxidas (EC 1.2.3.14), jež katalyzuje závěrečný krok biosyntézy ABA, tj. oxidaci ABA aldehydu na ABA (Taylor *et al.*, 1988). Aplikace exogenní ABA zvýšila citlivost WT rajčete k *G. intraradices*. U mutantů byla AM oproti infikovaným WT rostlinám redukována o 70-80 %, a ABA má tedy zřejmě důležitou roli jak při počáteční penetraci hyf, tak samotném rozvoji mykorrhizy (Obr. 14). Navíc byly zjištěny morfologické změny v utváření arbuskulí, které mohou ovlivnit jejich funkčnosti při samotné mykorrhize. V celkovém důsledku tak došlo ke snížení citlivosti rajčete k infekci touto AM houbou (Herrera-Medina *et al.*, 2007).



Obr. 14 Tvorba arbuskulární mykorrhizy v kořenech WT (wild-type) a mutantních rostlinách rajčete (*Lycopersicon esculentum*) s delecí aldehydoxidas. Rostliny byly infikovány *Glomus intraradices*. Obarveno trypanovou modří; měřítko – 50 μ m (Herrera-Medina *et al.*, 2007; upraveno).

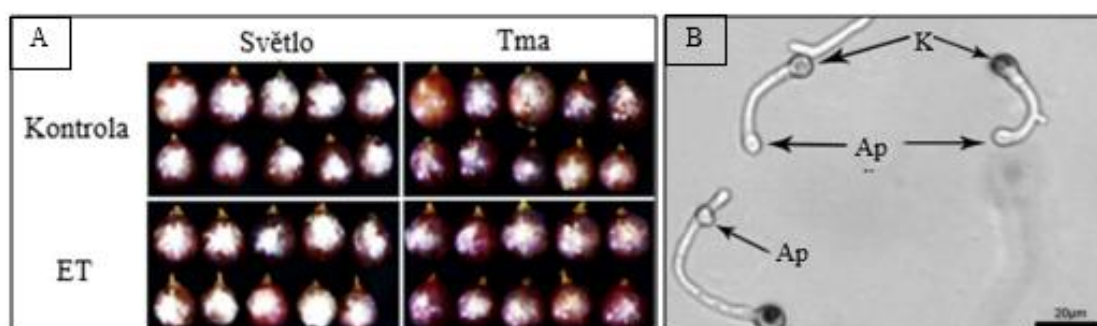
2.2.6 Ethylen

Gane (1934) při pěstování sazeniček hrachu zjistil, že v blízkosti pekařského droždí dochází k inhibici jejich růstu. Biale (1940) a Miller *et al.* (1940) nezávisle na sobě ukázali, že *Penicillium digitatum* má na rostliny stejný účinek jako plynný ethylen (ET). Ilag a Curtis (1968) pak studiem 228 druhů hub zjistili produkci ET u 58 druhů.

Prekurzorem ET u řady fytopatogenních hub jako *Verticillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum* (Tzeng a De Vay, 1984) a *P. digitatum* (Chalutz *et al.*, 1977), je methionin. I *Botrytis cinerea* využívá methionin pro produkci ET, avšak ta se liší v závislosti na hostitelské rostlině. U napadené jahody či plodu kiwi byla zjištěna větší produkce ET oproti hroznovému vínu či borůvkám o 50 % (Qadir *et al.*, 1997).

Kępczyńska (1989) zjistila, že ethylen se u hub podílí na klíčení spor, když aplikací 2,5-norbornadienu, kompetitivního inhibitoru ethylenu, potlačila germinaci spor *B. cinerea*. Ethylen umožňuje houbám správné načasování invaze rostlinného pletiva. Studie zástupců rodu *Colletotrichum*, *C. gloeosporioides* a *C. musae* ukázaly, že plyny uvolněné klimakterickými plody jako rajče, avokádo či banán indukují při infekci klíčení spor a tvorbu apresorií těchto fytopatogenních hub (Flaishman a Kolattukudy, 1994).

Produkci ET u *B. cinerea* se zabývali také Zhu *et al.* (2012). Při pozorování závislosti tvorby plynu na světelných podmínkách zjistili, že více ET bylo uvolněno u infikovaných hroznů kultivovaných na světle. U nenapadených plodů byla pak produkce ET velmi nízká, přičemž ani po osvětlení nedošlo k jejímu zvýšení (Obr. 15-A). Tvorba plynu také zřejmě úzce souvisí s rozvojem nemoci u napadených hroznů, jelikož ET byl detekován již 24 h před objevením prvních symptomů. Aplikace vnějšího ET na *B. cinerea* pak měla pozitivní vliv na růst hyf i tvorbu apresorií (Obr. 15-B).



Obr. 15 (A) Vliv světla a exogenního ethylenu na rozvoj šedé plísně na hroznových plodech infikovaných *Botrytis cinerea*. Konečná koncentrace ethylenu (ET) = $100 \mu\text{l}^{-1}$. Výsledky zpracovány po 5 dnech kultivace. (B) Působení ET ($10 \mu\text{l}^{-1}$) na klíčení konidií *B. cinerea*. Měřítko – 20 μm ; (K) konidie; (Ap) apresorium (Zhu *et al.*, 2012; upraveno).

2.2.7 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová (JA) a její deriváty, především pak methylester, patří k významným hormonálním regulátorům, které se uplatňují nejen v reakcích rostlin na stresové podmínky, ale také v samotném vývoji rostlin při senescenci listů, inhibici klíčení semen či pylové láčky. Významnou roli však mají i v obraně rostlin vůči patogenům, kdy se spolu s ethylenem účastní indukované systémové rezistence (ISR; Wasternack a Hause, 2013). JA zde zvyšuje expresi genů kódujících rostlinné obranné proteiny jako thionin (Epple *et al.*, 1995), defensin (Penninckx *et al.*, 1996) či VSP (vegetative storage protein se zásobní funkcí; Anderson *et al.*, 1989).

JA, 3-oxo-2-(2'-*cis*-pentenyl)cyklopentan-1-octová kyselina, byla poprvé izolována v roce 1971 z fytopatogenní houby *Lasiodiplodia theobromae* (Aldridge *et al.*, 1971). Tvorba JA zde zřejmě probíhá podobně jako u rostlin, tj. z kyseliny α -linolenové oktadekanoidní drahou (Vick a Zimmerman, 1984), liší se však v kroku redukce cyklopentanonu (Tsukada *et al.*, 2010).

Možné zapojení JA v arbuskulární mykorhize rostlin s mutualistickými houbami byla nejdříve studována pomocí experimentů spojených s aplikací exogenní JA. Při vystavení *Allium sativum* nízké koncentraci JA ($5 \mu\text{mol l}^{-1}$; jednou týdně) bylo stimulováno zakládání mykorhizy (Regvar *et al.*, 1996). Vyšší koncentrace JA ($0,05$ - 5 mmol l^{-1} ; každý druhý den) však u listů *Cucumis sativus*, *Tropus majus* a *Carica papaya* vedly k její redukci (Ludwig-Müller *et al.*, 2002). Další studie nicméně opět uvádějí zvýšenou hladinu JA u mykorhizních rostlin oproti kontrolám (Meixner *et al.*, 2005; Stumpe *et al.*, 2005).

Shoresh *et al.* (2005) se věnovali společnému působení JA a ET u okurky infikované *Trichoderma asperellum*. Analýzou RT-PCR bylo zjištěno, že *T. asperellum* se podílí na regulaci exprese genů zapojených v signalizační dráze JA/ET, tj. v ISR (*Lox1*, *Pall*, *ETR1* a *CTR1*) v hostitelských rostlinách. Následná inokulace *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* vedla ke zvýšení exprese PR-proteinů, konkrétně chitinasy (EC 3.2.1.14), β -1,3-glukanasy (EC 3.2.1.39) a peroxidasy (EC 1.11.1.7). *T. asperellum* tak zvyšuje rezistenci rostliny k následné infekci dalším patogenem.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Claviceps purpurea 20.1

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

3.1.2 Chemikálie

1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

10x CutSmart pufr (NEB, Velká Británie)

10x NEB 1.1 pufr (NEB, Velká Británie)

10x NEB 4 pufr (NEB, Velká Británie)

10x Turbo pufr (Ambion, USA)

5x GoTaq pufr (Promega, USA)

6x Loading Dye vzorkovací pufr (Thermo Scientific, USA)

Agar (HiMedia, Indie)

Agarosa (Amresco, USA)

Amoniak vodný roztok 25 % (Lach:ner, ČR)

Anti-digoxigenin-AP (Roche, Švýcarsko)

ApaLI (NEB, Velká Británie)

Blokovací reagent (Roche, Švýcarsko)

Bromid ethidia (NeoLab, Německo)

Citrát sodný dihydrát (Lach:ner, ČR)

CSPD (Roche, Švýcarsko)

DEPC (Sigma-Aldrich, USA)

DIG-labeled DNA molecular weight marker II (Roche, Švýcarsko)

Dihydrogenfosforečnan draselný (AppliChem, Německo)

DMSO (Duchefa, Nizozemí)

dNTPs (Fermentas, Kanada)

D-sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)

EDTA (Penta, ČR)

Ethanol (Penta, ČR)

Ethylacetát (Lach:ner, ČR)
Formamid (Fluka, Německo)
Gamborg B5 medium (Duchefa, Nizozemí)
Glukosa (Lach:ner, ČR)
GoTaq G2 Flexi polymerasa (Promega, USA)
Hydrogenfosforečnan draselný (Lach:ner, ČR)
Hydroxid draselný (Lach:ner, ČR)
Hydroxid sodný (Penta, ČR)
Chlorid hořečnatý (Promega, USA)
Chlorid sodný (Lach:ner, ČR)
Chlorid vápenatý (Penta, ČR)
Chlorid železitý hexahydrát (Sigma-Aldrich, USA)
IAA (Sigma-Aldrich, USA)
IAM (Sigma-Aldrich, USA)
Isopropanol (Lach:ner, ČR)
Kyselina chlorovodíková 36% (Lachema, ČR)
Kyselina maleinová (Lachema, ČR)
Kyselina sírová 98 % (Lach:ner, ČR)
L-asparagin monohydrát (HiMedia, Indie)
LB Broth (Sigma-Aldrich, USA)
L-tryptofan (Sigma-Aldrich, USA)
Lyzační enzym z *Trichoderma harzianum* (Sigma, USA)
Methanol (Lach:ner, ČR)
N-laurosylsarkosin (Sigma, USA)
Octan amonný (Lachema, ČR)
Octan draselný (Penta, ČR)
PEG 6000 (AppliChem, Německo)
Phleomycin (Duchefa, Nizozemí)
RNase-free voda (Qiagen, Německo)
Sacharosa (Lach:ner, ČR)
SDS (Penta, ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát (Lach:ner, ČR)
Tris (AppliChem, Německo)
Turbo DNasa (Ambion, USA)

Tween20 (NeoLab, Německo)

XhoI (NEB, Velká Británie)

3.1.3 Primery

dia_Cp1aaH_fw	5'-GAAGCAACGACATGAAGAAGG-3'
dia_Cp1aaH_rev	5'-AGCAAACTGCGACAATCAC-3'
dia_Cp1aaH_WT_fw	5'-TTCCAGCAGGGCTGACTACT-3'
Phleo_Hi3F2	5'-GTGTTCAGGATCTCGATAAGATACG-3'
Phleo_out_Hefe3	5'-GAGCTCGGTATAAGCTCTCC-3'

(lyofilizáty byly rozpuštěny v Nuclease-Free vodě na koncentraci 100 mmol⁻¹; Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4 Roztoky a média

1% (w/v) agarosový gel

1 g agarosy v 100 ml TAE pufru

10x blokovací reagent

2 g blokovacího prášku v 20 ml pufru kyseliny maleinové; autoklávováno

0,2mol⁻¹ malát draselný

600 ml 0,2mol⁻¹ hydroxid draselný, 200 ml 0,2mol⁻¹ pufr kyseliny maleinové; pH = 5,2

20x SSC pufr

3mol⁻¹ chlorid sodný, 300mmol⁻¹ citrát sodný dihydrát, pH = 7,0; autoklávováno

Blokovací roztok

1 ml 10x blokovací reagent, 10 ml pufru kyseliny maleinové

Denaturační roztok

0,5mol⁻¹ hydroxid sodný, 1,5mol⁻¹ chlorid sodný; autoklávováno

DEPC voda

0,1% (v/v) DEPC v ddH₂O, inkubováno přes noc při pokojové teplotě; autoklávováno

Detekční pufr

0,1mol⁻¹ chlorid sodný, 0,1mol⁻¹ Tris; pH = 9,5; autoklávováno

Gamborg medium

0,75 g agarosa, 0,3 g Gamborg B5 medium, 1 g glukosa ve 100 ml destilované vody

Kultivační BII agar

12 g agar, 1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 5 g L-asparagin monohydrát, 5 g pepton, 100 g sacharosa, 0,5 g síran hořečnatý pentahydrát; doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2; autoklávováno

Kultivační BII medium

1 g dihydrogenfosforečnan draselný, 5 g L-asparagin monohydrát, 5 g pepton, 100 g sacharosa, 0,5 g síran hořečnatý pentahydrát; doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 5,2; autoklávováno

LB médium

9,5 g chlorid sodný, 15,5 g LB Broth; doplněno do 1 l destilovanou vodou; autoklávováno

Na⁺ fosfátový pufr

2,14 g dihydrogenfosforečnan sodný, 8,74 g hydrogenfosforečnan sodný; rozpuštěno ve 40 ml DEPC vody; autoklávováno

Neutralizační roztok

1,5 mol l⁻¹ chlorid sodný, 0,5 mol l⁻¹ Tris; pH = 7,5; autoklávováno

PEG roztok

0,05 mol l⁻¹ chlorid vápenatý, 25% PEG 6000, 0,1 mol l⁻¹ Tris; pH = 7,5; sterilizováno přes 0,22 μm filtr

Prehybridizační roztok

4 ml blokovací roztok, 10 ml formamid, 1 ml Na⁺ fosfátový pufr, 0,2 ml *N*-lauroylsarkosin, 1,4 g SDS, 5 ml 20x SSC

Promývací pufr

0,15 mol l⁻¹ chlorid sodný, 0,1 mol l⁻¹ maleinová kyselina, 0,3% (v/v) Tween1; pH = 7,5; autoklávováno

Protoplastizační roztok

100 mg lyzační enzym z *Trichoderma harzianum*, 20 ml SMaC; pH = 5,2; sterilizováno přes 22 μm filtr

Pufr kyseliny maleinové

0,15 mol l⁻¹ chlorid sodný, 0,1 mol l⁻¹ maleinová kyselina; pH = 7,5; autoklávováno

Pufr s nízkou stringencí

0,1% (w/v) SDS, 2x SSC pufr; rozpuštěno v DEPC vodě

Pufr s vysokou stringencí

0,1% (w/v) SDS, 0,1 mol l⁻¹ SSC pufr, rozpuštěno v DEPC vodě; autoklávováno

Salkowského reagent

0,1015 g chlorid železitý hexahydrát, 15 ml 96% kyselina sírová, 25 ml destilované vody

SMaC pufr

0,05mol·l⁻¹ chlorid sodný, 0,85mol·l⁻¹ D-sorbitol, 0,2mol·l⁻¹ malát draselný; autoklávováno

STC pufr

0,05mol·l⁻¹ chlorid vápenatý, 0,85mol·l⁻¹ D-sorbitol, 0,01mol·l⁻¹ Tris; pH = 7,5; autoklávováno

TAE pufr

1mol·l⁻¹ EDTA, 40mol·l⁻¹ Tris-acetát; pH = 8

Transformační BII agar

2,4 g agar, 0,2 g hydrogenfosforečnan draselný, 1 g L-asparagin monohydrát, 1 g pepton, 40 g sacharosa, 0,1 g síran hořečnatý pentahydrát; doplněno do 200 ml destilovanou vodou, pH = 8; autoklávováno

3.1.5 Laboratorní pomůcky

3 MM Whatman papíry (Sigma-Aldrich, USA)

Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)

Filtr s velikostí pórů 0,22 μm (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko)

Miracloth membrána (Calbiochem, ČR)

Nylonová membrána (Fluka, Německo)

TLC Silicagel 60G F254 (Merck, Německo)

3.1.6 Kity a návody

DIG RNA labeling Kit (Roche, Švýcarsko)

Qiagen PCR cloning kit (Qiagen, Německo)

QIAprep Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo)

QIAprep Spin Maxiprep kit (Qiagen, Německo)

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

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)

3.1.7 Programy a software

AlphaDigiDoc RT Gel Documentation System (Alpha Innotech, USA)

ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA)

ImageJ (National Institutes of Health, USA)

Optika Vision Lite/OPTIKA IsView (OPTIKA, Itálie)

3.1.8 Přístroje

Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko)

Digitální fotoaparát Panasonic Lumix TZ6 (Panasonic, Japonsko)

Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)

Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)

Flowbox (MERCİ, ČR)

Hybridizační pec (Thermo Electron Corporation, USA)

Inkubátor (Mettler, Německo)

Laboratorní mixér SJB-S 450 (Siehe, Čína)

Lyofilizátor SeduVac (LaboGene, Dánsko)

Megafuga Heraeus 40R (Thermo Scientific, USA)

Mikroskop Helago B-382PHi-ALC (Helago, ČR)

NanoDrop NAS 99 spektrofotometr (ACT, USA)

Parní sterilizátor Sterivap (BMT Medical Technology, ČR)

Rotátor Revolver (Labnet, USA)

SpeedVac SPD (Thermo Electron Corporation, USA)

Sušárna MOV-212F (Sanyo, Japonsko)

Termoblok (BIOER, Čína)

Termocykler T-gradient (Biometra, Německo)

Třepačka Orbit 1000 (Labnet, USA)

UV/VIS spektrofotometr (Agilent, USA)

UV-kroslinker-DNA-CL-1 (Herolab, Německo)

UV-transiluminátor UVT-20 M-HC (Herolab, Německo)

Vortex (Labnet, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.2 Metody

Během celého experimentu byla houba *C. purpurea* pěstována v inkubátoru ve tmě při 26 °C. Veškeré práce s *C. purpurea* probíhaly ve flowboxu.

3.2.1 Příprava rezistenční kazety pro transformaci *C. purpurea* 20.1

3.2.1.1 Izolace plasmidové DNA

Plasmid *pRS426::ΔCpiaaH* s konstruktem obsahujícím 3' a 5' okrajové sekvence genu *CpiaaH* *C. purpurea* 20.1 spolu s kazetou s rezistencí na phleomycin byl izolován z transformovaných chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* TOP 10 pomocí QIAprep Spin Maxiprep Kitu (Qiagen, Německo). Všechny centrifugace probíhaly při 3500 rpm a 4 °C. Kultura transformovaných buněk *E. coli* pěstovaných v LB mediu o objemu 100 ml byla centrifugována (10 min) a bakteriální pelet byl resuspendován v 10 ml P1 pufru (4 °C). Po přidání 10 ml P2 pufru byla suspenze buněk promíchána a inkubována 5 min při pokojové teplotě (RT). Následně bylo přidáno 10 ml P3 pufru (4 °C) a směs byla po promíchání inkubována 20 min na ledu. Po centrifugaci (30 min) byl supernatant přefiltrován přes QIA MAXI filtr a přelit do QIAGEN-tip 500 kolonky, která byla před použitím ekvilibrována 10 ml QBT pufru, jenž se přes kolonku nechal volně protéct. Po protečení lyzátu byla plasmidová DNA na kolonce dvakrát promyta 30 ml QC pufru a následně eluována 15 ml QF pufru. Přidáním 10,5 ml isopropanolu byla DNA vysrážena. Po centrifugaci (30 min) byl pelet dvakrát promyt 5 ml 70% ethanolu (10 min). Po jeho vysušení byla DNA rozpuštěna v 1000 μl vody.

3.2.1.2 Restrikce *pRS426::ΔCpiaaH* plasmidu enzymem *XhoI*

Pro vyštěpení rezistenční kazety s okrajovými sekvencemi genu *CpiaaH* z plasmidu *pRS426::ΔCpiaaH* byla použita restrikční endonukleasa *XhoI* (Tab. 1). Restrikční směs byla inkubována při 37 °C do dalšího dne.

Tab. 1 Restrikce konstruktu *pRS426::ΔCpiaaH* enzymem *XhoI*

Složka	Objem [μl]
<i>pRS426::ΔCpiaaH</i> (10 μg)	15
<i>XhoI</i> (20 000 U/ml)	0,5
10x NEB 4 pufr	8
H ₂ O	56,5
Celkový objem	80

3.2.1.3 Elektroforetická separace a purifikace DNA fragmentu z agarosového gelu

K restriční směsi bylo přidáno 16 µl vzorkovacího pufru 6x Loading Dye. Fragменты DNA byly separovány pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu, pro zviditelnění DNA bylo do gelu přidáno 10 µl 0,5% bromidu ethidia. Separace probíhala v 1x TAE pufru při napětí 120 V po dobu 30 min. Jako standard byl použit 1kb DNA Ladder.

Separovaný fragment DNA odpovídající velikosti rezistenční kazety s 3' a 5'okrajovými sekvencemi genu *CpialaH* (3200 bp) byl z gelu vyříznut za použití sterilního skalpelu a UV-transiluminátoru, proužek gelu byl umístěn do 1,5ml mikrozkušavky. DNA byla z gelu přečištěna pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Gel byl rozpuštěn ve 150 µl Membrane Binding Solution při 60 °C (10 µl roztoku na 10 mg gelu). Směs byla napipetována na SV kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a inkubována 1 min při pokojové teplotě. Všechny následující centrifugace probíhaly při 16 000 g a pokojové teplotě (RT). Po centrifugaci (1 min) byla kolonka s navázanou DNA promyta 700 µl Membrane Wash Solution (centrifugace 1 min), a poté 500 µl Membrane Wash Solution (centrifugace 5 min). Pro odpaření zbytkového ethanolu byla kolonka ve zkumavce naprázdno centrifugována (1 min). Po umístění kolonky do čisté 1,5ml mikrozkušavky byl DNA fragment z kolonky eluován 50 µl Nuclease-free vody (inkubace 1 min, RT; poté centrifugace 1 min).

3.2.2 Transformace *C. purpurea* 20.1

3.2.2.1 Izolace protoplastů

Kultivační BII médium (50 ml) v Erlenmayerově baňce (250 ml) bylo inokulováno mycelií *C. purpurea* 20.1. Inkubace na třepačce (180 rpm) probíhala po dobu tří dnů. Poté byla mycelia centrifugována (3500 rpm, 10 min, RT) a pelet byl promyt 20 ml SMaC pufru (3500 rpm, 10 min, RT). Po resuspendování peletu v protoplastizačním roztoku a následné 1hod inkubaci (80 rpm, 28 °C) byla suspenze s protoplasty přefiltrována přes Nytexovou membránu do kádinky, filtrát byl přelit do 50ml zkumavky Falcon a centrifugován 10 min (900 g, RT). Pelet byl dvakrát promyt 5 ml STC pufru (900 g, 10 min, RT), poté byly protoplasty resuspendovány v 1 ml STC pufru. Pomocí Bürkerovy komůrky a světelného mikroskopu (400x zvětšení) byla zkontrolována hustota protoplastů (optimální hodnota - $5 \cdot 10^8$ protoplastů v 1 ml).

3.2.2.2 Transformace protoplastů

Pro transformaci *C. purpurea* 20.1 byla v 15ml zkumavce Falcon připravena transformační směs, která obsahovala 90 μl STC pufru, 50 μl roztoku PEG, 100 μl suspenze protoplastů a 10 μl (5-10 μg) DNA. Po 20min inkubaci (RT) byly ke směsi napipetovány 2 ml roztoku PEG. Za 5 min byly do zkumavky napipetovány 4 ml STC pufru.

Pro kultivaci protoplastů bylo připraveno 200 ml BII transformačního agaru (50 °C). Petriho miska s 20 ml BII agaru byla inokulována 11 μl suspenze izolovaných protoplastů. Tato protoplastizační kontrola sloužila pro ověření schopnosti růstu buněk hub i po odstranění buněčné stěny, a tedy kontrolu provedení izolace protoplastů. Pro kontrolu procesu transformace, tj. ověření životaschopnosti protoplastů po samotné transformaci, bylo k 20 ml BII agaru připipetováno 690 μl transformační směsi. Ke zbylým 160 ml BII agaru bylo pro výslednou koncentraci phleomycinu 33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ připipetováno 52,8 μl zásobního roztoku antibiotika (100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Celkem 8 Petriho misek s 20 ml tohoto agaru bylo inokulováno 690 μl transformační směsi.

Mycelia *C. purpurea* narostlá z jednotlivých protoplastů byla poté přeočkována na misky s BII agarem s vyšší koncentrací antibiotika, tj. 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.2.3 Ověření transformace diagnostickou PCR

3.2.3.1 Izolace genomické DNA

Z transformantů *C. purpurea* rostoucích na BII agaru s koncentrací phleomycinu 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly vyřezány části mycelií a umístěny do 2ml mikrozkuvek s propíchnutým víčkem. Po zalití zkumavek tekutým dusíkem byla mycelia přes noc lyofilizována (-110 °C; 0,410 mbar).

Lyofilizované mycelium umístěné v nové 2ml mikrozkuavce bylo po ochlazení tekutým dusíkem rozdrveno špachtlí. Následné centrifugace probíhaly při 21 000 g a 4 °C. K rozdrčenému myceliu bylo přidáno 600 μl Lyzačního pufru a po 10min inkubaci na třepačce (300 rpm, RT) bylo k suspenzi mycelia připipetováno 400 μl 5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu draselného, centrifugace 20 min. Supernatant byl přepipetován k 1 ml isopropanolu v nových 2ml mikrozkuvkách. Po centrifugaci (30 min) byl pelet promyt 300 μl 70% ethanolu (-20 °C), centrifugace 5 min, a následně vysušen v digestoři (30 min). DNA byla rozpuštěna v 50 μl sterilní vody.

3.2.3.2 Diagnostická PCR

Pro základní analýzu pravděpodobných transformantů *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpiaaH* byla použita diagnostická PCR. Izolovaná genomická DNA (gDNA) z primárních mutantů sloužila jako templát pro PCR reakce. Složení reakčních směsí se až na použité kombinace primerů nelišilo (Tab. 2), podmínky v termocykleru byly pro všechny reakce stejné (Tab. 3)

První PCR premix obsahoval primery dia_CpiaaH_fw a Phleo_Hi3F2, druhý kombinaci primerů dia_CpiaaH_rev a Phleo_Hefe3, do třetí reakce byly přidány primery dia_CpiaaH_WT_fw a dia_CpiaaH_rev.

3.2.3.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Fragmenty DNA amplifikované během PCR reakcí byly separovány gelovou elektroforézou v 1% agarosovém gelu (3.2.1.3). K 10 μ l vzorku byly přidány 2 μ l vzorkovacího pufru 6x Loading Dye, jako standard byl použit 1kb DNA Ladder. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 20 min. Po separaci byl gel přenesen na UV-transiluminátor, snímek byl vytvořen pomocí AlphaDigi dokumentačního gelového systému a programu Alpha DigiDoc RT (Alpha Innotech, USA).

Tab. 2 Složení reakční směsi pro PCR reakci s GoTaq Flexi polymerasou

Složka	Objem [μ l]
gDNA <i>C. purpurea</i> 20.1 (100 ng)	1
5x GoTaq pufr	2,5
GoTaq G2 Flexi polymerasa (10 mmol \cdot l $^{-1}$)	0,07
MgCl $_2$ (25 mmol \cdot l $^{-1}$)	0,75
dNTPs (10 mmol \cdot l $^{-1}$)	0,25
Forward primer (10 mmol \cdot l $^{-1}$)	0,25
Reverse primer (10 mmol \cdot l $^{-1}$)	0,25
H $_2$ O	7,43
Celkový objem	12,5

Tab. 3 Podmínky pro diagnostickou PCR reakci s GoTaq Flexi polymerasou

Krok	Teplota[$^{\circ}$ C]	Čas[s]
1. Počáteční denaturace	95	120
2. Denaturace	95	30
3. Hybridizace primerů	58	30
4. Elongace	72	80
5. Závěrečná elongace	72	300

Cyklus 2-4 byl opakován 35x.

3.2.4 Příprava RNA próby pro Southern blot

3.2.4.1 Restrikce *pDRIVE* plasmidu s 3' okrajovou sekvencí genu *CpiaaH* enzymem *XhoI*

Pro vytvoření RNA próby byl jako templát použit linearizovaný *pDRIVE* vektor obsahující 3' okrajovou sekvencí genu *CpiaaH* *C. purpurea* 20.1, která je součástí i konstruktů pro knock-out. Plasmidová DNA (3 µg) byla naštěpena enzymem *XhoI* v prostředí 10x CutSmart pufru, restrikční směs byla inkubována při 37 °C.

3.2.4.2 Purifikace naštěpené DNA z restrikční směsi

Naštěpená plasmidová DNA byla z restrikční směsi purifikována pomocí QIAquick Gel Extraction kitu (Qiagen, Německo). Všechny centrifugace probíhaly při 18 000 g a pokojové teplotě. K restrikční směsi bylo napipetováno 200 µl PB pufru (5x objem restrikční směsi). Po přepipetování do QIAquick kolonky byla směs centrifugována po dobu 1 min. DNA zachycená na kolonce byla nejdříve promyta 500 µl QC pufru (centrifugace 1 min), a poté 750 µl PE pufru (centrifugace 1 min). Pro úplné odstranění PE pufru byla kolonka se sběrnou mikrozkuvkou naprázdno stočena po dobu 1 min. Po přenesení kolonky do nové 1,5ml mikrozkuvky byla DNA eluována 16 µl Nuclease-free vody (inkubace 1 min, RT; centrifugace 1 min, RT).

3.2.4.3 *In vitro* transkripce

Purifikovaná templátová DNA byla přepsána do sekvence RNA pomocí DIG RNA labeling kitu (Roche, Švýcarsko).

Pro vytvoření RNA próby byl použit 1 µg DNA templátu, který byl doplněn Nuclease-free vodou na objem 13 µl. Na ledu pak byly k DNA přidány další reagenty reakční směsi (Tab. 4) a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hodin. Přidáním 2 µl roztoku EDTA (0,2 mol·l⁻¹; pH = 8,0) byl přepis DNA do RNA zastaven.

Připravená RNA próba byla analyzována elektroforetickou separací v 1% agarosovém gelu (3.2.1.3). Vzorek byl připraven z 2 µl RNA transkriptu, ke kterému bylo přidáno 6 µl vzorkovacího pufru 6x Loading Dye. Připravená směs byla inkubována 10 min při 65 °C a poté okamžitě přenesena na led. Jako standard byl použit 1kb DNA Ladder.

Tab. 4 Složení reakční směsi pro vytvoření RNA próby značené digoxigeninem transkripcí *in vitro* (DIG RNA labeling kit; Roche, Švýcarsko)

Složka	Objem [μl]
DNA	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
RNA polymerasa T7	2
Inhibitor RNasy	1
Celkový objem	20

3.2.5 Příprava vzorků gDNA pro Southern blot

3.2.5.1 Restrikce gDNA *C. purpurea* enzymem *ApaLI*

Ze čtyř předpokládaných mutantů *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpiaaH* a WT *C. purpurea* 20.1 byla izolována gDNA (3.2.3.1). Ve 100μl reakci bylo 15 μg gDNA štěpeno s 10 μl *ApaLI* restrikční endonukleasy přes noc (37 °C).

3.2.5.2 Ethanolová precipitace

Naštěpená gDNA byla z restrikční směsi přečištěna a zakoncentrována ethanolovou precipitací. Restrikční směs (100 μl) byla spolu s 10 μl roztoku 5mol·l⁻¹ octanu amonného vortexována a poté smíchána s 275 μl 96% ethanolu (-20 °C). Po 30min inkubaci (-20 °C) byla směs centrifugována (21 000 g, 15 min, 4 °C). Následně byl pelet DNA promyt 1 ml 70% ethanolu (-20 °C; centrifugace 21 000 g, 5 min, 4 °C). Po odpaření zbytkového ethanolu v digestoři byla DNA rozpuštěna v 15 μl Nuclease-free vody.

3.2.6 Southern blot

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

3.2.6.1 Elektroforéza v agarosovém gelu, promývání gelu

Separace fragmentů naštěpené a zakoncentrované gDNA byla provedena elektroforeticky v 1% agarosovém gelu v 1x TAE pufru, kdy ke 12 μl vzorku DNA byly přidány 3 μl vzorkovacího pufru 6x Loading Dye. Při konstantním napětí 90 V probíhala elektroforéza po dobu 1 hod s použitím DIG-labeled DNA molecular weight markeru II jako standardu.

Gel se separovanými fragmenty DNA byl poté umístěn na třepačku (300 rpm, RT) a promýván Denaturačním roztokem (2x 15 min). Po omytí sterilní vodou byl gel ponořen do Neutralizačního roztoku (2x 15 min). Závěrečná inkubace gelu s 20x SSC přenosovým pufrům probíhala po dobu 10 min.

3.2.6.2 Kapilární přenos gDNA

DNA byla z agarosového gelu přenesena na pozitivně nabitou nylonovou membránu na základě působení kapilárních sil. Pro transfer DNA fragmentů byla sestavena aparatura „sandwichového typu“. Na gel byla položena nylonová membrána, na niž byly postupně vrstveny 3 MM Whatman papíry spolu s papírovými ubrousky. Gel byl položen na filtrační papír, který byl namočen do zásobníku 20x SSC přenosového pufru. Zatížení aparatury závažím pak zajistilo lepší kontakt jednotlivých vrstev. Při laboratorní teplotě probíhal přenos DNA po dobu 12 hodin.

Přenesené fragmenty DNA byly na membráně zafixovány pomocí UV-crosslinkingu. Expozice UV záření probíhala po dobu 100 s (500 J).

3.2.6.3 Prehybridizace a hybridizace, promývání membrány

Membrána byla umístěna do 50ml zkumavky Falcon a inkubována v hybridizační peci s 20 ml Prehybridizačního roztoku při 50 °C po dobu 30 min. Poté byl Prehybridizační roztok spolu se značenou RNA próbou použit k přípravě Hybridizačního roztoku. Značená RNA próba o objemu 5 µl byla rozpuštěna v 50 µl Nuclease-free vody. Připravená směs byla při 100 °C inkubována 7 min a poté okamžitě přenesena na led. Připravená próba byla smíchána s 5 ml Prehybridizačního roztoku. S Hybridizačním roztokem byla membrána inkubována v hybridizační peci při 50 °C do dalšího dne.

Pro odmytí nenavázané RNA próby byla membrána postupně promývána pufrům s rostoucí stringencí. Všechny následné inkubace membrány probíhaly při laboratorní teplotě. Nejdříve byla membrána v 50ml zkumavce Falcon umístěná na rotátoru inkubována s 20 ml Pufru s nízkou stringencí (2x 15 min), další inkubace probíhala s 20 ml Pufru s vysokou stringencí (2x 15 min). Poté byla membrána umístěná na třepačce (300 rpm) promývána 2 min Promývacím pufrům. Následovala inkubace s Blokovacím roztokem po dobu 30 min.

3.2.6.4 Detekce

Detekce fragmentů hybridizovaných s digoxigeninem značenou RNA próbou byla provedena s použitím protilátky Anti-digoxigenin-AP. Po centrifugaci (11 000 g, 5 min, 4 °C) byly 2 µl této protilátky smíchány s 20 ml Blokovacího roztoku. Po 30min inkubaci s tímto roztokem byla membrána umístěná na třepačce (300 rpm) ponořena do Promývacího pufru (2x 15 min). Následovala inkubace s Detekčním pufrem (3 min). Všechny inkubace probíhaly při laboratorní teplotě.

K membráně byl napipetován 1 ml chemiluminiscenčního substrátu CSPD. Po 5 min inkubaci byl roztok substrátu z membrány odstraněn, membrána byla zabalena do průhledné fólie a inkubována při 37 °C po dobu 10 min. Snímek byl pořízen pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP Imaging System (Biorad, USA).

3.2.7 Fenotyp mutantu $\Delta CpiaaH$

Růstové vlastnosti $\Delta CpiaaH$ a WT *C. purpurea* 20.1 byly porovnávány kultivací hub na Petriho miskách s BII kultivačním agarem. Experiment byl proveden i s BII kultivačním agarem obsahujícím IAA o koncentraci 1 µmol·l⁻¹, 10 µmol·l⁻¹ a 100 µmol·l⁻¹ (rozpuštěno v DMSO; jako kontrola stejný objem DMSO).

Četnost větvení hyf a přítomnost sept byla pozorována mikroskopicky (100x a 400x zvětšení). Mycelia transformanta $\Delta CpiaaH$ a WT byla pěstována na Gamborg mediu, jenž bylo v tenké vrstvě hokejkou rozetřeno na podložní sklíčko (400 µl media na sklíčko). Po dvou dnech kultivace byly kousky mycelií z podložního sklíčka opatrně strženy a hyfy byly po zakápnutí vodou přikryty krycím sklíčkem. Snímky byly pořízeny s programem Optika Vision Lite/OPTIKA IsView (OPTIKA, Itálie).

3.2.8. TLC

Auxiny produkované houbami $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 a uvolněné do kultivačního media byly separovány pomocí TLC. Během kultivace a zpracování byla média uchovávána v neprůsvitných nádobách, neboť auxiny jsou na světle degradovány (Yamakawa *et al.*, 1979).

Erlenmayerovy baňky (250 ml) s 50 ml BII kultivačního media byly inokulovány mycelií mutantu $\Delta CpiaaH$ a WT *C. purpurea* 20.1. Všechny následující centrifugace probíhaly při 4 000 rpm a RT. Po 5denní kultivaci byla mycelia centrifugována (10 min) a promyta 20 ml čistého BII kultivačního media (centrifugace 10 min).

Po rozmixování mycelií v 10 ml BII media byly Erlenmayerovy baňky (250 ml) s 50 ml BII kultivačního media a s 50 ml BII kultivačního media obohaceném o 4 mmol l^{-1} L-Trp inokulovány 1 ml myceliární suspenze.

Po 6 dnech kultivace byla média za sníženého tlaku filtrována přes Büchnerovu nálevku s Miracloth membránou a jejich pH bylo upraveno na hodnotu 2,8 pomocí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ HCl.

Auxiny byly z media extrahovány do ethylacetátu. Ve 2ml mikrozkuhavce bylo smícháno 800 μl media s 800 μl ethylacetátu. Vytřepávání probíhalo na třepačce (300 rpm, RT) po dobu 10 min. Po vytvoření rozhraní mezi oběma vrstvami byl horní ethylacetátový extrakt opatrně přepipetován do 1,5ml neprůsvitné zkumavky. Medium bylo poté vytřepáno podruhé, opět s 800 μl ethylacetátu (300 rpm, 10 min, RT). Po vakuovém odpaření ethylacetátu na SpeedVacu (RT) byl pelet rozpuštěn v 30 μl methanolu.

Připravené vzorky (15 μl) byly postupně nanášeny na vrstvu Silufolu ve vzdálenosti 5 cm od spodního okraje ve formě 1cm proužků. Jako standardy byly použity IAA, IAM a L-Trp (1 mmol l^{-1} methanolové roztoky). Po odpaření methanolu byl Silufol ve vertikální poloze uzavřen do chromatografické komory s mobilní fází, jež byla připravena smícháním ethylacetátu, isopropanolu a vodného roztoku amoniaku v poměru 45:35:20. Analýza byla dokončena, když čelo mobilní fáze dorazilo přibližně 1 cm od horního okraje Silufolu. Tato vzdálenost byla poté na Silufolu zaznačena.

Detekce indolových sloučenin byla provedena s použitím Salkowského reagentu, který byl na suchý Silufol aplikován pomocí rozprašovače. Poté byl chromatogram 30 min inkubován v sušárně při $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.9. HPLC/MS

Obsah auxinů v myceliích mutanta s delecí genu *CpialaH* a WT *C. purpurea* 20.1 byl stanoven metodou HPLC/MS.

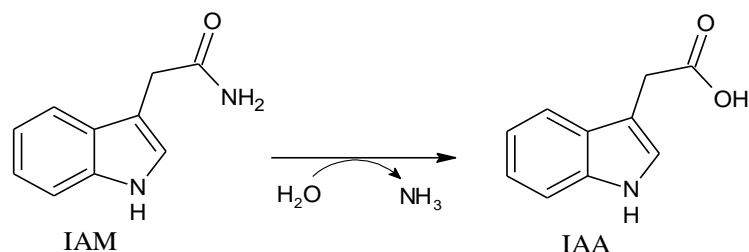
Erlenmayerovy baňky (250 ml) s 50 ml modifikovaného BII kultivačního media (koncentrace sacharosu 40 g l^{-1}) byly inokulovány mycelií mutanta $\Delta\text{CpialaH}$ a WT *C. purpurea* 20.1, obsah auxinů u WT byl navíc stanoven v BII kultivačním mediu (koncentrace sacharosu 40 g l^{-1}) obohaceném o L-Trp (4 mmol l^{-1}). Po 7 dnech kultivace byla kultivační média za sníženého tlaku filtrována přes Büchnerovu nálevku s Miracloth membránou a lyofilizována ($110 \text{ }^\circ\text{C}$; 0,410 mbar; přes noc). Analýza auxinů byla provedena v Laboratoři růstových regulátorů, CRH.

4 VÝSLEDKY

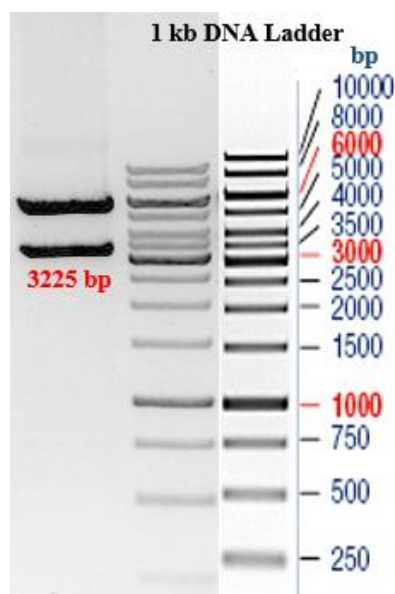
4.1 Transformace *C. purpurea* 20.1

Transformace *C. purpurea* 20.1 byla založena na homologní rekombinaci genu *CpiaaH* s lineárním konstruktem vyštěpeným z *pRS426::ΔCpiaaH* obsahujícím kazetu s rezistencí na phleomycin spolu s 3' a 5' okrajovými sekvencemi genu *CpiaaH*. Tento gen pravděpodobně kóduje enzym indolyl-3-acetamidhydrolasu (EC 3.5.1.4) katalyzující přeměnu IAM na IAA (Pollmann *et al.*, 2003; Obr. 16).

Plasmid *pRS426::ΔCpiaaH* byl izolován z transformovaných buněk *E. coli TOP 10* (3.2.1.1) a pomocí restriční endonukleasy *XhoI* byl vyštěpen fragment o velikosti 3225 bp (3.2.1.2). Po elektroforetické separaci (Obr. 17) a následné purifikaci z gelu (3.2.1.3) byl fragment použit pro transformaci protoplastů *C. purpurea* 20.1 (3.2.2.2).



Obr. 16 Reakční schéma reakce katalyzované enzymem indolyl-3-acetamidhydrolasa (*iaaH*). (IAM) indolyl-3-acetamid; (IAA) indolyl-3-octová kyselina (Pollmann *et al.*, 2003; upraveno).

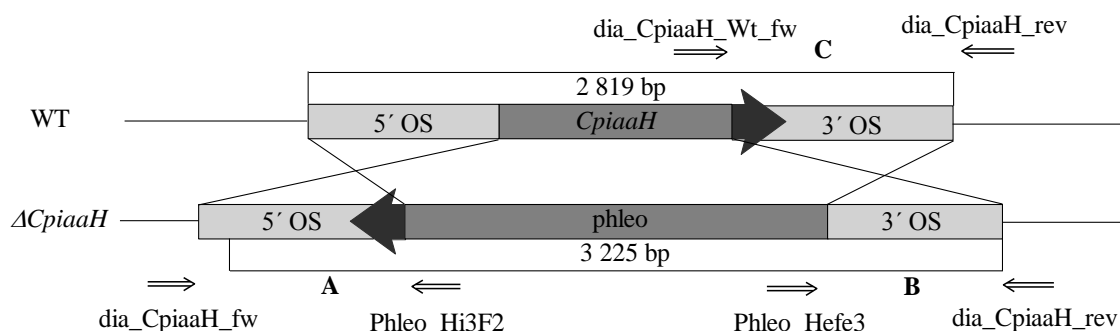


Obr. 17 Elektroforetogram restrikce plasmidu *pRS426::ΔCpiaaH* restriční endonukleasou *XhoI*. Na transformaci byl použit fragment DNA o velikosti 3225 bp. Standard: 1 kb DNA Ladder.

Z Petriho misek s BII kultivačním agarem a koncentrací phleomycinu $33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo přeočkováno 184 mycelií na misky s BII agarem s vyšší koncentrací antibiotika ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Z lyofilizovaných mycelií primárních transformantů *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpialaH* byla izolována gDNA (3.2.3.1), která sloužila jako templát pro diagnostickou PCR pro ověření úspěšnosti transformace (3.2.3.2). Separace ampliconů PCR reakcí byla provedena elektroforézou v agarosovém gelu (3.2.3.3). Fragменты DNA amplifikované kombinací primerů dia_CpialaH_fw a Phleo_Hi3F2 (A; velikost 696 bp), spolu s dvojicí Phleo_Hefe3 a dia_CpialaH_rev (B; velikost 1231 bp) naznačovaly přítomnost phleomycinové kazety a zdařilou integraci delečního konstruktů do místa genu *CpialaH* v genomu *C. purpurea* 20.1. Amplicon o velikosti 1186 bp (C; kombinace primerů dia_CpialaH_WT_fw a dia_CpialaH) sloužil k potvrzení přítomnosti WT alely genu *CpialaH* (Obr. 18).

Analýzou 148 primárních transformantů se zjistilo, že phleomycinová kazeta byla plně zaintegrována u vzorku 86, neboť došlo k amplifikaci DNA úseků o velikosti 696 bp a 1231 bp (Obr. 19). Neamplifikovala se kombinace primerů C (dia_CpialaH_WT_fw a dia_CpialaH) signalizující WT alelu, a tak lze u tohoto transformanta usuzovat na delecí genu *CpialaH* na obou alelách.

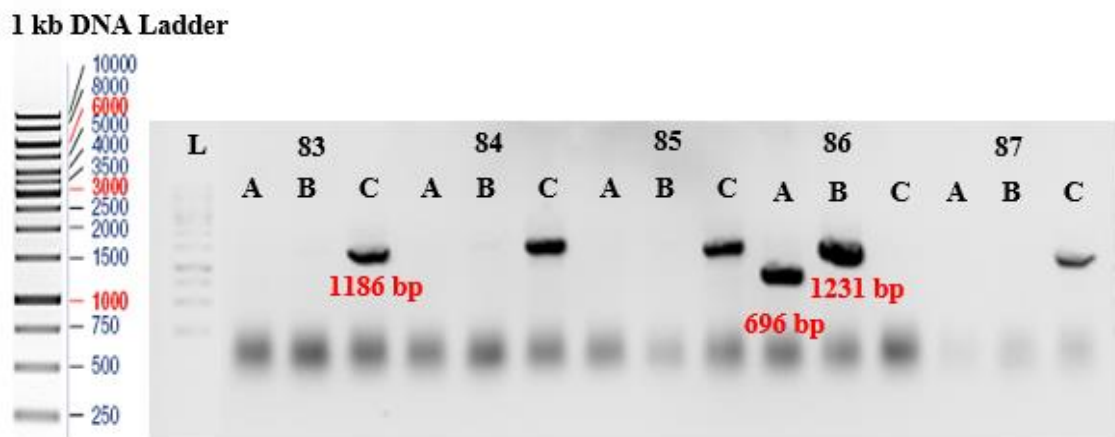
Pokud by došlo k homologní rekombinaci genu *CpialaH* s rezistenční kazetou pouze na jedné alele genu, byla by pro izolaci mutantů s delecí genu *CpialaH* na obou alelách použita metoda monosporické izolace (Schürmann *et al.*, 2013). Myceliární buňky *C. purpurea* jsou totiž heterokaryontní a obsahují dvě jádra. Konidiospory vzniklé meiotickým dělením jsou pak jednojaderné (Esser a Tudzynski., 1978). Díky tomu lze z jediné spory vypěstovat homokaryotické mycelium.



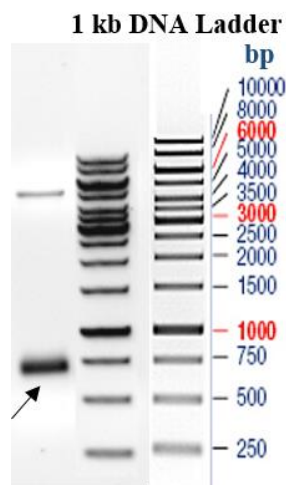
Obr. 18 Schéma nasedání primerů při diagnostické PCR pro ověření transformace *C. purpurea* 20.1. Transformace spočívala v delecí genu *CpialaH* (WT, wild type) homologní rekombinací s rezistenční kazetou na phleomycin (phleo; $\Delta CpialaH$). (OS) okrajová sekvence genu. Černé šipky ukazují orientaci transkripce.

4.2 Southern blot

Hybridizační metoda Southern blot byla provedena pro ověření počtu integrací delečního konstruktů u získaných transformantů. RNA próba byla připravena z *pDRIVE* plasmidu obsahujícím 3' okrajovou sekvenci genu *CpiaaH*. Restriční endonukleasou *XhoI* byla plasmidová DNA naštěpena (3.2.4.1) a po purifikaci z restriční směsi (3.2.4.2) byly fragmenty DNA použity pro *in vitro* transkripci (3.2.4.3). Vytvořená RNA próba značená digoxigeninem byla analyzována elektroforézou v agarosovém gelu (Obr. 20), která potvrdila úspěšnou přípravu próby.



Obr. 19 Elektroforetogram vzorků primárních transformantů *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpiaaH* z diagnostické PCR. (L) 1 kb DNA Ladder; (83, 84, 85, 86, 87) vzorky transformantů; (A) primery *dia_CpiaaH_fw* a *Phleo_Hi3F2*; (B) *Phleo_Hefe3* a *dia_CpiaaH_rev*; (C) *dia_CpiaaH_WT_fw* a *dia_CpiaaH*.

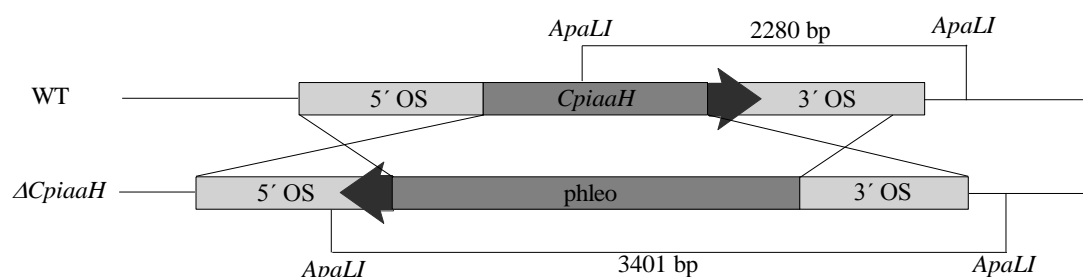


Obr. 20 Elektroforetogram RNA próby pro Southern blot (označena šipkou). Standard: 1 kb DNA Ladder.

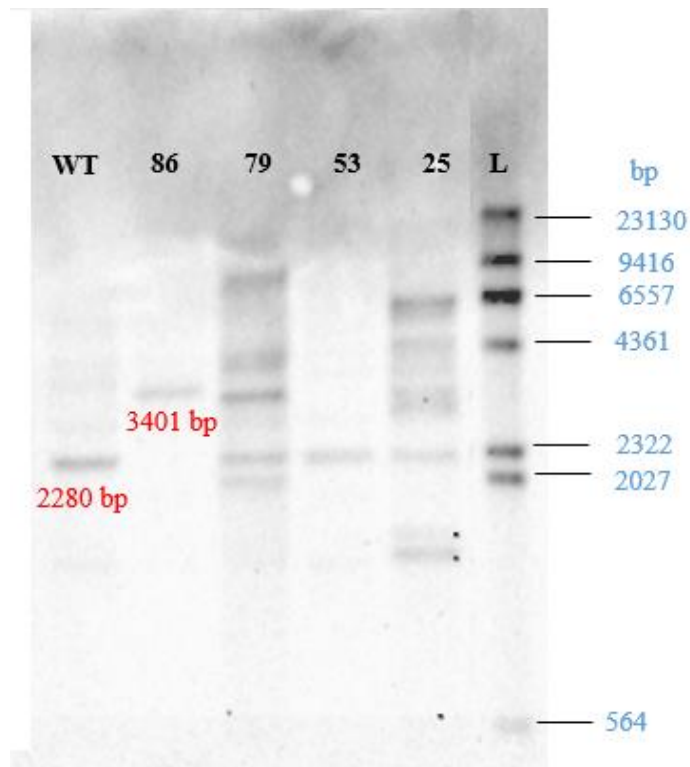
Na základě výsledků z diagnostické PCR (3.2.3) byly pro Southern blot vybrány 4 vzorky předpokládaných $\Delta CpiaaH$ mutantů. Kromě transformanta 86, u kterého se předpokládá delece genu *CpiaaH* na obou alelách, byly vybrány i vzorky 25, 58 a 79, u kterých došlo k amplifikaci DNA jen s některými kombinacemi primerů. Jako kontrola sloužila gDNA WT *C. purpurea* 20.1. Izolovaná gDNA z vybraných vzorků byla naštěpena enzymem *ApaLI* (3.2.5.1) a restriční směs byla přečištěna a zakoncentrována ethanolovou precipitací (3.2.5.2) Výběr enzymu spočíval v porovnání sekvence gDNA v okolí genu *CpiaaH* se sekvencí rezistenční kazety na phleomycin, kdy se štěpením gDNA restriční endonukleasou *ApaLI* získaly fragmenty odlišných velikostí v případě WT a knock-out mutantu. U WT *C. purpurea* 20.1 měl detekovaný fragment velikost 2280 bp, u předpokládaného knock-outa $\Delta CpiaaH$ pak 3401 bp (Obr. 21).

Štěpená gDNA byla separována elektroforeticky v agarosovém gelu (3.2.6.1) a poté přenesena na pozitivně nabitou nylonovou membránu (kapilární přenos; 3.2.6.2). Po hybridizaci se značenou RNA próbou (3.2.6.3) následovala detekce pomocí Anti-digoxigenin-AP protilátkou. Pro vizualizaci hybridizovaných fragmentů byl použit CSPD chemiluminiscenční substrát (3.2.6.4).

Přítomnost fragmentu o velikosti 3401 bp, jenž odpovídá úseku DNA s rezistenční kazetou, byla zjištěna u vzorků 79 a 86 (pravděpodobně i 25, band nebyl příliš výrazný). V případě vzorku 86 se jedná o jediný hybridizovaný fragment, což nasvědčuje, že se jedná o mutantu s delecí genu *CpiaaH* na obou alelách. Velikost jediného fragmentu vzorku 53 se shodovala s velikostí bandu WT alely. U transformantů 25 a 79 byl naopak zjištěn výskyt několika bandů, což nasvědčuje ektopické inzerci rezistenční kazety do více míst genomu *C. purpurea* 20.1. Homologní rekombinace pouze v úseku genu *CpiaaH* nebyla v případě mutantů 25, 53 a 79 úspěšná (Obr. 22). Další experimenty byly tudíž prováděny s mutantem $\Delta CpiaaH$ 86.



Obr. 21: Schéma restrikce gDNA restriční endonukleasou *ApaLI* u wild typu (WT) *C. purpurea* 20.1 a mutantu $\Delta CpiaaH$ s rezistentní kazetou na phleomycin. (OS) okrajová sekvence genu. Šipky ukazují orientaci transkripce.

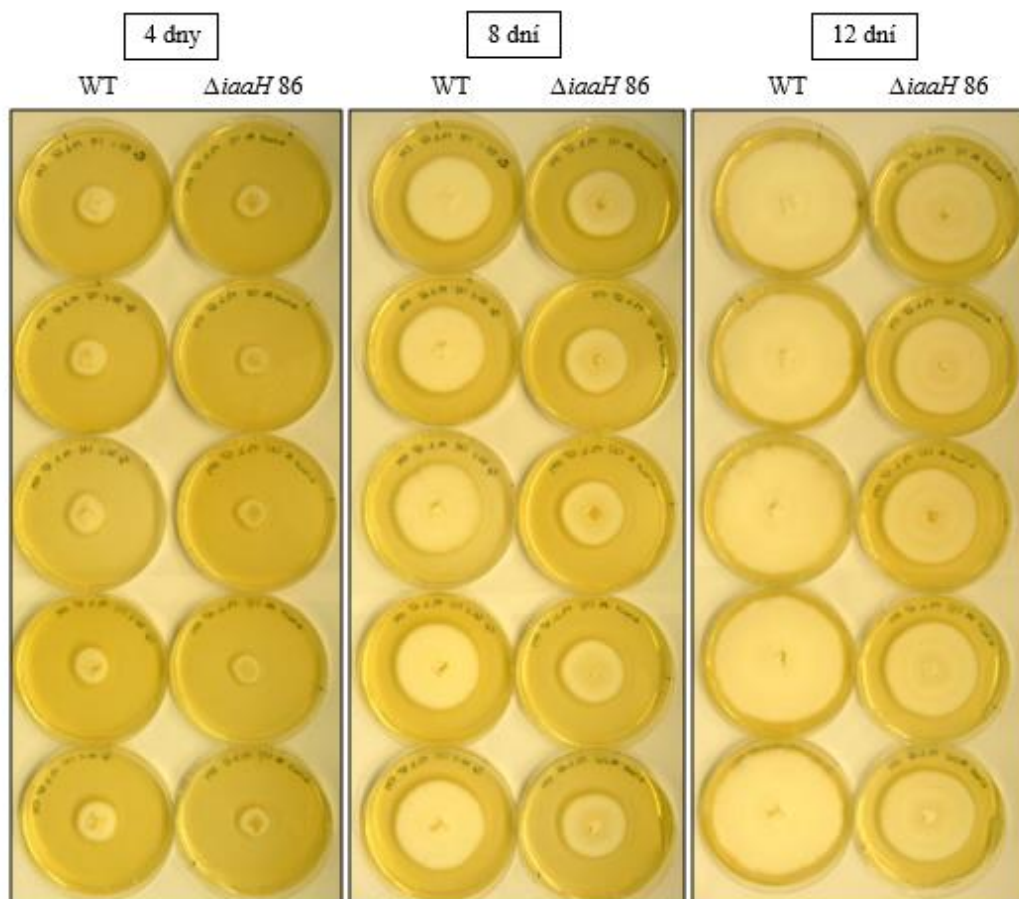


Obr. 22 Záznam ze Southern blotu. (WT) wild type *C. purpurea* 20.1; (25, 53, 79, 86) vzorky transformantů *C. purpurea* 20.1; (L) DIG-Labeled Molecular Weight II.

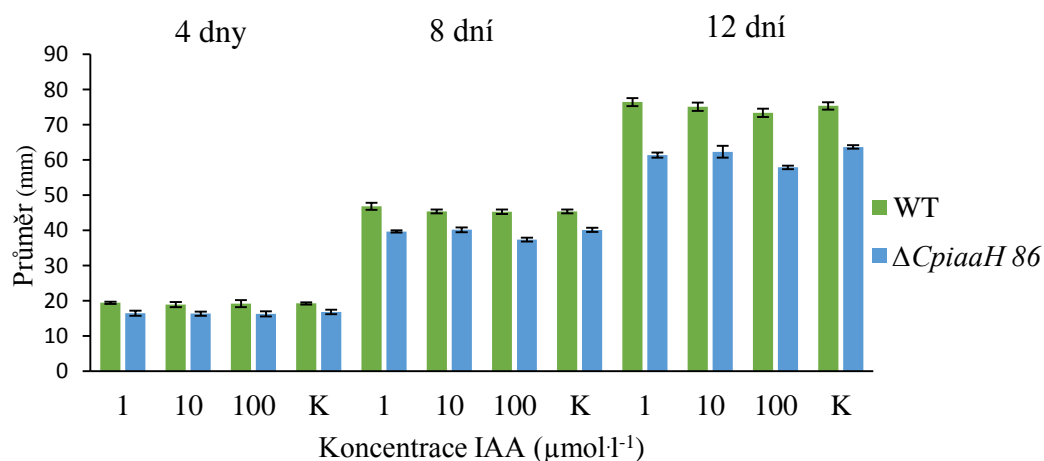
4.3 Fenotyp mutantu $\Delta CpiaaH$ 86

S předpokladem, že gen *CpiaaH* kóduje enzym katalyzující druhou reakci IAM dráhy biosyntézy auxinů, a jeho delece z genomu *C. purpurea* 20.1 by tedy mohla vést k odlišným hladinám auxinů s následným odlišným fenotypovým projevem, byl s $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 proveden test na porovnání fenotypu (3.2.7). Mycelia byla pěstována na BII kultivačním agaru a po 4, 8 a 12 dnech byly porovnávány velikosti a zbarvení mycelií (Obr. 23). Již po 4 dnech byl pozorovatelný redukovaný růst mutantu $\Delta CpiaaH$ 86. Mycelia $\Delta CpiaaH$ 86 pak celkově dosahovala v průměru 75% velikosti WT mycelií ($P \leq 0,0001$; Studentův test). Odlišná pigmentace obou vzorků pozorována nebyla.

Při kultivaci $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 na BII kultivačním agaru s různou koncentrací IAA ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; rozpuštěno v DMSO) k obnovení rychlosti růstu mutantu nedošlo (Obr. 24).



Obr. 23 Porovnání fenotypu mutanta $\Delta CpiaaH$ 86 s WT *C. purpurea* 20.1. Kultivace na BII kultivačním agaru. Průměr Petriho misek – 9 cm.



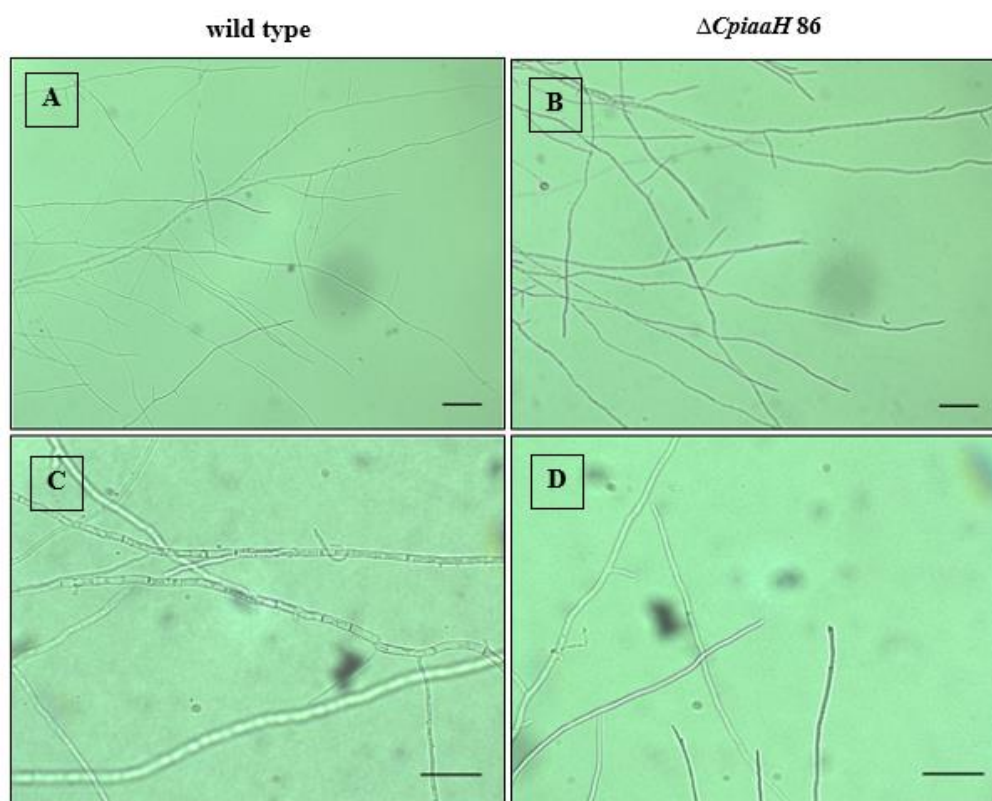
Obr. 24 Velikost mycelií $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 pěstovaných na BII kultivačním agaru obohaceném o IAA ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; rozpuštěno v DMSO). (K) BII kultivační agar + DMSO. Velikost mycelií byla zaznamenána po 4, 8 a 12 dnech kultivace a měřena programem ImageJ (The National Institutes of Health, USA).

Pro mikroskopická pozorování byla mycelia $\Delta CpiaaH$ 86 a WT pěstována na Gamborg mediu. Po dvou dnech kultivace byly připraveny preparáty, které byly pozorovány při 100x a 400x zvětšení. Četnost větvení a přítomnosti sept byly u obou vzorků srovnatelné (Obr. 25).

4.4 Identifikace a kvantifikace indolových sloučenin

Pro identifikaci a kvantifikaci indolových sloučenin byly pro porovnání produkce IAA u $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 zvoleny metody TLC a HPLC/MS.

Auxiny uvolněné do kultivačního média byly měřeny pomocí TLC. Ethylacetátové extrakty kultivačních BII médií a BII médií s přidaným Trp (4 mmol·l⁻¹; 3 biologické replikáty) byly spolu s 1mmol·l⁻¹ standardy Trp, IAM a IAA nanесeny na vrstvu Silufolu. Chromatogram byl vyvíjen v chromatografické komoře s mobilní fází o složení ethylacetát:isopropanol:vodný roztok amoniaku (45:35:20). Pro detekci byl použit Salkowského reagent (3.2.8).

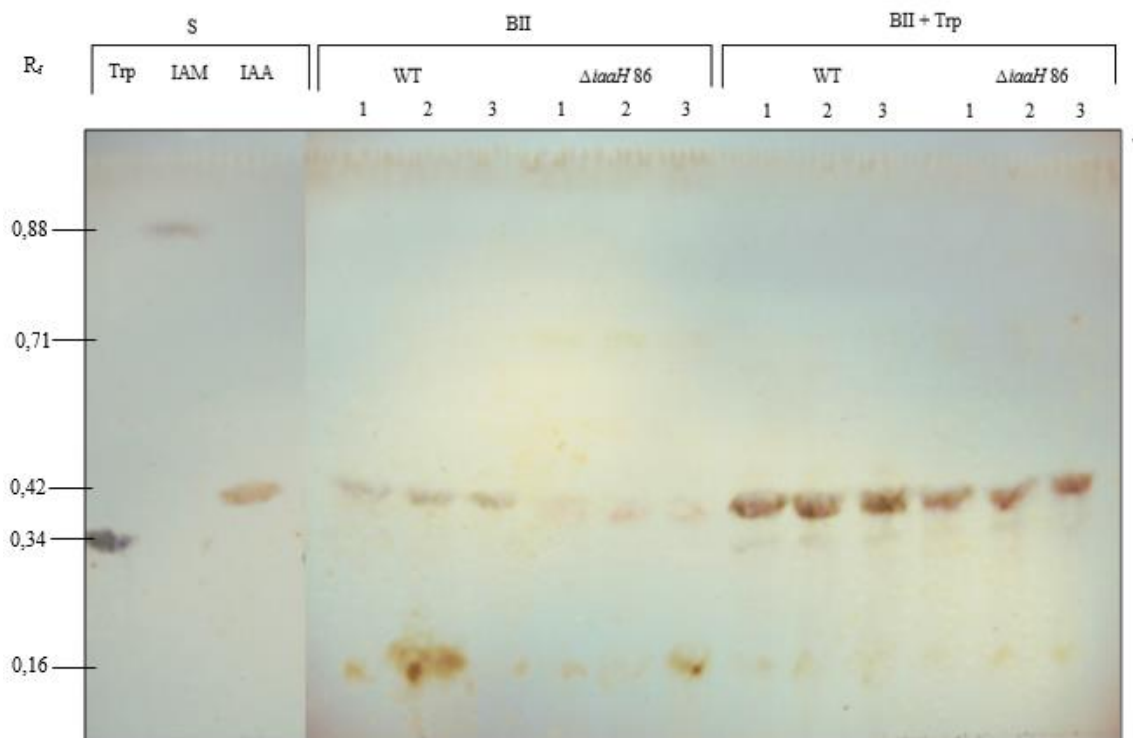


Obr. 25 Morfologie hyf mutanta $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1. Kultivace 2 dny na Gamborg mediu. (A+B) 100x zvětšení, délka úsečky: 0,1 mm; (C+D) 400x zvětšení, délka úsečky: 0,15 mm. Snímky byly pořízeny pomocí Optika Vision Lite/OPTIKA IsView (OPTIKA, Itálie)

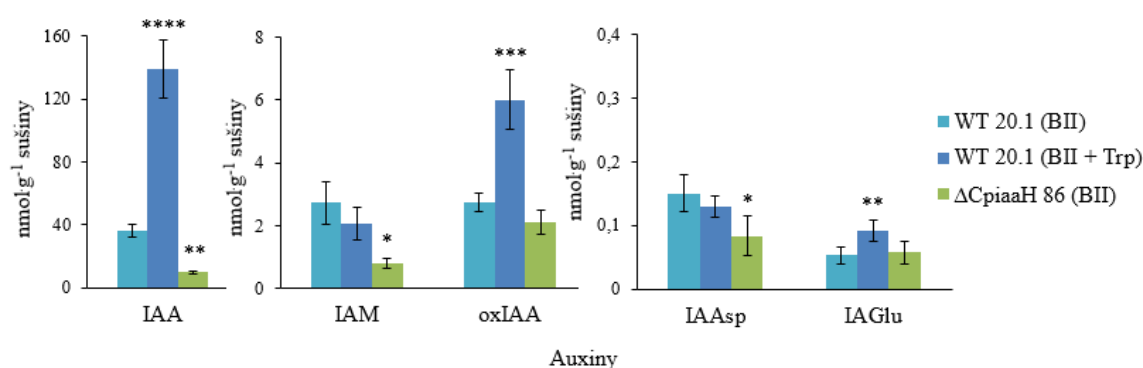
Produkce auxinů do media byla prokázána jak u WT *C. purpurea* 20.1, tak vzorku $\Delta CpiaaH$ 86 (Obr. 26). U mutanta $\Delta CpiaaH$ byl však oproti WT zaznamenán pokles v produkci IAA. Tyto výsledky byly získány jak při kultivaci v samostatném BII mediu, tak mediu obsahujícím Trp. Lze tedy usuzovat na přímé zapojení IAM dráhy v produkci IAA u *C. purpurea*. Nicméně i přes knock-out genu *CpiaaH* byla určitá množství IAA detekována, produkce auxinů u *C. purpurea* tedy neprobíhá jen IAM dráhou. IAM v obou typech médií detekováno nebylo. Důvodem byla zřejmě nízká koncentrace, neboť pomocí HPLC/MS bylo IAM v kultivačním mediu identifikováno (data nezobrazena). Pozitivní reakci se Salkowského činidlem poskytly i další indolové sloučeniny ($R_{f1} = 0,16$; $R_{f2} = 0,71$), kvůli nepřítomným standardům nebyly tyto látky identifikovány.

Obsah auxinů v myceliích $\Delta CpiaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 byl stanoven pomocí HPLC/MS (Obr. 27). Pro analýzu byla použita mycelia obou vzorků pěstovaných v modifikovaném BII kultivačním mediu (sacharosa 40 g l^{-1}) spolu s mycelií WT v mediu obsahujícím L-Trp ($4 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) po dobu 7 dní (dva biologické replikáty, dva technické replikáty). I zde byl zaznamenán pokles IAA u $\Delta CpiaaH$ 86 oproti WT pěstovaných v čistém BII mediu, obsah IAM byl ovšem u mutanta také snížen. V případě WT kultivovaného v mediu s Trp byla hladina IAA oproti BII mediu bez Trp 4x zvýšena, toto navýšení však nebylo pozorováno u IAM, které zůstalo srovnatelné.

V myceliích byla měřena i hladina degradačních produktů IAA, a to 2-oxindolyl-3-octové kyseliny (oxIAA) a jejich konjugátů s aminokyselinami aspartátem (IAAsp) a glutamátem (IAGlu; Ludwig-Müller, 2011; Obr. 27). Změny v hladinách oxIAA korelovaly se sníženou koncentrací IAA u $\Delta CpiaaH$ 86 a zvýšenou koncentrací IAA u WT pěstovaném v mediu s Trp. V případě $\Delta CpiaaH$ 86 hladina IAAsp i IAGlu klesla. U WT došlo k poklesu pouze v případě IAAsp, množství IAGlu bylo zvýšeno.



Obr. 26 Chromatogram ethylacetátových extraktů kultivačních médií mutanta $\Delta iaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 na vrstvě Silufolu. Houbové kultury byly pěstovány v BII kultivačním mediu a BII mediu s 4mmol l^{-1} Trp. Detekce – Salkowského reagent. (S) standardy, koncentrace 1mmol l^{-1} ; (IAA) indolyl-3-octová kyselina; (IAAsp) konjugát IAA s aspartátem (Asp); (IAGlu) konjugát IAA s glutamátem (Glu); (IAM) indolyl-3-acetamid; (R_f) retenční faktor; (Trp) tryptofan. Analýza byla provedena se třemi biologickými replikáty. Šipka ukazuje směr rozvoje chromatogramu.



Obr. 27 Kvantifikace indolových sloučenin v myceliu $\Delta iaaH$ 86 a WT *C. purpurea* 20.1 metodou HPLC/MS. Kultivace v BII mediu (sacharóza 40g l^{-1}) po dobu 7 dní. Hodnoty v grafu jsou průměrem 2 měření 2 biologických replik. (IAM) indolyl-3-acetamid; (IAA) indolyl-3-octová kyselina; (oxIAA) 2-oxindolyl-3-octová kyselina; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (Studentův test).

5 DISKUZE

Auxiny představují významnou skupinu fytohormonů, které se uplatňují při mnoha fyziologických procesech rostlin během jejich vývoje a růstu. Významně se podílejí i na signalizaci rostlin, a změny v jejich hladině tak mohou hrát důležitou roli při interakci rostlin s mikroorganismy (Kazan a Manners, 2009).

Syntéza IAA u rostlin je již z velké části objasněna, u hub je však její studium teprve na začátku. Pro studium funkce genů u *Claviceps purpurea* je používán kmen 20.1, jehož genom byl osekvenován (Schardl *et al.*, 2013). Možnost porovnat kódující sekvence *C. purpurea* s jinými organismy pomohla odhalit gen CPUR_04616 anotovaný jako amidasa, který byl označen jako *cpiaaH* a připraven pro knock-out konstrukt.

IAM hydrolasa, jež je kódována genem *CpiaaH*, katalyzuje konverzi IAM na IAA v druhém kroku IAM dráhy biosyntézy auxinů. Nicméně gen s funkcí Trp monooxygenasy (*iaaM*; EC 1.13.12.3), která se účastní oxidace Trp na IAM, u *C. purpurea* identifikován nebyl. Podobně neúplná dráha byla zjištěna u *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Zde byl identifikován gen *iaaM*, nicméně homolog *iaaH* v genomu této parazitické houby nalezen nebyl (Yin *et al.*, 2014).

U většiny dosud publikovaných hub je produkce auxinů v axenické kultuře možná jen v přítomnosti Trp. V případě *C. purpurea* však byla IAA detekována i při kultivaci bez Trp, a to jak v myceliu, tak i kultivačním mediu. Přítomnost Trp v mediu *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* způsobila zvýšení hladiny IAA a IAM (Maor *et al.*, 2004). U WT *C. purpurea* ovlivnil exogenní Trp pouze množství IAA, které bylo zvýšeno, k výrazné změně v koncentraci IAM však nedošlo. Knock-out genu *CpiaaH* snížil u *C. purpurea* hladinu IAA i IAM, nicméně určitá množství IAA byla stále detekována. Tyto výsledky nasvědčují aktivnímu využívání i jiné biosyntetické dráhy. Oddělení molekulární biologie, CRH se v současné době zabývá studii dalších genů zapojených do produkce auxinů, a to *YUCCA* a *TDC* účastnících se IPA, resp. TAM dráhy.

Ačkoli je produkce auxinů u hub spojená především s patogenitou rostlin, jsou známy i případy, kdy změny koncentrací IAA korelovaly s odlišnostmi myceliárního růstu (Gay *et al.*, 1994; Prusty *et al.*, 2004). U mutantu $\Delta CpiaaH$ došlo k redukci růstu. Zdali je však způsobena sníženou hladinou IAA, jisté není, jelikož při komplementaci exogenním IAA nedosáhl mutant $\Delta CpiaaH$ stejné rychlosti růstu jako WT.

Studium IAM dráhy v produkci auxinů u *C. purpurea* bude nadále pokračovat. Bude zkoumán vliv snížené hladiny auxinů u mutanta $\Delta CpiaaH$ na patogenicitu při infekci žita v porovnání s WT kmenem 20.1. Pro inokulaci žita bude použit i WT kultivovaný v mediu s tryptofanem. Bude sledován průběh infekce, počet úspěšně napadených semeníků a v poslední fázi i množství vytvořených sklerocií.

6 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma biologie houby *Claviceps purpurea* a na téma rostlinných hormonů u hub se zaměřením na auxiny. Dále byla pozornost věnována cytokininům, giberelinům, kyselině abscisové, kyselině salicylové, ethylenu a kyselině jasmonové.

Cílem experimentální části byla příprava mutanta *C. purpurea* 20.1 s delecí genu *CpialaH*, jenž kóduje indolyl-3-acetamidhydrolasu (iaaH). Tento enzym katalyzuje konverzi IAM na IAA, tj. druhý krok v IAM dráze biosyntézy auxinů. Lineární konstrukt obsahující 3' a 5' okrajové sekvence genu *CpialaH* spolu s rezistenční kazetou na phleomycin byl vyštěpen z plasmidu *pRS426::CpialaH* a použit pro transformaci protoplastů *C. purpurea* 20.1. Selekcí na mediu s antibiotikem byli získáni primární mutantni, kteří byli ověřeni metodou diagnostické PCR. U vybraných mutantů byla správná integrace rezistenční kazety do genomu *C. purpurea* založená na homologní rekombinaci analyzována pomocí Southern blotu. Ten potvrdil delecí genu *CpialaH* na obou alelách u mutanta $\Delta CpialaH$ 86. Tento mutant vykazoval redukováný růst oproti WT *C. purpurea*, v četnosti větvení hyf a tvorbě sept však rozdíl pozorován nebyl. Při analýze obsahu auxinů v kultivačním mediu pomocí TLC a myceliu metodou HPLC/MS byla u mutanta $\Delta CpialaH$ 86 zjištěna snížená tvorba IAA, která byla doprovázena poklesem hladiny IAM. Stálá tvorba IAA u $\Delta CpialaH$ 86 pak naznačuje produkci auxinů i jinou biosyntetickou drahou. Zřejmě se jedná o Trp-dependentí dráhu, neboť při kultivaci WT i $\Delta CpialaH$ 86 na mediu s Trp bylo detekováno zvýšené množství IAA.

7 LITERATURA

- Aldridge D. C., Galt S., Giles D., Turner W. B. (1971): Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1623-1627.
- Anderson J. M., Spilatro S. R., Klauer S. F., Franceschi V. R. (1989): Jasmonic acid-dependent increase in the level of vegetative storage proteins in soybean. *Plant Science* **62**, 45-52.
- Angra-Sharma R., Sharma D. K. (2000): Cytokinins in pathogenesis and disease resistance of *Pyrenophora teres*-barley and *Dreschlera maydis*-maize interactions during early stages of infection. *Mycopathologia* **148**, 87-95.
- Archive.bio.ed.ac home page: http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/chap1_im.htm (5.5.2015)
- Audenaert K., De Meyer G. B., Höfte M. M. (2002): Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**, 491-501.
- Bartling D., Seedorf M., Mithöfer A., Weiler E. W. (1992): Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *European Journal of Biochemistry* **205**, 417-424.
- Bartling D., Seedorf M., Schmidt R. C., Weiler E. W. (1994): Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **91**, 6021-6025.
- Basse C. W., Lottspeich F., Sgetlich W., Kahnmann R. (2004): Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry* **242**, 648-656.
- Behr M., Motyka V., Weihmann F., Malbeck J., Deising H. B., Wirsig S. G. R. (2012): Remodeling of cytokinin metabolism at infection sites of *Colletotrichum graminicola* on maize leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1073-1082.
- Biale J. B. (1940): Effect of emanations from several species of fungi on respiration and colour development of citrus fruits. *Science* **91**, 458-459.
- Bové F. J. (1970): The story of ergot. S. Karger, New York, USA, 297 stran.
- Brandi M., Clark E. M., Lindow S. E. (1996): Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. *Canadian Journal of Microbiology* **42**, 586-592.
- Camtagroup home page: http://www.camtagroup.com/?page_id=48 (19.4.2015).
- Carlile M. J., Watkinson S. C., Gooday G. W. (2001): Parasites and mutualistic symbionts. In: *The fungi*. 2nd ed., Academic Press, Londýn, Velká Británie, 608 stran.
- Comai L., Surico G., Kosuge T. (1982): Relation of plasmid DNA to indoleacetic acid introduction in different strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Journal of General Microbiology* **128**, 2157-2163.
- Costacurta A., Keijers V., Vanderleyden J. (1994): Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular and General Genetics* **243**, 463-472.
- Crespi M., Messens E., Caplan A. B., van Montagu M., Desomer J. (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The European Molecular Biology Organization Journal* **11**, 795-804.
- Crosignani P. G. (2006): Current treatment issues in female hyperprolactinemia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **125**, 152-164.
- Curtis P. J., Cross B. E. (1954): Gibberellic acid – a new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella-fujikuroi*. *Chemistry and Industry* **35**, 1066-1066.
- Darwin C. (1880): *The power of movement in plants*. Murray, London, UK, 286 stran.
- Davies P. J. (2004): *Plant hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3rd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nizozemí, 750 stran.

- Dekhuijzen H. M. (1981): The occurrence of free and bound cytokinins in plasmodia of *Plasmodiophora brassicae* isolated from tissue cultures of clubroots. *Plant Cell Reports* **1**, 18-20.
- Demoss J. A. (1961): Studies on the mechanism of the tryptophan syntetase reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **62**, 279-293.
- Dodge A. G., Wackett L. P. (2005): Metabolism of bismuth subsalicylate and intracellular accumulation of bismuth by *Fusarium* sp. strain BI. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 876–882.
- Dolk H. E., Thimann K. V. (1932): Studies on the growth hormone of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **18**, 30-46.
- Epple P., Apel K., Bohlmann H. (1995): An Arabidopsis thaliana thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**, 813-820.
- Ernstsen A., Sandberg G., Crozier a., Wheeler C. T. (1987): Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. *Planta* **171**, 422-428.
- Esser K. a Tudzynski P. (1978): Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Theoretical and Applied Genetics* **53**, 145-149.
- Flaishman M. A., Kolattukudy P. E. (1994): Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* **91**, 6579-6583.
- Forestryimages home page:
<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5436334> (19.4.2015).
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006): Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436-442.
- Furukawa T., Koga J., Adachi T., Kishi K., Syono 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.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Gane R. (1934): Production of ethylene by some ripenin fruits. *Nature* **134**, 1008-1008.
- García-Tabares F., Herraiz-Tomico T., Amat-Guerri F., Bilbao J. L. G. (1987): Production of 3-indoleacetic acid and 3-indolelactic acid in *Azotobacter vinelandii* cultures supplemented with tryptophan. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**, 502-506.
- Garre V., Tenberge K. B., Eisinger R. (1998): Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: putative role in pathogenicity and suppression of Host Defense. *Biochemistry and Cell Biology* **88**, 744-753.
- Gay G., Normand L., Marmeisse R., Sotta B., Debaud J. C. (1994): Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist* **128**, 645-657.
- Graminha M. A., Rocha E. M., Prade R. A., Martinez-Rossi N. N. (2004): Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3530–3535.
- Grossmann K. (2009): Auxin herbicides: current status of mechanisms and mode action. *Pest Management Science* **66**, 113-120.
- Haarmann T., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular Plant Pathology* **10**, 563-577.
- Hedden P., Phillips A. L., Rojas M. C., Carrera E., Tudzinski B. (2001): Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *Journal of Plant Growth Regulation* **20**, 319-331.

- Herrera-Medina M. J., Steinkeller S., Vierheilig H., Bote J. A. O., Carrido J. M. G. (2007): Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* **175**, 554-564.
- Hilbert M., Voll L. M., Hofmann J., Sharma M., Zuccaro A. (2012): Indole derivative 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.
- Hinsch J., Vrabka J., Oeser B., Novák O., Galuszka P., Tudzynski P. (2015): *De novo* biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.12838.
- Hirai N., Yoshida R., Todoroki Y., Ohigashi H. (2000): Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 1448-1458.
- Hofmann (1980): *LSD: My Problem Child*. 1st ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 209 stran.
- Hull A. K., Vij R., Celenza J. L. (2000): Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2379-2384
- 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.
- Chagué V., Maor R., Sharon A. (2009): CgOpt1, a putative oligopeptide transporter from *Colletotrichum gloeosporioides* that is involved in responses to auxin and pathogenicity. *BMC Microbiology* **9**, 173.
- Chalutz E., Lieberman M., Sisler H. (1977): Methionine-induced ethylene production by *Penicillium digitatum*. *Plant Physiology* **60**, 402-406.
- Chen H., Fink G. R. (2006): Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes and Development* **20**, 1150-1161.
- Chung K. R., Tzeng D. D. (2004): Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the gall-inducing fungus *Ustilago esculenta*. *Journal of Biological Sciences* **4**, 744-750.
- Ilag L, Curtis R. W. (1968): Production of ethylene by fungi. *Science* **159**, 1357-1358.
- Inzé D., Follin A., Van Lijsebettens M., Simoens C., Genetello C., Van Montagu M., Schell J. (1984): Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*; further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Molecular and General Genetics* **194**, 265-274.
- Isaac S. (1992): *Fungal-Plant Interactions*. 1st ed, Chapman and Hall, London, 418 stran.
- Iwasaki Y., Gunji H., Kino K., Hattori T., Ishii Y., Kirimura K. (2010): Novel metabolic pathway for salicylate biodegradation via phenol in yeast *Trichosporon moniliiforme*. *Biodegradation* **21**, 557-564.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kaper J. M., Veldstra H. (1958): On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochimica et Biophysica Acta* **30**, 401-420.
- Kawaguchi M., Kobayashi M., Sakurai A., Syōno K. (1991): The presence of an enzyme that converts indole-3-acetamide into IAA in wild and cultivated rice. *Plant and Cell Physiology* **32**, 143-149.
- Kawanabe Y., Yamane H., Murayama T., Takahashi N., Nakamura T. (1983): Identification of gibberellin A₃ in mycelia of *Neurospora crassa*. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**, 1693-1694.
- Kazan K., Manners J. M. (2009): Lingering development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* **14**, 373-382.
- Kępczyńska E. (1989): Ethylene requirement during germination of *Botrytis cinerea* spores. *Physiologia Plantarum* **77**, 369-372.
- Khan A. L., Hamayun M., Kang S.-M., Kim Y.-H., Jung H.-Y., Lee J.-H., Lee I.-J. (2012): Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology* **12**, 1-14.

- Koga J., Adachi T., Hidaka H. (1991): Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. *Molecular and General Genetics* **226**, 10-16.
- Kögl F., Kostermans D. G. F. R. (1934): Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **228**, 113-121.
- Kojima H., Hossain M., Kubota M., Hyakumachi M. (2013): Involvement of the salicylic acid signaling pathway in the systemic resistance induced in *Arabidopsis* by plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* GF19-1. *Journal of Oleo Science* **62**, 415-426.
- Konevega A. L., Soboleva N. G., Makhno V. I., Peshekhonov A. V., Katunin V. I. (2006): The effect of modification of tRNA nucleotide-37 on the tRNA interaction with the P- and A-site of the 70S ribosome *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **40**, 669-683.
- 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**, 1983-1991.
- Koshiba T., Saito E., Ono N., Yamamoto N., Sato M. (1996): Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiology* **110**, 781-789.
- 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.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Hitoshi S., Sakakibara H., Kyozuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Lo W. S., Dranginis A. M. (1998): The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 161-171.
- Loew D. M., van Deusen E. B., Meier-Ruge W. (1978): Effects on the central nervous system. In: *Ergot alkaloids and related compounds*. (Berde B., Schild H. O. eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 421-531.
- López-Carbonell M., Moret A., Nadal M. (1998): Changes in cell ultrastructure and zeatin riboside concentrations in *Hedera helix*, *Pelargonium zonale*, *Prunus avium*, and *Rubus ulmifolius* leaves infected by fungi. *Plant Disease* **82**, 914-918.
- Low P. S., Merida J. R. (1996): The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiologia Plantarum* **96**, 533-542.
- Ludwig-Müller J. (2011): Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *The Journal of Experimental Botany* **62**, 1757-1773.
- Ludwig-Müller J., Bennett R. N., García-Garrido J. M., Piché Y., Vierheilig H. (2002): Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in *Tropaeolum majus* and *Carica papaya* after jasmonic acid application can not be attributed to increased glucosinolate levels. *Journal of Plant Physiology* **169**, 617-623.
- Ludwig-Müller J., Hilgenberg W. (1988): A plasma membrane-bound enzyme oxidizes L-tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Physiologia Plantarum* **74**, 240-250.
- MacMillan J. (2002): Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**, 387-442.
- Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., Raskin I. (1990): Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**, 1002-1004.
- Mandal S., Mallick N., Mitra A. (2009): Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 642-649.
- Mano Y., Nemoto K., Suzuki M., Seki H., Fujii I., Muranaka T. (2009): The AMI1 gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **61**, 25-32.
- Mantle P. G., Nisbet L. J. (1976): Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *Microbiology* **93**, 321-334.

- 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.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara s., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K-i., Kamiya Y., Kasahara H. (2011): The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18512-18517.
- Meixner C., Ludwig-Müller J., Miersch O., Gresshoff P., Staehelin C., Vierheilig H. (2005): Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. *Planta* **222**, 709-715.
- Métraux J. P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W., Inverardi B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.
- Michniewicz M., Rozej B. (1987): Further studies on the role of auxin on the growth and development of *Fusarium culmorum* (W.G.Sm) Sacc. *Acta Physiologiae Plantarum* **9**, 219-227.
- Mikkelsen M. D., Hansen C. H., Wittstock U, Halkier B. A. (2000): Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 33712-33717.
- Miller V. E., Winston J. R., Fisher D. F. (1940): Production of epinasty by emanations from normal and decaying citrus fruits and from *Penicillium digitarum*. *Journal of Agricultural Research* **60**, 269-277.
- Mukherjee J., Menge M. (2000): Progress and prospects of ergot alkaloid research. *Advances of Biochemical Engineering/Biotechnology* **68**, 1-20
- Müller A., Weiler E. W. (2000): Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**, 855-863.
- Müller P., Hilgenberg W. (1986): Isomers of zeatin and zeatin riboside in clubroot tissue: evidence for trans-zeatin biosynthesis by *Plasmodiophora brassicae*. *Physiologia Plantarum* **66**, 245-250.
- Murai N., Skoog F., Doyle M. E., Hanson R. S. (1980): Relationships between cytokinin production, presence of plasmids, and fasciation caused by strains of *Corynebacterium fascians*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **77**, 619-623.
- Murphy A. M., Pryce-Jones E., Johnstone K., Ashby M. (1996): Comparison of cytokinin production *in vitro* by *Pyrenopeziza brassicae* with other plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 53-65.
- Nafisi M., Goregaoker S., Botanga C. J., Glawischnig E., Olsen C. E., Halkier B. A., Glazebrook J. (2007): *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *The Plant Cell* **19**, 2039-2052.
- Nassar A. H., El-Tarabily K. A., Sivasithamparam K. (2005): Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* **42**, 97-108.
- Nicholson R. L. (1992): Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 369-389.
- Noé W., Mollenschott C., Berlin J. (1984): Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein. *Plant Molecular Biology* **3**, 281-288.
- Normanly J., Cohen J. D., Fink G. R. (1993): *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **90**, 10355-10359.
- Oeser B., Heidrich P. M., Müller U., Tudzynski P., Tenberge K. B. (2002): Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology* **36**: 176-186.

- Oritani T., Kiyota H. (2003): Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Natural Product Reports* **20**, 414-425.
- Ouyang J., Shao X., Li J. (2000): Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **24**, 327-334.
- Pallas J. A., Paiva N. L., Lamb C., Dixon R. (1996): Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* **10**, 281-293.
- Park W. J., Kriechbaumer V., Müller A., Piotrowski M., Meeley R. B., Griel A., Glawischnig E. (2003): The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiology* **133**, 794-802.
- Penninckx I. A., Eggermont K., Terras F. R., Thomma B. P., De Samblanx G. W., Buchala A. Métraux J. P., Manners J. M., Broekaert W. F. (1996): Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Phinney B. O. (1983): The history of gibberellins. In: *The biochemistry and physiology of gibberellins*. (Crozier A.), Praeger, New York, USA 19-52.
- Pollmann S., Müller A., Piotrowski M., Wiler E. W. (2002): Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 155-161.
- Prusty R., Grisafi P., Fink G. R. (2004): The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **101**, 4153-4157.
- Qadir A., Hewett E. W., Long P. G. (1997): Ethylene production by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* **11**, 85-91.
- Quittenden L. J., Davies N. W., Smith J. A., Molesworth P. P., Tivendale N. D., Ross J. J. (2009): Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiology* **151**, 1130-1138.
- Rabe F., Ajami-Rashidi Z., Doehlemann G., Kahmann R., Djamei A. (2013): Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **89**, 179-188.
- Rademacher W. (1992): Occurrence of gibberellins in different species of the fungal genera *Sphaceloma* and *Elsinoe*. *Phytochemistry* **31**, 4155-4157.
- Rademacher W., Grabe J. E. (1979): Gibberellin A₄ produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot exculenta*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **91**, 35-40.
- 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.
- Rayle D. L., Purves W. K. (1967): Conversion of indole-3-ethanol to indole-3-acetic acid in cucumber seedlings shoots. *Plant Physiology* **42**, 1091-1093.
- Regvar M., Gogala N., Zalar P. (1996): Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist* **134**, 703-707.
- Reineke G., Heinze B., Schirawski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C. W. (2008): Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Molecular Plant Pathology* **9**, 339-355.
- Reusche M., Klásková J., Thole K., Truskina J., Novák O., Janz D., Strnad M., Spíchal L., Lipka V., Teichmann T. (2013): Stabilization of cytokinin levels enhances *Arabidopsis* resistance against *Verticillium longisporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 850-860.
- Robert-Seilantantz A., Navarro L., Bari R., Jones J. D. G. (2007): Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 372-379.
- Robinson M., Riov J., Sharon A. (1998): Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5030-5032.

- Rogers L. M., Kim Y.-K., Guo W., González-Candelas L., Li D., Kolattukudy P. E. (2000): Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria haematococca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9813-9818.
- Sassa T., Katsuhiko S., Haruki E. (1989): Isolation and identification of gibberellins A₄ and A₉ from a fungus *Phaeosphaeria* sp. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**, 564-566.
- Sassa T., Kawaide H., Takarada T. (1994): Identification of gibberellins A₄, A₉, and A₂₄ from *Phaeosphaeria* sp. L487 cultured in a chemically defined medium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**, 438-439.
- Seo M., Akaba S., Oritani T., Delarue M., Bellini C., Caboche C., Koshiba T. (1998): Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 687-693.
- Seto H., Sassa T., Kawaide H., Shigihara T., Uzawa J., Yoshida S. (1995): Isolation and stereocontrolled synthesis of a 17-hydroxy-16- β , 17-dihydrogibberellin, GA₈₂. *Tetrahedron Letters* **36**, 5917-5920.
- Shaw B. I. a Mantle P. G. (1980): Host infection by *Claviceps purpurea*. *Transactions of the British Mycological Society* **75**, 77-90.
- Shoresh M., Yedidia I., Chet I. (2005): Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* **95**, 76-84.
- Schardl C. L., Young C. A. Hesse U., Amyotte S. G., Andreeva K., Calie P. J., Fleetwood D. J., Haws D. C., Moore N., Oeser B., Panaccione D. G., Schweri K. K., Voisey C. R., Farman M. L., Jaromczyk J. W., Roe B. A., O'Sullivan D. M., Scott B., Tudzynski P., An Z., Amaoudova E. G., Bullock C. T., Chariton N. K., Chen L., Cox M., Dinkins R. D., Florea S., Glenn A. E., Gordon A., Güldener U., Harris D. R., Hollin W., Jaromczyk J., Jonson R. D., Khan A. K., Leistner E., Leuchtmann A., Li C., Liu J.-G., Liu J., Liu M., Mace W., Machado C., Nagabhyru P., Pan J., Schmidt J., Sugawara K., Steiner U., Takach J. E., Tanaka E., Webb J. S., Wilson E. V., Wiseman J. L., Yoshida R., Zeng Z. (2013): Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: multi-genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *Public Library of Science Genetics* **2**, 1-26
- Schmidt K., Pflugmacher M., Klages S., Mäser A., Mock A., Stahl D. J. (2008): Accumulation of the hormone abscisic acid (ABA) at the infection site of the fungus *Cercospora beticola* supports the role of ABA as a repressor of plant defence in sugar beet. *Molecular Plant Pathology* **9**, 661-673.
- 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.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007): Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 425-448.
- 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.
- Stepanova A. N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L. M., Xie D.-Y., Doležal K., Schlereth A., Jürgens G., Alonso J. M. (2008): TAAI-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177-191.
- Strader L. C., Wheeler D. L., Christensen S. E., Berens J., Cohen J. D., Rampey R. A., Bartel B. (2011): Multiple facets of *Arabidopsis* seedling development require indole-3-butyric acid-derived auxin. *The Plant Cell* **23**, 984-999.
- Stumpe M., Carsjens J.-G., Stenzel I., Göbel C., Lang I., Pawlowski K., Hause B., Feussner I. (2005): Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **66**, 781-791.

- 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 of the United States of America* **106**, 5430-5435.
- Swartzberg D., Kirschner B., Rav-David D., Elad Y., Granot D. (2008): *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. *European Journal of Plant Pathology* **120**, 289-297.
- Taber, W.A. (1985) Biology of *Claviceps*. In: *Biology of industrial microorganisms* (Demain A. L. a Solomon N. A. eds), The Benjamin Cummings Publishing Company, Londýn, Velká Británie, 449–486.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866-41872.
- 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., Göran S., Noel J. P., Chory J. (2008): Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance. *Cell* **133**, 164-176.
- Taylor I. B., Linforth R. S. T., Al-Naieb J., Bowman W. R., Marples B. A. (1988): The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant, Cell and Environment* **11**, 739-745.
- Tfelt-Hansen P. C., Koehler P. J. (2008): History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia* **28**, 877-886.
- Thobois S. (2006): Proposed dose equivalence for rapid switch between dopamine receptor agonists in Parkinson's disease: A review of the literature. *Clinical Therapeutics* **28**, 1-12.
- Tivendale N. D., Ross J. J., Cohen J. D. (2014): The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, **19**, 44-51.
- Tranvan H., Habricot Y., Jeannette E., Gay G., Sotta B. (2000): Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. *Tree Physiology* **20**, 123-129.
- Tsai I. J., Tanaka E., Masuya H., Tanaka R., Hirooka Y., Endoh R., Sahashi N., Kikuchi T. (2014): Comparative genomics of *Taphrina* fungi causing varying degrees of tumorous deformity in plants. *Genome Biology and Evolution* **6**, 861-872.
- 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.
- Tsukada K., Takahashi K., Nabeta K. (2010): Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* **71**, 2019-2023.
- Tudzynski B. (1999): Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **52**, 298-310.
- Tudzynski B., Sharon A. (2002): Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. In: *The Mycota*. Vol. 10, *Industrial applications* (Osiewacz H. D. ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Německo, 183-204.
- Tudzynski P., Correia T., Keller U. (2001): Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 593-605.
- Tudzynski P., Scheffer J. (2004): *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Molecular Plant Pathology* **5**, 377-388.
- Tzeng D. D., De Vay J. E. (1984): Ethylene production and toxicity of methionine and its derivatives with riboflavin in cultures of *Verticillium*, *Fusarium* and *Colletotrichum* species exposed to light. *Plant Physiology* **62**, 545-552.
- Uknes S., Mauch-Mani B., Moyer M., P. Sharon, Williams S., Dincher S., Chandler D., Slusarenko A., Ward E., Ryals J. (1992): Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **4**, 645-656.

- Vick B. A., Zimmerman D. C. (1984): Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* **75**, 458-461.
- Wagas M., Khan A. L, Kamran M., Hamayun M., Kang S.-M., Kim Y.-H., Lee I.-J. (2012): Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* **17**, 10754-10773.
- Wang B., Chu J., Yu T., Xu Q., Sun X., Yuan J., Xiong G., Wang G., Wang Y., Li J. (2015): Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **112**, 4821-4826.
- Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Métraux J.-P., Ryals J. A. (1991): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **3**, 1085-1094.
- Ward E. W. B., Cahill D. M., Bhattacharyya M. K. (1989): Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiology* **91**, 23-27.
- Wasternack C., Hause B. (2013): Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* **111**, 1021-1058.
- Wen P.-F., Chen J.-Y., Kong W.-F., Pan Q.-H., Wan S.-B., Huang W.-D. (2005): Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* **169**, 928-934.
- 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 the United States of America* **108**, 18518-18523.
- Woodward A. W., Bartel B. (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Wu G., Shortt B. J., Lawrence E. B., Leon J., Fitzsimmons K. C., Levine E. B., Raskin I., Shah D. M. (1997): Activation of host defence mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *The Journal of Plant Physiology* **115**, 427-435.
- Yamakawa T., Kurahashi O., Ishida K., Kato S., Kodama T., Minoda Y. (1979): Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**, 879-880.
- Yamamoto H., Inomata M, Tsuchiya S., Nakamura M, Uchiyama T., Oritani T. (2000): Early biosynthetic pathway to abscisic acid in *Cercospora cruenta*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 2075-2082.
- Yao Q., Zhu H. H., Chen J. Z. (2005): Growth responses and endogenous IAA and iPAs changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation. *Scientia Horticulturae* **105**, 145-151.
- Yin Ch., Park J.-J., Gang D. R., Hulbert S. H. (2014): Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 227-235.
- Zeigler R. S., Powel L. E., Thurston H. D. (1980): Gibberellin A₄ production by *Sphaceloma manihoticola*, causal agent of cassava superelongation disease. *Phytopathology* **70**, 589-593.
- Zhang R., Wang B., Ouyang J., Li J., Wang Y. (2008): *Arabidopsis* indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1070-1077.
- Zhao Y., Christensen S. K., Fankhauser Ch., 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.
- Zhu P., Xu L., Zhang C., Toyoda H., Gan S.-S. (2012): Ethylene produced by *Botrytis cinerea* can affect early fungal development and can be used as a marker for infection during storage of grapes. *Postharvest Biology and Technology* **66**, 23-29.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-Cl-IAA	4-chlorindolyl-3-octová kyselina
ABA	abscisová kyselina
ADH	alkoholdehydrogenasa
ald	aldehyddehydrogenasa
AM	arbuskulární mykorhiza
Aro	aromatická transaminasa
BA	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin
bp	pár basí
cizZ	<i>cis</i> -zeatin
CK	cytokinin
CKX	cytokininoxidas/dehydrogenasa
CNS	centrální nervová soustava
CSPD	3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)tricyklo[3.3.1.1 ^{3,7}]dekan}-4-yl)fenylfosfát disodný
CYP	cytochrom P450 monooxygenasa
DEPC	diethylpyrokarbonát
Dicamba	3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina
DIG	digoxigenin (3-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-3,12,14-trihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-tetradekahydrocyklopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-2 <i>H</i> -furan-5-on)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ET	ethylen
GA	giberelin
gDNA	genomická DNA
IAA	indolyl-3-octová kyselina
iaaH	indolyl-3-acetamidhydrolasa
IAAld	indolyl-3-acetaldehyd
iaaM	tryptofan-2-monooxygenasa
iad	IAAld dehydrogenasa
IAM	indolyl-3-acetamid
IAN	indolyl-3-acetonitril

IAOx	indolyl-3-acetaldoxim
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
IGP	indolyl-3-glycerolfosfát
INS	indolylsynthasa
iP	isopentenyladenin
IPA	indolyl-3-pyruvátová kyselina
IPDC	IPA dekarboxylasa
IPT	isopentenyltransferasa
ISR	indukovaná systémová rezistence
JA	jasmonová kyselina
LOG	lonely guy
NAA	naftyloctová kyselina
NHT	<i>N</i> -hydroxytryptamin
nit	nitrilasa
PAA	fenyloctová kyselina
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PEG	polyethylenglykol
R _f	retenční faktor
SA	salicylová kyselina
SAR	systémově získaná rezistence
SDS	dodecylsírán sodný
shy	salicyláthydroxylasa
TAA	Trp aminotransferasa
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
Tam	transaminasa
TAM	tryptamin
TAR	Trp aminotransferasa
TDC	Trp dekarboxylasa
TOL	tryptofol (indolyl-3-ethanol)
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
tZ	<i>trans</i> -zeatin
U	jednotka aktivity restrikčního enzymu
YUC (YUCCA)	flavinmonooxygenasa
ZR	zeatinribosid