

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Transformace produkčního kmene *Claviceps purpurea*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Bražinová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Helena Hanosová
Termín odevzdání práce:	červenec 2012

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Poděkování

Děkuji Mgr. Heleně Hanosové za odbornou pomoc při zpracování mé bakalářské práce a Mgr. Márii Čudejkové za pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lucie Bražinová
Název práce	Transformace produkčního kmene <i>Claviceps purpurea</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Helena Hanosová
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p><i>Claviceps purpurea</i> je houba produkující námelové alkaloidy, jež jsou hojně využívány ve farmaceutickém průmyslu. Proto je neustále snaha zvýšit produkci těchto alkaloidů genetickou cestou. Nadexprese vybraného genu <i>dmaW</i>, jehož produkt, tryptofan dimetylallyltransferasa, katalyzuje první z reakcí biosyntézy, by mohla vést ke zvýšení produkce námelových alkaloidů.</p> <p>Byly transformovány protoplasty <i>Claviceps purpurea</i> kmene Gal 130 konstruktem, obsahujícím gen <i>dmaW</i> pod promotorem <i>gpdA</i> a gen pro rezistenci na phleomycin. Úspěšnost transformace byla potvrzena pomocí real-time PCR. V budoucnu by měl být transformant použit k infekci rostlin žita a ke sledování změn v produkci námelových alkaloidů.</p> <p>Byl izolován a amplifikován gen <i>cloA</i> a následně odsekvenován.</p>
Klíčová slova	<i>Claviceps purpurea</i> , námelové alkaloidy, biosyntéza námelových alkaloidů
Počet stran	45
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Lucie Bražinová
Title	Transformation of the production strain of <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Helena Hanosová
The year of presentation	2012
Abstract	<p><i>Claviceps purpurea</i> is a fungus produces ergot alkaloids, which are widely used in the pharmaceutical industry. That's the reason for an effort to increase the production of these alkaloids by genetic manipulation. Overexpression of selected gene <i>dmaW</i>, whose product is tryptophan dimethylallyltransferase, catalyzing the first reaction of the biosynthesis, could lead to increased production of ergot alkaloids.</p> <p>Protoplasts of <i>Claviceps purpurea</i>, Gal 130 strain, were transformed by construct containing gene <i>dmaW</i> under the control of <i>gpdA</i> promoter and gene for resistance to phleomycin. The success of the transformation was confirmed by real-time PCR. In near future, the transformant will be used for an infection of the plants of rye to monitor changes in the production of ergot alkaloids.</p> <p>Gene <i>cloA</i> was isolated, amplified and subsequently sequenced.</p>
Keywords	<i>Claviceps purpurea</i> , ergot alkaloids, biosynthesis of ergot alkaloids
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Cíle bakalářské práce	8
2. Úvod.....	9
3. Teoretická část	10
3.1 <i>Claviceps purpurea</i>	10
3.1.1 Taxonomie.....	10
3.1.2 Rod <i>Claviceps</i>	10
3.1.3 Životní cyklus a vývoj.....	11
3.2 Námelové alkaloidy	13
3.2.1 Historie a ergotismus.....	13
3.2.2 Chemie námelových alkaloidů a jejich využití	13
3.2.3 Dělení námelových alkaloidů.....	14
3.3 Biosyntéza námelových alkaloidů.....	17
3.3.1 Biosyntéza	17
3.3.2. Geny klastru pro biosyntézu námelových alkaloidů	19
4. Praktická část	21
4.1 Biologický materiál	21
4.2 Chemikálie.....	21
4.3 Připravené roztoky.....	23
4.4 Použité kity	24
4.5 Přístroje.....	24
4.6 Postup	25
4.6.1 Inokulace média BII	25
4.6.2 Příprava protoplastů	25
4.6.3 Transformace.....	26
4.6.4 Monosporická izolace	27
4.6.5 Purifikace celkové RNA.....	27
4.6.6. Odstranění zbytků DNA.....	28
4.6.7 Izolace RNA.....	28
4.6.8 Reverzní transkripce.....	29
4.6.9 Real-Time PCR	29
4.6.10 Izolace DNA.....	31
4.6.11 PCR Amplifikace	31
4.6.12 Polyadenylace.....	32
4.6.13 Elektroforéza a separace fragmentu	32

4.6.14 Izolace DNA z gelu.....	32
4.6.15 Klonování DNA fragmentů.....	33
4.6.16 Izolace plasmidu.....	34
4.6.17 Restrikce.....	34
5. Výsledky a diskuze	35
5.1 Transformace <i>Claviceps purpurea</i> Gal 130.....	35
5.2 Izolace a amplifikace <i>cloA</i> genu	36
5.3 Vyhodnocení sekvencí genu <i>cloA</i>	37
6. Závěr	40
7. Seznam použitých zkratk	41
8. Použitá literatura	42

1. Cíle bakalářské práce

Cílem v teoretické části bylo vypracování literární rešerše na téma *Claviceps purpurea*, námelové alkaloidy a genetika biosyntézy námelových alkaloidů. Vědomosti a informace získané vypracováním teoretické části byly využity v experimentální části práce, při odsekvenování *cloA* genu produkčních kmenů Gal 130 a Gal 404 a srovnání s ortologním genem P1 kmene *C. purpurea*. Dalším cílem byla overexprese *dmaW* genu v *C. purpurea* průmyslovém kmeni Gal 130 a následné sledování vlivu na produkci námelových alkaloidů.

2. Úvod

Claviceps purpurea, česky paličkovice nachová, patří mezi vřeckovýtrusé houby, které parazitují na jednoděložných rostlinách, zahrnující i zemědělsky významné druhy, jako je žito, pšenice, ječmen, kukuřice a další. Vytváří na klasech útvary zvané sklerocia (námel), ve kterých dochází k produkci námelových alkaloidů, hojně využívaných již v minulosti v porodnictví pro vyvolání porodu ale i potratu. V dnešní době jsou i nadále využívány v porodnictví a přibýly další oblasti využití, proto je snaha vytvořit funkční mutanty *C. purpurea*, které by produkovaly větší množství těchto alkaloidů. Tato bakalářská práce se zabývá izolací a sekvenací genu, kódujícího enzym biosyntetické dráhy námelových alkaloidů, který bude v budoucnu použit pro vytvoření konstruktů vhodného k transformaci *C.purpurea* a přípravou funkčního mutanta, transformovaného jiným, již připraveným konstruktem.

3. Teoretická část

3.1 *Claviceps purpurea*

3.1.1 Taxonomie

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

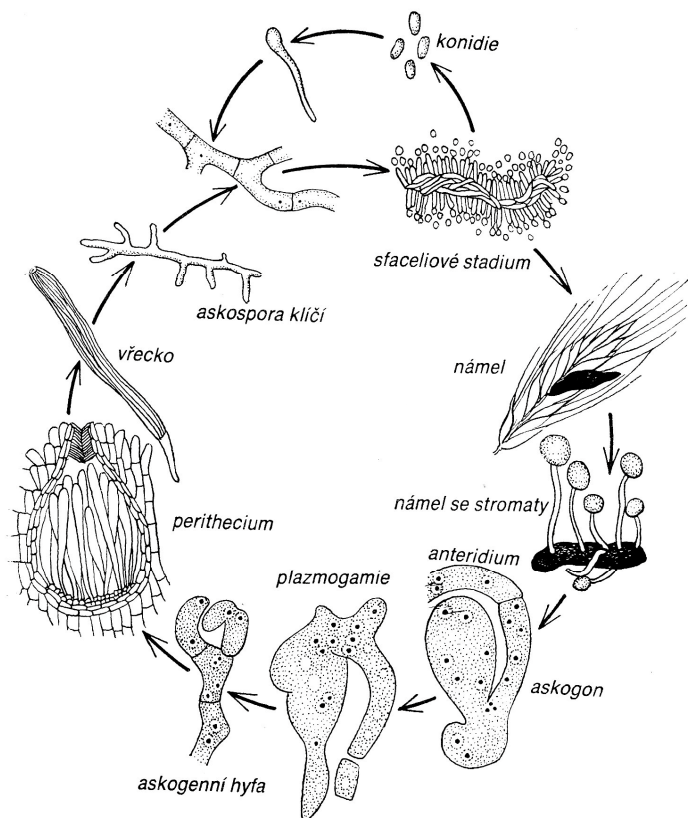
3.1.2 Rod *Claviceps*

Členové rodu *Claviceps* jsou parazitické houby, jejichž hostiteli je více než 600 druhů jednoděložných rostlin rodu Lipnicovité, Sítinovitě a Šáchorovitě, jenž zahrnují i ekonomicky důležité plodiny jako jsou žito, pšenice, ječmen, kukuřice a další (Bové, 1970). Většina druhů tohoto rodu má velmi úzký hostitelský rozsah. Výjimku tvoří druh *Claviceps purpurea*, který napadá přes 400 druhů rostlin (Taber, 1985). Mezi důležité plodiny, jež jsou napadány houbou rodu *Claviceps*, přesněji *Claviceps africana*, patří čirok, hojně pěstovaný v Africe, střední Americe a jižní Asii (Bandyopadhyay et al., 1998). V Japonsku je čirok napadán ještě jiným druhem rodu *Claviceps* a tím je *Claviceps sorghicola* (Tsukiboshi et al., 1999). Následky po požití napadených rostlin se přirozeně nevyskytly jen u lidí ale i u zvířat. Druh *Claviceps paspali* je v Austrálii již po více než 100 let příčinou klopýtavosti u koní, skotu a ovcí (Cawdell-Smith et al., 2010).

Neobvyklá černá sklerocia se zeleným nádechem vytváří *C. viridis*, která byla nalezena v jižní Indii (Thomas et al., 1945). *Claviceps pusilla* je zajímavým druhem pro svá sklerocia trojúhelníkovitého tvaru (Pažoutová and Parbery, 1999).

3.1.3 Životní cyklus a vývoj

Napadány jsou výhradně mladé, neoplozené semeníky rostlin trav a obilovin. Důvod této orgánové specifity není prozatím jasný, ale je pravděpodobné, že roli bude hrát charakteristický povrch blizny semeníku. Kromě toho, rané fáze infekce vykazují výraznou paralelu s rostlinným oploďňovacím procesem, kdy pylová zrna dosednou na povrch blizny a dochází k prorůstání pylové láčky pestíkem. Díky tomu, že houba napodobuje růst pylové láčky a může využít jejích signálních komponent interakce mezi pylem a bliznou, nedochází k rozpoznání houby rostlinou, a tedy ani k vyvolání obranné reakce. K obraně rostliny dojde jen v případě, že houba vybočí ze standardní cesty pylové láčky (Tudzynski and Scheffer, 2004). Až poté co houba dorazí k cévním svazkům, se může začít vytvářet rozvětvené mycelium (tzv. sphaecium), které kolonizuje celý semeník. Po 7 dnech od počátku infekce rostliny začne mycelium produkovat spory, které jsou sekretovány společně s tekutinou zvanou medovice, čímž dochází k sekundární infekci buďto ukápnutím této tekutiny, nebo přenosem pomocí hmyzu. Přibližně po dvou týdnech od napadení ustává tvorba medovice a začíná vytváření sklerocia, přezimující struktury, umožňující houbě přežít nepříznivé období, obsahující námelové alkaloidy (Haarmann et al., 2009). Na jaře ze sklerocia vyrůstají stopkaté nachové plodnice neboli stromata (Obr.1), ve kterých se tvoří dutinky. Těmi pak pronikají hyfy, rozlišené na askogon a anteridium. Během vývoje vřecek se pak vytvářejí perithecia, jež jsou zřetelně oddělena buňkami, tvořícími stěnu perithecia od ostatních pletiv plodnice. Vřecka (*ascus*) a nit'ovité výtrusy (*askospory*) vyplňují perithecium a později jsou uvolněny do okolí (Zicháček a Jelínek, 2007).



Obrázek 1: Životní cyklus *Claviceps purpurea* (Urban a Kalina, 1980)

3.2 Námelové alkaloidy

3.2.1 Historie a ergotismus

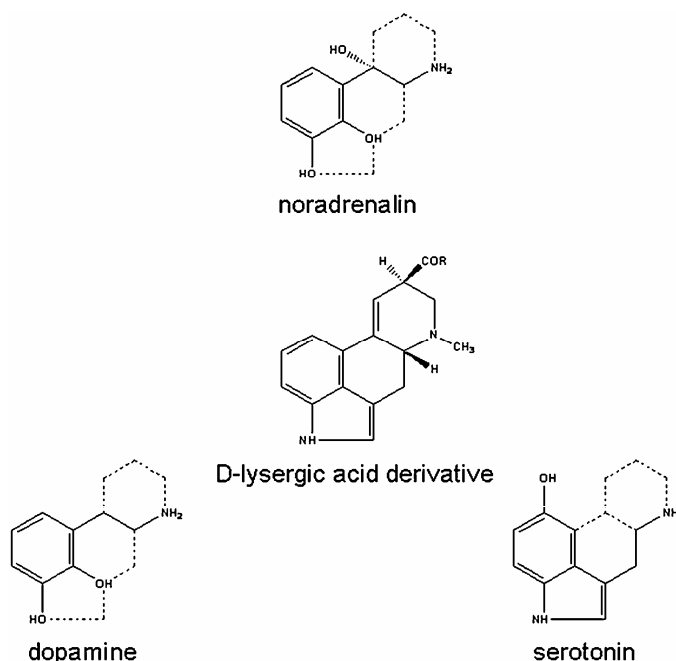
Útvary, které u napadených rostlin vznikají, se nazývají sklerocia nebo také námel, anglicky ergot (odtud „ergot fungus“), což vzniklo z francouzského „argot“ neboli výběžek. Právě v těchto útvarech jsou obsaženy námelové alkaloidy. Ve středověku kvůli nechtěné konzumaci námelových alkaloidů došlo k vypuknutí epidemie ergotismu, tehdy nazývaného „svatý oheň“ nebo „oheň sv. Antonína“ (Haarmann et al., 2009). Název vznikl podle svěťce, jenž byl patronem klášterního řádu, který pečoval o postižené touto nemocí, u níž byla jeden ze symptomů i palčivá bolest v končetinách (Matossian, 1989). Onemocnění se rozděluje na dva typy a příznaky se liší v souvislosti s různými druhy námelových alkaloidů obsažených ve sklerociích. První je ergotismus křečový a jak už samotný název napovídá, jedním z jeho symptomů jsou křeče a záškuby, dále pak halucinace a paranoia. Druhým typem je ergotismus gangrenózní, kdy dochází ke ztrátě periferní citlivosti, otokům a nakonec k odumírání tkáně tzv. gangréně (Eadie, 2003). K oné nechtěné konzumaci docházelo kvůli chlebu, který obsahoval mouku z kontaminovaného žita. Námel však může být využit i pozitivně, dříve v léčitelství, dnes i v moderní medicíně. Je využíván například při vyvolání porodu, jak tomu bylo již v minulosti (Haarmann et al., 2009). Vyvolání porodu ovšem není jediné jeho využití, byl používán i k vyvolání potratů. V souvislosti s touto vlastností docházelo ke spekulacím, že otrava námelem způsobila pomalejší zotavení společnosti po velké morové epidemii ve 14. století (Matossian, 1989). O tři století později sehrály námelové alkaloidy významnou roli při čarodějnických procesech s ženami, jež požíly kontaminované potraviny (Alm, 2003). Napříč stoletími jsou zdokumentovány mnohé epidemie ergotismu v různých zemích Evropy jako je Německo, Rusko (Barger, 1931), Francie (Schiff, 2006), ale i v Africe (Urga et al., 2002). Trvalo poměrně dlouhou dobu, než byla prokázána souvislost mezi infikovaným obilím (konkrétně žitem) a ergotismem, což se povedlo až v 19. století botanikovi a mykologovi Louis René Tulasne (Tulasne, 1853).

3.2.2 Chemie námelových alkaloidů a jejich využití

Mezi nejznámější námelové alkaloidy patří ergopeptidy, například ergotamin, ergocryptin, ergonovin a další, které mohou být snadno převedeny na kyselinu lysergovou pomocí alkalické nebo kyselé hydrolyzy. Tato kyselina je pak vhodná k využití ve farmacii nebo přípravě ilegální drog, jakou je LSD (diethylamid kyseliny lysergové). Tato semisyntetická látka byla vyrobena vlastně náhodou a dnes je jednou z nejsilnějších halucinogenních látek vůbec. Není tomu však

dávno, kdy opět stoupl zájem o ergolinové halucinogeny (Fantegrossi et al., 2008), vhodné například k léčbě autismu (Sigafos et al., 2007).

Farmakologická aktivita je zapříčiněná jistou strukturální podobností mezi deriváty D-lysergové kyseliny a neurotransmitery noradrenalinem, dopaminem a serotoninem, Obr.2, (Haarmann et al., 2009).



Obrázek 2: Srovnání chemické struktury derivátů D-lysergové kyseliny a neurotransmiterů (Haarmann et al., 2009)

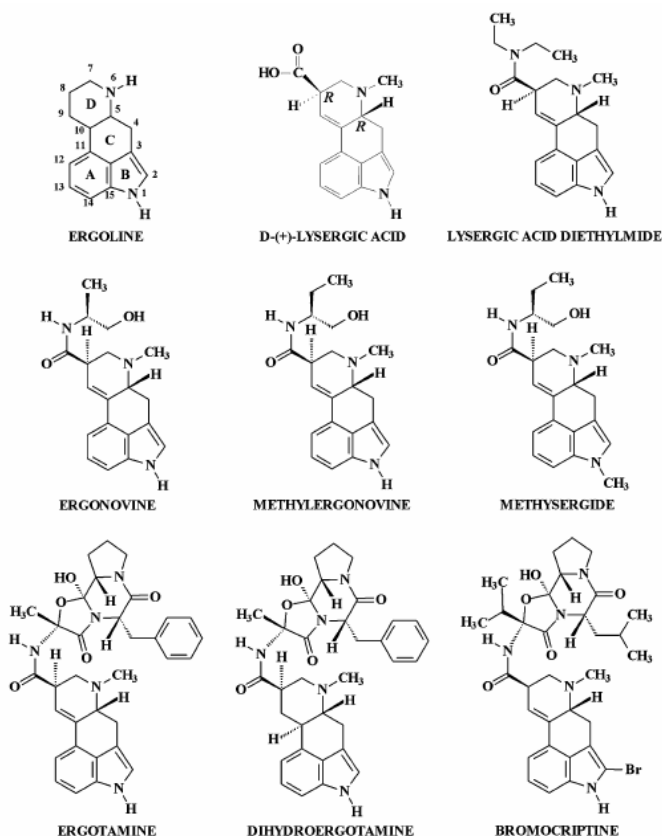
Jak již bylo zmíněno, námelové alkaloidy byly již v minulosti bohatě využívány k vyvolání porodu a potratů, díky uterotonickým účinkům, kdy dochází ke zvýšení frekvence a síly kontrakcí dělohy. Poněkud novější využití alkaloidů obsažených v námelu, je při léčbě některých onemocnění, hlavně cévní a nervové soustavy, konkrétně pak Parkinsonova nemoc, akromegalie nebo hyperprolaktinemie (Mukherjee and Menge, 2000), ale i mnohem běžnější onemocnění jako je migréna (Tfelt-Hansen and Koehler, 2008).

3.2.3 Dělení námelových alkaloidů

Základní stavební strukturou všech námelových alkaloidů je ergolinový kruh (Obr.3). Z hub rodu *Claviceps* bylo izolováno přes 70 různých alkaloidů, které jsou rozdělovány podle několika kritérií. Jedním z nich je rozpustnost ve vodě: 80% alkaloidů ve vodě rozpustná není. Dalším z kritérií je struktura. Dle ní jsou námelové alkaloidy rozděleny do 3 základních skupin:

- 1) klavinové alkaloidy
- 2) jednoduché deriváty kyseliny lysergové
- 3) peptidové alkaloidy (ergopeptidy)

Alkaloidy obsahují několik center chiralita, která jsou variabilní, výjimku tvoří nevariabilní chiralita na pozici C-5. Medicínsky významné alkaloidy jsou všechny C-8 amidové nebo peptidové deriváty kyseliny lysergové.



Obrázek 3: Strukturální vzorec ergolinu a jeho derivátů (Schiff, 2006)

Klavinové alkaloidy

Klaviny jsou substituované 6,8-dimethylergoliny, a přestože tato skupina zahrnuje přes 35 alkaloidů, žádný z nich nenašel využití v medicíně.

Deriváty kyseliny lysergové

Nejpočetnějšími deriváty této skupiny jsou amidy, které dále můžeme dělit na nepeptidové a peptidové (běžné jsou tripeptidy) viz dále. Mezi nepeptidové amidy kyseliny lysergové patří např. ergonovin (ergometrin, ergobasin) či 2-hydroxyethylamid kyseliny lysergové.

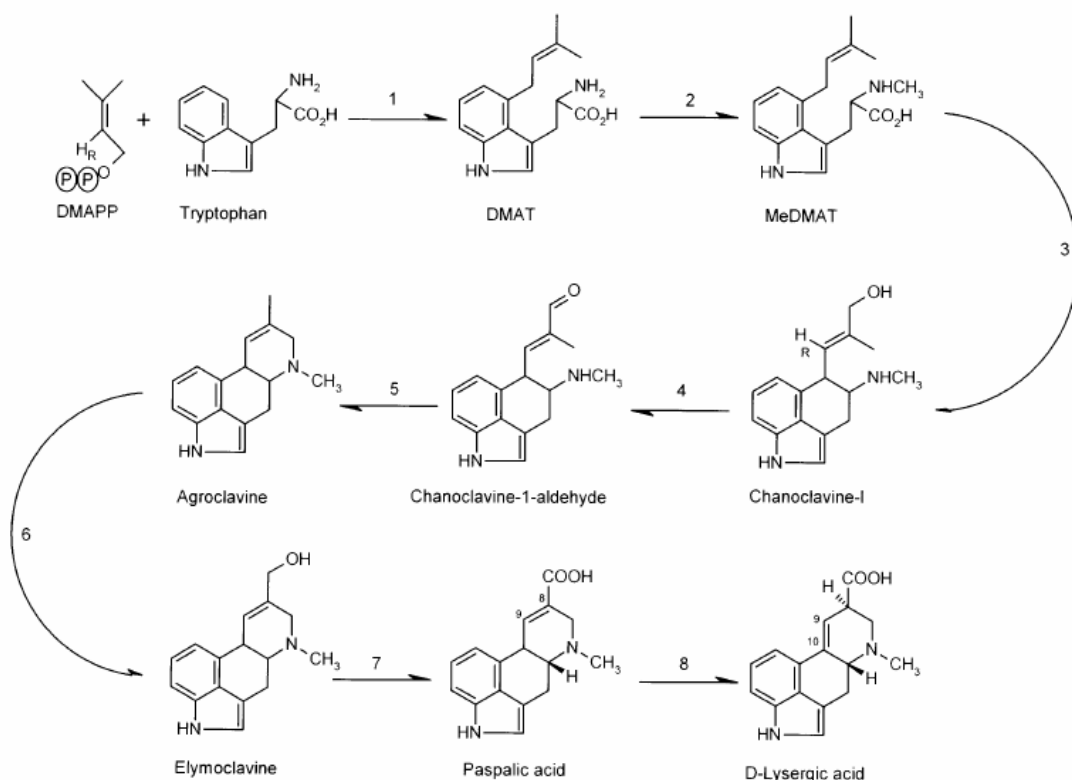
Peptidové alkaloidy

Prvním členem peptidového řetězce je kyselina lysergová, po ní následují 3 klasické aminokyseliny, třetí AMK je téměř výhradně prolin, ale první dvě jsou proměnné, čímž se tato skupina alkaloidů stává velmi rozmanitou. Příkladem peptidových alkaloidů je ergotamin, jenž je hojně využíván v lékařství, stejně tak i jeho semisyntetické deriváty dihydroergotamin používaný při akutní léčbě migrény nebo klastrových bolestí hlavy a bromokriptin indikovaný při hyperprolaktinémii, která může vést až k neplodnosti, dále je účinný i při léčbě akromegalie a Parkinsonovy nemoci (Schiff, 2006).

3.3 Biosyntéza námelových alkaloidů

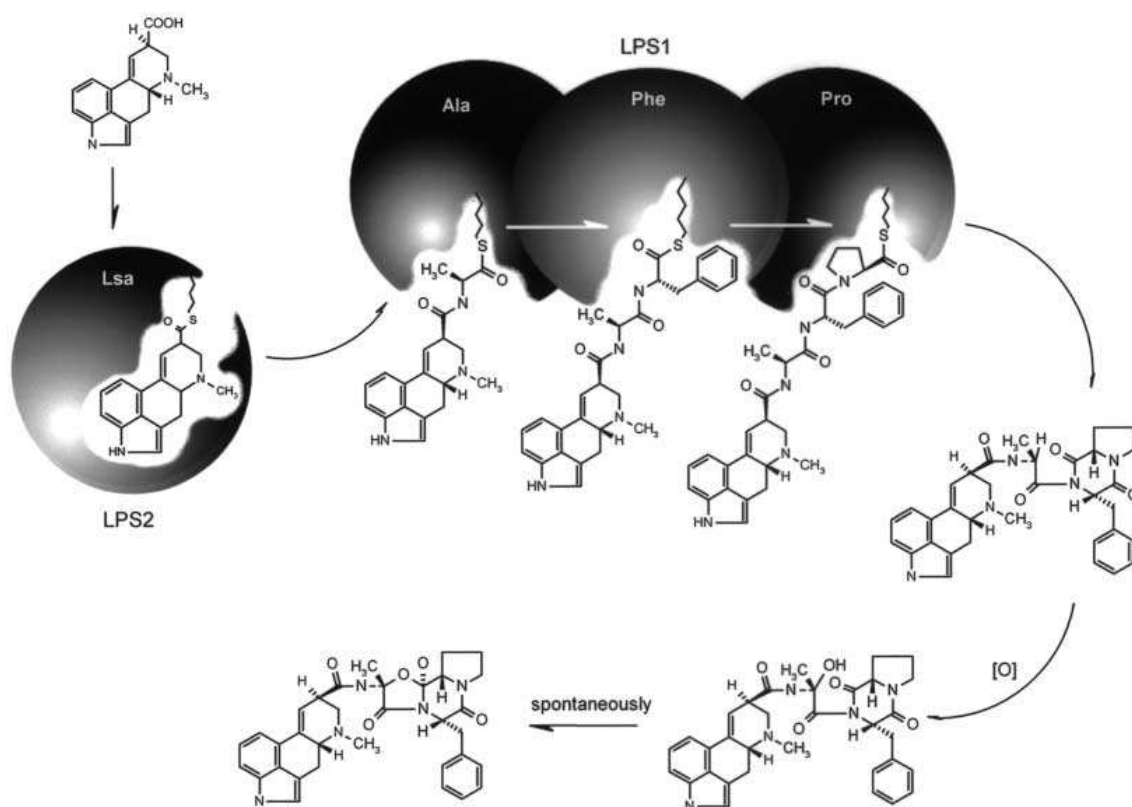
3.3.1 Biosyntéza

Syntéza začíná alkyací L-tryptofanu, jenž indukuje tvorbu námelových alkaloidů (Obr.4). Společně s fosfátem, který funguje naopak jako inhibitor, jsou jedny z nejdůležitějších látek v regulaci biosyntézy (Robbers et al., 1972). Tryptofan s dimethylallyldifosfátem poskytuje 4-dimethylallyl-L-tryptofan, který je N-metylovaný S-adenosyl-L-methioninem (Schiff, 2006). Tento krok je katalyzován N-methyltransferasou (Otsuka et al., 1980). Uzavřením kruhu vzniká chanoklavin-I a následuje oxidace na chanoklavin-I aldehyd za působení chanoklavin-I cykasy (Gröger and Sajdl, 1972). Dekarboxylací a redukcí je uzavřen další kruh a vzniká agroklavin. Následující oxidací se agroklavin přeměňuje na elymoklavin za katalýzy enzymem agroklavin, 17-mono-oxygenasa, (Kim et al., 1981). Další z enzymů zapojených do biosyntézy je produkt genu *cloA*, katalyzující přeměnu elymoklavinu na kyselinu paspalovou (Haarmann et al., 2006) a tím je enzym elymoklavin 17-monooxygenasa (Maier et al., 1988). Kyselina paspalová poté spontánně izomeruje na kyselinu lysergovou.



Obrázek 4: Biosyntéza D-lysergové kyseliny (Tudzynski, 2001)

Z Kyseliny lysergové a 3 aminokyselin vznikají ergopeptidy za působení D-lysergyl peptidových syntetas = LPS, které patří do neribosomálních peptid syntetas (NRPS). LPS se skládá ze dvou podjednotek, větší z nich (LPS1) má velikost 370 kDa a aktivuje aminokyseliny. Menší podjednotka (LPS2) má 140 kDa a je zodpovědná za aktivaci D-lysergové kyseliny. Syntéza ergopeptidů začíná navázáním kyseliny lysergové na LPS2 (Obr.5), pokračuje jejím navázáním na první AMK, která je na LPS1 a vytvoří se D-lysergyl-monopeptid. LPS1 katalyzuje kondenzaci s dalšími dvěma aminokyselinami. Nakonec je D-lysergyltripeptid uvolněn z LPS1 cyklizací na laktam (Riederer et al., 1996).



Obrázek 5: Biosyntetická dráha ergopeptidů (Tudzynski, 2001)

3.3.2. Geny klastru pro biosyntézu námelových alkaloidů

Základními stavebními kameny pro kostru kyseliny lysergové je aminokyselina L-tryptophan a isopren dimethylallyldifosfát. Tento rozhodující krok katalyzuje enzym dimethylallyltryptofan syntasa, DMATS, (Gebler and Poulter, 1992), který je kódován genem *dmaW* (Haarmann et al., 2009), jenž byl první ze 14 detekovaných genů klastru, pomocí metody „chromosome walking“ (Tudzynski et al., 1999). Seskupování genů biosyntézy do klastru (Obr.6) je z důvodu jejich snadnější regulace (Haarmann et al., 2005). Další z genů, jejichž funkce byly charakterizovány jsou *lpsA1* a *lpsA2*, které kódují větší z podjednotek LPS. Menší podjednotka LPS, zodpovědná za aktivaci D-lysergové kyseliny, je kódována genem *lpsB*. Narušením genu *cloA*, u něhož byl předpoklad kódování cytochrom-P450 monooxygenasy (elymoklavin 17-monooxygenasa), bylo demonstrováno, že jeho produkt je zapojen do přeměny elymoklavinu.

Nicméně stále ještě nebyly všechny geny klastru funkčně charakterizovány, jsou označeny jako *eas(A-G)* = ergot alkaloid synthesis, neboli účastníci se syntézy námelových alkaloidů, plus *easH1* a *easH2*, které jsou blízce příbuzné těmto genům (Schardl et al., 2006). I k těmto genům jsou však funkce pomalu přiřazovány. Gen *easE*, kóduje chanoklavin syntasu (Lorenz et al., 2010) a produktem genu *easF* je N-methyltransferasa (Rigbers and Li, 2008). Seznam a předpokládaná funkce genů jsou sepsány v Tabulce 1.

Tabulka 1: Geny klastru *Claviceps purpurea* a jejich funkce

Gen	Dřívější nomenklatura	Předpokládaná funkce
<i>easA</i>	<i>cpox3</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>lpsB</i>	<i>cppe2</i>	Lysergyl peptidyl syntetasa 2
<i>lpsC</i>	<i>Cpps3</i>	Monomodulární neribosomální peptid syntetasa
<i>cloA</i>	<i>cpP450-1</i>	Elymoklavin oxygenasa
<i>easC</i>	<i>cpcat2</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>easD</i>	<i>cpox2</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>easE</i>	<i>cpox1</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>easF</i>	<i>orfB</i>	Metyltransferasa
<i>easG</i>	<i>orfA</i>	Reduktasa/dehydrogenasa
<i>dmaW</i>	<i>cpd1</i>	Dimethylallyltryptofan syntasa
<i>easH1</i>	<i>orfC</i>	Oxygenasa/hydroxylasa
<i>lpsA1</i>	<i>cppe1</i>	Lysergyl peptidyl syntetasa 1
<i>easH2</i>	<i>orfE</i>	Hydroxylasa
<i>lpsA2</i>	<i>cppe4</i>	Lysergyl peptidyl syntetasa 1



Obrázek 6: Schéma genového klastru *Claviceps purpurea* (Lorenz et al., 2009)

4. Praktická část

4.1 Biologický materiál

Transformován byl průmyslově využívaný kmen *Claviceps purpurea*, Gal 130, získaný od firmy TEVA Czech industries. Pro jeho transformaci byl použit plasmid dmaW-p444, připravený klonováním z p444 plasmidu získaného z Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/>). Dále byly použity elektrokompetentní buňky *E.coli* TOP10 a pDrive plasmid (Qiagen, USA) při klonování požadovaného genu.

4.2 Chemikálie

1 kb DNA ladder: Fermentas, Litva
10x pufr pro T₄ DNA ligasu: TaKaRa, Japonsko
6x loading pufr: TaKaRa, Japonsko
Agar: Himedia, Indie
Agarosa: Amresco, USA
Amoniak: Lach-Ner, Česká Republika
Ampicilin: Sigma, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný: Lach-Ner, Česká Republika
dNTP směs 25mM : Fermentas, Litva
Driselasa: Sigma, USA
D-Sorbitol: Duchefa, Holandsko
EB pufr: Qiagen, USA
EcoRI pufr: Fermentas, Litva
EcoRI restriční endonukleasa: 10U/μl, Fermentas, Litva
Ethanol: Penta, Česká Republika
Ethidiumbromid: NeoLab, Německo
Glukosa monohydrát: Lach-Ner, Česká Republika
Heptahydrát síranu zinečnatého: Neo-Lab, Německo
Heptahydrát síranu železnatého: Neo-Lab, Německo
Hydroxid draselný: Lach-Ner, Česká Republika
Chlorid draselný: Lach-Ner, Česká Republika
Chlorid hořečnatý: Finnzymes, Finsko
Chlorid sodný: Lach-Ner, Česká Republika
Chlorid vápenatý: Penta, Česká Republika

IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid): Duchefa, Holandsko
Isopropanol: MACH, Česká Republika
Kanamycin: Duchefa, Holandsko
Komplexon III (EDTA): Penta, Česká Republika
Kvasinkový extrakt: Sigma-Aldrich, USA
T4DNA ligasa: ligasa: NEB, USA
L-Asparagin monohydrát: Sigma-Aldrich, USA
L-cystein hydrochlorid: Lachema, Česká republika
LB Broth hight salt: Duchefa, Holandsko
Luria broth agar: Duchefa, Holandsko
Lyzační enzym z *Trychoderma harzianum*: Sigma, USA
Magnetické kuličky Agencourt RNAClean XP: Beckman Coulter, USA
Octan draselný: Lach-Ner, Česká Republika
Oligo(dT)primer: Fermentas, Litva
Pepton: Duchefa, Holandsko
Pfu DNA polymerasa: Fermentas, Litva
Phleomycin: Duchefa, Holandsko
Polyetylenglykol 6000: Fluka, Německo
POWER SYBRgreen PCR master mix: Applied Biosystems, USA
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u*/ μ l): Fermentas, Litva
Sacharosa: Penta, Česká Republika
SDS: Penta, Česká Republika
Síran hořečnatý: Penta, Česká Republika
Taq DNA polymerasa: vlastní příprava (Šmehilová, 2005)
Tetrahydrát dusičnanu vápenatého: Penta, Česká Republika
Tris (hydroxymethyl)aminomethan: Duchefa, Holandsko
Trypton: Duchefa, Holandsko
TURBO DNase™ (2 U/ μ l): Ambion, USA
Ultračistá neionizovaná voda: RNase, DNase free: Invitrogen, USA
XGal: Duchefa, Holandsko
 β -merkptoethanol: Fluka, Německo

4.3 Připravené roztoky

BII agar: 50 g sacharosu, 1 g peptonu, 1 g L-Asparaginu, 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,1 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 2,4 g agaru na 200 ml média, pH upraveno hydroxidem draselným na 8 (Esser and Tudzynski, 1978)

BII médium: 50 g sacharosu, 1 g peptonu, 1 g L-Asparaginu, 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,1 g heptahydrátu síranu hořečnatého bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody, pH 8 (Esser and Tudzynski, 1978)

LB agar: 30,5g Luria broth agaru, 9,5g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 1l destilované vody

LB médium: 25g Luria broth high salt bylo rozpuštěno v 1l destilované vody

Mantle agar: 100 g sacharosu, 10 g L-Asparaginu, 1 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého, 0,25 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,25 g heptahydrátu síranu hořečnatého, 0,125 g chloridu draselného, 0,033 g heptahydrátu síranu železnatého, 0,027 g heptahydrátu síranu zinečnatého, 0,01 g L-cystein hydrochloridu, 0,1 g yeast extraktu bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody, pH 8, 2% agar (Mantle and Nisbet, 1976)

STC pufr: 0,85 M Sorbitol, 0,01 M Tris, 0,05 M chlorid vápenatý, pH 7,5 (Mey et al., 2002)

SMaC pufr: 0,2 M malát draselný, 0,85 M sorbitol, 0,05 M chlorid vápenatý, pH 7,5 (Mey et al., 2002)

SOC médium: 20g tryptonu, 5g yeast extraktu, 0,5g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 0,95 l destilované vody a bylo přidáno 10 ml 0,25 M roztoku chloridu draselného. pH upraveno hydroxidem sodným na 7,0 a objem byl doplněn vodou na 1l. Roztok byl sterilizován autoklávováním. Nakonec bylo přidáno: 5 ml 2M chloridu hořečnatého, 20 ml sterilního 1M roztoku glukosy - sterilizace pomocí 0,2µm filtru (Sambrook et al., 2001)

Roztok PEG: 25% polyethylen glykol 6000, 0,01 M Tris-HCl, 0,050 M chlorid vápenatý, pH 7,5 (Mey et al., 2002)

TE pufr: 0,1 M Tris-Cl, 0,010 M EDTA, pH 8,0 (Sambrook et al., 2001)

4.4 Použité kity

Qiagen PCR Cloning Kit, Qiagen, USA
QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, USA
QIAprep Mini Kit, Qiagen, USA
RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, USA

4.5 Přístroje

Autoklav: Sanyo MLS-3020U Labo Autoclave, Japonsko
Centrifuga: Jouan MR23i, Francie
Digitální fotoaparát: DC120, Kodak s UV clonou, USA
Elektroporátor: BTX PEP ECM 399, BTX, USA
Flowbox: Steril-Polaris Schoeller Instruments, Německo
Inkubátor: Lovibond, Německo
Mikrocentrifuga: Eppendorf Microcentrifuge 5417R, Německo
Mikrocentrifuga: Hettich Zentrifugen ROTANTA 460R, Německo
Mikroskop: Olympus CX 21, Japonsko
pH metr: Jenway 3505 pH meter, Velká Británie
Real time PCR: StepOnePlus Real Time PCR systém, Applied Biosystems, USA
Termocykler: TGradient Biometra, Německo
Třepačka: Grant-Bio POS300, Grant, Velká Británie
Třepačka: Thermo scientific MaxQ 4450, USA
UV transiluminátor: VL TFP-M/WL, Vilber Lourmat, Francie
Vaničky pro horizontální elektroforézu: Compact XS/S, Biometra, Německo
Vortex: Biosan Combi-spin, Biosan, Litva
Zdroj napětí pro elektroforézu: Standard Power Pack P25 Biometra, Německo

4.6 Postup

1. část: Transformace *Claviceps purpurea*

4.6.1 Inokulace média BII

Do tří 250 ml Erlenmeyrových baněk bylo nalito BII médium, do každé po 50 ml. Médium bylo inokulováno houbou *Claviceps purpurea*, kmenem 130, jedna baňka z tekutého média (2 ml) a 2 z pevného. Nově inokulovaná tekutá média byla inkubována při teplotě 28 °C na třepače po dobu 2 týdnů.

4.6.2 Příprava protoplastů

Narostené tekuté kultury byly centrifugovány. První z řady centrifugací běžela po dobu 10 minut při 4700 otáčkách a pokojové teplotě, druhá po promytí mycelia SMaC pufrem opět 10 minut za stejných podmínek. Během centrifugace bylo připraveno 40 ml SMaC pufru, do kterého bylo přidáno 200 mg lýzujícího enzymu a 60 mg driselasy a vzniklý roztok byl přefiltrován přes 5 nm a následně 0,2 nm filtr, čímž vznikl protoplastizační pufr. Po centrifugaci byl supernatant vylit a do každé z kyvet s kulturou bylo přidáno 20 ml protoplastizačního pufru a pelety v něm byly opatrně rozsuspendovány. Kyvety s myceliem a SMaC pufrem byly ponechány hodinu na třepače při 28°C. Mezitím bylo připraveno médium BII a autoklávováno při 121°C 20 minut. Protoplastizovaná mycelia byla přefiltrována přes nytexovou membránu do Erlenmeyerovy baňky. Filtrát byl přelit do falkonky a následně centrifugován 10 minut při 2000 otáčkách. Byl odlit supernatant, pelet byl promyt 5 ml STC pufru a centrifugován na 10 minut, při 2800 otáčkách. Poslední krok byl zopakován a poté byl pelet rozsuspendován v 1 ml STC pufru a pod mikroskopem byla zkontrolována hustota protoplastů. Ke kontrole bylo použito 10 µl suspenze, která byla naředěna 90 µl STC pufru.

4.6.3 Transformace

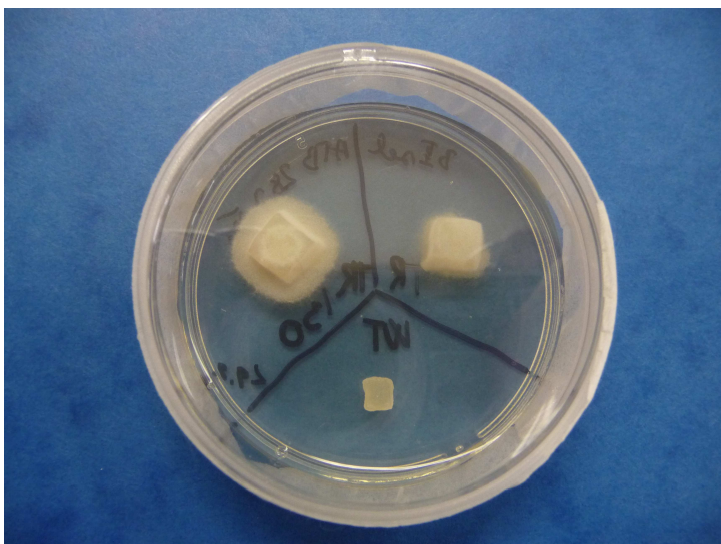
Do 2 zkumavek byly postupně přidány všechny složky směsi (Tab.2).

Tabulka 2: Směs látek na transformaci

Zk1 (negativní kontrola)	Zk2
-	10 μ l DNA
100 μ l STC	90 μ l STC
50 μ l PEG	50 μ l PEG
100 μ l protoplastů	100 μ l protoplastů

Po 20 minutách od smíchání výše uvedených komponent byly do každé ze zkumavek přidány 2 ml PEG. Po dalších 5 minutách pak 4 ml STC pro zastavení transformace. Nakonec bylo přichystáno 10 Petriho misek. Do každé z nich bylo vždy nalito cca 20 ml BII média. Do jedné misky bylo přidáno 11 μ l roztoku ze zkumavky s negativní kontrolou (miska bude sloužit jako kontrola protoplastů, zda jsou schopné růstu i po odstranění buněčné stěny a zda nebyly během transformace usmrceny) a do další 690 μ l ze zkumavky 2. Do zbytku BII média bylo připipetováno 120 μ l antibiotika (phleomycin), aby výsledná koncentrace byla 33 ng/ml. Takto upravené médium bylo rozlito do zbývajících 8 misek a opět bylo přidáno po 690 μ l směsi ze zkumavky 2, která obsahovala transformanty.

Transformanti byli po 8 dnech přeneseni na médium s vyšší koncentrací antibiotika (100 μ l/ml) a s pH 8, společně s wild typem daného kmene pro kontrolu účinnosti antibiotika (Obr.7).



Obrázek 7: Selekční médium s transformanty kmene 130 a WT

Po 6 dalších dnech byli z původního média, kde byla koncentrace antibiotika 33 ng/ml, vyříznuti další 4 transformanti a přeneseni na nové médium s vyšší koncentrací phleomycinu (100 µl/ml). Transformanti zobrazení na obrázku 6 byli rozděleni na půl a jedna půlka byla přenesena na nové samostatné médium, shodné s tím, ze kterého byla odebrána, tedy BII agar, a druhá půlka na médium podporující sporulaci, tedy Mantle agar. Transformanti byli označeni jako TR1 a TR2.

4.6.4 Monosporická izolace

Do misky s transformantem nebo WT byl napipetován 1- 1,5 ml sterilní vody. Gumovou tyčinkou bylo přejížděno po povrchu kultury, aby se docílilo oddělení spor. Sterilní voda se sporami byla odebrána špičkou s filtrem a byla přepipetována do Eppendorfy. Do dalších 3 Eppendorfek bylo napipetováno 900 µl sterilní vody. Do jedné z těchto tří zkumavek bylo přidáno 100 µl roztoku se sporami. Takto byly získány spory 10x naředěné. Úkon byl zopakován ještě dvakrát a spory tak byly 100x a 1000x ředěné. Naředěné roztoky (10x, 100x, 1000x) byly z Eppendorfek vylity na misky s Mantle agarem obsahujícím antibiotikum phleomycin o koncentraci 100 µl/ml. Po narostení byly jednotlivé kolonie přeneseny na čerstvé médium se stejnou koncentrací daného antibiotika a inkubovány při 28 °C.

4.6.5 Purifikace celkové RNA

Purifikace RNA byla provedena za použití kitu (RNeasy Mini Handbook, 2006), kdy byl do misky nalit tekutý dusík pro její zchlazení a z pevného média do ní byla přenesena narostlá houba. Průběžně byl přidáván dusík, aby houba zůstala zmrazena po celou dobu manipulace a byla rozdracena na prášek. Většina rozdracené hmoty byla odebrána do Eppendorfy, která sloužila jako zásobník a do další bylo nabráno množství menší než 100 mg a bylo přesně zváženo. Zkumavky byly i nadále uchovávány v tekutém dusíku. Do naváženého množství byl přidán RLC pufr (450 µl), do kterého bylo připipetováno 10 µl β-merkaptoethanolu a zkumavky byly intenzivně promíchány na vortexu. Z těchto zkumavek bylo odpipetováno 500 µl do fialových kolonek a byly 2 minuty centrifugovány na maximální rychlost. Supernatant byl opatrně přepipetován do nových zkumavek, aby nebyl narušen pelet a bylo přidáno poloviční množství 96% ethanolu (tj. 250 µl). Pipetou byl roztok promíchán a cca 700 µl bylo přeneseno do nových, růžových kolonek, umístěných do 2 ml zkumavek. Byly centrifugovány 15 s při 10 000 otáčkách. Poté bylo odlito to, co proteklo přes kolonky a bylo přidáno 700 µl RW1 pufru a opět byly centrifugovány 15 vteřin. Kolonky pak byly přendány do nových zkumavek a bylo přidáno 500 µl RPE pufru. Po 30 vteřinách centrifugace byl odlit proteklý odpad a poslední

krok byl zopakován ještě jednou. Následně byly kolonky centrifugovány 2 minuty na sucho. Nakonec byly kolonky přemístěny do 1,5 ml zkumavky a bylo přidáno 30 μ l RNase-free vody přímo na střed kolonek a minutu byly centrifugovány. Opět se tento krok zopakoval, čímž se RNA vymyla z kolonek, a zůstala tak v roztoku pod nimi.

4.6.6. Odstranění zbytků DNA

Z každého vzorku přečištěné RNA bylo odebráno 43 μ l, k tomu bylo přidáno 5 μ l DNasa pufru, 2 μ l DNasy a směs byla inkubována 45 minut při 37 °C. Po této době byl přidán další 1,5 μ l DNasy a znova bylo inkubováno při 37 °C, ale jen po dobu 30 minut. Po jejich uběhnutí byl přidán další 1,5 μ l enzymu a směs inkubována 30 minut. Takto byly odstraněny poslední zbytky DNA.

4.6.7 Izolace RNA

V mikrodestičce bylo smícháno 50 μ l RNA, 30 μ l magnetických kuliček a 25 μ l 100% isopropanolu. Po promíchání pipetou byla směs ponechána 10 minut ve stojánku. Poté byla mikrodestička přemístěna na magnetickou destičku a po chvíli RNA, navázaná na magnetických kuličkách, vytvořila prsteneček kolem stěn v mikrodestičce, což umožnilo odpipetování isopropanolu. Následně bylo opakovaně (3x) přidáváno 200 μ l 70 % ethanolu a zase byl odpipetován. Při posledním opakování bylo třeba odebrat maximum ethanolu, aby se zkrátila doba, během které bude mikrodestička vysychat v laminárním boxu. Po absolutním vysušení bylo přidáno do každé jamky 20 μ l RNase-free vody, ve které se RNA oddělila od magnetických kuliček. Stojánek s destičkou byl přemístěn na 10 minut na led a poté opět na magnetickou destičku. RNA rozpuštěná ve vodě byla odpipetována.

4.6.8 Reverzní transkripce

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 0,5 µl Oligo(dT) primeru, 1 µg RNA (max 5,5 µl) a doplněno vodou do 6 µl. Směs byla vložena do thermocykleru na 5 minut při 70°C. Po uplynutí této doby bylo přidáno do každé zkumavky 3,5 µl premixu, který obsahoval pro každou zkumavku 2 µl reakčního pufru, 1 µl dNTPs a 0,5 µl vody. Vzorky byly inkubovány 5 minut při 37°C a poté bylo přidáno 0,5 µl reverzní transkriptasy. Směs byla inkubována 60 minut při 42°C, pak následovalo 5 minut při 72°C.

4.6.9 Real-Time PCR

Primer Mix – příprava

Do 100 µl ultračisté, neionizované, RNase, DNase free vody bylo přidáno 1,2 µl PRIMER FW (c = 100 µM) a 1,2 µl PRIMER REV o stejné koncentraci (Tab.3).

PREMIX pro Real-Time PCR – příprava

Na každý vzorek byly smíchány 2,5 µl Primer Mix a 5 µl Master mix, obsahující Power SYBR Green. K celkovému množství 7,5 µl pak bylo přidáno po 2,5 µl cDNA.

Tabulka 3: Použité primery pro Real-Time PCR

Gen	Název primeru	Sekvence
PHLEO	PHLEOorttagnew_fw	CCGGAGCGGTTCGAGTTC
	PHLEOorttagnew_rev	TCCTGGACCGCGCTGAT
EF1	CpEF1tag_fw	CAAGCCCGGTATGGTCGTTA
	CpEF1tag_rev	CTGCTCGTGGTGCATTTC
TUB	CpTUBtag_fw	CTCAGCAAATGTTTGACCCTAAGA
	CpTUBtag_rev	AGATGGCAGAGCATGTCAGGTA
dmaWgen	CpDMAWtagenom_fw	CGGTTTTTCGGCATGAATGAC
	CpDMAWtag_rev	CAAATGTGTGCAAATATACGCTCAA
dma	CpDMAWtag_fw	TTCAGGATTCGTACCCGTATCA
	CpDMAWtag_rev	CAAATGTGTGCAAATATACGCTCAA

Metoda Real-Time PCR je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že umožňuje kontinuálně pozorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Nutná je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny.

Zde bylo použito fluorescenční barvivo SYBR green a primery byly navrženy programem PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems).

Nastavení programu real time PCR thermocycleru:

Počáteční denaturace probíhala při 95°C po dobu 10 minut, následovala denaturace rovněž při 95°C, 15 sekund. Annealing a elongace pak běžela při 60°C, 1 minutu. Druhý a třetí krok byly opakovány ve 40 cyklech.

Syntetizovaný produkt PCR byl relativně kvantifikován, tj. porovnán s kontrolní skupinou vzorků. Jako negativní kontrola zde byla použita cDNA z netransformované houby. Při hodnocení platí, že čím vyšší je obsah nukleové kyseliny v testovaném vzorku, tím rychlejší je přírůstek fluorescence. Do grafu vložíme horizontální křivku, což je tzv. treshold neboli fluorescenční práh. Jeho hodnotu zvolíme takovou, aby po převedení sigmoidní křivky na logaritmickou, práh protínal všechny tyto křivky v lineární části. Průnik křivek je C_T hodnota, u které platí nepřímá úměra s počátečním množstvím mRNA. U amplifikace cDNA byla míra exprese vztažena na expresi genu pro β -Tubulin a elongační faktor (EF1) a počítána metodou $\Delta\Delta C_T$. Pro dokázání exprese vloženého *dmaW* genu byl použit primer dmaW. Primer dmaW gen byl pro kontrolu přítomnosti genomické DNA, zda jí nebyl vzorek kontaminován.

2 část: Příprava *cloA* genu pro sekvenaci

4.6.10 Izolace DNA

Eppendorfka o objemu 2 ml byla z 1/8 naplněna lyofilizovaným myceliem *Claviceps purpurea*, kmeny 130 a 404. Mycelium bylo přelito tekutým dusíkem a rozdrceno skleněnou tyčinkou. Do Eppendorfky bylo přidáno 600 µl pufru (Tab.4)

Tabulka 4: Složení lýzujícího pufru

Lýzující pufr
200 mM Tris-HCl (pH 8,5)
250 mM NaCl
25 mM EDTA
0,5 % SDS

Následně bylo mycelium zvortexováno (cca 1 minutu) a přidáno 400 µl 5M KaAC. Poté bylo inkubováno 20 minut při -20 °C. Po vyjmutí z mrazáku bylo mycelium centrifugováno po dobu 20 minut, rychlostí 15000 otáček za minutu a 4 °C. Supernatant byl odlit do nové Eppendorfky, k němu byl připipetován 1 ml isopropanolu a směs byla protřepána a opět inkubována 45 minut při -20 °C. Zmrazený vzorek byl pak půl hodiny centrifugován při 4 °C a 15 000 otáčkách. Pelet byl promyt 1 ml 70% etanolu a 10 minut centrifugován při stejném nastavení jako u předchozích kroků. Nakonec byl pelet rozpuštěn ve 30 µl TE pufru a do další práce zmrazen.

4.6.11 PCR Amplifikace

Polymerázová řetězová reakce je metoda používaná k rychlému namnožení úseku DNA díky opakované denaturaci a následné replikaci jednotlivých vláken. Byl připraven premix, který obsahoval pro každý vzorek 0,25 µl Pfu DNA polymerasy, 2,5 µl pufru, 19,75 µl vody, po 0,5 µl forward a reverse primeru (Tab.5) a 0,5 µl nukleotidů.

Tabulka 5: Sekvence primerů genu *cloA*

primer <i>cloA</i> full_fw	ATGTCGCTACAATGGCTGCAACA
primer <i>cloA</i> full_rev	TCAGGTCCATCGATCAGCCAGTA

Do mikrozkuhavky tedy bylo napipetováno 24 µl premixu a přidán 1 µl DNA. Vzorky byly vloženy do thermocykleru a byla spuštěna PCR. Počáteční denaturace běžela při 95 °C po dobu 3 minut. Pak začala 30 vteřinová denaturace cyklovaná při stejné teplotě, následovaná půlminutovým annealingem při 58 °C. Elongace pak běžela 3 minuty při 72 °C a finální elongace 10 minut při stejné teplotě. Počet nastavených cyklů byl 35.

4.6.12 Polyadenylace

Do vzorků po PCR bylo přidáno 0,5 μ l Taq polymerasy a byly vloženy do thermocyklieru na 10 minut. Teplota byla nastavena na 72 °C. Po uplynutí 10 minut byly vzorky podrobeny gelové elektroforéze. Pomocí této reakce byly vytvořeny polyA konce umožňující klonování do pDrive plasmidu.

4.6.13 Elektroforéza a separace fragmentu

Elektroforéza byla provedena pro rozdělení DNA na fragmenty dle jejich molekulových hmotností. Byl použit 1% agarosový gel a napětí 120 V. Do ještě horkého gelu bylo napipetováno 50 μ l 10% ethidium bromidu (v/v) na cca 150 ml agarosového gelu a pečlivě rozmícháno špičkou. Ethidium bromid byl použit jako fluorescenční barvivo, které se velmi silně váže na DNA. Pomocí hřebínku byly vytvořeny jamky, do nichž se po ztuhnutí gelu a vyjmutí hřebínku, nanasla DNA. Pro usnadnění aplikace vzorků a možnost sledovat průběh elektroforetického dělení, byl k DNA nejprve přidán 6x vzorkovací pufr. Mimo vzorky byly na gel ještě napipetovány 3 μ l markeru 1 kb DNA ladder, pro umožnění odečtení velikostí získaných bandů.

4.6.14 Izolace DNA z gelu

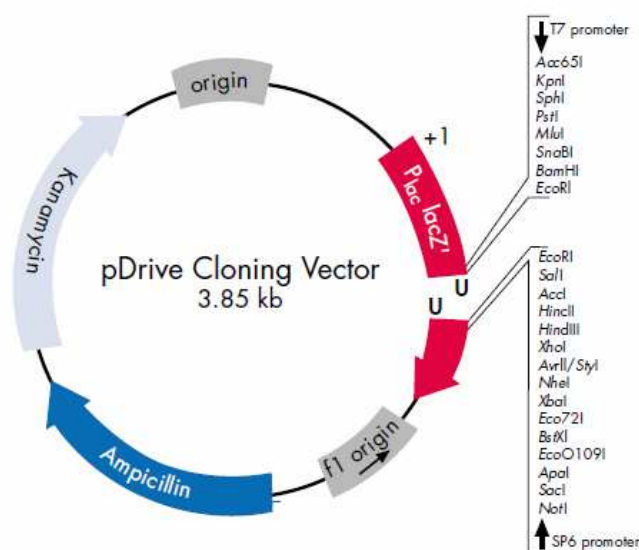
Po proběhnutí elektroforézy byly fragmenty o velikosti 2100 párů bazí vyříznuty čistým skalpelem z gelu a zbaveny jeho zbytků pomocí kitu na gelovou extrakci (QIAquick Spin Handbook, 2006). K plátku gelu byl přidán trojnásobný objem QG pufru a byl v něm inkubován při 50 °C, dokud se gel úplně nerozpustil (přibližně 10 minut). Barva byla i po rozpuštění gelu žlutá (pufr obsahuje pH indikátor), což značilo příznivé pH ($\leq 7,5$) pro efektivní adsorpci DNA na membránu. Ke vzorku byl poté přidán 1 objem gelu 100% isopropanolu a napipetován na odstředivou kolonku, která byla vložena do 2 ml zkumavky a byla centrifugována po dobu 1 minuty. Proteklý roztok byl odlit a kolonka byla vrácena zpět do zkumavky. Pro úplné odstranění agarosy bylo na kolonku napipetováno 0,5 ml QG pufru a centrifugace zopakována. K promytí byl použit PE pufr a kolonka byla před další centrifugací ponechána několik minut ve stojanu. Poté byl odpad odlit a kolonka centrifugována na sucho 1 minutu při 13 000 otáčkách. Kolonka byla předána do čisté zkumavky o objemu 1,5 ml. Pro vymytí DNA z kolonky byl použit EB pufr (30 μ l), jenž se nanasla přímo na střed kolonky, ta byla ponechána 1 minutu ve stojanu před finální centrifugací (rovněž 1 minuta).

4.6.15 Klonování DNA fragmentů

Vzorky DNA, zbavené gelu, byly použity při ligaci (Tab.6) do pDrive plasmidu (Obr.8), která probíhala přes noc při 16 °C, ráno byla ligasa inaktivována zvýšením teploty na 70 °C po dobu 10 minut (Qiagen PCR cloning handbook, 2001).

Tabulka 6: Ligační směs

DNA v EB pufru	4 µl
Ligační směs 2x	5 µl
pDrive cloning vektor (50 µg/µl)	1 µl



Obrázek 8: Mapa pDrive cloning vektoru (Qiagen PCR cloning kit handbook, 2001)

DNA (1 µl) byla smíchána s 50 µl elektrokompetentních *E.coli* TOP 10 buněk, rozmražených 3 minuty na ledu. Poté byl proveden impuls o 1800 V po dobu 4 ms. Bylo přidáno 150 µl SOC média a vzorky byly inkubovány hodinu na třepačce při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky naneseny na LB agary s antibiotikem ampicilinem nebo kanamycinem (50 mg/ml). Před nanesením buněk na misky bylo aplikováno 40 µl X-Gal a 40 µl IPTG pro Blue White screening a rozetřeno hokejkou. Veškerá práce, kromě impulsu, byla prováděna v laminárním boxu. Misky pak byly inkubovány do druhého dne horní stranou dolů při 37 °C. Bílé kolonie byly sterilním párátkem přeneseny do zkumavek s 2 ml tekutého LB média, obsahujícího stejná antibiotika, jako předchozí médium i o stejné koncentraci.

Princip Blue White screeningu

Tato selekce slouží k odlišení úspěšně transformovaných buněk od netransformovaných. Princip je založen na aktivitě enzymu β -galaktosidasy, která štěpí galaktosu na laktosu a glukosu. Pro sledování aktivity tohoto enzymu lze použít umělý substrát, tzv. X-Gal. Tento substrát je bezbarvý, ale po jeho rozštěpení vzniká modrý produkt. Pokud je tedy X-Gal přidán do média, na které jsou nanášeny bakterie, obsahující funkční β -galaktosidasu, budou se jejich kolonie zabarvovat do modra. V případě, že bakterie nemají funkční gen pro β -galaktosidasu, zůstanou krémově bílé. Gen, kódující produkci β -galaktosidasy lze využít jako tzv. reportérový gen - do tohoto genu je možné vložit cizí DNA. Při úspěšném vložení cizí DNA, dojde k narušení genu pro β -galaktosidasu a bakterie zůstanou krémově bílé. Ve vektorech se konkrétně používá *lacZ* gen, jenž kóduje tzv. alfa-fragment β -galaktosidasy a je potřeba přidat IPTG, jakožto induktor exprese *lacZ*.

4.6.16 Izolace plasmidu

Z narostlých kultur bakterií byly izolovány plasmidy. Na izolaci byl použit kit (QIAprep Miniprep Handbook, 2006). Obsah zkumavek byl přelit do zkumavek 2 mililitrových a centrifugován 3 minuty při 9000 otáčkách. Supernatant byl odlit a pelet řádně rozsuspendován pomocí vortexu v 250 μ l P1 pufru. Poté bylo ke směsi připipetováno 250 μ l P2 pufru a promícháno opatrným obrácením zkumavky. Dále bylo přidáno 350 μ l N3 pufru a obsah zkumavky byl okamžitě promíchán opakovaným převrácením zkumavky. Směs byla 10 minut centrifugována při 13000 otáčkách a supernatant byl přepipetován do QIAprep spin kolonek. Ty byly 1 minutu centrifugovány při 13000 otáčkách a kapalina, jež protekla, byla odlita. Kolonky pak byly promyty 500 μ l PB pufru, který se nechal protéct skrz kolonky a poté byl odlit. Předchozí krok byl zopakován s 750 μ l množstvím PB pufru. Po odlití pufru byly kolonky opětovně centrifugovány 1 minutu na sucho. Vysušené kolonky byly přemístěny do nových 1,5 ml zkumavek. Na střed kolonek bylo nanášeno 50 μ l EB pufru, 1 minutu byly ponechány ve stojánku a následně centrifugovány. DNA tak byla z kolonek eluována.

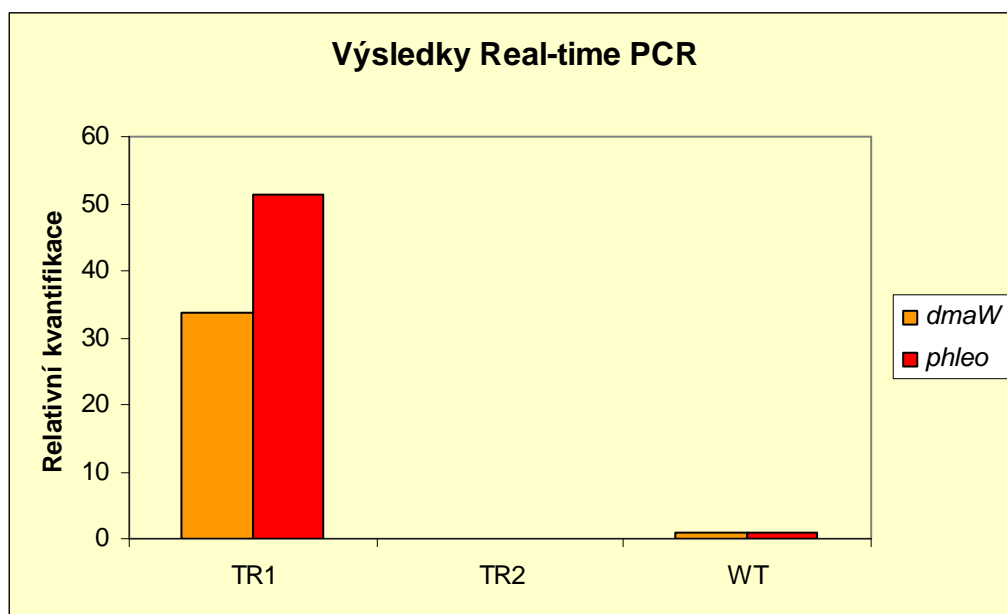
4.6.17 Restrikce

K potvrzení úspěšnosti ligace byla využita restrikční analýza. Do každé mikrozkumavky byly napipetovány 2 μ l pufru, takové množství vzorku, aby zkumavka obsahovala 1 ng plasmidu pDrive se zaklonovaným *cloA* genem, 0,3 μ l EcoRI restrikční endonukleasy a voda doplňující směs do 20 μ l. Zkumavky byly inkubovány při 37°C a štěpené plasmidy byly podrobeny elektroforetickému dělení.

5. Výsledky a diskuze

5.1 Transformace *Claviceps purpurea* Gal 130

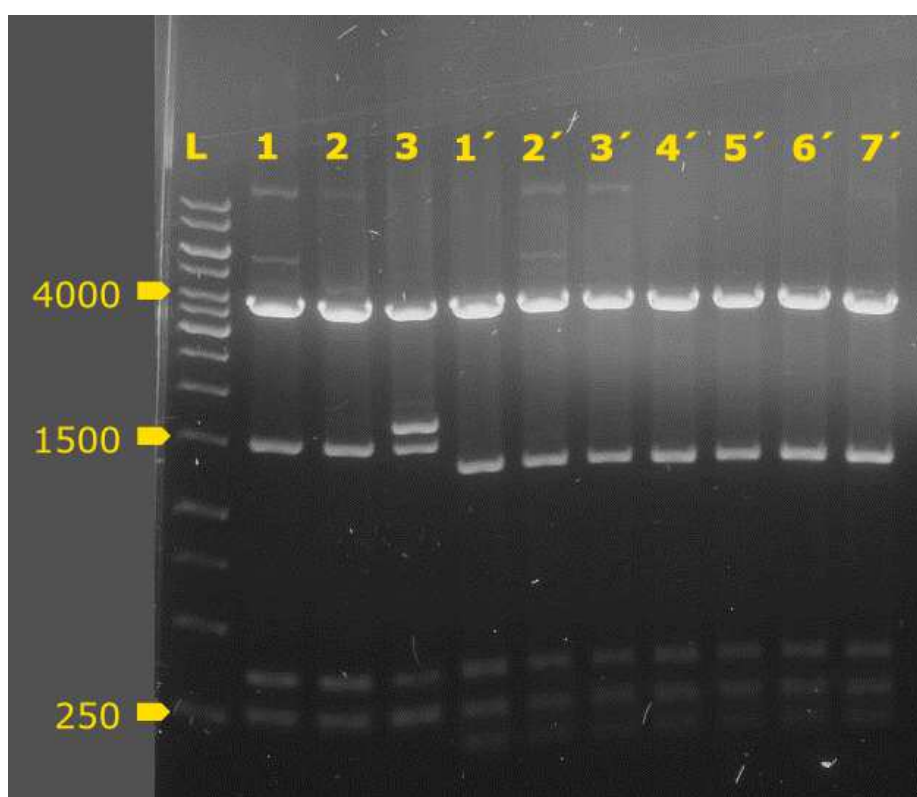
Gal 130 produkční kmen *C. purpurea*, byl transformován konstruktem pro nadexpresi genu *dmaW*. RNA z netransformovaného Gal 130 kmene a jeho dvou transformantů byla izolována a přečištěna (4.6.5). Poté byl odstraněn zbytek DNA (4.6.6). Získaná RNA byla převedena na DNA (4.6.8), která byla použita k Real-Time PCR (4.6.9). Byla sledována exprese genu pro resistenci na antibiotikum phleomycin a exprese genu *dmaW*, který je u divokého námele mimo parazitickou fázi exprimován v minimální míře. U amplifikace cDNA byla míra exprese vztažena na expresi genu pro Tubulin a elongační faktor (EF1) a počítána metodou delta delta C_T . Pro prokázání exprese vloženého *dmaW* genu pod konstitutivním promotorem byl použit primer *dmaW* (Obr.9). Primer *dmaW* gen byl pro kontrolu přítomnosti genomické DNA, zda jí nebyl vzorek kontaminován.



Obrázek 9: Graf zobrazující přítomnost genů *dmaW* a *phleo* v transformantech a WT

5.2 Izolace a amplifikace *cloA* genu

DNA izolovaná z *Claviceps purpurea*, konkrétně z kmenů 130 a 404 (4.6.10), byla amplifikována pomocí PCR (4.6.11). Poté následovala polyadenylace (4.6.12) a elektroforéza na agarosovém gelu (4.6.13). Fragmenty o přibližné velikosti 2100 párů bazí byly izolovány z gelu (4.6.14) a klonovány do pDrive plasmidu (4.6.15). Plasmid s inzertem byl elektroporován do buněk *E.coli* TOP 10 (4.6.15). Z nich pak byl izolován plasmid pomocí kitu (4.6.16). Získaný plasmid byl rozštěpen restriční endonukleasou EcoRI (4.6.17) a štěpy byly rozděleny elektroforézou, kterou byla potvrzena přítomnost inzertu (Obr.10) na základě přítomnosti fragmentů o požadovaných velikostech (260bp, 360bp, 1500bp a 3800bp).

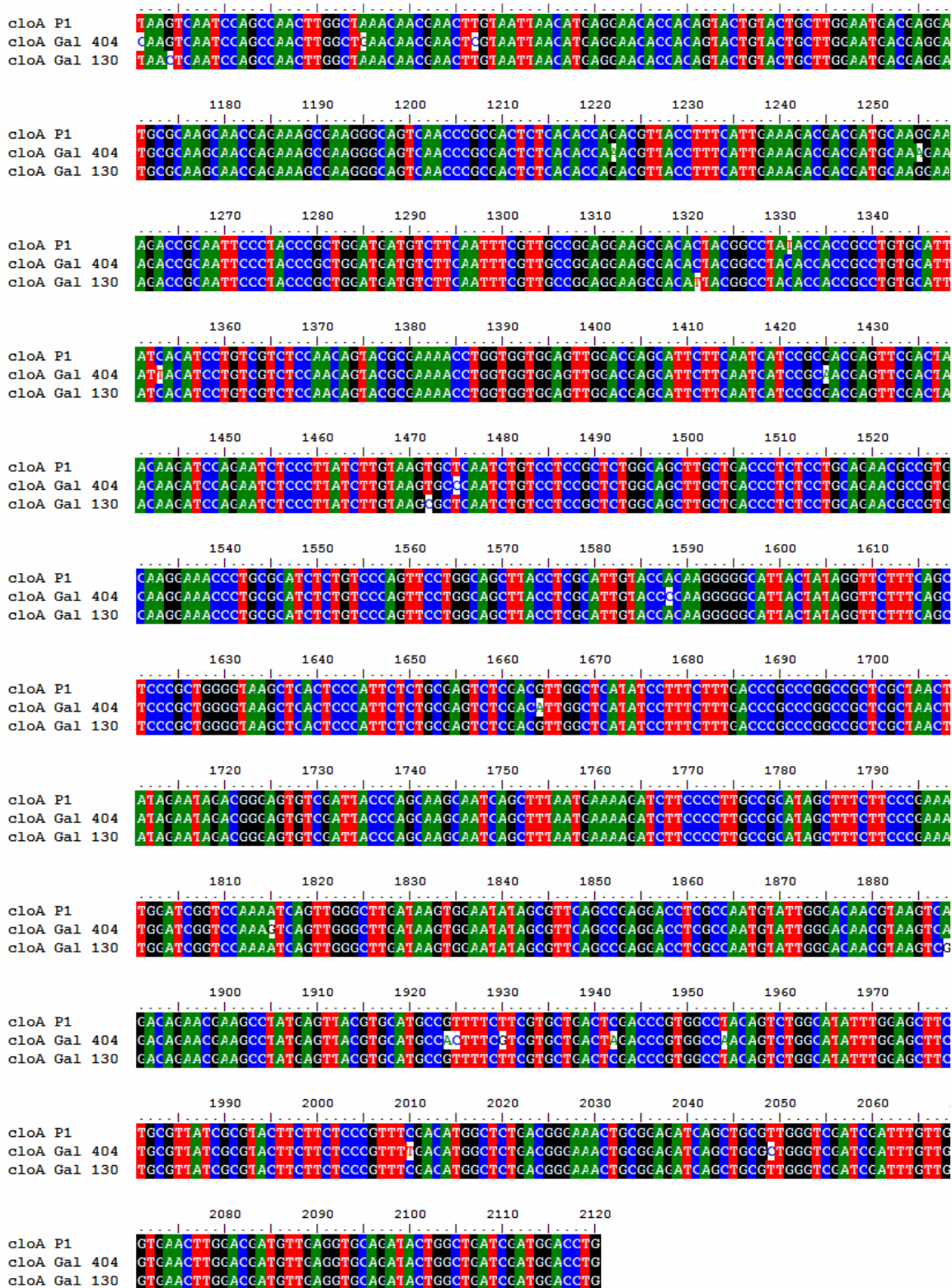


Obrázek 10: Elektroforeogram pDrive plasmidu s inzertem

Izolované plasmidy pak byly odeslány na sekvenaci firmě ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

5.3 Vyhodnocení sekvencí genu *cloA*

	10	20	30	40	50	60	70	80
cloA P1	ATGTCGCTACAATGGCTGCAACAAACTCGGCACCAACTTTCTTGCACCTTGGATTTTACTCACCACATGATTTGCTCTCACATCTCCAC							
cloA Gal 404	ATGTCGCTACAATGGCTGCAACAAACTCGGCACCAACTTTCTTGCACCTTGGATTTTACTCACCACATGATTTGCTCTCACATCTCCAC							
cloA Gal 130	ATGTCGCTACAATGGCTGCAACAAACTCGGCACCAACTTTCTTGCACCTTGGATTTTACTCACCACATGATTTGCTCTCACATCTCCAC							
	100	110	120	130	140	150	160	170
cloA P1	GTTCTCAAAGGCATCTATAAATGCTATTTTCATCCCTTTCGCAACATTCCGGGGCCCAAGCTTGCCGCATTCAACCACCTTTTATGCCCT							
cloA Gal 404	GTTCTCAAAGGCATCTATAAATGCTATTTTCATCCCTTTCGCAACATTCCGGGGCCCAAGCTTGCCGCATTCAACCACCTTTTATGCCCT							
cloA Gal 130	GTTCTCAAAGGCATCTATAAATGCTATTTTCATCCCTTTCGCAACATTCCGGGGCCCAAGCTTGCCGCATTCAACCACCTTTTATGCCCT							
	190	200	210	220	230	240	250	260
cloA P1	TACTGCAACTGCATCCACATCAAGCATATTTCCAAGCAGTTCACTCGCTTGACCAGCAGTACAGTAAGTTGTCAATCGCAAGCCACG							
cloA Gal 404	TACTGCAACTGCATCCACATCAAGCATATTTCCAAGCAGTTCACTCGCTTGACCAGCAGTACAGTAAGTTGTCAATCGCAAGCCACG							
cloA Gal 130	TACTGCAACTGCATCCACATCAAGCATATTTCCAAGCAGTTCACTCGCTTGACCAGCAGTACAGTAAGTTGTCAATCGCAAGCCACG							
	280	290	300	310	320	330	340	350
cloA P1	TCAAGCACTCAAGGTTTGTGTGTTGACACAGGGCGCAAGATTCTCCCATCATTCGAATTTGGTCCAAACAAGTCCATACCACACAGGTA							
cloA Gal 404	TCAAGGTTTGTGTGTTGACACAGGGCGCAAGATTCTCCCATCATTCGAATTTGGTCCAAACAAGTCCATACCACACAGGTA							
cloA Gal 130	TCAAGCACTCAAGGTTTGTGTGTTGACACAGGGCGCAAGATTCTCCCATCATTCGAATTTGGTCCAAACAAGTCCATACCACACAGGTA							
	370	380	390	400	410	420	430	440
cloA P1	ATTCTACGATGTGTAAGTACTGCATATGCCGCACACAGTGGCAATGGGGCCGGCATATCAAACCTCTAACTGCAAAGTAAACATAAACAAT							
cloA Gal 404	ATTCTACGATGTGTAAGTACTGCATATGCCGCACACAGTGGCAATGGGGCCGGCATATCAAACCTCTAACTGCAAAGTAAACATAAACAAT							
cloA Gal 130	ATTCTACGATGTGTAAGTACTGCATATGCCGCACACAGTGGCAATGGGGCCGGCATATCAAACCTCTAACTGCAAAGTAAACATAAACAAT							
	460	470	480	490	500	510	520	530
cloA P1	TCAAATCGGGTTCCAAATGGCTCAAGCATAAAGTCGTTCTATAAGTATTTCAATGGCCACATGCCATGATTCAACCATATCAGTATCG							
cloA Gal 404	TCAAATCGGGTTCCAAATGGCTCAAGCATAAAGTCGTTCTATAAGTATTTCAATGGCCACATGCCATGATTCAACCATATCAGTATCG							
cloA Gal 130	TCAAATCGGGTTCCAAATGGCTCAAGCATAAAGTCGTTCTATAAGTATTTCAATGGCCACATGCCATGATTCAACCATATCAGTATCG							
	550	560	570	580	590	600	610	620
cloA P1	CCTATCGTACTCACCTCGGCCATTATATGCGCAGCGGGCCATTACCGGGTTGGGCCCAAGCTTGCAGTCACTGACGAAATTCGGC							
cloA Gal 404	CCTATCGTACTCACCTCGGCCATTATATGCGCAGCGGGCCATTACCGGGTTGGGCCCAAGCTTGCAGTCACTGACGAAATTCGGC							
cloA Gal 130	CCTATCGTACTCACCTCGGCCATTATATGCGCAGCGGGCCATTACCGGGTTGGGCCCAAGCTTGCAGTCACTGACGAAATTCGGC							
	640	650	660	670	680	690	700	710
cloA P1	CCGGAATCATCAGACAGACCATAAATGGACAGACCCGTAACATGGCCAAAGTTTTCAGCACTTTCAGCGTCAGTATCATTAAGGTTTC							
cloA Gal 404	CCGGAATCATCAGACAGACCATAAATGGACAGACCCGTAACATGGCCAAAGTTTTCAGCACTTTCAGCGTCAGTATCATTAAGGTTTC							
cloA Gal 130	CCGGAATCATCAGACAGACCATAAATGGACAGACCCGTAACATGGCCAAAGTTTTCAGCACTTTCAGCGTCAGTATCATTAAGGTTTC							
	730	740	750	760	770	780	790	800
cloA P1	CGTTGACCTCGAGCTCAGCATTAGACATAGACGTCATGATTCTTACAACTCTTTCTCACTCCACATTTCTCTCAATCAGGGCA							
cloA Gal 404	CGTTGACCTCGAGCTCAGCATTAGACATAGACGTCATGATTCTTACAACTCTTTCTCACTCCACATTTCTCTCAATCAGGGCA							
cloA Gal 130	CGTTGACCTCGAGCTCAGCATTAGACATAGACGTCATGATTCTTACAACTCTTTCTCACTCCACATTTCTCTCAATCAGGGCA							
	820	830	840	850	860	870	880	890
cloA P1	AATACCATCCATTTCTCCAGGCATTCCAGCAGCTTATGACCCAGAGCTGGCTGTGTCAGTATTACCTTCCTTTCCATGGCAAAAAATA							
cloA Gal 404	AATACCATCCATTTCTCCAGGCATTCCAGCAGCTTATGACCCAGAGCTGGCTGTGTCAGTATTACCTTCCTTTCCATGGCAAAAAATA							
cloA Gal 130	AATACCATCCATTTCTCCAGGCATTCCAGCAGCTTATGACCCAGAGCTGGCTGTGTCAGTATTACCTTCCTTTCCATGGCAAAAAATA							
	910	920	930	940	950	960	970	980
cloA P1	CCCAAATCGTACAAACATAGCTCTGCTAAAAATGGCCAGCAAAACACACTCACCGTAGCCCGTGTGCTATCTTTATTAGTGGTCACGTAT							
cloA Gal 404	CCCAAATCGTACAAACATAGCTCTGCTAAAAATGGCCAGCAAAACACACTCACCGTAGCCCGTGTGCTATCTTTATTAGTGGTCACGTAT							
cloA Gal 130	CCCAAATCGTACAAACATAGCTCTGCTAAAAATGGCCAGCAAAACACACTCACCGTAGCCCGTGTGCTATCTTTATTAGTGGTCACGTAT							
	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070
cloA P1	CATGGTTCCATATGGTGTTCAGCCTCATCCCCGGCACAAGCTTGGCCCCATTCAACTCCTCGTACACACAGCTTCTTAATGTAAGTACA							
cloA Gal 404	CATGGTTCCATATGGTGTTCAGCCTCATCCCCGGCACAAGCTTGGCCCCATTCAACTCCTCGTACACACAGCTTCTTAATGTAAGTACA							
cloA Gal 130	CATGGTTCCATATGGTGTTCAGCCTCATCCCCGGCACAAGCTTGGCCCCATTCAACTCCTCGTACACACAGCTTCTTAATGTAAGTACA							



Obrázek 11: Srovnání sekvencí genu *cloA* kmenů P1, Gal 130 a Gal 404

Tabulka 7: Míra similarity *cloA* genu různých kmenů *C. purpurea*

Seq	P1	Gal 404	Gal 130
P1	ID	0,977	0,988
Gal 404	0,977	ID	0,976
Gal 130	0,988	0,976	ID

Byly porovnány sekvence genu *cloA* u kmenů P1, Gal 130 a Gal 404. U sledovaných kmenů se vyskytlo několik bodových mutací, delecí a inzercí viz Obrázek 11. U některých kmenů rodu *Claviceps* nebyla detekována elymoklavin-17-monooxygenasa, což je produkt genu *cloA*, takže tyto kmeny vytvářejí jako koncové produkty agroklavin a elymoklavin, nikoli kyselinu paspalovou popřípadě kyselinu lysergovou (Kim et al, 1983). Rozsáhlejší delece o velikosti 8 nukleotidů u kmene Gal 404 způsobuje poněkud větší diverzitu ke zbývajícím dvěma kmenům. Výskyt této delece může naznačovat, že se jedná o pseudogen, obzvláště pak tehdy, když jde o delecí bází, jejichž počet není násobkem 3. Míra similarity všech kmenů je uvedena v Tabulce 7. Získané sekvence byly zpracovány v programu BioEdit.

6. Závěr

V této bakalářské práci byla vypracována literární rešerše o rodu *Claviceps* s konkrétnějším zaměřením na druh *Claviceps purpurea*, jejich tvorbu námelových alkaloidů a následné využití těchto látek hlavně ve farmaceutickém průmyslu. Teoretická část se rovněž zabývala biosyntézou alkaloidů produkovaných zmiňovanou houbou.

V praktické části byla houba *Claviceps purpurea* transformována již připraveným konstruktem obsahujícím gen *dmaW* pod promotorem *gpdA* a byla potvrzena jeho přítomnost stejně jako i životaschopnost transformované houby. V druhé části byl amplifikován gen *cloA* a naklonován do plasmidu, který být použit k získání sekvence genu.

7. Seznam použitých zkratek

KaAC - octan draselný

X-Gal - 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galaktopyranosid

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid

PCR – polymerázová řetězová reakce

gpdA – glycerinaldehydfosfát dehydrogenasa z organismu *Aspergillus nidulans*

8. Použitá literatura

- Alm T. (2003) The witch trials of Finnmark, nother Norway, during the 17th century: evidence for ergotism as a contributing factor. *Econ. Bot.* **57**, 403–416.
- Bandyopadhyay R., Frederickson D.E., McLaren N.W., Odvody G.N., Ryley M.J. (1998) Ergot: a new disease threat to sorghum in the Americas and Australia. *Plant Dis.* **82**, 356–367.
- Barger G. (1931) Ergot and Ergotism. London: Gurney & Jackson.
- Bové F.J. (1970) The story of ergot, Basel & New York, Karger.
- Cawdell-Smith A. J., Scrivener C. J., Bryden, W. L. (2010) Staggers in horses grazing paspalum infected with *Claviceps paspali*. *Aust. Vet. J.* **88**, 393–395.
- Eadie M.J. (2003) Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome? *Lancet Neurol.* **2**, 429–434.
- Esser K. and Tudzynski P. (1978) Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Theor. Appl. Genet.* **53**, 145–149.
- Fantegrossi W.E., Murnane A.C., Reissig C.J. (2008) The behavioral pharmacology of hallucinogens. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 17–33.
- Gebler J.C. and Poulter D. (1992) Purification and characterization of dimethylallyltryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 308–313.
- Gröger D. and Sajdl P. (1972) Enzymatic conversion of chanoclavine-I. *Pharmazie* **27**, 188.
- Haarmann T., Machado C., Lübbe Y., Correia T., Schardl C.L., Panaccione D.G., Tudzynski P. (2005) The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry* **66**, 1312–1320.
- Haarmann T., Ortel I., Tudzynski P., Keller U. (2006) Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *ChemBioChem.* **7**, 645–652.

- Haarmann T., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009) Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 563–577.
- Kim I-S., Kim S-U., Anderson J.A. (1981) Microsomal agroclavine hydroxylase of *Claviceps* species. *Phytochemistry* **20**, 2311–2314.
- Kim S-U., Cho Y-J., Floss H.G., Anderson J.A. (1983) Conversion of elymoclavine to paspalic acid by a particulate fraction from an ergotamine-producing strain of *Claviceps* sp. *Planta med.* **48**, 145–148
- Keller U. (1999) Biosynthesis of ergot alkaloids. In: Křen V., Cvak L. - Ergot, the genus *Claviceps*. Harwood Academic, Chur, pp 95–163.
- Lorenz N., Haarmann T., Pažoutová S., Jung M., Tudzynski P. (2009). The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyse and evolutionary aspects. *Phytochemistry* **70**, 1822–1832.
- Lorenz N., Olšovská J., Šulc M., Tudzynski P. (2010) Alkaloid cluster gene *ccsA* of the ergot fungus *Claviceps purpurea* encodes chanoclavine I synthase, a flavin adenine dinucleotide-containing oxidoreductase mediating the transformation of N-methyl-dimethylallyltryptophan to chanoclavine I. *Appl Environ Microb.* **76**, 1822–1830.
- Maier W., Schumann B., Gröger D. (1988) Microsomal oxygenases involved in ergoline alkaloid biosynthesis of various *Claviceps* strains. *J. Basic Microb.* **28**, 83–93.
- Mantle P.G. and Nisbet L.J. (1976) Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *J.Gen. Microbiol.* **93**, 321–334.
- Matossian M.K. (1989) Poisons of the past: molds, epidemics and history. New Haven, CT: *Yale University Press*.
- Mey G., Held K., Scheffer J., Tenberge K.B., Tudzynski P. (2002) CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* **46**, 305–318.
- Mukherjee J. and Menge M. (2000) Progress and prospects of ergot alkaloid research. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* **68**, 1–20.

Pažoutová S. and Parbery D.P. (1999) The Taxonomy and Phylogeny of *Claviceps*, In: Křen V., Cvak L. - Ergot, the genus *Claviceps*. Harwood Academic, Chur, pp 57–77.

Qiagen PCR cloning handbook (2001) QIAGEN PCR Cloning Kit Ligation Protocol, 12–13.

QIAprep Miniprep Handbook (2006) QIAprep Miniprep Handbook, 22.

QIAquick Spin Handbook (2006) QIAquick Gel Extraction Kit Protocol using a microcentrifuge, 25–26.

Riederer B., Han M., Keller U. (1996) D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* **271**, 27524–27530.

Rigbers O., Li S-M. (2008) Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* - Overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyltryptophan N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **283**, 26859–26868.

Robbers J.E., Robertson I.W., Hornemann K.M., Jindra J., Floss H.G. (1972) Physiological studies on ergot: further studies on the induction of alkaloid synthesis by tryptophan and its inhibition by phosphate. *J. Bacteriol.* **112**, 791–796.

RNeasy Mini Handbook (2006) RNeasy Mini Handbook, 52–55.

Sambrook J., Russel D.W. (2001) Molecular cloning a laboratory manual 3, Cold Spring Harbor, New York.

Scharidl C.L., Panaccione D.G., Tudzynski P. (2006) Ergot alkaloids--biology and molecular biology. *Alkaloids Chem. Biol.* **63**, 45–86.

Schiff P.L. (2006) Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharm. Educ.* **70**, 98–107.

Sigafoos J., Green V.A., Edrisinha C., Lancioni G.E. (2007) Flashback to the 1960s: LSD in the treatment of autism. *Dev. Neurorehabil.* **10**, 75–81.

Šmečilová M. (2005) Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v *Escherichia coli*, diplomová práce, katedra biochemie, Universita Palackého.

Taber W.A. (1985) Biology of *Claviceps*. In Demain A.L. and Solomon N.A. (eds.), Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, London, Amsterdam, Don Mills, pp. 449–486.

Tfelt-Hansen P.C. and Koehler P.J. (2008) History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia*, **28**, 877–886.

Thomas K.M., Ramakrishnan T.S., Srinivasan K.V. (1945) The natural occurrence of ergot in south India. *Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B*, **21**, 93–100.

Tsukiboshi T., Shimanuki T., Uematsu T. (1999) *Claviceps sorghicola* sp. nov., a destructive ergot pathogen of sorghum in Japan. *Mycol. Res.* **103**, 1403–1408.

Tudzynski P., Correia T., Keller U. (2001) Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl. Microbiol. Biot.* **57**, 593–605.

Tudzynski P., Höter K., Correia T., Arntz C., Grammel N., Keller U. (1999) Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 133–141.

Tudzynski P. and Scheffer J. (2004) *Claviceps purpurea*: molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. *Mol. Plant. Pathol.* **5**, 377–388.

Tulasne L.R. (1853) Memoire sur l'ergot des glumacees. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol.* **20**, 5–56.

Urban Z. a Kalina T. (1980) Systém a evoluce nižších rostlin. SPN, Praha.

Urga K., Debella A., W Medihn Y., Agata N., Bayu A., Zewdie W. (2002) Laboratory studies on the outbreak of gangrenous ergotism associated with consumption of contaminated barely in Arsi, Ethiopia. *Ethiop. J. Health Dev.* **16**, 317–323.

Zicháček V. a Jelínek J. (2007) Biologie pro gymnázia, pp 79, Nakladatelství Olomouc.