

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Kvantifikace genové exprese u *Claviceps purpurea*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Věra Juračková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
Rok:	2016

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

V Olomouci dne 22. 4. 2016

Bc. Věra Juračková

Poděkování

Touto cestou bych ráda velmi poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Márii Majeské Čudejkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas, všestrannou pomoc a především za trpělivost, které mi pomohly k dokončení diplomové práce. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Věra Juračková
Název práce	Kvantifikace genové exprese u <i>Clavices purpurea</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
Rok obhajoby	2016

Abstrakt

Studium genové exprese je v dnešní době hlavním zájmem mnoha výzkumných projektů. Mezi populární techniky, které jsou využívány pro kvantitativní studium genové exprese, patří real-time RT-qPCR a RNA sekvencování (RNAseq). RNAseq je relativně novou metodou, která je stále ve vývoji, na rozdíl od metody real-time RT-qPCR, která je osvědčená a používaná již mnoho let. V současné době bývá často při studiích genové exprese metodou RNAseq vyžadováno potvrzení výsledků jinou metodou, například real-time RT-qPCR.

V rámci diplomové práce byly tyto dvě metody srovnávány a byly použity pro kvantifikaci genové exprese dvou kmenů *Claviceps purpurea* (Cp), Gal404 a 20.1. Byla provedena analýza diferencielně exprimovaných genů (DEGs) mezi vzorky mycelia a sklerocia Cp kmene Gal404 a také mezi vzorky sklerocií Cp kmene Gal404 a 20.1. Pro analýzu DEGs byly používány dva programy, DESeq a edgeR. Počet DEGs vyhodnocených programy DESeq a edgeR se mezi srovnávanými vzorky lišil, jelikož se ukázalo, že hodnoty $\log_2\text{FoldChange}$, které vyjadřují změnu v expresi genů mezi srovnávanými vzorky u obou programů korelovaly, kdežto hladina významnosti zjištěných změn v genové expresi (padj) při těchto výsledcích byla často oběma programy vyhodnocena rozdílně. Na základě výsledků metody RNAseq bylo vybráno několik genů pro relativní kvantifikaci genové exprese metodou real-time RT-qPCR u vzorků mycelia a sklerocia obou kmenů, Gal404 i 20.1. Výsledky kvantifikace genové exprese prostřednictvím obou metod byly srovnatelné.

Klíčová slova	<i>Claviceps purpurea</i> , diferencielní exprese, real-time RT-qPCR, RNA sekvencování.
Počet stran	119
Počet příloh	4
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Věra Juračková
Title	Quantification of gene expression in <i>Claviceps purpurea</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Mária Majeská Čudejková, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

Study of the gene expression represents an important part of many research projects. The most popular techniques used for a quantitative gene expression analyses are real-time RT-qPCR and RNA Sequencing (RNAseq). RNAseq is relatively new and still developing method, in contrast to real-time RT-qPCR method, which is well established and used for many years. Due to this fact, the confirmation of RNAseq results by real-time RT-PCR use to be required very often.

The main aim of this diploma thesis was to compare the two methods, and to quantify the gene expression in the two strains of *Claviceps purpurea*, strain Gal404 and 20.1. Identification of significantly differentially expressed genes (DEGs) was performed between the samples of mycelia and sclerotia of the strain Gal404 and between the samples of sclerotia of the strain 20.1 and Gal404. For the analysis of DEGs the two programs were used, DESeq and edgeR. The number of DEGs identified by DESeq and edgeR was different. Moreover, it was found out that values of log₂FoldChange, which indicate the change in the gene expression, calculated by both programs was in good correlation, however, significance level of the detected changes (padj) was not. Based on the RNAseq results, some genes were chosen for the relative quantification of the gene expression by real-time RT-qPCR between the samples of mycelia and sclerotia of the both strains, Gal404 and 20.1. The results of the gene expression quantification obtained by both methods were comparable.

Key words	<i>Claviceps purpurea</i> , differential expression, real-time RT-qPCR, RNA Sequencing.
Number of pages	119
Number of appendices	4
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	<i>Claviceps purpurea</i> - rostlinný patogen	10
2.1.1	Biosyntéza námelových alkaloidů	11
2.2	Metody kvantifikace genové exprese	13
2.2.1	Monitorování průběhu real-time RT-qPCR reakce	17
2.2.2	Kvantifikace genové exprese	19
2.2.3	Normalizace	19
2.2.4	Absolutní kvantifikace genové exprese	19
2.2.5	Relativní kvantifikace genové exprese	20
2.3	Vývoj a využití metod sekvencování	21
2.3.1	Sekvencování metodou Illumina	22
2.4	Sekvencování transkriptomu pomocí RNAseq	25
2.4.1	Kontrola kvality sekvencování	25
2.4.1.1	FASTQ Formát	25
2.4.1.2	Zhodnocení kvality dat	27
2.4.2	Zarovnání „readů“	30
2.4.3	Analýza diferenciální exprese genů	32
2.4.3.1	Kvantifikace	33
2.4.3.2	Normalizace dat	33
2.4.3.3	Statistická analýza diferenciálně exprimovaných genů	34
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1	Biologický materiál	36
3.2	Chemikálie	36
3.3	Použité roztoky	37
3.4	Použité kity	37
3.5	Použité přístroje	37
3.6	Metody a postupy	38
3.6.1	Sekvenační data transkriptomu a kontrola kvality dat	38
3.6.2	Zarovnání „readů“ na referenční genom a kvantifikace jejich počtu	39
3.6.3	Analýza DEGs pomocí DESeq a edgeR	41
3.6.4	Izolace RNA	44
3.6.5	Ošetření vzorků DNAsou	44
3.6.6	Kontrola úspěšného ošetření vzorků RNA DNAsou	45
3.6.7	Elektroforetická separace v agarosovém gelu	45
3.6.8	Příprava cDNA	45
3.6.9	Navrhování primerů	46
3.6.10	Stanovení účinnosti amplifikace	46
3.6.11	Real-time RT-qPCR	47
3.6.12	Relativní kvantifikace genové exprese	47
4	VÝSLEDKY	49
4.1	Kvantifikace genové exprese pomocí RNA sekvencování	49
4.1.1	Optimalizace procesu zarovnání „readů“	49
4.1.2	Výsledky analýzy DEGs pomocí programů DESeq a edgeR	50

4.1.3	Výčet výsledků metody RNAseq pozorovaných u genů, které byly vybrány pro real-time RT-qPCR.....	56
4.2	Kvantifikace genové exprese pomocí real-time RT-qPCR.....	57
4.2.1	Příprava cDNA vzorků používaných pro relativní kvantifikaci genové exprese.....	57
4.2.2	Navrhování primerů a výpočet účinnosti amplifikace	58
4.2.3	Výsledky relativní kvantifikace genové exprese pomocí real-time RT-qPCR	58
5	DISKUZE	62
5.1	Porovnání metod: real-time RT-qPCR a RNAseq	62
5.2	Porovnání programů DESeq a edgeR.....	65
6	ZÁVĚR.....	67
7	LITERATURA	68
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	76
9	PŘÍLOHY.....	77
9.1	Příloha 1 - Tabulka s DEGs mezi vzorky mycelia a sklerocia kmene Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu DESeq.....	77
9.2	Příloha 2 - Tabulka s DEGs mezi vzorky mycelia a sklerocia kmene Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu edgeR.....	93
9.3	Příloha 3 - Tabulka s DEGs mezi vzorky sklerocií kmene 20.1 a Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu DESeq.....	118
9.4	Příloha 4 - Tabulka s DEGs mezi vzorky sklerocií kmene 20.1 a Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu edgeR.....	119

CÍLE PRÁCE

- V teoretické části bylo cílem diplomové práce vypracování literární rešerše zaměřené na obecnou charakteristiku *Claviceps purpurea* a vývoj a využití technologií pro sekvencování. Dále bylo cílem teoretické části práce zpracování kapitol zabývajících se popisem metody a analýzou dat real-time RT-qPCR, a také analýzou dat pocházejících z RNA sekvencování.
- V experimentální části bylo cílem provést analýzu dat z RNA sekvencování s ohledem na diferenciální expresi genů mezi srovnávanými vývojovými stádii *Claviceps purpurea* s použitím dvou programů DESeq a edgeR a jejich porovnání.
- Dalším cílem experimentální části bylo relativně kvantifikovat expresi vybraných genů mezi srovnávanými vývojovými stádii *Claviceps purpurea* pomocí real-time RT-qPCR.

Hlavním cílem této práce bylo porovnat metody RNA sekvencování a real-time RT-qPCR a porovnat výsledky získané pomocí obou těchto metod.

1 ÚVOD

V dnešní době je studium genové exprese zájmem mnoha výzkumných prací. Pro analýzu genové exprese je často využívána metoda real-time RT-qPCR a metoda RNAseq. Metoda real-time RT-qPCR je osvědčenou a několik let používanou metodou, která umožňuje analyzovat desítky transkriptů najednou. Na rozdíl od metody RNA sekvencování (RNAseq), která je relativně novou metodou, která poskytuje informace o celém transkriptomu a umožňuje kvantifikovat expresi všech exprimovaných genů v rámci jednoho testu. Z tohoto důvodu byly v rámci diplomové práce tyto dvě metody použity pro analýzu kvantifikace genové exprese u *Claviceps purpurea* kmene Gal404 a 20.1, za účelem srovnání těchto dvou metod. Pro analýzu RNAseq dat s ohledem na diferenciální expresi genů existuje v dnešní době spousta programů, kdy v rámci diplomové práce byly pro analýzu diferenciálně exprimovaných genů (DEGs) použity programy DESeq a edgeR. Tyto programy byly vybrány na základě předchozích studií, které ukázaly, že získané výsledky pomocí těchto dvou programů jsou v dobré korelaci.

Teoretická část této diplomové práce poskytuje literární přehled řešené problematiky na téma obecná charakteristika *Claviceps purpurea* (Cp) a vývoj a využití metod sekvencování. Dále se teoretická část věnuje popisu metody real-time RT-qPCR a analýzy real-time RT-qPCR dat, a také analýzou dat pocházejících z RNAseq. V experimentální části a ve výsledcích je popsán postup a výsledek zpracování RNAseq dat s ohledem na diferenciální expresi genů mezi srovnávanými vývojovými stádii Cp (mycelium Gal404/sklerocium Gal404, sklerocium 20.1/sklerocium Gal404). V další části práce byly na základě výsledků RNAseq metody vybrány geny, pro relativní kvantifikaci genové exprese metodou real-time RT-qPCR. V experimentální části a ve výsledcích je popsán postup a výsledek relativní kvantifikace genové exprese 23 genů pomocí real-time RT-qPCR. Získané výsledky byly na závěr použity pro srovnání obou použitých metod (RNAseq a real-time RT-qPCR) a také pro srovnání programů DESeq a edgeR.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Claviceps purpurea* - rostlinný patogen

V dnešní době je známo asi 45 druhů vláknitých hub, které patří do rodu *Claviceps* (Pažoutová, 2001). Jedním z nejvýznamnějších a dobře prozkoumaných zástupců tohoto rodu vřeckovýtrusných, fytopatogenních hub je *Cp* (Paličkovice nachová). Zástupci rodu *Claviceps* mohou napadat více než 600 druhů jednoděložných rostlin včetně celosvětově významných plodin jako je žito, pšenice, rýže, kukuřice, ječmen, oves, proso (Bové, 1970) a také čirok (Tsukiboshi *et al.*, 1991).

Častým hostitelem *Cp* je žito, u kterého může tato fytopatogenní houba způsobovat onemocnění známé jako námel. Během životního cyklu *Cp* dochází ke tvorbě sklerocií, která obsahují fyziologicky velmi aktivní sloučeniny - námelové alkaloidy. Tyto látky v minulosti způsobovaly onemocnění známé jako ergotismus (Lee, 2009). V dnešní době jsou námelové alkaloidy farmaceuticky významné mykotoxiny se širokým spektrem využití při terapeutických aplikacích, díky jejich schopnosti reagovat s receptory neurotransmiterů centrální nervové soustavy (Haarmann *et al.*, 2009).

Jeden ze zástupců námelových alkaloidů – Ergotamin je používán při léčbě migrény (Hansen a Koehler, 2008). Bromokryptin (semisyntetický derivát ergokryptinu) má své uplatnění při léčbě Parkinsonovy choroby a také působí jako inhibitor při nadměrném vylučování prolaktinu během hyperprolaktinémie (Schiff, 2006). Neméně významný zástupce Ergonovin, nazývaný také Ergometrin, našel své uplatnění v porodnictví, díky jeho schopnosti stimulovat děložní svalstvo a tím zvýšit intenzitu svalových kontrakcí během porodu (de Groot *et al.*, 1998). Dihydroergotoxin je směsí tří alkaloidů – ergokryptinu, ergokryptinu a ergokorninu a je využíván pro léčbu stařecké demence (Schiff, 2006).

Přirozená infekce *Cp* začíná klíčením askospor na povrchu blizny hostitelské rostliny. Tato fytopatogenní houba je vysoce orgánově specifická a napadá výhradně mladé semeníky hostitelské rostliny. V semeníku dochází k hojné proliferaci sfacelia produkujícího spory (konidie). Tyto spory jsou poté vylučovány do sladké kapaliny (medovice), která obsahuje převážně glukosu a fruktosu. Spory jsou v medovici přenášeny pomocí hmyzu, anebo vzájemným kontaktem květů, čímž dochází k sekundární infekci a intenzivnímu rozšiřování houby během sezóny. Poté co produkce medovice ustane, dochází k tvorbě sklerocií, která mají obvykle fialovo-černou barvu. Sklerocia obsahují asi 30 % tuků a 0,01 – 1 % alkaloidů (Kobel a Sanglier, 1986; Tenberge, 1999;).

U *Cp* nedochází k tvorbě námelových alkaloidů ve sfaceliálním stádiu. Nutným předpokladem pro tvorbu námelových alkaloidů je diferenciace sklerociálních buněk (Mantle a Tonolo, 1968). Tvorba sklerocií je spjata s prudkým nárůstem celkového obsahu lipidů cca z 10 % na 30 % oproti buňkám sfacelia. Dochází k akumulaci triglyceridových olejů, v nichž majoritní mastnou kyselinu představuje ricinolejová kyselina (Bassett *et al.*, 1972). Koncentrace kyseliny ricinolejové odpovídá množství sklerocií, a proto je tato kyselina dobrým ukazatelem námelových nečistot v obilných produktech (Franzmann *et al.* 2010). Bylo prokázáno, že k diferenciaci buněk sklerocia dochází jak za přirozených podmínek během infekce, tak v axenické kultuře (Mantle, 1976). K produkci námelových alkaloidů může za specifických podmínek taktéž docházet v axenické kultuře (Kobel a Sanglier, 1986).

2.1.1 Biosyntéza námelových alkaloidů

Námelové alkaloidy reprezentují skupinu dusíkatých houbových metabolitů, derivátů indolu, které jsou biosynteticky odvozeny od L-tryptofanu. Tyto sloučeniny lze rozdělit do 3 hlavních skupin: klavinové alkaloidy, D-lysergová kyselina a její deriváty a ergopeptiny (Shiff P. L., 2006). Geny, které jsou zapojeny do biosyntetické cesty námelových alkaloidů, vytváří klastr 14 genů o velikosti 68,5 kb (Obr. 1) (Haarmann *et al.*, 2005).

Biosyntetická cesta námelových alkaloidů vedoucí k D-lysergové kyselině začíná krokem isoprenylace tryptofanu, která je katalyzována enzymem 4-(γ,γ -dimethylallyl)tryptofan syntasou (DMATS) a vede k tvorbě 4-dimethylallyltryptofanu (DMAT). Dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) zde působí jako donor isoprenylové skupiny (Gebler a Poulter, 1992). Tento krok pravděpodobně určuje rychlost biosyntézy námelových alkaloidů a DMATS, který je kódován genem *dmaW* je pozitivně regulován tryptofanem a naopak zpětnovazebně inhibován pomocí agroklavinu či elymoklavinu (Cheng *et al.*, 1980).

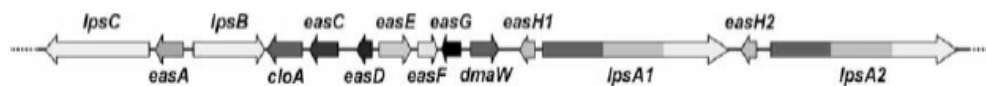
Cesta biosyntézy pokračuje methylací DMAT za vzniku N-methyl-dimethylallyltryptofanu (MeDMAT). Tato přeměna je katalyzována methyltrasferasou a jako donor methylové skupiny zde vystupuje sloučenina S-adenosylmethionin (Otsuka *et al.*, 1980). Následuje několik kroků oxidace a redukce, díky nimž dochází k tvorbě chanoklavinu I, chanoklavin I aldehydu a agroklavinu. Enzym chanoklavin I syntasa katalyzuje oxidaci MeDMAT za vzniku chanoklavinu I, tento enzym je kódován genem

easE (Lorenz *et al.*, 2010). Chanoklavin I je následně oxidován na chanoklavin I aldehyd za účasti enzymu alkohol dehydrogenasy kódované genem **easD** (Wallwey a Li, 2011). Chanoklavin I aldehyd následně podléhá dvojité izomeraci za tvorby isochanoklavin I aldehydu, tato přeměna probíhá neenzymaticky redukcí glutathionu. Isochanoklavin I aldehyd je následně redukován na agroklavin za katalýzy enzymem **easG**, produktem genu **easG**, v přítomnosti NADPH (Matuschek *et al.*, 2011).

Oxidace agroklavinu, která vede k tvorbě elymoklavinu je katalyzována agroklavin-17-monooxygenasou (Kim *et al.*, 1981). Elymoklavin je poté oxidován na paspalovou kyselinu klavin oxidasou, kódovanou genem **cloA** (Haarmann *et al.*, 2006). Vznikající kyselina paspalová je poté spontánně přeměněna na kyselinu D-lysergovou (Gröger a Floss 1998).

Součástí genového klastru *Cp* jsou 4 geny pro neribosomální peptidové syntasy (NRPS) - **lpsB**, **lpsC**, **lpsA1** a **lpsA2**. Tyto geny jsou zapojeny do dalších kroků metabolické dráhy, které vedou k tvorbě D-lysergyl peptidových laktamů, prekursorů ergopeptinů. V této dráze je nejprve D-lysergová kyselina aktivována enzymem LPS2, produktem genu **lpsB** (Correia *et al.*, 2003). Enzym LPS1, kódovaný genem **lpsA1**, se poté podílí na kovalentní vazbě 3 aminokyselinových zbytků na aktivovanou kyselinu za tvorby D-lysergyl tripeptidových laktamů (Riederer *et al.*, 1996; Haarmann *et al.*, 2005;), které jsou na závěr přeměněny na ergopeptiny v reakci katalyzované Fe²⁺/2-ketoglutarát dependentní dioxygenasou, kódovanou genem **easH** (Havemann *et al.*, 2014). Struktura finálních produktů - ergopeptinů závisí na aminokyselinách, které byly zapojeny do kondenzace s D-lysergovou kyselinou, kdy platí, že třetí aminokyselinou je vždy prolin (Tab. 1) (Keller, 1999).

LPS1 společně s LPS2 se podílí na biosyntéze ergotaminu (Haarmann *et al.*, 2005). Enzym LPS3 (označovaný jako ergometrin syntasa), kódovaný genem **lpsC**, je zapojen do biosyntézy ergometrinu (Ortel a Keller, 2009). Do genového klastru námelových alkaloidů také patří gen **lpsA2**, funkčně podobný genu **lpsA1**, který kóduje enzym LPS4 (Lorenz *et al.*, 2009). Jejich funkční odlišnost spočívá v tom, že LPS4 se podílí na syntéze ergokryptinu, zatímco LPS1 katalyzuje produkci ergotaminu (Haarmann *et al.*, 2005).



Obr. 1: Klastř genů zapojených do biosyntézy námelových alkaloidů (Lorenz *et al.*, 2009).

Tab. 1: Druhy ergopeptinů v závislosti na aminokyselinovém složení (Podle Keller, 1999).

Pozice II	Pozice I		
	Alanin	Kyselina amino butanová	Valin
Fenylalanin	Ergotamin	Ergostin	Ergokristin
Leucin	α -Ergosin	α -Ergoptin	α -Ergokryptin
Isoleucin	β -Ergosin	β -Ergoptin	β -Ergokryptin
Valin	Ergovalin	Ergonin	Ergokornin
Kyselina α -amino butanová	Ergobin	Ergobutin	Ergobutyryn

2.2 Metody kvantifikace genové exprese

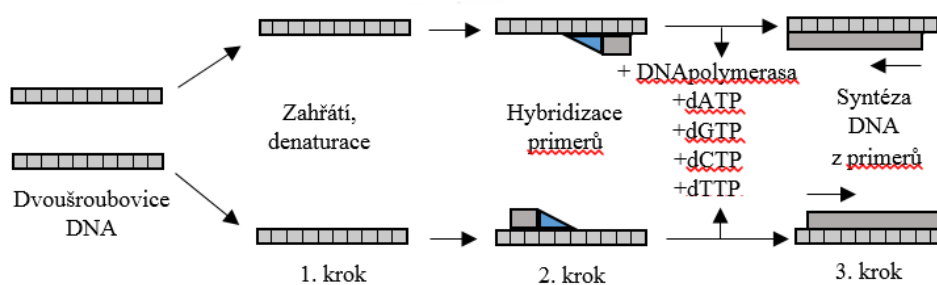
Pro kvantifikaci genové exprese v buňkách a tkáních je používáno několik metod, mezi které patří například Northern blot a *in situ* hybridizace (Parker a Barners, 1999), RNase protection assay (Hod, 1992; Saccomanno *et al.*, 1992), DNA čipy (DNA microarrays) (Schulze a Downward, 2001) a metoda RNAseq (Wang *et al.*, 2009). Kvantifikace genové exprese může být provedena také pomocí různých variant reverzně transkripční polymerasové řetězové reakce (RT-PCR), jako jsou např. semikvantitativní RT-PCR (Montgomery a Dallman, 1977) či kvantitativní kompetitivní RT-PCR (Wang *et al.*, 1989, Vanden Heuvel *et al.*, 1993). Nejmodernější variantou RT-PCR pro kvantifikaci genové exprese je však kvantitativní real-time RT-PCR (real-time RT-qPCR) (Heid *et al.*, 1996). Metody RNAseq a real-time RT-qPCR jsou předmětem této práce, proto se následující text zaměří pouze na popis real-time RT-qPCR a později na popis metody RNAseq.

Genová exprese je proces, při kterém je genetická informace uložená v genu (DNA) převedena do struktury proteinů. mRNA je molekula, která přenáší genovou informaci k ribozomům, místu syntézy proteinů. Analýza genové exprese tedy probíhá na úrovni mRNA, a proto musí být RNA v testovaném vzorku nejprve přepsána do komplementárního řetězce DNA (cDNA) prostřednictvím retrovirálního enzymu

reverzní transkriptasy (RT), což je RNA-dependentní DNA polymerasa. Proces reverzní transkripce je rozhodující pro citlivou a přesnou kvantifikaci genové exprese, jelikož množství cDNA odráží původní množství mRNA ve vzorku (Kubista *et al.*, 2006).

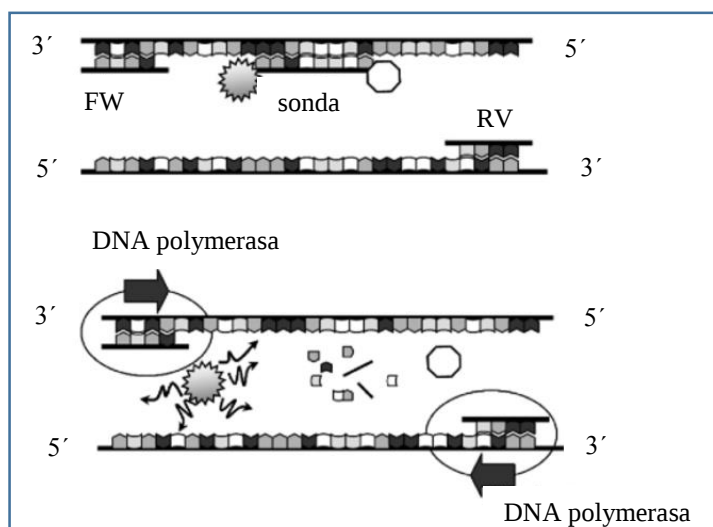
Reverzní transkripce může probíhat bez přídavku primeru, vyšší účinnosti reakce lze však dosáhnout, když jsou primery přidány (Stählberg *et al.*, 2004). Primer je krátký synteticky připravený oligonukleotid, který se komplementárně navazuje ke specifickému místu templátu a slouží jako počátek syntézy nově vznikajícího řetězce pomocí polymerasy. Deoxyribonukleotidové primery používané pro reverzní transkripci jsou trojího typu: oligo(dT) primery, náhodné hexanukleotidové primery (random hexamers) a genově specifický primer. Oligo(dT) primery hybridizují s polyadeninovým koncem přítomným ve většině eukaryotických mRNA a tím iniciují reverzní transkripci mRNA (Kubista *et al.*, 2006). Výhodou těchto primerů je nepřítomnost adeninové báze v jejich sekvenci, což zamezuje skládání nukleových kyselin do vyšších struktur, proto se u těchto primerů předpokládá, že jsou účinnější a méně závislé na teplotě než ostatní používané (Stählberg *et al.*, 2004). V případě hexanukleotidových primerů se jedná o směs fragmentů, které obsahují všechny možné kombinace nukleotidů (A, C, T, G) a jsou schopny zahajovat syntézu cDNA na mnoha místech RNA templátu. Efektivita RT reakce závisí na sekundární a terciární struktuře RNA (Freeman *et al.*, 1999; Kubista *et al.*, 2006). Třetí alternativou je genově specifický primer, který je používán, má-li být analyzována specifická mRNA (Kubista *et al.*, 2006).

Po ukončení reverzní transkripce je získaná cDNA exponenciálně amplifikována v průběhu polymerasové řetězové reakce (PCR) s využitím DNA polymerasy, kdy nejčastěji používanou je termostabilní DNA polymerasa (Taq) izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Metoda využívá pár primerů, kdy každý hybridizuje s komplementární sekvencí na jednom či druhém vlákně dvouřetězcové struktury DNA (dsDNA). Tato dvojice oligonukleotidů ohraničuje specifickou oblast cílové molekuly, která má být exponenciálně amplifikována. Hybridizované primery slouží jako substrát pro Taq DNA polymerasu, která syntetizuje nové vlákno DNA na základě původního vlákna postupným přidáváním deoxynukleotidů (dNTPs) (Kubista *et al.*, 2006). Reakce klasicky probíhá v opakujících se teplotních cyklech, které zahrnují tyto 3 kroky: 1. denaturace DNA dvoušroubovice, 2. nasednutí primerů na denaturovaná vlákna DNA (ssDNA) a 3. syntéza DNA (Obr. 2). Tuto techniku poprvé popsal v roce 1980 americký chemik Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986).



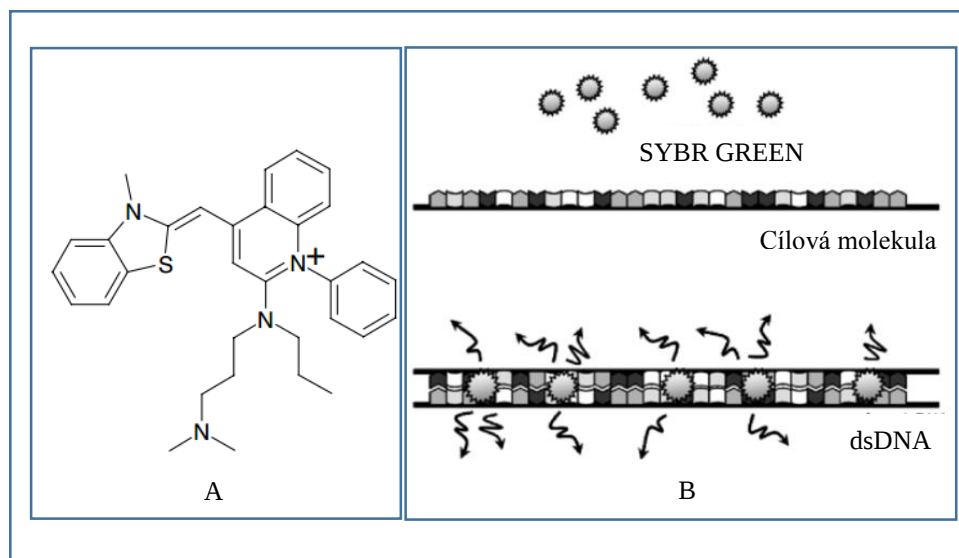
Obr. 2: Znázornění průběhu prvního cyklu polymerasové řetězové reakce (PCR).

Analýza a kvantifikace DNA v případě real-time RT-qPCR je prováděna na základě měření fluorescence. Technika real-time RT-qPCR umožňuje kvantifikaci vznikajícího produktu v reálném čase (Higuchi *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996). Tato citlivá a přesná metoda umožňuje kvantifikaci PCR produktu během exponenciální fáze PCR. V dnešní době existuje více monitorovacích technik, které umožňují detekci vznikajícího PCR produktu v reálném čase. Metoda real-time RT-qPCR byla poprvé popsána s použitím hydrolyzační sondy (TaqMan). TaqMan sondy využívají 5'-3' exonukleasové aktivity Taq DNA polymerasy, tedy schopnost štěpit sondu v průběhu prodlužovací fáze PCR cyklu (Holland *et al.*, 1991). Sonda je komplementární k templátové sekvenci DNA a k její hybridizaci dochází společně se specifickými primery v druhé fázi PCR cyklu. TaqMan sonda emituje fluorescenční signál pouze po jejím rozštěpení, kdy je uplatňován Försterův rezonanční přenos energie (FRET) (Cardullo *et al.*, 1988). Tato hydrolyzační sonda je dvojitě značený oligonukleotid s reportérovým fluorochromem, který umožňuje detekci fluorescence, např. FAM (6-karboxyfluorescein) na jednom konci a jeho zhášecem, např. TAMRA (6-karboxy-tetramethylrhodamin) na konci druhém. Pokud je sonda v intaktní formě, není měřena žádná fluorescence. Během polymerace začne být sonda postupně degradována prostřednictvím 5'-3' exonukleasové aktivity Taq polymerasy, reportér a jeho zhášec se od sebe začnou vzdalovat a fluorescence produkovaná reportérovým barvivem již není pohlcována jeho zhášecem, což se projevuje zvýšením intenzity fluorescenčního signálu (Obr. 3), který je měřen po každém cyklu reakce a koreluje s množstvím vznikajícího produktu (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996).



Obr. 3: Znárodnění principu TaqMan sondy, FW představuje „forward“ primer, RV „reverse“ primer (Podle Overbergh *et al.*, 2010).

Další používaná zobrazovací technika real-time RT-qPCR je založena na detekci a kvantifikaci PCR produktu na základě použití fluorescenčních, interkalačních barviv. Tato technika byla poprvé popsána v roce 1993 na základě sledování zvýšení fluorescence ethidium bromidu, jako výsledek jeho inkorporace do dvoušroubovice DNA (Higuchi *et al.*, 1993). Poslední dobou je však široce používaným barvivem SYBR GREEN (Obr. 4 A), který se interkaluje do dvoušroubovice DNA a je mnohem méně toxický než ethidium bromid. SYBR GREEN patří mezi kyaninová barviva (Zipper *et al.*, 2004). Asymetrická kyaninová barviva obsahují dva aromatické systémy, které jsou spojeny methinovým můstkem a ve své struktuře mají kladně nabitý atom dusíku. Tato barviva ve volném stavu neprodukují fluorescenci v důsledku stabilních vibračních stavů aromatických systémů, které přeměňují excitační energii na teplo. Produkce fluorescence nastane, pokud je ve vzorku přítomna dsDNA a toto barvivo je navázáno do malého zářezu dvoušroubovice, čímž je znemožněna rotace na methinových můstcích (Obr. 4 B). Intenzita fluorescence se zvyšuje s přibývajícím množstvím dvouvláknové DNA (dsDNA) (Nygren *et al.*, 1998). Tato barviva jsou sekvenčně nespecifická a vedou k tvorbě fluorescence v přítomnosti jakékoliv dvouvláknové DNA, včetně primer-dimerových formací, což může vést k chybným výsledkům, proto je dobré vždy po skončení PCR reakce provést analýzu křivky tání amplifikovaného produktu.



Obr. 4: Strukturní vzorec barviva SYBR GREEN (A) (Kubista *et al.*, 2006). Grafické znázornění interkalace barviva SYBR GREEN do dvoušroubovice DNA (B) (Podle Overbergh *et al.*, 2010).

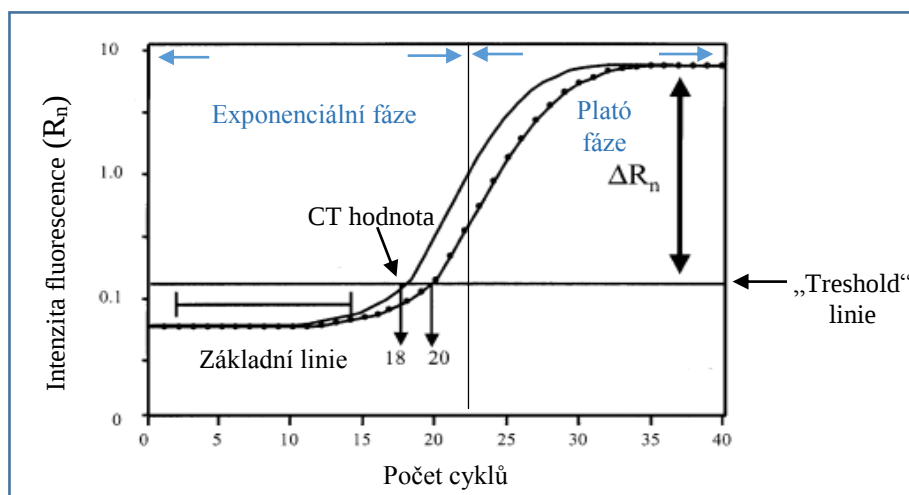
Mezi další typy sond či primerů, které slouží k monitorování průběhu PCR reakce v reálném čase, můžeme zařadit například hybridizační sondy (Caplin *et al.*, 1999), „molecular beacons“ (tzv. molekulární majáčky) (Tyagi a Kramer, 1995), Scorpion primery (Thelwell *et al.*, 2000) a Light-up sondy (Isacsson *et al.*, 2000).

2.2.1 Monitorování průběhu real-time RT-qPCR reakce

Reakce probíhá a je zaznamenávána pomocí přístroje pro real-time RT-qPCR. Tento přístroj má vlastnosti klasického thermocycleru, který slouží k amplifikaci požadovaného templátu. Přístroj je navíc vybaven optikou pro excitaci fluorescence a detektorem pro zachycení fluorescenčního signálu. Software přístroje slouží pro sběr a analýzu dat, což umožňuje zaznamenávání průběhu reakce do grafu – amplifikační křivka, kde na ose y je vynesena změna fluorescence a osa x vyjadřuje počet PCR cyklů (Obr. 5) (Ma *et al.*, 2002).

Reportérové barvivo generuje fluorescenční signál, který odráží množství vznikajícího produktu. Se zvyšujícím se množstvím amplifikovaného produktu, dochází k exponenciálnímu růstu křivky. Po určité době křivka přestává růst a dostává se do fáze nasycení (plató), během níž dochází k vyčerpání kritických složek, jako jsou primery, reportérové barvivo či dNTPs (Kubista *et al.*, 2001). V průběhu exponenciální fáze růstu se určuje tzv. prahová hodnota fluorescenčního signálu – „threshold“ linie, kdy při

této stanovené hodnotě mohou být srovnány všechny vzorky. Cyklus, při kterém dochází k nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu je vyjadřován CT hodnotou (cycle threshold). Tato hodnota je nepřímo úměrná množství výchozího templátu a je základním parametrem pro výpočet míry exprese. Základní linie (baseline) představuje počáteční cykly PCR reakce, ve kterých dochází k akumulaci signálu, který je pod mezí detekce používaného přístroje (Ginzinger, 2002).



Obr. 5: Schéma průběhu real-time RT-qPCR reakce (amplifikační křivka). Základní linie představuje počáteční cykly PCR reakce, kdy přístrojem není detekován žádný signál. „Threshold“ linie představuje prahovou hodnotu fluorescenčního signálu. Hodnota CT vyjadřuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence překračující prahovou hodnotu. ΔR_n je indikátorem velikosti signálu tvořeného během PCR reakce (Podle Grinzinger, 2002).

2.2.2 Kvantifikace genové exprese

Metoda real-time RT-qPCR je používána k detekci a kvantifikaci nukleových kyselin, přičemž kvantifikace může být absolutní nebo relativní. Chybné interpretaci expresních profilů cílových genů mezi jednotlivými vzorkami můžeme predejit normalizací (Bustin *et al.*, 2000).

2.2.3 Normalizace

Porovnání genové exprese u různých vzorků pomocí real-time RT-qPCR vyžaduje korekci rozdílů ve výchozím množství RNA a v účinnosti reakce reverzní transkriptasy, které mohou mít za následek, že množství cDNA nemusí přesně odrážet původní množství mRNA. Proto je nutné provést normalizaci, která slouží ke zjištění, zda rozdílný expresní profil, který byl analyzován mezi vzorkami u cílového genu skutečně odpovídá rozdílu v expresi cílového genu nebo je tento výsledek zapříčiněn rozdílným množstvím vstupní cDNA. Nejpoužívanějším způsobem pro korekci těchto rozdílů mezi vzorkami je normalizace referenčním genem. Ideální referenční gen by měl vykazovat konstantní expresi ve všech tkáních organismu, v různých vývojových stádiích a za všech podmínek. Ve skutečnosti exprese referenčních genů může být také regulována a závisí na druhu používaných tkání. Univerzální referenční gen s konstantní expresí ve všech tkáních neexistuje, a proto je důležité, aby byl pro příslušný experiment vždy vybrán vhodný referenční gen (Overbergh *et al.*, 2010). Jako referenční geny bývají často používány – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GPDH), albumin, aktin, tubulin, cyklofilin, hypoxantin fosforibosyltransferasa (HRPT), 28S a 18S rRNA (Thellin *et al.*, 1999). Byly vyvinuty také specifické softwary, které slouží k hledání optimálního referenčního genu pro konkrétní experimenty (Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004).

2.2.4 Absolutní kvantifikace genové exprese

Absolutní kvantifikace genové exprese je založena na známé koncentraci standardu, který je využit pro měření skutečného počtu kopií cílové molekuly v neznámém vzorku. Postupným ředěním vzorku o známé koncentraci je získán set standardů, je konstruována kalibrační křivka závislosti logaritmu hodnot počátečních množství standardů na odpovídajících hodnotách CT získaných během amplifikace každého vzorku ředící řady. Z kalibrační přímky lze odečíst výchozí koncentraci neznámého

vzorku. Jako standardy mohou být používány různé materiály, jako jsou např. PCR-amplifikované cílové sekvence (Leong *et al.*, 2007), plasmidy obsahující cílové sekvence (Whelan *et al.*, 2003) nebo komerčně připravovaná DNA (Dworkin *et al.*, 2002).

2.2.5 Relativní kvantifikace genové exprese

Při relativní kvantifikaci genové exprese je porovnávána relativní změna genové exprese ve více vzorcích. Jeden ze vzorků je používán jako kalibrátor – kontrolní vzorek. Zjišťují se změny v množství mRNA testovaného vzorku oproti kalibrátoru (downregulace, upregulace). Pro výpočet relativní kvantifikace genové exprese jsou používány různé metody.

Jednou z používaných metod pro relativní kvantifikaci genové exprese je komparativní $2^{-\Delta\Delta CT}$ **metoda**. Při této metodě jsou nejprve normalizovány C_T hodnoty cílového genu C_T hodnotami referenčního genu pro neznámý vzorek i kalibrátor. V dalším kroku je vypočtena relativní kvantifikace genové exprese rozdílem normalizovaných hodnot neznámého vzorku a kalibrátoru. Na závěr je vypočten normalizovaný expresní poměr (NEP). Tato metoda předpokládá, že cílový a referenční gen jsou amplifikovány se stejnou efektivitou, a to 100 % (Livak a Schmittgen, 2001).

$$\Delta C_T (\text{neznámý vzorek}) = C_T (\text{cílový gen, neznámý vzorek}) - C_T (\text{referenční gen, neznámý vzorek})$$

$$\Delta C_T (\text{kalibrátor}) = C_T (\text{cílový gen, kalibrátor}) - C_T (\text{referenční gen, kalibrátor})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{neznámý vzorek}) - \Delta C_T (\text{kalibrátor}) \rightarrow \text{NEP} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Další přístupem je **PFafflůva metoda** kvantifikace s kalkulací efektivity PCR reakce. Při použití této metody musí být stanovena efektivita PCR reakce pro cílový i referenční gen, proto bývá nejprve sestrojena kalibrační křivka pro pár primerů, kdy z rovnice regresní přímky kalibrační křivky může být vypočtena efektivita reakce podle vzorce: $E = 10^{\frac{-1}{\text{směrnice přímky}}}$. Pro získání normalizovaného expresního poměru touto metodou je používán vztah:

$$\text{NEP} = \frac{E_{\text{cílový gen}} \Delta C_T \text{ cílový gen (kalibrátor-vzorek)}}{E_{\text{referenční gen}} \Delta C_T \text{ referenční gen (kalibrátor-vzorek)}}, \quad \text{kde hodnota } E \text{ představuje účinnost amplifikace (Pfaffl, 2001).}$$

2.3 Vývoj a využití metod sekvencování

Historie sekvencování má své počátky v roce 1977, kdy byla poprvé publikována Sangerova a Maxam-Gilbertova metoda sekvencování (Maxam a Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977). Sangerova metoda je založena na sekvencování pomocí detekce ukončení prodlužujícího se vlákna DNA, kdy k ukončení elongace vlákna jsou využívány dideoxynukleotidy (Sanger *et al.*, 1977). Maxam-Gilbertova metoda sekvencování je založena na modifikaci molekuly DNA a následném štěpení molekuly pomocí chemických činidel specifických pro jednotlivé nukleové báze (např. hydrazin štěpí cytosin a thymin) (Maxam a Gilbert, 1977). Jak Sangerova, tak Maxam-Gilbertova metoda sekvencování patří mezi technologie tzv. první generace. I když v průběhu let došlo k několika vylepšením, ke kterým patří využití fluorescenčního značení (Smith *et al.*, 1986) či nahrazení gelové elektroforézy kapilární elektroforézou (Swerdlow a Gesteland, 1990), s postupem času se začaly vyvíjet nové technologie, které umožňují sekvencování obrovského množství fragmentů DNA mnohem rychleji a jsou méně finančně náročné (Tucker *et al.*, 2009). Nejprve se začaly objevovat technologie tzv. druhé generace, v dnešní době již známe i tzv. třetí generaci sekvenačních technologií (Delseny *et al.*, 2010). Nové metody sekvencování poskytují obrovské množství krátkých sekvencí nukleotidů („ready“), které lze využít pro mnoho aplikací. Mezi nejdůležitější aplikace patří celogenomové sekvencování a celogenomové či cílené resequencování. K dalším využitím těchto metod patří odhalování mutací, polymorfismů, sekvencování transkriptomu (RNAseq), studium interakcí DNA-protein a studium konformace chromosomů (Shendure a Ji, 2008; Metzker, 2009).

K sekvenačním technologiím tzv. druhé generace patří metoda Roche/454, která je založena na pyrosequencování (Ronaghi *et al.*, 1996), metoda Illumina využívající sekvenaci syntézou (Turcatti *et al.*, 2008), metoda SOLID založená na sekvencování ligací (Shendure *et al.*, 2005) a také metoda Ion torrent, která využívá detekce vodíkových protonů uvolněných v průběhu syntézy nově vznikajícího řetězce DNA (Merriman a Rothberg *et al.*, 2012). Důležitou součástí procesu sekvencování u technologií tzv. druhé generace je amplifikace fragmentů DNA (Delseny *et al.*, 2010).

Jak již bylo zmíněno, v dnešní době jsou již vyvinuty sekvenační metody tzv. třetí generace, pro které je charakteristické vynechání amplifikačního kroku. Tyto metody lze využít k sekvencování jediné molekuly DNA (Delseny *et al.*, 2010). Do této skupiny metod můžeme zahrnout technologii HeliScopeTM, která byla vyvinuta společností

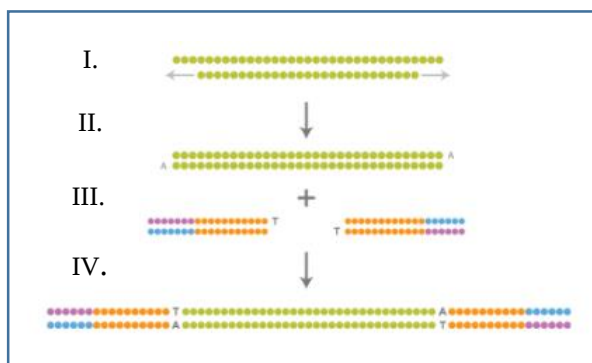
Helicos Biosciences (Thompson a Steinmann, 2010), technologie SMRTTM (z anglického single molecule real-time sequencing technology) od společnosti Pacific Biosciences (Eid *et al.*, 2009) a sekvencování s využitím nanopórů, kde jsou umístěny malé elektrody a prochází jimi zkoumaný řetězec DNA (Branton *et al.*, 2008).

V rámci diplomové práce byla pro sekvencování vzorků využita metoda Illumina, proto se následující text bude zabývat postupem sekvencování touto metodou.

2.3.1 Sekvencování metodou Illumina

Sekvenátor firmy Solexa byl poprvé uveden na trh v roce 2006 a o rok později byl tento přístroj odkoupen firmou Illumina. Princip metody je založen na sekvencování syntézou (Ansorge, 2009). Tento první sekvenátor společnosti Illumina umožňoval přečtení sekvencí dlouhých typicky 36 bp a byl původně určen pro resekvenčení genomů (Farrer *et al.*, 2009). V současné době společnost Illumina poskytuje několik sekvenačních platforem, jako jsou: MiniSeq systém a přístroje série MiSeq, NextSeq, HiSeq a HiSeq X.

Příprava DNA knihovny vyžaduje fragmentaci vzorku DNA. K tomuto účelu mohou být využity tři rozdílné přístupy. Běžně používanou metodou je nebulizace, kdy stlačený dusík nebo vzduch svým tlakem mechanicky fragmentuje DNA. Další používané metody jsou sonikace, při které jsou využity ultrazvukové vlny pro narušení DNA a enzymatická fragmentace DNA (Knierim *et al.*, 2011). Konce fragmentů DNA jsou po fragmentaci zarovnány, fosforylovány a na 3'- konci adenylovány (Ansorge *et al.*, 2009). Následně jsou na 5' a 3' konce vzniklých fragmentů DNA navázány dva rozdílné adaptéry, díky nimž dochází k navázání vlákna ke komplementárním oligonukleotidům amplifikační destičky (Obr. 6) (Mardis, 2007).



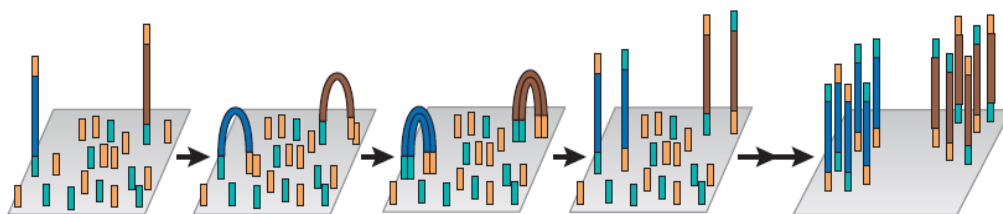
Obr. 6: Grafické znázornění přípravy DNA knihovny. I. fragmentace DNA. II. zatupení konců, adenylace. III. připojení adaptérů. IV. výběr fragmentů s připojenými adaptéry (Podle Ansorge *et al.*, 2009).

Jakmile je knihovna připravena, dochází k hybridizaci fragmentů DNA na speciální amplifikační destičku („flow cell“), kde probíhá tzv. můstková amplifikace. Amplifikační destička je složena z 8 linií, kdy každá linie má na svém povrchu kovalentně navázány dva typy oligonukleotidů, které jsou komplementární ke specifickým adaptérům na koncích DNA fragmentů (Mardis *et al.*, 2007).

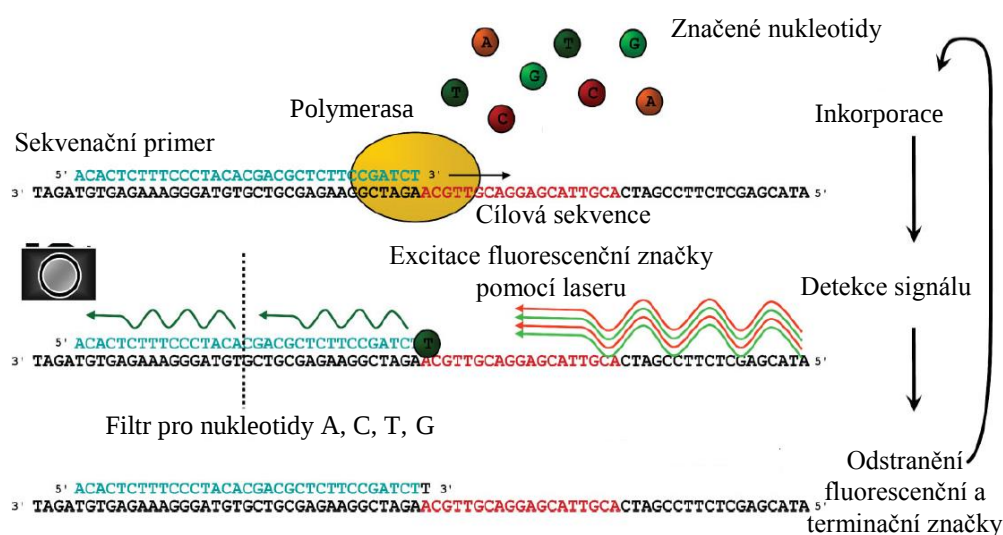
Fragment jednořetězcové DNA (ssDNA) je navázán adaptérem na komplementární oligonukleotid amplifikační destičky. Následně dochází k syntéze druhého vlákna, kdy adaptér slouží jako primer. Vzniklé vlákno dsDNA je denaturováno a původní templát je odmyt. Poté dochází k ohnutí vzniklého vlákna a jeho navázání k druhému typu oligonukleotidů, čímž vzniká můstek mezi oběma typy oligonukleotidů. Jakmile je vlákno ohnuto, dochází k syntéze komplementárního řetězce. Vzniklá dsDNA je následně denaturována, čímž dochází ke vzniku dvou vláken, forward a reverse. Celý proces je s těmito vlákny opakován, kdy výsledkem je mnohonásobné znásobení fragmentů DNA a tvorba tzv. klastrů (Obr. 7). Po dokončení amplifikace jsou „reverzní“ vlákna odmyta. „Forward“ vlákna jsou zachována a jsou následně využita pro samotný proces sekvencování (Ansorge, 2009).

Po dokončení tvorby klastrů následuje samotný proces sekvencování, kdy na jednovláknové a lineární amplikony v klastrech jsou hybridizovány sekvenační primery, které přisedají k sekvencím adaptérů. Sekvence primerů je prodlužována a je vytvářeno komplementární vlákno s použitím DNA polymerasy a čtyř odlišně fluorescenčně značených nukleotidů, jejichž 3' –OH skupina je chemicky inaktivována. Tato inaktivace umožňuje inkorporaci pouze jednoho nukleotidu do vznikajícího řetězce

v průběhu jednoho cyklu. Po začlenění nukleotidu dochází k uvolnění fluorescenčního signálu, který je zachycen detektorem, díky němuž je nukleotid identifikován. Terminační a fluorescenční značky jsou následně chemicky odstraněny a dochází k inkorporaci a identifikaci dalšího nukleotidu (Obr. 8) (Shedure a Ji, 2008).



Obr. 7: Grafické znázornění můstkové amplifikace a tvorby klastrů (Shendure a Ji, 2008).



Obr. 8: Grafické znázornění samotného procesu sekvencování metodou Illumina (Podle Kircher a Kelso, 2010).

2.4 Sekvencování transkriptomu pomocí RNAseq

Vývoj metod sekvencování nové generace poskytl novou metodu RNAseq, která je velmi výkonnou technologií pro studium transkriptomu. Metoda RNAseq je využívána pro studium alternativních sestřihů (Gan *et al.*, 2010), umožňuje zkoumat expresi genů organismů v různých tkáních, různých fázích vývoje a za různých podmínek (Mortazavi *et al.*, 2008), může být využita také k detekci fúze genů (Maher *et al.*, 2009) či k detekci dlouhých nekódujících RNA (lncRNAs) (Guttman *et al.*, 2010) a k identifikaci jednonukleotidových variant (SNVs) v oblastech exonů (Chepelev *et al.*, 2009).

Tato metoda vyžaduje fragmentaci mRNA na menší části, ze kterých je vytvořena knihovna krátkých cDNA fragmentů s připojenými adaptéry na jejich koncích. Fragmenty jsou poté sekvencovány pomocí sekvenátoru, kdy výsledkem jsou tzv. „ready“, krátké sekvence nukleotidů vzniklé sekvencováním z jednoho konce fragmentů („single-end sequencing“) nebo obou konců („pair-end sequencing“). Výsledkem jsou jeden nebo dva soubory obsahující sekvence získaných „readů“ ve formátu FASTQ (Wang *et al.*, 2009).

2.4.1 Kontrola kvality sekvencování

2.4.1.1 FASTQ Formát

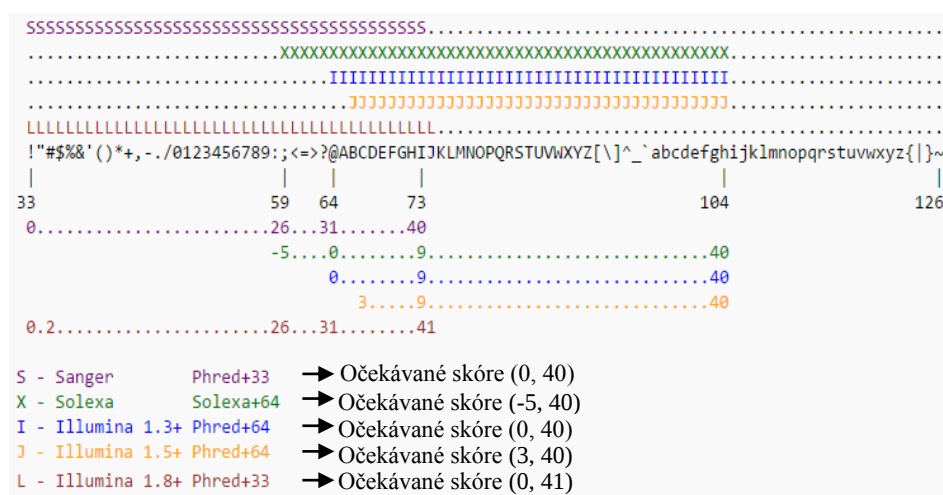
FASTQ formát obsahuje nejen informace o sekvenci produkovaných „readů“, ale také o kvalitě každé báze, která se v sekvenci nachází. Každý „read“ je běžně popsán čtyřmi řádky. První řádek začíná znakem „@“ za nímž následuje identifikátor sekvence. Druhý řádek obsahuje sekvenci „readu“. Třetí řádek začíná znakem „+“ a většinou obsahuje opět identifikátor sekvence a můžou se zde objevit doplňující informace. Poslední řádek FASTQ formátu obsahuje jednomístný ASCII kód pro skóre kvality každé báze. (Tab. 2) (Cock *et al.*, 2010).

Skóre kvality určuje pravděpodobnost chyby při sekvencování nukleotidové báze (base call) sekvenačním přístrojem. Existuje několik různých FASTQ formátů, které se liší v typu zapisování skóre kvality a v počtu ASCII znaků, které jsou k zapisování použity (Obr. 9). Původní FASTQ formát (fastq-sanger) využívá pro určení kvality správné identifikace báze přístrojem Phred skóre (Cock *et al.*, 2010), které je definováno jako dekadický logaritmus pravděpodobnosti (P), že při identifikaci báze došlo k chybě vynásobený -10 $\rightarrow Q_{\text{PHRED}} = -10 * \log_{10}(P)$ (Ewing a Green, 1998). Další

FASTQ formáty pochází od firmy Illumina. První se nazývá fastq-solexa, pro určení kvality správné identifikace báze využívá Solexa skóre, které je počítáno podle vztahu $Q_{\text{SOLEXA}} = -10 * \log_{10} \left(\frac{P}{1-P} \right)$, (Cock *et al.*, 2010). Další FASTQ Illumina formáty 1.3+, 1.5+ a 1.8+ používají Phred skóre kvality. Jednotlivé formáty používají k zakódování skóre kvality různé ASCII znaky (Obr. 9). Vztah mezi Phred skóre a pravděpodobností chyby identifikace báze je vyjádřena v Tab. 3.

Tab. 2: Ukázka FASTQ formátu, udávajícího informaci o „readu“ (Podle www.wikipedia.org).

1. řádek	@Seq_ID
2. řádek	GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGT TCAACTCACAGTTT
3. řádek	+
4. řádek	!""*(((***+))%%%+)(%%%%).1***-+*('))*55CCF>>>>>>CCCCCCCC65



Obr. 9: Typ kódování využívaný vybranými sekvenačními přístroji. Např. fastq-sanger formát kóduje Phred skóre použitím ASCII znaků 33–126. Kódování Phred+33 značí, že ke skóre je nutno přičíst číslo 33 (Podle www.wikipedia.org).

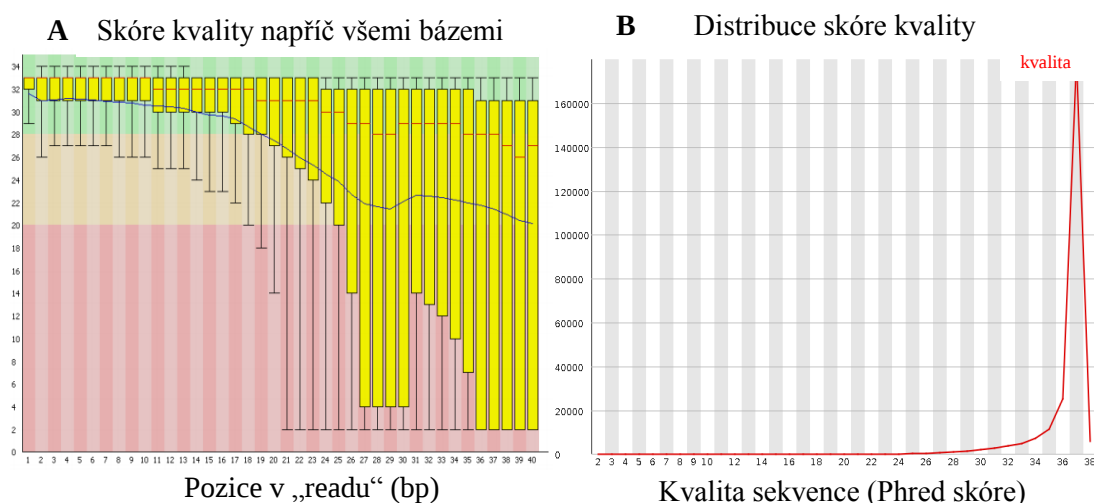
Tab. 3: Vztah mezi „Phred quality score“ a pravděpodobností chybné identifikace báze (Podle www.illumina.com).

„Phred quality score“	Pravděpodobnost nesprávně identifikované báze	Přesnost identifikace (%)
10	1 z 10	90
20	1 ze 100	99
30	1 z 1000	99,9
40	1 z 10 000	99,99
50	1 z 100 000	99,999

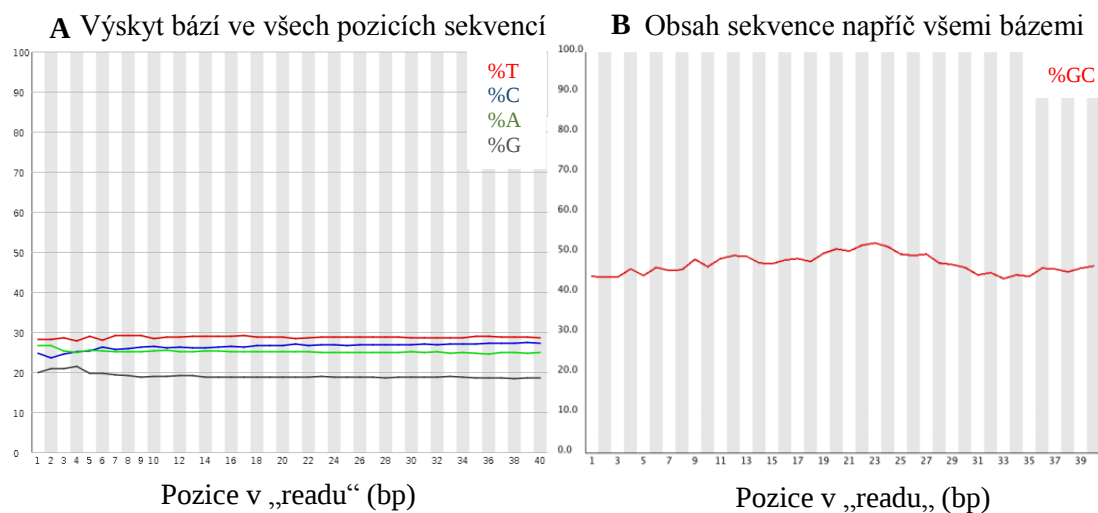
2.4.1.2 Zhodnocení kvality dat

Moderní sekvenátory mohou produkovat desítky miliónů krátkých sekvencí („readů“) v jednom běhu. Před použitím těchto „readů“ pro další analýzy je nutné provést kontrolu jejich kvality. Oblíbeným nástrojem pro hodnocení kvality dat je program fastQC, kde je analýza prováděna řadou analytických modulů. Program nám poskytuje informace o základní statistice. Hodnotí rozložení Phred kvality v jednotlivých pozicích sekvencí a distribuci Phred kvality sekvencí (Obr. 10 A, B). Je hodnocen také výskyt jednotlivých bází ve všech pozicích sekvencí, který by měl být vyvážen a výskyt GC ve všech pozicích sekvencí (Obr. 11 A, B) a distribuce procentuálního obsahu GC v sekvencích (Obr. 12). Program využívá také moduly, které hodnotí neidentifikované báze (N) ve všech pozicích sekvencí, distribuci délky sekvencí (Obr. 13 A, B) a přítomnost duplikovaných sekvencí (Obr. 14 A) a adaptérů. Hodnotí se také přítomnost nadměrně zastoupených sekvencí a k-merů (Obr. 14 B) (www.insidedna.me).

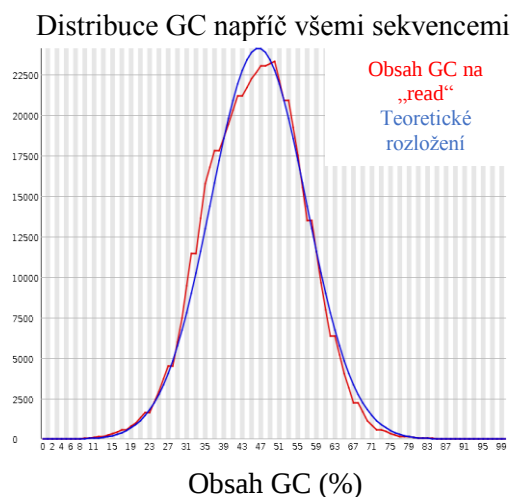
Kromě programu fastQC existují i další nástroje pro zhodnocení kvality dat, jako jsou například programy PRINSEQ (Schmieder a Edwards, 2011), TagCleaner (Schmieder *et al.*, 2010) a HTQC (Yang *et al.*, 2013).



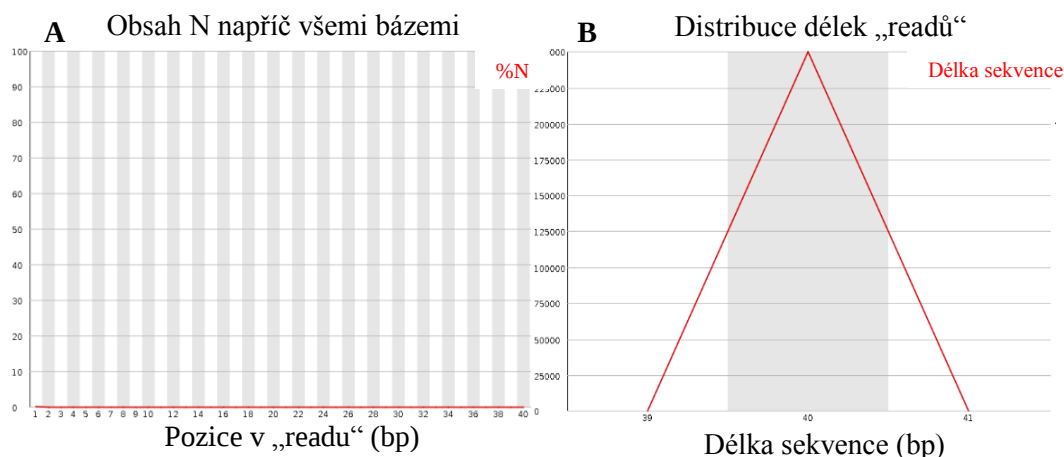
Obr. 10: Grafické zhodnocení kvality bází v každé pozici „readu“. Zelená oblast představuje velmi dobrou kvalitu báze, oranžová průměrnou kvalitu a červená oblast špatnou kvalitu bází (A). Distribuce Phred kvality sekvencí. Vrchol grafu představuje průměrnou kvalitu bází (B) (Podle www.bioinformatics.babraham.ac.uk).



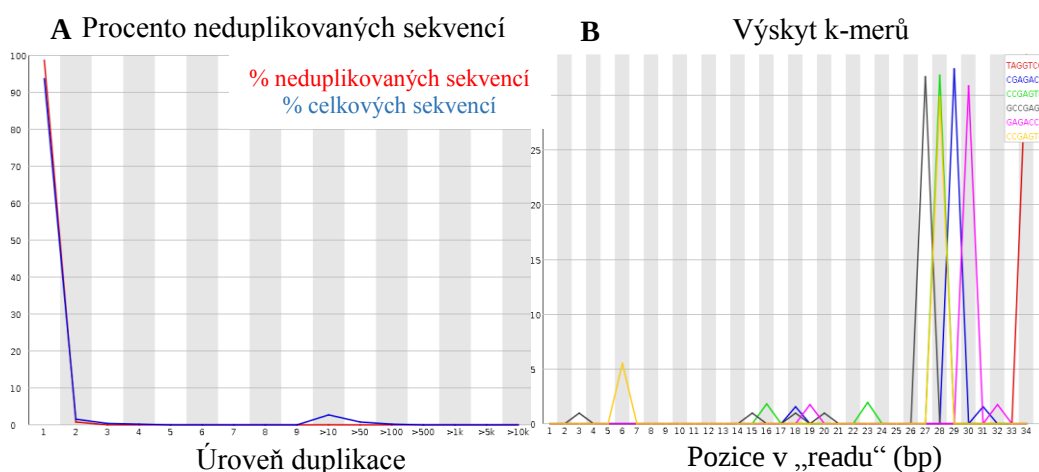
Obr. 11: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých bází v sekvencích (A) a výskytu GC ve všech pozicích sekvencí (B) (Podle www.bioinformatics.babraham.ac.uk).



Obr. 12: Grafické znázornění distribuce % obsahu GC (Podle www.bioinformatics.babraham.ac.uk).



Obr. 13: Grafické znázornění obsahu neidentifikovaných bází (N) ve všech pozicích sekvencí (A) a distribuce délek „readů“ (B) (Podle www.bioinformatics.babraham.ac.uk).



Obr. 14: Grafické znázornění přítomnosti duplikovaných sekvencí (A) a k-merů (B) (Podle www.bioinformatics.babraham.ac.uk).

Pokud je v datech ze sekvenování v rámci vyhodnocení kvality objeven problém, můžeme použít různé volně dostupné programy, které slouží například k odstranění nekvalitních částí sekvencí, zbytků specifických adaptérů či duplikovaných sekvencí. Mezi tyto programy patří např. Trimmomatic, který pracuje s daty produkovanými sekvenátory Illumina (Bolger *et al.*, 2014), QTrim, který zpracovává data produkované platformou Roche/454 (Shrestha *et al.*, 2014) a multiplatformní je program QcReads (Ma *et al.*, 2013).

2.4.2 Zarovnání „readů“

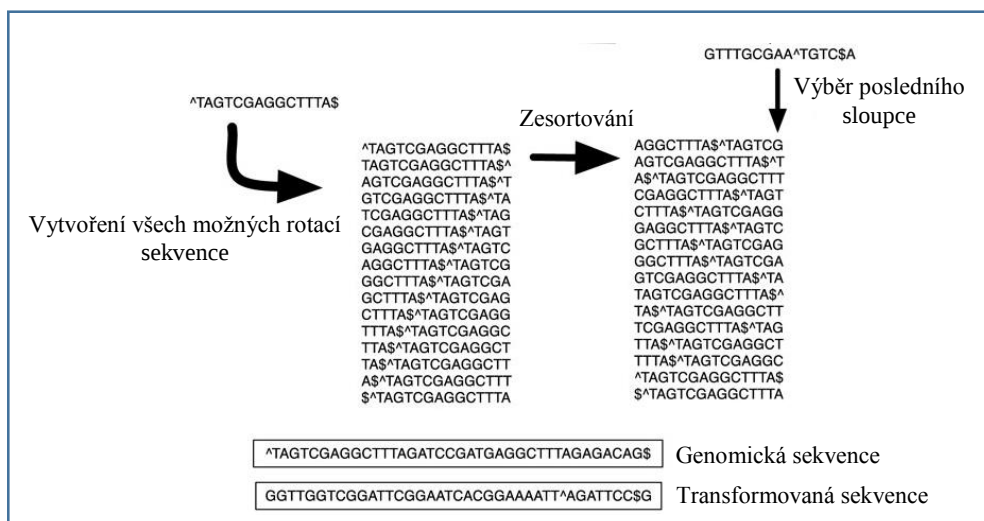
„Ready“ zkontrolované pro svou kvalitu jsou zarovnány na referenční genom, pomocí programů, kterých je v současné době k dispozici více než 60 (Fonseca *et al.*, 2012). Programy využívané pro zarovnání „readů“ na referenční genom, lze podle používaného algoritmu rozdělit do několika skupin. První skupina programů využívá Burrows-Wheelerovu transformaci (BWT), další skupina programů využívá algoritmus kladení jader a jejich postupného rozšiřování, třetí skupina programů umožňuje identifikaci mezer mezi exony („splice junction“) s použitím kombinace dvou výše zmíněných algoritmů (Trapnell a Salzberg, 2009).

Programy využívající Burrows-Wheelerovu transformaci (BWT) povolují zarovnání „readů“, které přesně neodpovídají referenční sekvenci, a proto jsou obecně rychlejší než programy využívající algoritmus kladení jader (Martin a Wang, 2011). Tyto programy si vytváří indexovanou verzi genomické sekvence, pomocí BWT transformace (Obr. 15) (Flicek a Birney, 2009). „Ready“ jsou následně zarovnány znak po znaku, zprava doleva na transformovaný řetěz. S každým novým znakem je aktualizován interval, kde by mohl být „read“ zarovnán (Obr. 16 B) (Trapnell a Salzberg, 2009). Mezi programy využívající BWT patří např. Bowtie (Langmead *et al.*, 2009), BWA (Li a Durbin, 2009) a SOAP2 (Li *et al.*, 2009).

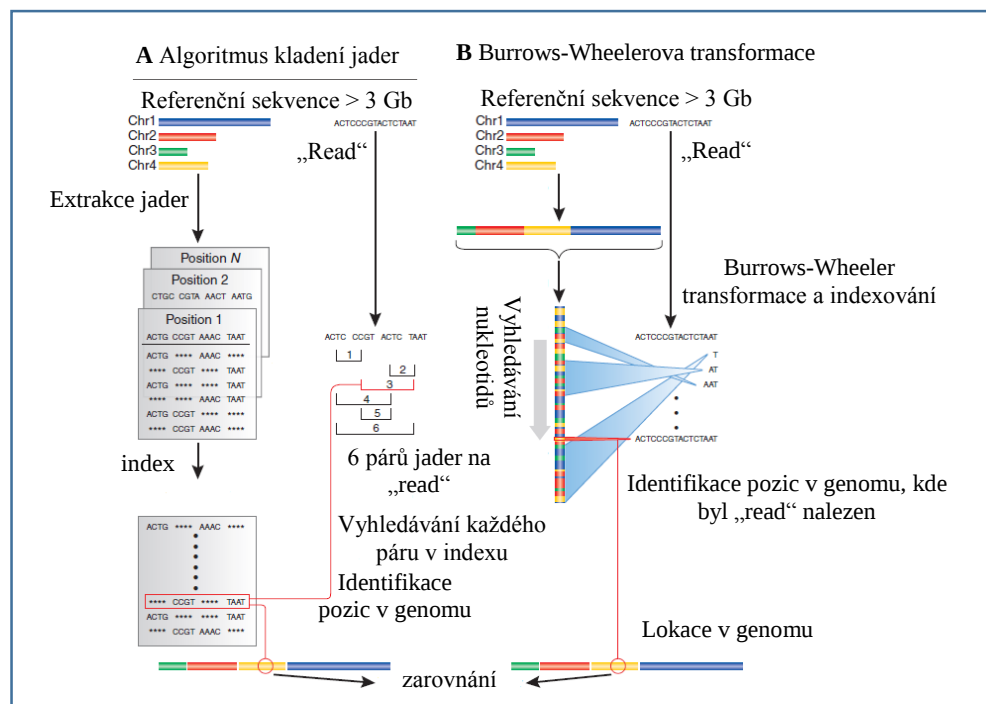
Programy využívající algoritmus kladení jader jsou založeny na vyhledávání sekvencí přesně odpovídajících referenčnímu genomu a jejich následné rozšiřování pomocí Smith-Watermanova algoritmu (Martin a Wang, 2011). Referenční genom a „ready“ jsou rozfragmentovány na stejně dlouhé segmenty, jádra. Jádra „readů“ jsou párována a uložena ve vyhledávací tabulce (tzv. hašovací tabulka) a slouží ke skenování reference (Obr. 16 A) (Trapnell s Salzberg, 2009). Programy využívající tento algoritmus jsou např. MAQ (Li *et al.*, 2008), SHRIIMP (Rumble *et al.*, 2009) a BFAST (Homer *et al.*, 2009).

„Ready“ pocházející ze sekvencování transkriptomů je vhodné zarovnávat na referenční genomickou sekvenci pomocí programů, které berou do úvahy intronový sestřih (Trapnell a Salzberg, 2009). Takovým programem je např. TopHat, který umožňuje identifikaci mezer mezi exony („splice junctions“) a byl použit i v rámci diplomové práce. Program TopHat zarovná „ready“ k referenci ve dvou fázích. V první fázi jsou „ready“ zarovnány na referenční genom vcelku pomocí programu Bowtie, který využívá algoritmus BWT. „Ready“, které se nepodařilo namapovat

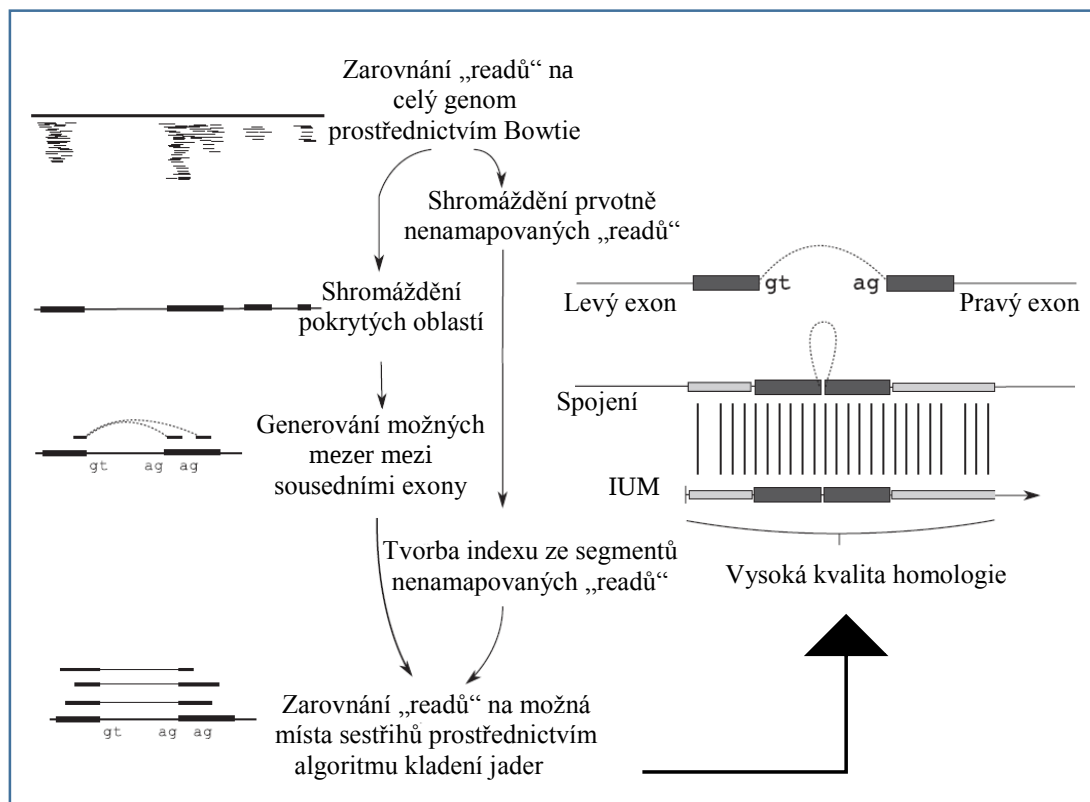
vcelku, jsou shromážděny pro další analýzu, kdy jsou „ready“ rozděleny na menší fragmenty - jádra, která jsou zarovnávána na referenční genom pomocí algoritmu kladení jader. Tento algoritmus tak zabezpečí zarovnání „readů“ nacházejících se na rozhraní dvou exonů (Obr. 17) (Trapnell *et al.*, 2009).



Obr. 15: Grafické znázornění Burrows-Wheelerovy transformace genomické sekvence, která spočívá ve vytvoření všech možných rotací referenční sekvence tím, že první znak sekvence je umístěn vždy na konec. Následně jsou všechny řetězce vzniklé rotací lexikograficky seřazeny a z této seřazené posloupnosti řetězců se jako výstup použije poslední sloupec - transformovaná referenční sekvence. Znaky `^` a `$`, značí počátek a konec sekvence (Podle Flicek a Birney, 2009).



Obr. 16: Grafické znázornění zarovnání „readů“ k referenční sekvenci pomocí algoritmu kladení jader (A) a Burrows-Wheelerovy transformace (B) (Podle Trapnell a Salzberg, 2009).



Obr. 17: Grafické znázornění zarovnání „readů“ pomocí programu TopHat, který kombinuje Burrows-Wheelerovu transformaci a algoritmus kladení jader. IUM představuje původně nenamapovaný „read“ (Podle Trapnell *et al.*, 2009).

2.4.3 Analýza diferenciální exprese genů

Pro analýzu DEGs jsou po zarovnání „readů“ na referenční genom používány programy určené pro kvantifikaci „readů“. Aby bylo možné správně přiřadit zarovnané „ready“ k anotovaným genům, je potřebná jejich anotace v podobě anotačního souboru ve formátu gtf, gff2 či gff3, který obsahuje informace o začátcích a koncích genů v referenčním genomu. Následně jsou získaná data normalizována a statistická analýza je použita pro identifikaci DEGs (Oshlack *et al.*, 2010). Pro analýzu diferenciální exprese jsou používány volně dostupné softwarové balíčky jako např. Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2010), edgeR (Robinson *et al.*, 2010), DESeq (Anders a Huber, 2010), PoissonSeq (Li *et al.*, 2012), baySeq (Hardcastle a Kelly, 2010) a limma (Ritchie *et al.*, 2015).

2.4.3.1 Kvantifikace

Po zarovnání „readů“ na jednotlivé pozice v genomu musí být stanoven počet „readů“, které byly zarovnány na anotované geny, resp. jejich exony. Pro kvantifikaci zarovnaných „readů“ jsou používány nástroje, jako například HTSeq (Anders *et al.*, 2014), BEDTools (Quinlan a Hall, 2010), Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010) a také program featureCounts (Liao *et al.*, 2013), který byl používán i v rámci této diplomové práce pro kvantifikaci počtu zarovnaných „readů“ na referenční sekvenci.

2.4.3.2 Normalizace dat

Normalizace dat je potřebná pro co nejpřesnější srovnání úrovně exprese transkriptu mezi dvěma vzorky nebo úrovně exprese dvou transkriptů u jednoho vzorku. V případě RNAseq dat je prováděna například normalizace dat na délku transkriptu, protože pokud dojde k zarovnání většího počtu „readů“ na delší transkripty, neznamená to nutně, že jejich míra exprese je vyšší. Dále bývá také používána normalizace dat na celkový počet „readů“ v knihovně, jelikož srovnávané vzorky mohou být sekvenovány do různé hloubky a mohou tedy obsahovat rozdílný počet „readů“ v knihovně (Oshlack *et al.*, 2010).

Jednou z normalizačních metod pro kvantitativní analýzu RNAseq dat je metoda RPKM („Reads Per Kilobase per Million mapped reads“), která normalizuje data jak z hlediska velikosti transkriptů, tak z hlediska velikosti knihovny (počtu „readů“). Pro tuto metodu je používán vztah $RPKM = 10^9 * \frac{C}{N * L}$, kde C představuje počet „readů“ zarovnaných na transkript, L je délka transkriptu a N je celkový počet „readů“ v knihovně (Mortazavi *et al.*, 2008). Variantou RPKM metody je metoda FPKM („Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped reads“), která je používána pro „paired-end“ sekvenování. Vzorec pro metodu FPKM je identický jako u metody RPKM, ale místo „readů“ dosazujeme informace vztahující se k celému fragmentu DNA, ze kterého byly paired-end „ready“ odvozeny. Ve výpočtu C značí počet fragmentů zarovnaných na transkript a L délku fragmentů. Celkový počet fragmentů je pro „paired-end“ „ready“ roven N/2 (Trapnell *et al.*, 2010). Nedostatkem těchto přístupů je, že poměrné zastoupení každého genu je závislé na úrovni exprese všech ostatních genů, proto malá část vysoce exprimovaných genů zkresluje množství málo exprimovaných genů (Bullard *et al.*, 2010).

Dalším přístupem normalizace je metoda TMM („Trimmed Means of M-values“). Tato metoda normalizace je součástí softwarového balíčku edgeR a je založena na hypotéze, že většina genů není diferenciaciálně exprimována. Pro výpočet TMM faktoru je jeden vzorek vybrán jako referenční a ostatní jsou vzorky testované. Hodnota M je vypočítána jako logaritmovaný poměr počtu „readů“ mezi testovaným vzorkem a referencí. Po vyloučení nejvíce exprimovaných genů a genů s největším logaritmovaným poměrem je váženým aritmetickým průměrem M hodnot (TMM) získán normalizační faktor. Normalizované hodnoty počtů „readů“ pro každý gen jsou získány dělením počtu „readů“ v testovaném vzorku získaným normalizačním faktorem (Robinson a Oshlack, 2010). Na obdobném principu funguje normalizační metoda DESeq, která je součástí softwarového balíčku DESeq a je také založena na předpokladu, že většina genů není diferenciaciálně exprimována. Při této metodě je vytvořen „referenční vzorek“ výpočtem geometrického průměru počtu „readů“ pro každý gen napříč všemi vzorky. Následně je získána hloubka sekvencování testovaného vzorku ve srovnání s „referenčním vzorkem“ – pro každý gen je vypočítán kvocient dělením počtu „readů“ v testovaném vzorku počtem „readů“ v referenčním vzorku. Medián všech těchto podílů představuje relativní hloubku knihovny tzv. „Size factors“ tj. normalizační faktor. Výpočet normalizovaných hodnot počtu „readů“ pro každý gen je získán dělením počtu „readů“ v testovaném vzorku normalizačním faktorem (Anders a Huber, 2010).

Normalizační metody TMM a DESeq jsou nejvíce preferovány díky své robustnosti a univerzálnosti, i když existují i jiné metody jako jsou např.: „Total Count“ (TC), při této metodě je množství „readů“ zarovnaných na gen děleno celkovým počtem zarovnaných „readů“, tento podíl je násoben průměrným celkovým počtem „readů“ napříč všemi testovanými vzorky. Další metody jsou například „Upper Quartile“ (UQ), kdy je celkový počet „readů“ nahrazen horním kvantilem při výpočtu normalizačního faktoru a „Median“ (Med), kdy při výpočtu normalizačního faktoru je celkový počet nahrazen mediánem hodnot (Dillies *et al.*, 2012).

2.4.3.3 Statistická analýza diferenciaciálně exprimovaných genů

Analýza DEGs může být provedena pomocí různých programů, které používají různé statistické testy (Seyednasrollah *et al.*, 2013). Existuje mnoho statistických přístupů, které mohou být použity pro analýzu DEGs a obecně spadají do dvou kategorií –

parametrické testy, u kterých je nutno specifikovat typ rozdělení dat a neparametrické testy, u kterých není nutno specifikovat typ rozdělení dat. Většina statistických metod sloužících pro analýzu DEGs jsou parametrické metody, které využívají buď Poissonovo nebo Negativně binomické rozdělení dat (Lin *et al.*, 2014). Poissonovo rozdělení předpokládá náhodný výběr „readů“ z pevné množiny genů. Toto rozdělení však předpovídá malé odchylky, a proto není schopno reálně zachytit biologickou variabilitu dat (Rapaport *et al.*, 2013). Poissonův model díky tomu vnáší do analýzy chyby, kdy statistickým testem jsou získány falešně pozitivní výsledky podhodnocením variability mezi biologickými replikáty (Langmead *et al.*, 2010), tento přístup se stále více uznává za nevhodný. Proto jsou nejčastěji používány parametrické metody, předpokládající negativně binomické rozdělení dat (Anders a Huber, 2010). Je-li však k dispozici málo replikátů bývá statistické modelování RNAseq dat velmi obtížné, navíc parametrické přístupy bývají problematické pro posouzení DEGs, u kterých je velmi malý počet zarovnaných „readů“ (Bullard *et al.*, 2010). Existují proto programy, které používají i neparametrické přístupy. V Tab. 4 jsou vybrány programy sloužící k analýze DEGs, jsou uvedeny metody normalizace a statistické testy, které tyto programy využívají. V rámci diplomové práce byly pro analýzu DEGs použity programy DESeq a edgeR. Tyto programy byly vybrány, jelikož patří k nejpopulárnějším ze všech dostupných a poskytují nejlepší výsledky v rámci srovnávacích studií (Soneson a Dolorenzi, 2013).

Tab. 4: Charakteristika vybraných metod pro analýzu DEGs (Podle Seyednasrollah *et al.*, 2013).

Metoda	Způsob normalizace	Předpokládané rozdělení dat	Statistický test pro analýzu diferenciálně exprimovaných genů
edgeR	TMM/Upper Quartile/RLE (podobné DESeq)	Negativně binomické	Fisherův exaktní test
DESeq	DESeq „sizeFactors“	Negativně binomické	Fisherův exaktní test
baySeq	TMM/Total Count	Negativně binomické	empirická Bayesovská metoda
SAMseq	SAMseq speciální metoda	Neparametrická metoda	Wilcoxonův statistický test
Limma	TMM	transformace normalizované hodnoty na logaritmickou stupnici (základ 2)	Empirická Bayesovská metoda
Cufflinks	Geometrická (podobné DESeq)	Beta negativně binomické	t-test

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

Pro kvantifikaci genové exprese metodou real-time RT-qPCR a metodou RNAseq byla používána mycelia a sklerocia *Cp* industriálního kmene Gal404 (TEVA Czech Industries, Česká republika) a divokého kmene 20.1 (Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Česká republika).

3.2 Chemikálie

Na přípravu Mantle agaru pro růst mycelií *Cp* byly použity následující chemikálie: agar (HiMedia, Indie), dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, Česká republika), heptahydrát síranu hořečnatého (Penta, Česká republika), heptahydrát síranu zinečnatého (NeoLab, Německo), heptahydrát síranu železnatého (NeoLab, Německo), chlorid draselný (LachNer, Česká republika), kvasinkový extrakt (Sigma, USA), L - asparagin monohydrát (Sigma, USA), L - cystein (Lachema, Česká republika), sacharosa (LachNer, Česká republika) a tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Penta, Česká republika). Pro úpravu pH byl použit hydroxid sodný (Penta, Česká republika).

RNA byla přečištěna Turbo DNasou (Ambion, USA) v prostředí 10x Turbo pufru (Ambion, USA). Pro precipitaci a následné promytí vzorků byl použit chlorid litný (Ambion, USA) a ethanol (LachNer, Česká republika). Vzorky RNA byly reverzní transkripcí přepsány na cDNA pomocí RevertAid H Minus reverzní transkriptasy (Thermo Scientific, USA), 5x Reakčního pufru pro reverzní transkriptasu (Thermo Scientific, USA) a Oligo(dT) primeru (Sigma, USA).

Při PCR byla použita GoTaq Flexi DNA polymerasa (Promega, USA) s 5x Green GoTaq Flexi pufrem (Promega, USA), 25 mmol.l⁻¹ chlorid hořečnatý (NEB, Velká Británie). Na PCR reakci byla použita 10 mmol.l⁻¹ směs deoxynukleotidtrifosfátů (dNTPs) (Fermentas, Kanada).

Jako standard pro agarosovou elektroforézu byl použit 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). Na přípravu gelu byla použita agarosa (Amresco, USA) zalitá TAE pufrem připraveným z Tris (Ducheva, Holandsko), kyseliny octové (LachNer, Česká republika) a EDTA (Penta, Česká republika). Pro vizualizaci fragmentů byl použit ethidium bromid (NeoLab, Německo).

Při real-time RT-qPCR reakci byl použit 2x gb SG PCR Master Mix, který obsahuje SYBR GREEN, Taq DNA polymerasu, reakční pufr, dNTP a MgCl₂ (GENERI BIOTECH, Česká republika) a pasivní referenční barvivo ROX (GENERI BIOTECH, Česká republika). Lyofilizované primery byly rozpuštěny v „nuclease free“ vodě na koncentraci 100 mmol.l⁻¹. Pro PCR reakce byly používány primery o koncentraci 10 mmol.l⁻¹.

3.3 Použité roztoky

Roztoky pro Mantle agar a TAE pufr byly po přípravě podle níže uvedených postupů sterilizovány autoklárováním.

Mantle agar, pH 5,2 (500 ml): 10 g agaru; 0,125 g dihydrogen fosforečnanu draselného; 0,125 g heptahydrátu síranu hořečnatého; 0,0135 g heptahydrátu síranu zinečnatého; 0,0165 g heptahydrátu síranu železnatého; 0,06 g chloridu draselného; 0,05 g kvasinkového extraktu; 5 g L - asparaginu; 0,005 g L - cysteinu; 50 g sacharosy a 0,5 g tetrahydrátu dusičnanu vápenatého bylo smícháno pro přípravu Mantle agaru, který byl použit pro růst mycelií *Cp* kmene Gal404 a 20.1.

TAE pufr 50x, pH 8 (1 L): 100 ml (0,5 mol.l⁻¹) EDTA (pH=8); 57,1 ml kyseliny octové; 242 g Tris báze.

1% Agarosový gel: 1 g agarosy a 100 ml TAE pufru 1x. Agarosa byla rozpuštěna v pufru zahřátím v mikrovlnné troubě.

3.4 Použité kity

Pro izolaci RNA ze vzorků mycelií a sklerocií *Cp* byl použit RNAqueous Total RNA Isolation Kit (Ambion, USA). Kontaminace izolovaných vzorků RNA genomovou DNA byla odstraněna pomocí TURBO DNA-free Kitu (Ambion, USA).

3.5 Použité přístroje

- Analytická váha 5034/120: Nahita-Auxilab, Španělsko
- Automatická třepačka: Biosan, Litva
- Centrifuga NF 400: Nüve, Turecko
- Elektroforetická komůrka: Biometra, Německo
- Flowbox: MERCI, Česká republika
- Gel DocTM EZ Imager: Bio-Rad, Česká republika

- Inkubátor: Memmert, Německo
- Optická izolující fólie: Thermo Scientific, USA
- Pipetovací robot: Agilent Technologies, USA
- Mikrocentrifuga SCAN SPEED 1730R: Labogene, Německo
- Termocycler T – personal: Biometra, Německo
- Termoblok: BIOER, Čína
- Transiluminátor UVT-20S: HeroLab, Německo
- Vortex Combi – spin: Biosan, Litva
- Viia7 Real-time PCR Systém: Applied Biosystems, USA
- Zdroj napětí pro elektroforézu Standard Power Pack P25: Biometra, Německo
- 384 jamkové destičky: Thermo Scientific, USA

3.6 Metody a postupy

3.6.1 Sekvenační data transkriptomu a kontrola kvality dat

V rámci diplomové práce mi byla poskytnuta data ze sekvenování, u kterých již byla provedena kontrola kvality pomocí volně dostupného programu FastQC (verze 0.10.0) (Majeská Čudejková M., Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Olomouc). Příprava knihovny u vzorků pocházejících ze sběru v roce 2013 byla provedena pomocí GATC Biotech AG (Cologne, Německo), knihovna byla sekvenována na přístroji Illumina HiSeq 2000. U vzorků pocházejících ze sběru v roce 2014 byla příprava knihovny provedena pomocí Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kitu (Illumina, San Diego, CA, USA). Knihovna byla sekvenována s použitím MiSeq Reagent Kitu v3 (Illumina, San Diego, CA, USA) na přístroji MiSeq. Transkriptom byl sekvenován přístupem „paired-end“. Biologický materiál využitý pro sekvenování je shrnut v Tab. 5. Vzorky získané po infekci žita z roku 2014, které byly použity pro sekvenování a následné zpracování dat metodou RNAseq jsou identické se vzorky z roku 2014, které byly využity pro relativní kvantifikaci genové exprese pomocí real-time RT-qPCR.

Tab. 5: Biologický materiál, ze kterého pocházela data ze sekvenování.

Pletivo/kmen	Mycelium/Gal404	Sklerocium/Gal404	Sklerocium/20.1
Biologické replikáty (rok)	2013 a 2014	2013 a 2014	2014

3.6.2 Zarovnání „readů“ na referenční genom a kvantifikace jejich počtu

„Ready“ pocházející ze sekvenování vzorků (Tab. 5) byly zarovnány na referenční genom *Cp* kmene 20.1 (Schardl *et al.*, 2013) s využitím programu TopHat2 (verze 2.0.12). Všechny používané programy včetně programu TopHat2 byly spouštěny za použití operačního systému Linux system Ubuntu 12.04.

Proces zarovnání „readů“ na referenční genom byl nejprve optimalizován změnou parametru -N („read-mismatches“) a -read edit dist. Pomocí těchto parametrů byl určován maximální možný počet nekomplementárních nukleotidů v sekvenci „readu“ a maximální počet chybějících nukleotidů v sekvenci „readu“, který je akceptován při jejich zarovnání k referenční sekvenci. Cílem bylo najít hodnotu těchto parametrů, při které docházelo k zarovnání největšího počtu „readů“ k referenci. Optimalizace procesu byla prováděna pomocí dat pocházejících ze sekvenování mycelia *Cp* kmene Gal404. Po optimalizaci procesu, byl program TopHat2 postupně použit k zarovnání „readů“ na referenční sekvenci pro všechny analyzované vzorky (Tab. 5) s použitím vybrané hodnoty pro parametry -N a --read edit dist.

Příkaz používaný pro zarovnání „readů“ na referenční genom měl následující syntaxi:

```
tophat2 -o výstupní_soubor -G anotační_soubor.gff3 -p 10 --library-type fr-unstranded/fr-firststrand -N 5 -read-edit-dist 5 genom C1_R1_1.fq C1_R1_2.fq
```

Výčet parametrů a jejich významu používaných při spouštění programu TopHat2:

-o	Výstupní soubor s výsledky.
-G	Anotační soubor ve formátu GFF3.
-p	Udává počet jader počítače, které jsou využity při procesu zarovnání readů.
-library-type	Specifikace knihovny - unstranded nebo firststrand.
-N	„Ready“, které jsou zarovnány k referenční sekvenci a mají větší počet neshodujících se nukleotidů, než určuje parametr -N, jsou z další analýzy vyřazeny.
-read-edit-dist	Parametr, který určuje maximální počet chybějících bazí při zarovnání „readů“. Pokud je chybějící počet bazí vyšší, než určuje parametr, příslušný „read“ je vyřazen.

Genom Sekvence referenčního genomu.

C1_R1_1.fq/ C1_R1_2.fq FASTQ soubory obsahující páry „readů“.

Jakmile byly získány výstupní soubory z programu TopHat2 pro všechny analyzované vzorky (Tab. 5), byly tyto soubory použity pro kvantifikaci množství zarovnaných „readů“ k jednotlivým genům pomocí programu featureCounts (verze 1.4.6).

Příkaz používaný pro kvantifikaci množství „readů“ zarovnaných k jednotlivým genům na referenční sekvenci měl následující syntaxi:

featureCounts -t CDS -g Parent -s 0/2 -p -T 10 -a anotační_soubor.gtf -o výstupní_soubor vstupní_soubor.bam

Výčet parametrů a jejich významu používaných při spouštění programu featureCounts:

Vstupní soubor	Soubor ve formátu BAM, který obsahuje výsledek zarovnání „readů“ z programu TopHat2.
-a	Anotační soubor ve formátu GTF.
-o	Výstupní soubor s výsledky kvantifikace.
-t	Specifikuje exony. Pouze řádky, které v anotačním souboru odpovídají této specifikaci, budou zahrnuty do kvantifikace počtu „readů“.
-g	Specifikuje geny.
-s	Specifikace knihovny. Používané hodnoty: 0 pro „unstranded“, 2 pro „firststrand“.
-p	Specifikace „paired-end“ sekvencování.
-T	Udává počet jader počítače, které jsou využity při procesu kvantifikace (urychlení procesu).

Výstupní soubory z programu featureCounts byly použity pro vytvoření tabulek, které obsahovaly porovnávaná vývojová stádia *Cp*, respektive informace o množství zarovnaných „readů“ k jednotlivým genům u těchto porovnávaných stádií (Tab. 6). Tabulky byly vytvořeny pomocí programovacího jazyka bash v příkazovém řádku Ubuntu. Vytvořené tabulky následně sloužily pro analýzu DEGs mezi srovnávanými vývojovými stádii *Cp*.

Tab. 6: Výčet vytvořených tabulek pro analýzu DEGs mezi srovnávanými vývojovými stádii *Cp*. Číslo v závorce udává počet replikátů používaných pro analýzu.

Tabulka	Vývojové stádium_Kmen / Vývojové stádium_Kmen
1	Mycelium_Gal404 (2) / Sklerocium_Gal404 (2)
2	Sklerocium_20.1 (1) / Sklerocium_Gal404 (2)

3.6.3 Analýza DEGs pomocí DESeq a edgeR

Analýza DEGs mezi srovnávanými vývojovými stádii *Cp* (Tab. 6) byla provedena pomocí programů DESeq a edgeR s využitím programovacího jazyka R. Výsledky získané pomocí těchto dvou programů byly následně porovnány.

Po načtení vytvořených tabulek do knihovny DESeq a edgeR byl proveden popis srovnávaných vzorků. Následně byla provedena normalizace dat, odhad rozptylu dat, analýza DEGs a výsledky byly uloženy ve formě grafů a tabulek. Příkazy používané pro výše uváděné kroky analýzy pomocí programu DESeq měly následující syntaxi:

Příprava tabulky:

```
>CpcountTAB = read.table( "/tabulka", header=TRUE, row.names=1 )
>CpDesign = data.frame(
+row.names = colnames( CpcountTAB ),
+condition = c( "vzorek1", "vzorek1", "vzorek2", vzorek2" ))
>condition = CpDesign$condition[ ]
>condition
>cdsCp = newCountDataSet( CpcountTAB, condition )
```

Normalizace:

```
>cdsCp = estimateSizeFactors( cdsCp )
>sizeFactors( cdsCp )
```

Odhad disperze dat:

```
>cdsCp = estimateDispersions( cdsCp, sharingMode="fit-only" )
```

Uložení grafu rozptylu dat:

```
>plotDispEsts <- function(cdsCp){
+plot( rowMeans( counts( cdsCp, normalized=TRUE ) ), fitInfo( cdsCp )
+perGeneDispEsts, pch=".", log="xy", ylab="roztyl dat",
+xlabel="průměr normalizovaných hodnot počtu readů" )
+xg=10^seq( -.5,5, length.out=300 )
+lines( xg, fitInfo(cdsCp)$dispFun( xg ), col="red" )}
>jpeg( "Obr.jpg" )
>plotDispEsts( cdsCp )
>dev.off
```

Test pro analýzu DEGs:

```
>resVzorek1_Vzorek2 = nbinomTest( cdsCp, "vzorek1", "vzorek2" )
```

Uložení grafu závislosti změny exprese genů mezi porovnávanými stádii na průměru normalizovaných hodnot počtu „readů“:

```
>jpeg( "Obr.jpg" )
```

```
>plotMA( resVzorek1_Vzorek2)
```

```
>dev.off()
```

Uložení tabulky obsahující výsledky z analýzy DEGs:

```
>write.table( resVzorek1_Vzorek2, file="tabulka.csv", sep="\t", quote=FALSE )
```

Uložení tabulky obsahující výsledky DEGs s hodnotou hladiny významnosti (padj)<0,05:

```
>write.table(resVzorek1_Vzorek2[!
```

```
+is.na(resVzorek1_Vzorek2$padj)&resVzorek1_Vzorek2$padj<0,05,],file="tabulka.csv", sep="\t", quote=FALSE )
```

Příkazy používané při analýze DEGs pomocí programu edgeR měly následující syntaxi:

Příprava tabulky:

```
>raw.data <- read.table( file = "/tabulka" , header = TRUE )
```

```
>counts <- raw.data[ , -c(1,ncol(raw.data)) ]
```

```
>rownames( counts ) <- raw.data[ , 1 ]
```

```
>colnames( counts ) <- paste(c(rep("vzorek1_R",2),rep("vzorek2_R",2)),  
c(1:2,1:2), sep="")
```

Popis srovnávaných vzorků a počtu replikátů:

```
>group <- c(rep("vzorek1",2) , rep("vzorek2",2))
```

```
>cds <- DGEList( counts , group = group )
```

```
>names ( cds )
```

Normalizace:

```
>cds <- calcNormFactors( cds )
```

Odhad rozptylu dat:

```
>cds <- estimateCommonDisp( cds, verbose=TRUE )
```

```
>cds <- estimateTagwiseDisp( cds )
```

Uložení grafu rozptylu dat:

```
>pdf( "plotBCV" )
```

```
>plotBCV( cds )
```

```
>dev.off()
```

Test pro analýzu DEGs:

```
>et <- exactTest( cds, pair = c( "vzorek1" , "vzorek2" ) )
```

```
>topTags( et )
```

```
>top <- topTags( et, n=nrow( cds$counts ) )$table
```

```
>summary(de <- decideTestsDGE(et))
```

Uložení grafu závislosti změny exprese genů mezi porovnávanými stádii na průměru normalizovaných hodnot počtu „readů“:

```
>detags <-rownames(cds)[as.logical(de)]
```

```
>pdf( "plotSmear" )
```

```
>plotSmear( cds , de.tags=detags )
```

```
>abline( h=c(-1,1), col="blue" )
```

```
>dev.off()
```

Pro uložení tabulky obsahující výsledky z analýzy DEGs byl použit stejný příkaz, jako u programu DESeq.

Výsledek analýzy DEGs programem DESeq je tabulka obsahující informace, které jsou shrnuty v Tab. 7. Výsledek analýzy programem edgeR je tabulka, ve které jsou informace o $\log_2\text{FoldChange}$, $\log_2\text{CPM}$ (logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtu „readů“), $p\text{val}$ a $p\text{adj}$. Tyto tabulky byly používány pro zhodnocení výsledků analýzy DEGs.

Tab. 7: Informace pro každý gen obsažené v tabulce získané po analýze DEGs mezi srovnávanými vývojovými stádii (2 podmínky) programe DESeq.

Získané informace	Význam
ID	Identifikátor genu.
baseMean	Průměrné normalizované hodnoty všech vzorků z obou podmínek.
baseMeanA	Průměrné normalizované hodnoty podmínky A.
baseMeanB	Průměrné normalizované hodnoty podmínky B.
foldChange	Změna hodnot z podmínky A na B ($\text{baseMeanB}/\text{baseMeanA}$).
log2FoldChange	Logaritmus hodnoty foldChange o základu 2.
pval	p hodnota udává statistickou významnost zjištěné změny. Pokud je hodnota p menší jak stanovená hladina významnosti (α , pro biologická data se udává hodnota 0,05), jedná se o statisticky významný rozdíl a nulová hypotéza (H_0) tedy tvrzení, které obvykle vyjadřuje žádný neboli nulový rozdíl mezi testovanými vzorkami, se zamítá.
padj	Upravená hodnota $p\text{val}$, pomocí metody Benjamini-Hochberg, která kontroluje poměrné množství falešně pozitivních výsledků z celkového počtu signifikantně diferenciatně exprimovaných genů.

3.6.4 Izolace RNA

K izolaci RNA byla použita mycelia (z let 2014 a 2015), která rostla na Mantle agaru (3.3), inokulovaném *Cp* kmenem Gal404 a 20.1. Dále byla k izolaci RNA použita sklerocia (z let 2014 a 2015), která se vytvořila po infekci žita *Cp* kmenem Gal404 a 20.1. Mycelia byla přes noc lyofilizována ve 2 ml mikrozkušavkách a poté v třecí misce s tloučkem rozdrovena. Sklerocia byla zalita tekutým dusíkem a poté také rozdrovena v třecí misce s tloučkem. Z takto připraveného materiálu mycelií a sklerocií bylo do 2 ml mikrozkušavek odebráno asi 100 mg každého vzorku pro izolaci RNA pomocí RNAqueous Total RNA Isolation Kitu. Ke 100 mg vzorků bylo přidáno 1200 μ l lyzačního pufru. Po 20 min inkubaci vzorků na automatické třepačce (při laboratorní teplotě) následovala centrifugace 2 min (20 000 g, 21 °C). Vzniklý supernatant byl poté společně se stejným množstvím 64% ethanolu přepipetován do čistých 2 ml mikrozkušavek a směs byla promíchána otočením mikrozkušavky. Všechny následující centrifugace probíhaly při 13 000 g a laboratorní teplotě. Reakční směs byla postupně po 700 μ l napipetována na kolonku ve sběrné mikrozkušavce, centrifugace 30 s. Směs, která kolonkou protekla, byla odlita. Za účelem promytí bylo na kolonku napipetováno 700 μ l Promývacího roztoku 1, centrifugace 30 s. Směs, která protekla, byla opět odstraněna. Poté bylo na kolonku postupně napipetováno 2 x 500 μ l Promývacího roztoku 2/3, centrifugace vždy 30 s. Směs, která kolonkou protekla, byla odstraněna. Kolonka byla následně centrifugována naprázdno 30 s a poté byla přenesena do čisté sběrné mikrozkušavky. Vzorky RNA byly eluovány 60 μ l Elučního pufru (80 °C), centrifugace 30 s. Ihned po ukončení centrifugace bylo na kolonku přidáno dalších 40 μ l Elučního pufru (80 °C), centrifugace 30 s.

3.6.5 Ošetření vzorků DNAsou

Pro odstranění kontaminující genomové DNA z izolovaných vzorků RNA byl použit TURBO DNA-free Kit. Ke vzorkům RNA byla přidána 1/10 objemu Turbo pufru (10x) a 3 μ l Turbo DNasy, inkubace 30 min při 37 °C. Následně byly k reakční směsi napipetovány 2 μ l Turbo DNasy, inkubace 30 min při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky precipitovány pomocí LiCl (polovina celkového objemu reakční směsi) a inkubovány 30 min při -20 °C. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min (20 000 g, 4 °C). Supernatant byl z mikrozkušavky odpipetován a vzniklý pelet byl promyt přidáním 500 μ l 70% ethanolu, vzorky byly následně centrifugovány 10 min (20 000 g, 4 °C). Ethanol byl odstraněn a vyschlý pelet byl resuspendován ve vodě bez nukleas.

3.6.6 Kontrola úspěšného ošetření vzorků RNA DNasou

Pro potvrzení úspěšného odstranění kontaminace genomovou DNA u vzorků RNA byla provedena PCR reakce. PCR reakce obsahovala tyto komponenty uváděné ve finálních koncentracích: RNA templát (c $\sim 1000 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), Green GoTaq Flexi pufr (1x), Go Taq polymerasa ($0,35 \text{ U}$), MgCl_2 ($1,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), „forward“ a „reverse“ primer pro genomickou DNA ($0,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), dNTPs ($0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Vodou byla reakční směs doplněna na celkový objem $12,5 \mu\text{l}$. Pozitivní kontrolou byla při PCR reakci genomová DNA *Cp* kmene 20.1 a jako negativní kontrola byla použita H_2O . Po počáteční denaturaci (95°C , 120 s) probíhala PCR reakce v opakujících se 30 cyklech s následujícím teplotním režimem: 95°C , 30 s ; 60°C , 30 s ; 72°C , 60 s . Konečná elongace probíhala při 72°C , 300 s .

Sekvence použitých primerů pro genomovou DNA (gDNA) byly následující: gDNA „forward“ primer: $5' \text{-AAGAAGTTGCCGCTCTCGTC-3'}$ a gDNA „reverse“ primer: $5' \text{-CTTGGACTGAGCCTCGTCAC-3'}$. Po ukončení PCR reakce byla provedena elektroforéza v agarosovém gelu pro separaci vzniklých fragmentů.

3.6.7 Elektroforetická separace v agarosovém gelu

Byl připraven 1% agarosový gel v 1x TAE pufru. Připravený gel byl nalit do elektroforetické vaničky a bylo do něj napipetováno $10 \mu\text{l}$ 0,5% ethidiumbromidu na cca 100 ml agarosového gelu. Do gelu byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek odstraněn a gel byl přemístěn do elektroforetické komůrky, kde byl zalit TAE pufrem tak, aby byl zcela ponořen.

Testované vzorky byly napipetovány do jamek gelu. Pro stanovení velikosti vzniklých fragmentů byl použit 1 kb plus DNA ladder, který byl napipetován do jedné z jamek v množství $4 \mu\text{l}$. Po nanesení všech vzorků byla elektroforetická komora uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Separace fragmentů probíhala při 120 V , cca 30 min .

3.6.8 Příprava cDNA

Ke $2 \mu\text{g}$ RNA byl napipetován $1 \mu\text{l}$ Oligo(dT) primeru ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a směs byla pomocí RNase free vody doplněna na objem $13 \mu\text{l}$. Reakční směs byla inkubována v termocycleru 5 min při 65°C a poté byla ihned přenesena na led. Na ledu byly k reakční směsi přidány následující komponenty uváděné ve finálních koncentracích: dNTPs ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), Reakční RT pufr (1x) a RevertAid H minus reverzní transkriptasa

(200U). Celkový objem reakce byl 20 μ l. Reverzní transkripce probíhala 60 min při 42°C v termocycleru. Reakce byla ukončena inkubací reakční směsí 10 min při 70°C. Takto připravená cDNA byla následně použita pro real-time RT-qPCR.

3.6.9 Navrhování primerů

Bylo navrženo několik párů primerů (Tab. 8) pomocí volně dostupného internetového programu Primer 3 (<http://simgene.com/Primer3>). Primery byly kontrolovány pro tvorbu primer-dimerových formací pomocí softwaru, který je volně přístupný na webových stránkách <http://www.operon.com/tools/oligo-analysis-tool.aspx>.

Tab. 8: Sekvence navržených primerů. Název genu je zahrnut v názvu primeru.

Primery	Sekvence primeru „forward“	Sekvence primeru „reverse“
B-tubulin	5' TTCCCTCGTCTGCACTTCTT 3'	5' CTCCTTCATAGCGACCTTGC 3'
Cp_05417.1	5' AACAGCAAGGGCGATAAAGT 3'	5' TTCTCCAAAGCCCACTTCTT 3'
Cp_05423.1	5' GCTTTCCGAGGTGGTTGTAT 3'	5' CGTCCAAGGCTCAAAGGTAT 3'
Cp_05422.1	5' TGTGTTCGTCGCATTCATAGC 3'	5' GGCGATGGTGGTAAGAAAGC 3'
Cp_07394.1	5' TTGCTGGAGGTCACACTTTC 3'	5' CTTTGCCAGTGCCGTAAGTA 3'
Cp_01235.1	5' CGATCTGCAACCTGGGTCTT 3'	5' GTAGGCCATTCCTTGCCAT 3'
Cp_02927.1	5' AGGAGGCGTTCTACAAAGGA 3'	5' AATGCACCTTGAACCTGACG 3'
Cp_04007.1	5' GGATGCAGAGTGATGGTCTG 3'	5' AATCCCTTCGCTCTTAGCAA 3'
Cp_04624.1	5' ATGGGCTGGGTTCTCTTGTG 3'	5' TCCGACTTTCCTTCCTTGGC 3'
Cp_01124.1	5' CTCATCGCATGTGGAAGCTA 3'	5' CCAAAAGTAGCACGGGATGT 3'
Cp_05066.1	5' AAGGGCTCTGCGCTGTATAA 3'	5' TCCTGCTGCTTCACACTTTG 3'
Cp_04021.1	5' TGAAGAATCTGAATGCGAGG 3'	5' GCTGAAAAGAAAAGCAGGGTC 3'
Cp_04556.1	5' GAGTTTCTCCGCGATTCTTC 3'	5' GGGGTGGTGGTATTCTGTTC 3'
Cp_06376.1	5' CGTAGTTGGGAAGCTAAGCC 3'	5' TCTTTCGGTCAGTCTTGTCTG 3'
Cp_03771.1	5' CTCTCCCCACTCAGCACAAG 3'	5' TTCTGTACCACCGGCTGAAC 3'
Cp_03275.1	5' ACAGCTACTCGCAAGGCAAT 3'	5' TTTGTGGCTCAGTGAAGTCG 3'
Cp_06946.1	5' AGTCTGGGCAACGAACCTCTT 3'	5' CTTGTGGATGTGACGCTTCT 3'
Cp_07808.1	5' CAGCAAAACGATAACCGAGA 3'	5' GCCCGTGCCATACTTAATTT 3'
Cp_04961.1	5' TAACACGATTACCTGCCCAA 3'	5' TGCGGTCTGTATGGAATGAT 3'
Cp_03774.1	5' AAAACGCGCACTTATCACCG 3'	5' CTCGGCAAGGTAGGCTATGG 3'
Cp_08634.1	5' TATCCCCAGAAAGTCCAAGG 3'	5' TCCAGTTCAAACGACAGAGC 3'
Cp_03220.1	5' GTGGCGGATGTCTTGTACCA 3'	5' TCGATGGAATGATGCGAGGG 3'
Cp_07998.1	5' CGTGCTGCTATTTGACGAGT 3'	5' CTTGTACGGATGGAGAGGGT 3'
Cp_04032.1	5' ACAGGACACAATTTCCACGA 3'	5' GCCGATGTCAGAGAGAACAA 3'
Cp_01647.1	5' GGTGTCGGCTTCTTACTGA 3'	5' CCGGGGTAATAGACGATGCC 3'

3.6.10 Stanovení účinnosti amplifikace

Byla vytvořena ředící řada cDNA mycelia *Cp* kmene 20.1 s postupným ředěním 2x (ředění 10x – 1280x). Ředící řada byla použita pro testování účinnosti amplifikace navržených primerů pomocí Viia™ 7 Real-Time PCR Systému. Real-time PCR reakce obsahovala následující komponenty uváděné ve finálních koncentracích: cDNA templát (1,25 μ l), PCR mix (1x), Referenční barvivo ROX (100 nmol.l⁻¹) a testovaný „forward“

a „reverse“ primer (500 nmol.l⁻¹). Vodou byla reakční směs doplněna na celkový objem 5 µl. Do každé jamky 384 jamkové destičky bylo napipetováno pomocí automatického pipetovacího robota 3,75 µl reakční směsi a na stěny jamek bylo napipetováno 1,25 µl vzorku. Poté byla destička přelepena optickou fólií a krátce zcentrifugována, aby došlo ke smísení reakční směsi se vzorkem. Reakce probíhala po dobu 2 hod pomocí Vii^a™ 7 Real-Time PCR Systému s následujícím teplotním režimem: počáteční zahřátí (95 °C, 120 s), denaturace 1 (95 °C, 600 s), denaturace 2 (95 °C, 15 s) a „annealing“ (60 °C, 60 s). Počet opakujících se cyklů byl 40. Účinnost amplifikace byla následně vypočtena z rovnice regresní přímky kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestrojena vynesemím získaných cycle threshold (CT) hodnot proti logaritmu ředění vzorku. Účinnost amplifikace byla vypočtena podle rovnice $E = 10^{\frac{-1}{\text{směrnice přímky}}}$ (Rasmussen, 2001). Primery s vhodnou účinností byly použity pro relativní kvantifikaci genové exprese pomocí real-time RT-qPCR.

3.6.11 Real-time RT-qPCR

Vzorky cDNA (Tab. 9) byly podrobeny analýze na Vii^a™ 7 Real-Time PCR Systému s použitím otestovaných primerů. Reakce probíhala za stejných podmínek, jak je popsáno v kapitole (3.6.10). Na základě předchozí analýzy kalibračních křivek byla všechna cDNA, která byla používána pro relativní kvantifikaci genové exprese vybraných genů, ředěna 80x. Po ukončení PCR reakce, byly vždy zkontrolovány křivky tání pomocí softwaru: ViiA 7 RUO Software (Applied Biosystems).

3.6.12 Relativní kvantifikace genové exprese

Primery, u kterých byla zjištěna optimální účinnost amplifikace a nedocházelo u nich k tvorbě dimerů a nespecifických produktů při amplifikační reakci, byly použity pro real-time RT-qPCR reakci a naměřené CT hodnoty byly použity pro relativní kvantifikaci genové exprese PFAFFLovou metodou, kdy byl pro výpočet použit vztah: $NEP = \frac{E_{\text{cílový gen}} \Delta CT_{\text{cílový gen (kalibrátor-vzorek)}}}{E_{\text{referenční gen}} \Delta CT_{\text{referenční gen (kalibrátor-vzorek)}}}$ (Pfaffl, 2001). Jako kalibrátor byl použit vzorek mycelia *Cp* kmene Gal404, jehož hodnota exprese byla stanovena jako 1. Vypočítané hodnoty exprese vybraných genů u ostatních analyzovaných vzorků byly relativně srovnávány s touto hodnotou.

Tab. 9: Vzorky používané pro relativní kvantifikaci genové exprese cílových genů pomocí Vii^a™ 7 Real-Time PCR Systému. Myc = mycelium, Skler = sklerocium.

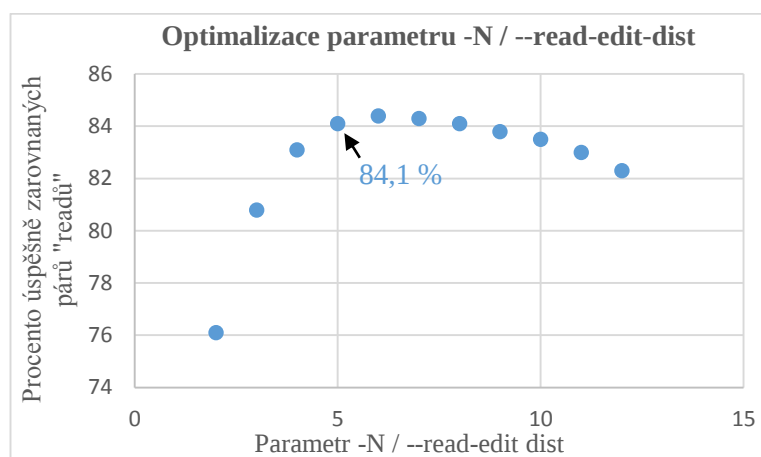
Pletivo/Kmen	Myc/Gal404	Skler/Gal404	Myc/20.1	Skler/20.1
Biologické replikáty (rok)	2014 a 2015	2014 a 2015	2014 a 2015	2014 a 2015

4 VÝSLEDKY

4.1 Kvantifikace genové exprese pomocí RNA sekvencování

4.1.1 Optimalizace procesu zarovnání „readů“

Se zvyšující se hodnotou parametru `-N` a `--read-edit-dist` docházelo při optimalizaci procesu zarovnání „readů“ ke zvyšování počtu úspěšně zarovnaných „readů“ na referenční genom *Cp* kmene 20.1. K tomuto jevu docházelo až do hodnoty v `-N/--read-edit-dist` 6, poté již počet úspěšně zarovnaných readů na referenční genom začal klesat (Obr.18). Jako optimální hodnota pro parametry `-N/--read-edit-dist` se tedy jevila hodnota 6, kdy došlo k zarovnání největšího množství „readů“ z jejich celkového počtu u analyzovaného vzorku mycelia kmene Gal404. Pro zarovnání readů na referenční genom u všech analyzovaných vzorků (3.6.2) byl však nakonec z technických důvodů použit parametr `-N 5` a `--read-edit-dist 5`. Kvantifikace počtu zarovnaných readů k anotovaným genům byla následně vyhodnocena pomocí programu `featureCounts` (Tab. 10).



Obr. 18: Grafické vyhodnocení optimalizace procesu zarovnání „readů“ k referenční sekvenci *Cp* kmene 20.1 změnou parametru `-N` („read-mismatches“) a `--read-edit-dist`. Optimalizace byla prováděna se vzorkem mycelia kmene Gal404. Šipkou je označena hodnota `-N 5` a `--read-edit-dist 5`, která byla použita při zarovnání „readů“ u všech analyzovaných vzorků.

Tab. 10: Shrnutí výsledků z programů TopHat2 a featureCounts.

Vzorek	Celkový počet „readů“	Počet „readů“ zarovnaných k referenčnímu genomu	Počet „readů“ zarovnaných k exonům anotovaných genů
Mycelium Gal404 1. replikát	92 693 884	78 882 495	55 034 196
Mycelium Gal404 2. replikát	20 763 830	18 562 864	10 201 150
Sklerocium Gal404 1. replikát	74 620 524	62 830 481	43 400 176
Sklerocium Gal404 2. replikát	18 828 958	16 908 404	12 252 332
Sklerocium 20.1	20 238 422	17 991 957	12 900 222

4.1.2 Výsledky analýzy DEGs pomocí programů DESeq a edgeR

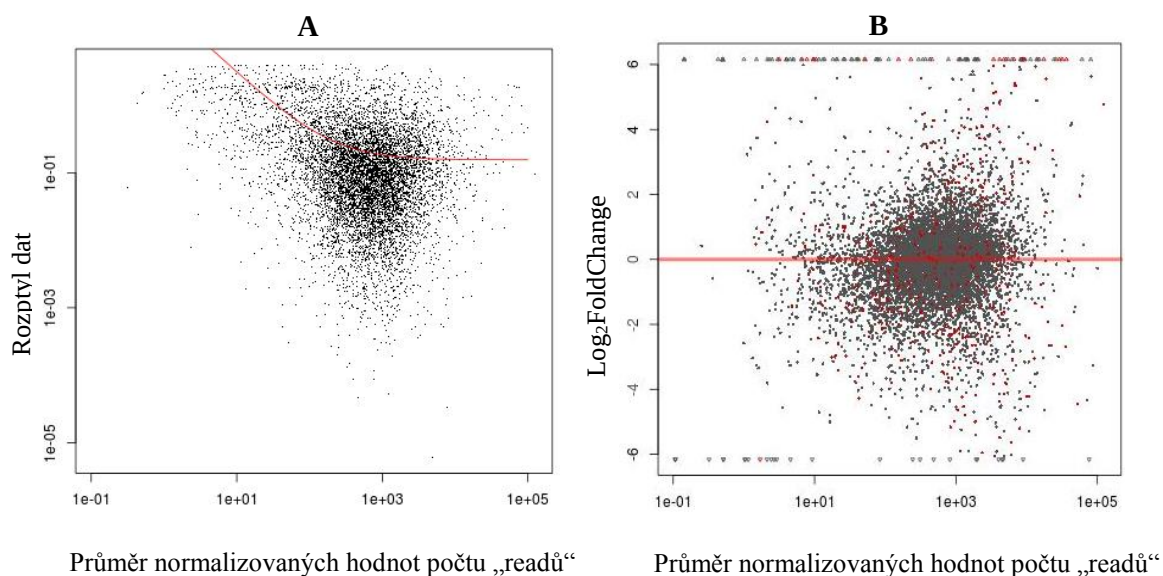
Při analýze DEGs mezi porovnávanými vývojovými stádii *Cp* (Tab 6), byly pomocí programů DESeq a edgeR vypočteny normalizační faktory, které sloužily pro získání normalizovaných hodnot počtu „readů“ zarovnaných na anotované geny. Normalizované hodnoty počtu „readů“ byly následně použity pro odhad rozptylu dat a statistické vyhodnocení DEGs. Normalizační faktory vypočítané programy DESeq a edgeR jsou uvedeny v Tab. 11 a 12. Grafické vyhodnocení rozptylu dat a analýzy DEGs je znázorněno na Obr. 19 – 22.

Tab. 11: Normalizační faktory používané programem DESeq pro výpočet normalizovaných hodnot počtu „readů“ zarovnaných k anotovaným genům při analýze DEGs mezi porovnávanými vývojovými stádii. Myc = mycelium, Sk = sklerocium.

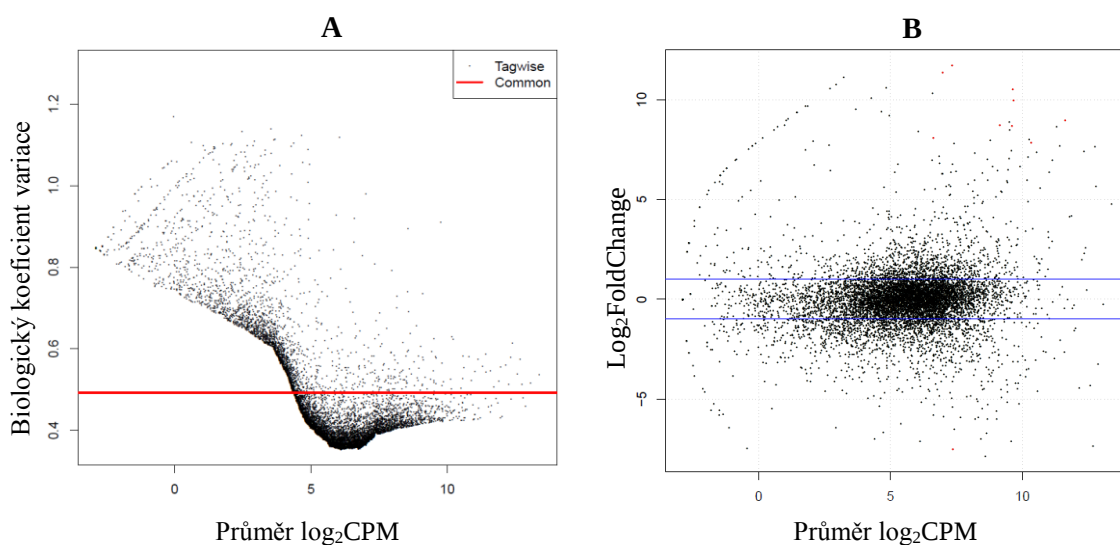
Porovnávaná stádia		Mycelium Gal404/Sklerocium Gal404		
Vzorky	Myc_1. replikát	Myc_2. replikát	Sk_1. replikát	Sk_2. replikát
Normalizační faktory	2,335	0,487	1,745	0,499
Porovnávaná stádia		Sklerocium 20.1/Sklerocium Gal404		
Vzorky	Sk20.1_1. replikát	Sk404_1. replikát	Sk404_2. replikát	
Normalizační faktory	0,663	2,272	0,662	

Tab. 12: Normalizační faktory používané programem edgeR pro výpočet normalizovaných hodnot počtu „readů“ zarovnaných k anotovaným genům při analýze DEGs mezi porovnávanými stádii. Myc = mycelium, Sk = sklerocium.

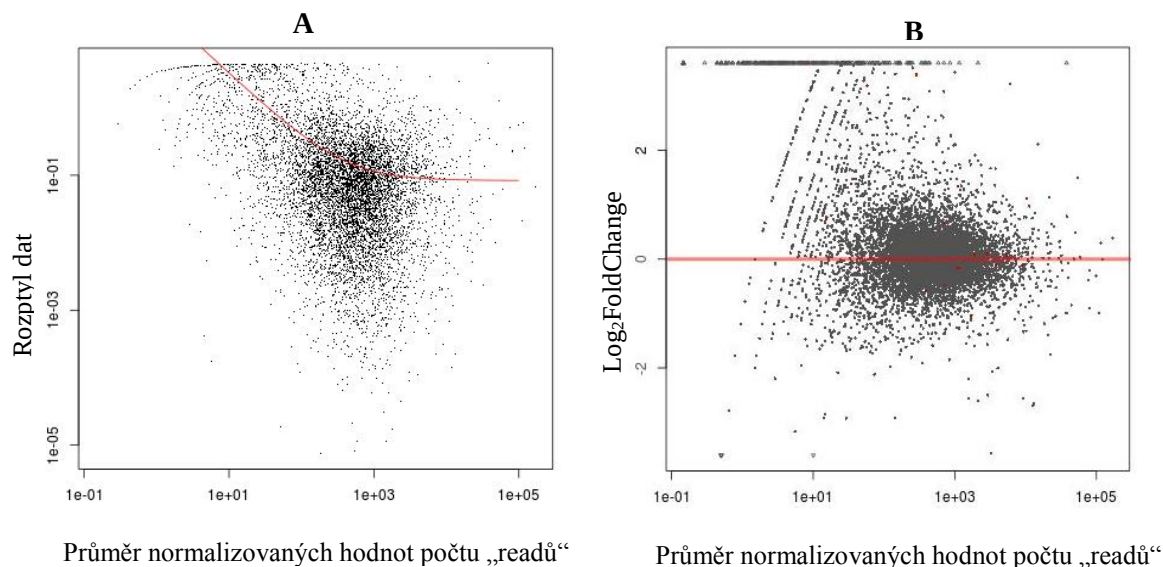
Porovnávaná stádia		Mycelium Gal404/Sklerocium Gal404		
Vzorky	Myc_1. replikát	Myc_2. replikát	Sk_1. replikát	Sk_2. replikát
Normalizační faktory	0,986	1,128	0,925	0,971
Porovnávaná stádia		Sklerocium 20.1/Sklerocium Gal404		
Vzorky	Sk20.1_1. replikát	Sk404_1. replikát	Sk404_2. replikát	
Normalizační faktory	0,979	0,994	1,028	



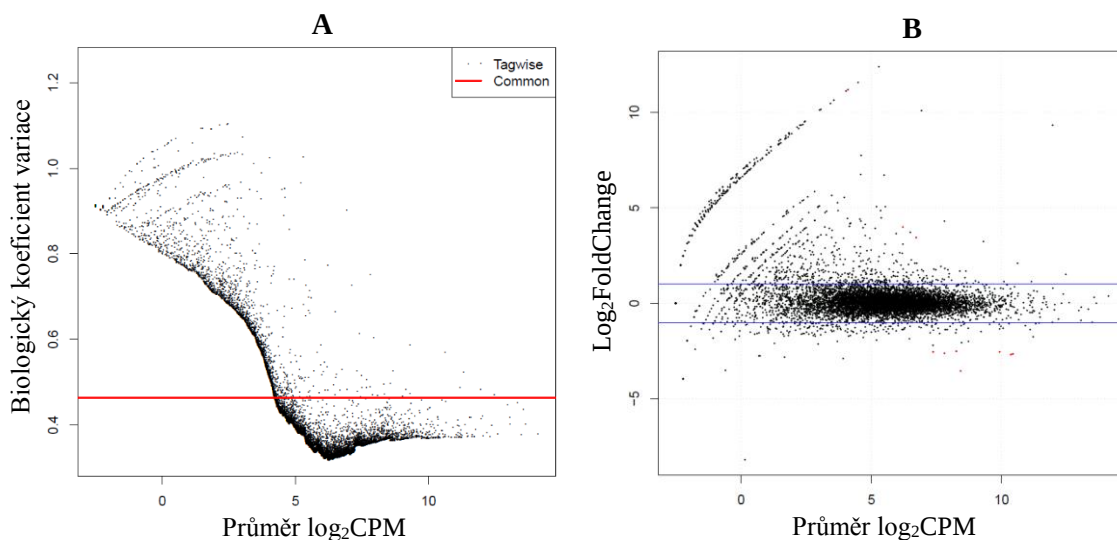
Obr. 19: Grafické vyhodnocení výsledků analýzy DEGs programem DESeq při porovnání mycelia a sklerocia kmene Gal404. Grafické vyhodnocení rozptylu dat v závislosti na průměru normalizovaných hodnot počtu „readů“. Černé tečky představují odhad hodnoty rozptylu pro každý gen, červená čára představuje regresní křivku (A). Grafické vyhodnocení závislosti $\log_2\text{FoldChange}$ (rozdíl v expresi genů mezi porovnávanými vzorky) na průměru normalizovaných hodnot počtu „readů“. Červeně jsou zbarveny signifikantně diferencially exprimované geny při $\text{padj} < 0,1$ (B).



Obr. 20: Grafické vyhodnocení výsledků analýzy DEGs programem edgeR při porovnání mycelia a sklerocia kmene Gal404. Grafické vyhodnocení rozptylu dat v závislosti na průměru hodnot $\log_2\text{CPM}$ (normalizovaný počet „readů“). Červená čára představuje tzv. obecný rozptyl („common dispersion“), který odhaduje celkový biologický koeficient variability datového souboru, v průměru pro všechny geny. Černé tečky představují tzv. „Tagwise“ rozptyl, který odhaduje specifickou hodnotu rozptylu pro jednotlivé geny (A). Grafické vyhodnocení závislosti $\log_2\text{FoldChange}$ (rozdíl v expresi mezi porovnávanými vzorky) na průměru $\log_2\text{CPM}$. Modré linky představují dvojnásobnou změnu v expresi genů. Červeně jsou zbarveny signifikantně diferencially exprimované geny při $\text{padj} < 0,05$ (B).



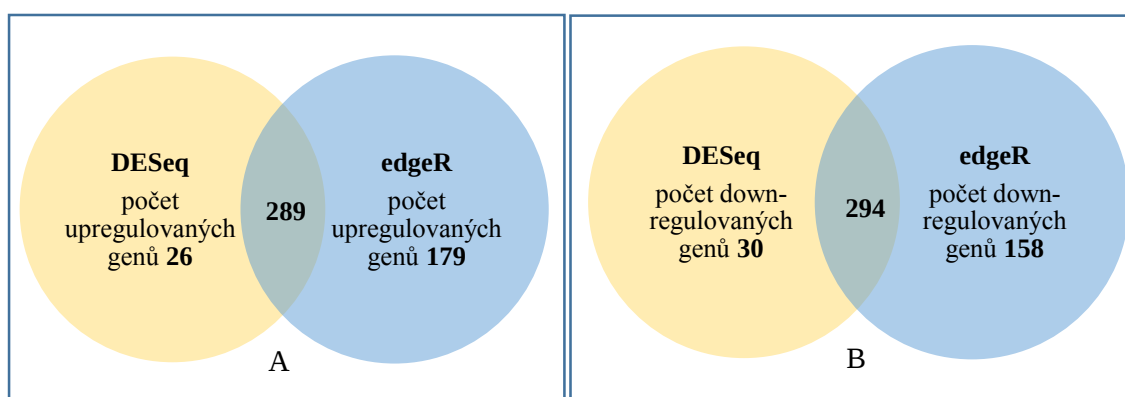
Obr. 21: Grafické vyhodnocení výsledků analýzy DEGs programem DESeq při porovnání sklerocia 20.1 a sklerocia Gal404. Grafické vyhodnocení rozptylu dat v závislosti na průměru normalizovaných hodnot počtu „readů“. Černé tečky představují odhad hodnoty rozptylu pro každý gen, červená čára představuje regresní křivku (A). Grafické vyhodnocení závislosti $\log_2\text{FoldChange}$ (rozdíl v expresi genů mezi porovnávanými vzorky) na průměru normalizovaných hodnot počtu „readů“. Červeně jsou zbarveny signifikantně diferencially exprimované geny při $\text{padj} < 0,1$ (B).



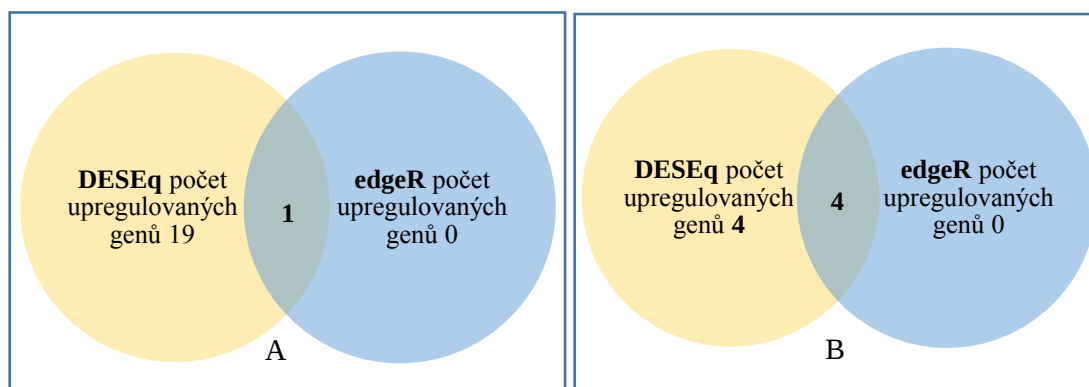
Obr. 22: Grafické vyhodnocení výsledků analýzy DEGs programem edgeR při porovnání sklerocia 20.1 a sklerocia Gal404. Grafické vyhodnocení rozptylu dat v závislosti na průměru hodnot $\log_2\text{CPM}$ (normalizovaný počet „readů“). Červená čára představuje tzv. obecný rozptyl („common“ disperzion), který odhaduje celkový biologický koeficient variability datového souboru, v průměru pro všechny geny. Černé tečky představují tzv. „Tagwise“ rozptyl, který odhaduje specifickou hodnotu rozptylu pro jednotlivé geny (A). Grafické vyhodnocení závislosti $\log_2\text{FoldChange}$ (rozdíl v expresi mezi porovnávanými vzorky) na průměru $\log_2\text{CPM}$. Modré linky představují dvojnásobnou změnu v expresi genů. Červeně jsou zbarveny signifikantně diferencially exprimované geny při $\text{padj} < 0,05$ (B).

Program DESeq vyhodnotil 429 a 639 DEGs mezi myceliem Gal404 a sklerociem Gal404, při hladině významnosti $\text{padj} < 0,01$ a $\text{padj} < 0,05$. Program edgeR při srovnávání stejných vývojových stádií *Cp* kmene Gal404 vyhodnotil 598 DEGs při $\text{padj} < 0,01$ a 920 DEGs při $\text{padj} < 0,05$. Z tohoto počtu genů, oba programy DESeq a edgeR vyhodnotily stejně 374 DEGs ($\text{padj} < 0,01$) a 583 DEGs genů ($\text{padj} < 0,05$) (Obr. 23).

Program DESeq vyhodnotil 24 DEGs mezi sklerociem Gal404 a 20.1, při $\text{padj} < 0,01$ a 28 DEGs při $\text{padj} < 0,05$. Program edgeR při porovnání stejných vývojových stádií nevyhodnotil žádný gen, jako diferenciálně exprimovaný při hodnotě $\text{padj} < 0,01$, při $\text{padj} < 0,05$ bylo programem edgeR vyhodnoceno 5 DEGs. Všechny pět těchto genů bylo identifikováno jako DEGs také pomocí programu DESeq (Obr. 24).



Obr. 23: Vennův diagram (A) znázorňuje počet upregulovaných genů ve sklerociu Gal404, vennův diagram (B) znázorňuje počet downregulovaných genů ve sklerociu Gal404, které byly vyhodnoceny programy DESeq a edgeR při analýze DEGs mezi myceliem Gal404 a sklerociem Gal404. Průnik diagramů vyjadřuje počet upregulovaných genů (A) a downregulovaných genů (B) ve sklerociu Gal404, které byly shodně vyhodnoceny oběma používanými programy. Výsledky pochází z analýzy DEGs při $\text{padj} < 0,05$.



Obr. 24: Vennův diagram (A) znázorňuje počet upregulovaných genů ve sklerocii Gal404, vennův diagram (B) znázorňuje počet downregulovaných genů ve sklerocii Gal404, které byly vyhodnoceny programy DESeq a edgeR při analýze DEGs mezi sklerociem 20.1 a sklerociem Gal404. Průnik diagramů vyjadřuje počet upregulovaných genů (A) a downregulovaných genů (B) ve sklerocii Gal404, které byly shodně vyhodnoceny oběma používanými programy. Výsledky pochází z analýzy DEGs při $\text{padj} < 0,05$.

Při porovnání vzorků mycelia Gal404 a sklerocia Gal404, oba programy DESeq i edgeR vyhodnotily všech 13 charakterizovaných genů EAS klastru jako signifikantně upregulované ve sklerocii při $\text{padj} < 0,05$. Nejvíce upregulovanými geny EAS klastru vyhodnocené jak programem DESeq, tak edgeR byly geny *easC*, *easA* a *cloA*. Nejméně upregulovanými geny EAS klastru, které byly opět vyhodnoceny oběma programy, byly geny *lpsA2* a *lpsC* (Tab. 13). Výsledek analýzy DEGs mezi sklerociem kmene 20.1 a Gal404 ukázal, že exprese genů EAS klastru, které jsou zapojeny do biosyntézy námelových alkaloidů, se mezi těmito kmeny neliší.

Nejvíce downregulovanými geny ve sklerocii Gal404 v porovnání s myceliem Gal404, byly geny CPUR_02481.1 (necharakterizovaný gen), CPUR_02520.1 (gen zapojen do transportu mědi) a CPUR_05920.1 (necharakterizovaný gen). Exprese těchto genů ve sklerocii byla přibližně 260x snížena. Největší downregulace genové exprese u výše zmíněných genů byla vyhodnocena jak programem DESeq, tak edgeR s hodnotami $\log_2\text{FoldChange}$ velmi podobnými, ale hodnota padj byla rozdílná (Příloha 1, Příloha 2). Nejvíce upregulovaným genem ve sklerocii Gal404 oproti myceliu Gal404, byl gen CPUR_03366.1 (gen pro oxido-reduktasu) a to jak u výstupu z programu DESeq, tak edgeR (Příloha 1, Příloha 2). Exprese genu CPUR_03366.1 byla ve sklerocii přibližně 5000x zvýšena.

Největší downregulace genové exprese ve sklerocii Gal404 oproti sklerocii 20.1 byla vyhodnocena jak programem DESeq, tak edgeR u genu CPUR_05920.1 (necharakterizovaný gen), a to přibližně 11x (Příloha 3, Příloha 4). Program edgeR

vyhodnotil jako nejvíce upregulovaný gen ve sklerociu Gal404 gen CPUR_08326.1 (necharakterizovaný gen), kdy byla míra genové exprese ve sklerociu Gal404 přibližně 11x zvýšena oproti sklerociu 20.1 (Příloha 4). Program DESeq vyhodnotil jako nejvíce upregulovaný gen ve sklerociu Gal404 gen CPUR_05449.1 (necharakterizovaný gen), jehož exprese byla ve sklerociu Gal404 zvýšena až 1000x oproti sklerociu 20.1 (Příloha 3). Program edgeR vyhodnotil změnu exprese genu CPUR_05449.1 mezi sklerociem Gal404 a sklerociem 20.1 téměř totožně (se srovnatelnou hodnotou $\log_2\text{FoldChange}$), ale hodnota padj se výrazně lišila a byla vyšší než 0,05, a proto tento gen nebyl identifikován jako diferenciálně exprimovaný (data nejsou uvedena).

Nejvíce exprimovaným genem ve sklerociu Gal404 byl gen CPUR_01071.1 (Grg1 – „glucose repressible protein 1“). Tento gen byl vyhodnocen jako nejvíce exprimovaný oběma programy (Příloha 1, Příloha 2).

Tab 13: Výčet genů EAS klastru, které jsou zapojeny do biosyntézy námelových alkaloidů. Výsledky znázorňují změny v genové expresi a hodnoty padj, které byly vyhodnoceny programy DESeq a edgeR u genů EAS klastru při porovnávání mycelia a sklerocia kmene Gal404 a také sklerocia 20.1 a sklerocia Gal404. M=mycelium, Sk=sklerocium.

ID transkriptu	Název genu	Log ₂ fold change M Gal404/Sk Gal404 DESeq/edgeR	Padj DESeq/edgeR	Log ₂ fold change Sk 20.1/Sk 404 DESeq/edgeR	Padj DESeq/ edgeR
CPUR_04073.1	lpsA2	2,23/2,24	0,025/0,006	-0,68/-0,66	1/1
CPUR_04074.1	lapsA1	2,69/2,69	0,005/0,001	-1,07/-1,06	1/1
CPUR_04075.1	easH	6,98/6,99	$4 \cdot 10^{-13}/3,7 \cdot 10^{-15}$	-0,07/-0,06	1/1
CPUR_04076.1	dmaW	7,14/7,13	$4,2 \cdot 10^{-12}/2,6 \cdot 10^{-14}$	-0,21/-0,20	1/1
CPUR_04077.1	easG	7,96/8,00	$1,2 \cdot 10^{-16}/2,6 \cdot 10^{-14}$	0,02/0,04	1/1
CPUR_04078.1	easF	5,35/5,37	$4,8 \cdot 10^{-10}/4,5 \cdot 10^{-9}$	0,13/0,15	1/1
CPUR_04079.1	easE	4,80/4,82	$1,3 \cdot 10^{-8}/5,5 \cdot 10^{-8}$	-0,08/-0,06	1/1
CPUR_04080.1	easD	7,38/7,34	$9,2 \cdot 10^{-13}/1,2 \cdot 10^{-12}$	0,44/0,46	1/1
CPUR_04081.1	easC	8,95/8,97	$1,6 \cdot 10^{-18}/4,3 \cdot 10^{-18}$	0,49/0,51	1/1
CPUR_04082.1	cloA	8,70/8,74	$8,2 \cdot 10^{-17}/1,3 \cdot 10^{-19}$	0,23/0,24	1/1
CPUR_04083.1	lpsB	5,17/5,20	$4,4 \cdot 10^{-9}/1,1 \cdot 10^{-9}$	-0,07/-0,06	1/1
CPUR_04084.1	easA	8,94/8,87	$2,5 \cdot 10^{-16}/6,5 \cdot 10^{-16}$	-0,23/-0,21	1/1
CPUR_04085.1	lpsC	2,54/2,55	$5,5 \cdot 10^{-4}/0,013$	-0,25/-0,23	1/1

4.1.3 Výčet výsledků metody RNAseq pozorovaných u genů, které byly vybrány pro real-time RT-qPCR

Pro srovnání metod RNAseq a real-time RT-qPCR bylo použito celkem 23 genů (Tab. 14), u kterých byla kvantifikována exprese pomocí obou metod. U těchto genů byla metodou RNAseq kvantifikována změna genové exprese mezi porovnávanými vývojovými stádii *Cp* následovně: z 23 genů, které byly použity pro real-time RT-qPCR bylo 19 genů vyhodnoceno programem DESeq, jako diferenciálně exprimované mezi myceliem a sklerociem Gal404 (Příloha 1). Čtyři geny a to CPUR_02927.1, CPUR_04961.1, CPUR_06376.1 a CPUR_07998.1 nebyly vyhodnoceny jako DEGs při hodnotě $\text{padj} < 0,05$. Při porovnání stejných vývojových stádií, program edgeR vyhodnotil 20 genů jako DEGs (Příloha 2) a tři geny nebyly diferenciálně exprimované při $\text{padj} < 0,05$ (CPUR_03771.1, CPUR_06376.1 a CPUR_07998.1). Program edgeR v porovnání s programem DESeq vyhodnotil jako DEGs i geny CPUR_02927.1 a CPUR_04961.1 (Příloha 2), i když hodnota $\log_2\text{FoldChange}$ (změna exprese genů) byla stejná u obou programů, na rozdíl od hodnoty padj . Gen CPUR_03771.1 nebyl programem edgeR vyhodnocen jako diferenciálně exprimovaný při $\text{padj} < 0,05$, kdežto programem DESeq ano (Příloha 1), i když hodnota $\log_2\text{FoldChange}$ byla u genu totožná.

Geny, které byly pomocí obou programů vyhodnoceny jako upregulované ve sklerociu oproti myceliu Gal404 byly: CPUR_01124.1, CPUR_01235.1, CPUR_02927.1, CPUR_03771.1, CPUR_03774.1, CPUR_04007.1, CPUR_04021.1, CPUR_04032.1, CPUR_04624.1, CPUR_05417.1, CPUR_05422.1, CPUR_05423.1, CPUR_06946.1, CPUR_07394.1 a CPUR_08634.1. Geny, které byly pomocí obou programů vyhodnoceny jako downregulované ve sklerociu oproti myceli Gal404 byly: CPUR_01647.1, CPUR_03220.1, CPUR_03275.1, CPUR_04556.1, CPUR_04961.1, CPUR_05066.1, CPUR_06376.1 a CPUR_07998.1.

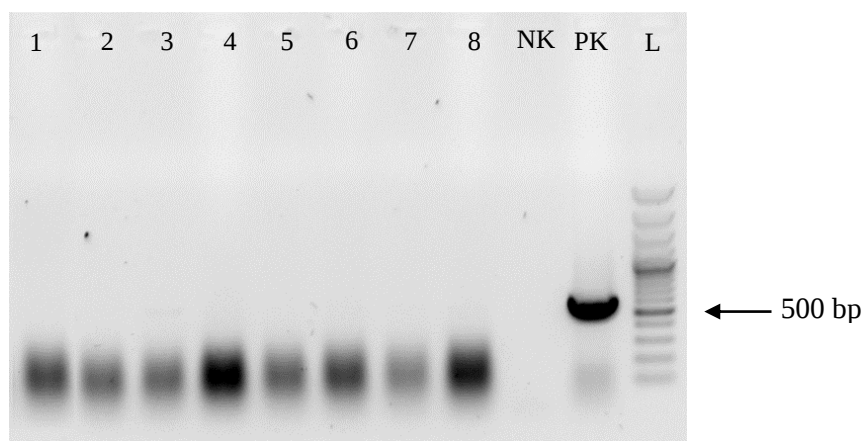
Z celkového počtu genů, které byly použity pro real-time RT-qPCR byly 4 geny vyhodnoceny programem DESeq, jako DEGs mezi sklerociem 20.1 a sklerociem Gal404, a to geny CPUR_03275.1, CPUR_04961.1, CPUR_06376.1 a CPUR_06946.1 (Příloha 3). Při porovnání stejných vývojových stádií programem edgeR byl pouze 1 gen vyhodnocen jako diferenciálně exprimovaný, gen CPUR_03275.1 (Příloha 4). Zbýlé tři geny, které byly vyhodnoceny jako diferenciálně exprimované programem

DESeq, program edgeR nevyhodnotil jako DEGs, i když hodnota $\log_2\text{FoldChange}$ byla u těchto genů téměř totožná (data nejsou uvedena).

4.2 Kvantifikace genové exprese pomocí real-time RT-qPCR

4.2.1 Příprava cDNA vzorků používaných pro relativní kvantifikaci genové exprese

Izolovaná RNA (3.6.4) ze vzorků mycelií a sklerocií *Cp*, která byla ošetřena DNasou (3.6.5), byla pomocí RevertAid H minus reverzní transkriptasy přepsána na cDNA (3.6.8). Úspěšné ošetření vzorků RNA bylo potvrzeno po provedení PCR reakce s primery pro genomickou DNA (3.6.6) na základě velikosti vytvořených fragmentů (Obr. 25) vizualizovaných po elektroforéze v agarosovém gelu (3.6.7).



Obr. 25: Elektroferogram vzorků pro potvrzení úspěšného odstranění genomové DNA z izolovaných vzorků RNA. 1,2: RNA mycelií *Cp* Gal404 (2 biologické replikáty). 3,4: RNA sklerocií *Cp* Gal404 (2 biologické replikáty). 5,6: RNA mycelií *Cp* 20.1 (2 biologické replikáty). 7, 8: RNA sklerocií *Cp* 20.1 (2 biologické replikáty). NK: negativní kontrola (H_2O). PK: pozitivní kontrola (genomická DNA *Cp* kmene 20.1). L: 1 kb Plus DNA Ladder. Velikost fragmentů očekávaných v případě přítomnosti genomové DNA ve vzorcích: 600 bp.

4.2.2 Navrhování primerů a výpočet účinnosti amplifikace

Na základě výsledků RNAseq analýzy bylo vybráno 25 genů (Tab. 14), pro které byly navrženy primery (3.6.9). Poté co byla vypočítána účinnost amplifikace pro každý pár primerů (3.6.10), jeden pár primerů (Cp_07808.1) byl z další analýzy vyřazen, jelikož jeho účinnost byla vysoká (152,82 %). Pro testování metodou real-time RT-qPCR bylo tedy použito 24 genů, kdy gen pro Beta-tubulin byl používán, jako referenční gen.

Tab. 14: Výčet primerů a jejich účinností amplifikace vypočítaných z rovnic regresních přímek kalibračních křivek. Červeně zvýrazněn primer, který nebyl pro analýzu dále používán.

Primery	Účinnost amplifikace [%]
B-tubulin	108,40
Cp_05417.1	104,33
Cp_05423.1	111,75
Cp_05422.1	109,47
Cp_07394.1	106,30
Cp_01235.1	108,36
Cp_02927.1	114,05
Cp_04007.1	110,46
Cp_04624.1	113,83
Cp_01124.1	111,95
Cp_05066.1	103,87
Cp_04021.1	111,19
Cp_04556.1	106,26
Cp_06376.1	110,90
Cp_03771.1	113,28
Cp_03275.1	107,99
Cp_06946.1	103,67
Cp_07808.1	152,82
Cp_04961.1	106,44
Cp_03774.1	110,34
Cp_08634.1	113,72
Cp_03220.1	104,64
Cp_07998.1	105,78
Cp_04032.1	110,27
Cp_01647.1	103,33

4.2.3 Výsledky relativní kvantifikace genové exprese pomocí real-time RT-qPCR

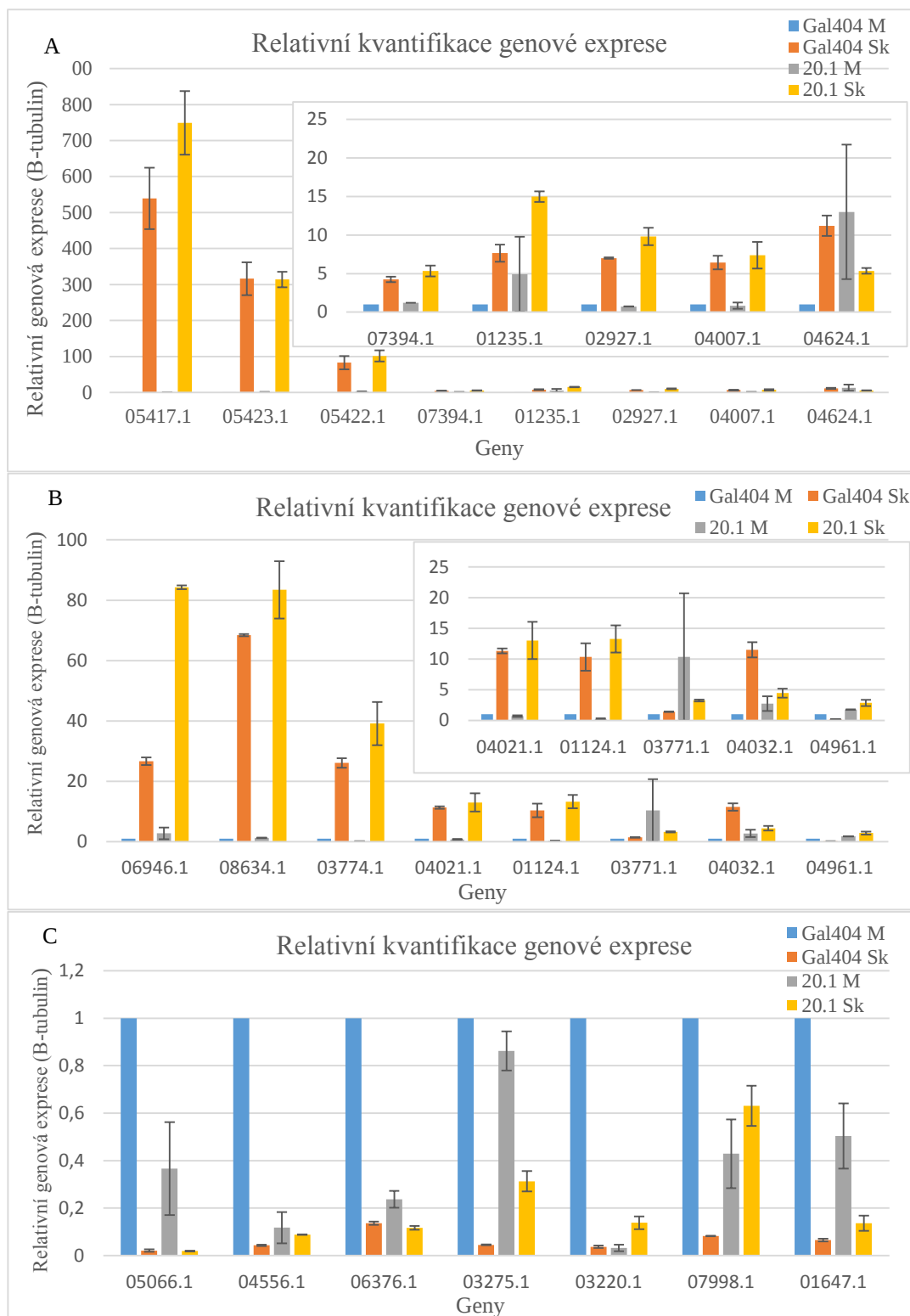
Real time RT-qPCR (3.6.11) a následná relativní kvantifikace genové exprese vybraných genů (Tab. 14), PFAFFLOvou metodou (3.6.12), byla provedena u vzorků mycelia kmene Gal404, sklerocia kmene Gal404, mycelia kmene 20.1 a sklerocia kmene 20.1. Při výpočtu relativní genové exprese byl jako referenční gen použit gen pro

Beta-tubulin a jako kalibrátor byl použit vzorek mycelia *Cp* kmene Gal404, jehož hodnota exprese byla stanovena na hodnotu 1 a vzhledem k této hodnotě byla vyhodnocena relativní genová exprese u ostatních vzorků.

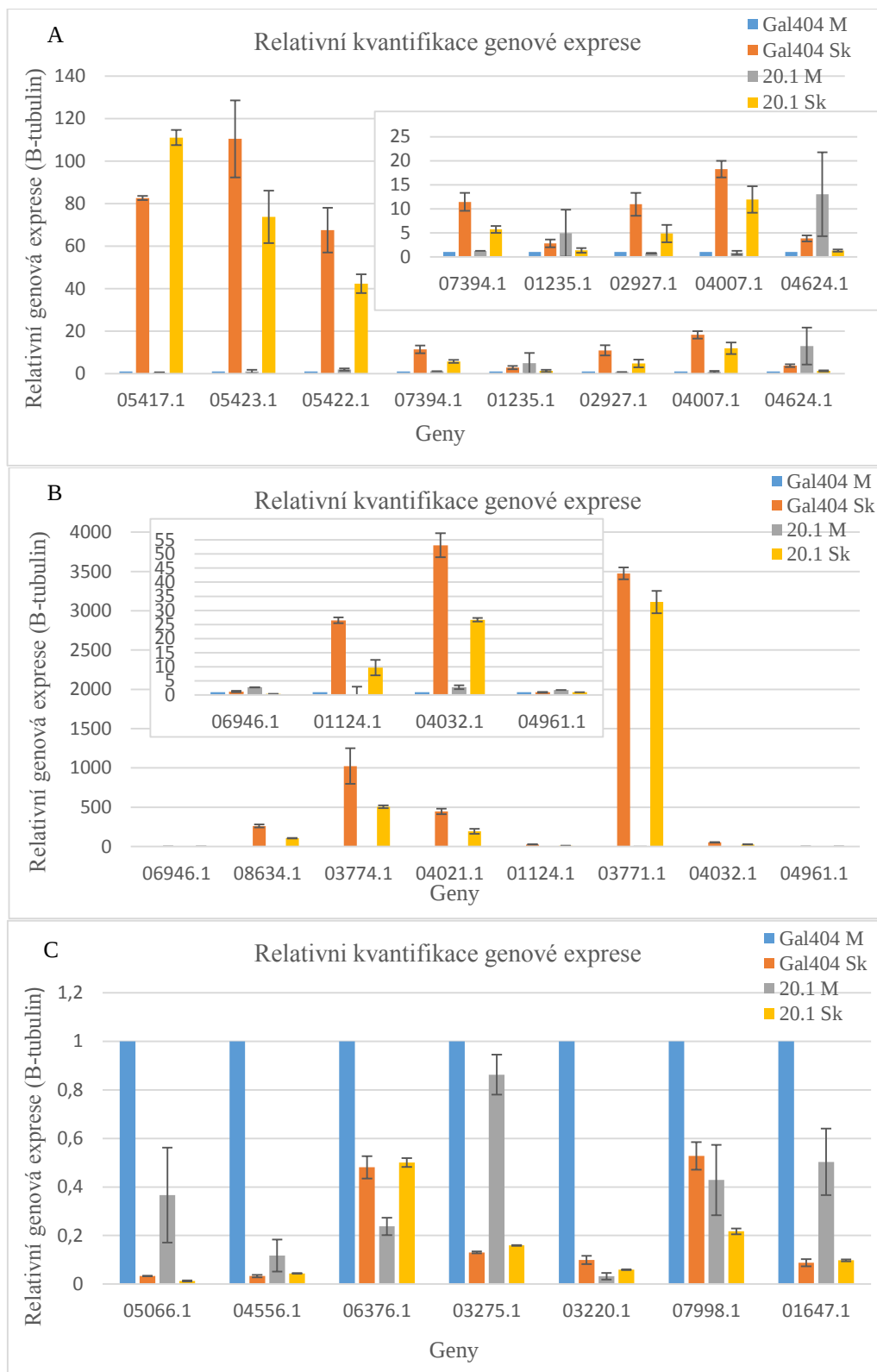
Analýza relativní genové exprese metodou real-time RT-qPCR byla provedena ve dvou nezávislých experimentech: 1. experiment byl proveden se vzorky z roku 2014 (Obr. 26) a 2. experiment se vzorky z roku 2015 (Obr. 27). Důvodem analýzy relativní genové exprese ve dvou nezávislých experimentech byla povaha testovaných vzorků, konkrétně sklerocií, které rostly a vyvíjely se na poli, kde v různých letech byly různé podmínky, zejména co se týká počasí. Vzorky mycelií však rostly v inkubátoru za stených podmínek a proto jsou hodnoty relativní exprese vzorků mycelií průměrem výsledků z obou experimentů.

Výsledky kvantifikace relativní genové exprese metodou real-time RT-qPCR ukázaly, že 11 genů bylo upregulovaných ve sklerociích obou kmenů ve srovnání s myceliem a v rámci obou experimentů, jedná se o geny: CPUR_01124.1 (Obr. 26, 27 B), CPUR_02927.1 (Obr. 26, 27 A), CPUR_03774.1 (Obr. 26, 27 B), CPUR_04007.1 (Obr. 26, 27 A), CPUR_04021.1, CPUR_04032.1 (Obr. 26, 27 B), CPUR_05417.1, CPUR_05422.1, CPUR_05423.1, CPUR_07394.1 (Obr. 26, 27 A) a CPUR_08634.1 (Obr. 26, 27 B). Naproti tomu geny CPUR_01647.1, CPUR_03275.1 a CPUR_05066.1 byly downregulovány ve sklerociích obou kmenů ve srovnání s myceliem, v rámci obou experimentů (Obr. 26, 27 C). U genů CPUR_03220.1, CPUR_04556.1, CPUR_06376.1, a CPUR_07998.1 byla ve výsledcích pozorována downregulace genové exprese ve sklerociu Gal404 v porovnání s myceliem Gal404 v rámci obou experimentů. Podobný trend však nebyl pozorován u druhého kmene *Cp* – 20.1 (Obr. 26, 27 C). V rámci obou experimentů můžeme u genu CPUR_04624.1 pozorovat upregulaci genové exprese ve sklerociu Gal404 ve srovnání s myceliem Gal404, avšak u kmene 20.1 se exprese tohoto genu mezi různými pletivy a experimenty nelišila (Obr. 26, 27 A).

Podle výsledků prvního experimentu jsou geny CPUR_01235.1 a CPUR_06946.1 upregulovány ve sklerociu u obou kmenů v porovnání s myceliem (Obr. 26 A, 26 B). Ve druhém experimentu se však exprese těchto genů mezi porovnávanými vzorky výrazně neliší (Obr 27 A, 27 B). U genů CPUR_03771.1 a CPUR_04961.1 se výsledky prvního a druhého experimentu liší a to i v rámci jenodnoho kmene (Obr. 26, 27 B).



Obr. 26: Grafické vyhodnocení relativní kvantifikace genové exprese vybraných genů v analyzovaných vývojových stádiích *Cp* z roku 2014. Kalibrátorem je vzorek mycelia Gal404, jehož hodnota exprese je stanovena na hodnotu 1. Referenční gen Beta-tubulin. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky, které byly vypočítány z 3 technických replikátů. U vzorku mycelia 20.1 byla směrodatná odchylka vypočítána z 2 biologických replikátů. M = mycelium, Sk = sklerocium.



Obr. 27: Grafické vyhodnocení relativní kvantifikace genové exprese vybraných genů v analyzovaných vývojových stádiích *Cp* z roku 2015. Kalibrátorem je vzorek mycelia Gal404, jehož hodnota exprese je stanovena na hodnotu 1. Referenční gen Beta-tubulin. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky, které byly vypočítány z 3 technických replikátů. U vzorků mycelia 20.1 byla směrodatná odchylka vypočítána z 2 biologických replikátů. M= mycelium, Sk= sklerocium.

5 DISKUZE

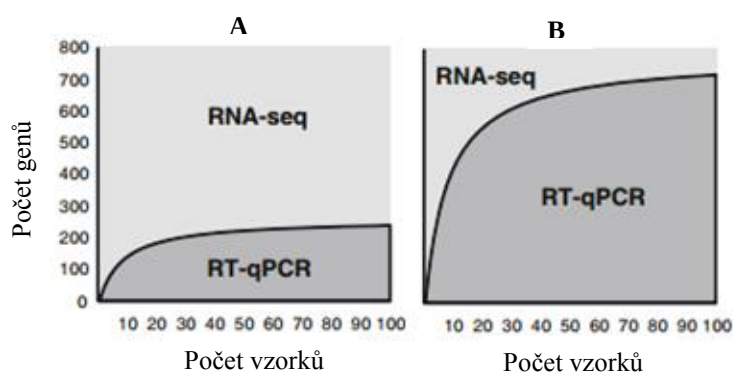
5.1 Porovnání metod: real-time RT-qPCR a RNAseq

Studium genové exprese je v dnešní době klíčovým zájmem mnoha výzkumných projektů. Mezi populární techniky, které jsou v dnešní době používány pro kvantifikaci genové exprese, patří: reverzně transkripční kvantitativní PCR v reálném čase (real-time RT-qPCR) a metoda RNA sekvencování (RNAseq).

Metoda real-time RT-qPCR se řadí mezi středně výkonné techniky („medium-throughput“), protože pomocí této metody je možno analyzovat desítky transkriptů najednou. Metoda RNAseq se naopak řadí mezi vysoce výkonné technologie („high-throughput“), jelikož poskytuje informace o celém transkriptomu a to jak z hlediska kvantitativního, tak kvalitativního a umožňuje kvantifikovat expresi všech exprimovaných genů v rámci jednoho testu. Metoda real-time RT-qPCR je v rámci studií genové exprese využívána již mnoho let, metoda RNAseq se začala dostávat do popředí přibližně od roku 2008, kdy začalo stoupat množství publikací zabývajících se studiem genové exprese s využitím této metody (Nonis *et al.*, 2014). Při metodě real-time RT-qPCR je zpracování získaných dat relativně jednoduché a existuje několik softwarových balíčků pro získání výsledků v krátké době, na rozdíl od metody RNAseq je nutností navrhování primerů pro vybrané geny, kdy existuje několik nástrojů pro výběr optimálních párů primerů a kontrolu primer-dimerových formací. Při použití metody RNAseq není zpracování získaných dat jednoduché, softwarové balíčky pro zpracování dat se stále vyvíjí, ale často nejsou pro uživatele přívětivé a dochází k nesrovnalostem, pokud jsou aplikovány různé metody či parametry pro zpracování dat (Soneson a Dolorenzi, 2013). Metoda také vyžaduje bioinformatické znalosti a za nevýhodu metody můžeme považovat vysoké pořizovací náklady chemie a přístrojů.

Důležité je pochopení, kdy je z ekonomického hlediska výhodnější použití RNAseq metody namísto metody real-time RT-qPCR, kdy bývá vhodné provést porovnání nákladů spojených s provedením jedné či druhé metody. Tímto úkolem se zabývali například Nonis *et al.* (2014) a zjistili, že při ceně €600 / RNAseq vzorek (20-30 milionů „readů“) a €2,30 / tři technické replikáty pro real-time RT-qPCR, by měla být preferována metoda real-time RT-qPCR, jestliže má být analyzováno méně jak 50 genů a to s minimálním počtem dvou vzorků. RNAseq experiment by měl být vždy preferován, má-li být testováno více než 258 genů (Obr 28 A). Dříve byly náklady na

RNAseq experiment dvakrát vyšší, než je současná cena, zatímco náklady na real-time RT-qPCR jsou stále stejné. Z toho vyplývá, že počet genů při kterých bylo dříve výhodnější provádět metodu RNAseq byl mnohem vyšší. Na druhé straně, se však v dnešní době začínají na trh zavádět platformy pro real-time RT-qPCR, které mohou reakční objem snížit až o desetinásobek, což může výrazně snížit náklady spojené s touto metodou. Budeme-li předpokládat trojnásobné snížení nákladů na real-time RT-qPCR, bude použití RNAseq metody výhodné až při analýze 780 genů (Obr. 28 B) (Nonis *et al.*, 2014).



Obr. 28: Grafy znázorňující situace, kdy je ekonomičtější z hlediska počtu genů a počtu vzorků použití metody real-time RT-qPCR namísto metody RNAseq. Oblast pod křivkou (tmavě šedá) představuje situaci, kdy je výhodnější použití metody real-time RT-qPCR na rozdíl od metody RNAseq. Výsledky jsou získány pro současně používané platformy (A) a nové real-time RT-qPCR platformy, s trojnásobně sníženými náklady na reakci (B) (Podle Nonis *et al.*, 2014).

Jelikož je metoda RNAseq relativně nová a analytické postupy výsledků jsou stále ve vývoji, je při studiích genové exprese touto metodou někdy vyžadováno potvrzení výsledků jinou metodou, například metodou real-time RT-qPCR (Duressa *et al.*, 2013). Z tohoto důvodu byly v rámci diplomové práce tyto dvě metody srovnávány a byly použity pro kvantifikaci genové exprese u dvou kmenů *Cp*, Gal404 a 20.1. V rámci práce byla provedena analýza DEGs mezi vzorky mycelia a sklerocia *Cp* kmene Gal404 a také mezi vzorky sklerocií *Cp* kmenů 20.1 a Gal404. I když používané vzorky sklerocií kmene Gal404 z roku 2013 a 2014 rostly a vyvíjely se na poli, kde v různých letech byly různé podmínky pro jejich růst, výsledky DEGs mezi srovnávanými stádii *Cp* metodou RNAseq byly získány z průměru dvou replikátů pro každý vzorek, s výjimkou vzorku sklerocia 20.1, kdy byl k dispozici pouze 1 biologický replikát. Přestože tyto replikáty nebyly ve skutečnosti biologickými replikáty, musely jsme s nimi jako s biologickými replikáty pracovat, protože téměř všechny programy pro analýzu DEGs použití biologických replikátů vyžadují (s výjimkou DESeq verze 1) a bez nich pracovat nelze. Na základě výsledků analýzy DEGs metodou RNAseq bylo vybráno několik genů pro relativní kvantifikaci genové exprese metodou real-time RT-qPCR. Pokud se na výsledky z real-time RT-qPCR ze dvou nezávislých experimentů podíváme jako na celek a zohledníme, že výsledky získané metodou RNAseq jsou průměrem replikátů, můžeme konstatovat, že u vybraných genů byl ve výsledcích obou metod pozorován stejný trend genové exprese mezi vzorkami mycelia a sklerocia kmene Gal404. U kmene 20.1 byl pomocí real-time RT-qPCR analyzován navíc i vzorek mycelia, abychom mohli sledovat, jestli výsledky porovnání mycelia a sklerocia u kmene Gal404 vykazují podobný trend, což by znamenalo, že dosažené výsledky jsou pravděpodobně pletivově a ne kmenově specifické. Ve výsledcích relativní kvantifikace genové exprese metodou real-time RT-qPCR bylo pozorováno, že exprese genů CPUR_01124.1, CPUR_02927.1, CPUR_03774.1, CPUR_04007.1, CPUR_04021.1, CPUR_04032.1, CPUR_05417.1, CPUR_05422.1, CPUR_05423.1, CPUR_07394.1 a CPUR_08634.1 byla upregulována ve sklerociích obou kmenů a u obou biologických replikátů. Naopak exprese genů CPUR_01647.1, CPUR_03275.1 a CPUR_05066.1 byla downregulována ve sklerociích obou kmenů a u obou biologických replikátů. O těchto genech můžeme tedy říct, že jejich upregulace/downregulace genové exprese je pro dané pletivo specifická a není ovlivňována environmentálními podmínkami. Mezi vybranými geny byly i takové (CPUR_01235.1, CPUR_03220.1, CPUR_03771.1,

CPUR_04556.1, CPUR_04624.1, CPUR_04961.1, CPUR_06376.1, CPUR_06946.1, CPUR_07998.1), jejichž míra exprese se ale lišila v rámci kmene a v některých případech i u biologických replikátů, o těchto genech můžeme říct, že jejich exprese je kmenově specifická a/nebo závislá na environmentálních podmínkách.

Z celkového počtu genů, které byly analyzovány metodou real-time RT-qPCR mezi vzorkami sklerocií kmene 20.1 a Gal404 byly jako DEGs s pomocí DESeq vyhodnoceny 4 geny (CPUR_03275.1, CPUR_04961, CPUR_06376.1, CPUR_06946.1) a pomocí edgeR 1 gen (CPUR_03275.1). Přičemž výrazně změněná exprese genů CPUR_03275.1, CPUR_04961.1, a CPUR_06946.1 byla potvrzena i metodou real-time RT-qPCR. Metoda real-time RT-qPCR však u těchto vzorků nepotvrdila výraznou změnu exprese u genu CPUR_06376.1. Na závěr můžeme říct, že výsledky obou používaných metod se v podstatě shodují. Tato skutečnost již byla potvrzena ve více pracích (Yendrek *et al.*, 2012; McClure *et al.*, 2013).

5.2 Porovnání programů DESeq a edgeR

Pro analýzu RNAseq dat s ohledem na diferenciální expresi genů je v dnešní době k dispozici nejméně 11 programů (Soneson a Dolorenzi, 2013). V rámci diplomové práce byla prováděna analýza DEGs mezi srovnávanými vývojovými stádii *Cp* s použitím dvou programů, DESeq a edgeR. Tyto programy byly vybrány pro analýzu DEGs, jelikož patří mezi nejpoužívanější, oba programy využívají negativně binomické rozdělení dat pro statistickou analýzu a na základě předchozích studií bylo zjištěno, že získané výsledky jsou v dobré korelaci (Seyednasrollah *et al.* 2013). Při porovnání vzorků mycelia kmene Gal404 a sklerocia kmene Gal404 program edgeR identifikoval větší počet diferenciálně exprimovaných genů, než program DESeq, z 8825 anotovaných genů v genomu *Cp* program edgeR vyhodnotil 920 genů, jako diferenciálně exprimovaných při hladině významnosti $\text{padj} < 0,05$, což je přibližně 10 % z jejich celkového počtu. Program DESeq identifikoval 639 genů, jako diferenciálně exprimovaných mezi srovnávanými vývojovými stádii *Cp*, což je pouze 7 % z celkového počtu anotovaných genů. Při porovnání vzorků sklerocia 20.1 a sklerocia Gal404 identifikoval naopak program DESeq větší počet diferenciálně exprimovaných genů (28 genů, tj. 0,3 %, $\text{padj} < 0,05$), než program edgeR (5 genů, tj. 0,06 %, $\text{padj} < 0,05$). Dále bylo zjištěno, že oba používané programy poskytují velmi podobné hodnoty $\log_2\text{FoldChange}$, které vyjadřují změnu v expresi genů mezi srovnávanými

podmínkami. Hladina významnosti zjištěných změn v genové expresi (padj) při těchto výsledcích však často byla oběma programy vyhodnocena rozdílně, proto se počet identifikovaných DEGs lišil. Tato skutečnost je v souladu s předchozí studií, kdy při testování různých programů používaných pro analýzu DEGs, mezi nimi i DESeq a edgeR, se zjistilo, že hodnota $\log_2\text{foldChange}$ u různých programů koreluje téměř na 100 %, kdežto hodnoty padj bývají často odlišné (Guo *et al.*, 2013).

Pokud se podíváme na výsledky analýzy DEGs, jak z programu DESeq, tak edgeR zjistíme, že exprese všech genů EAS klastru zapojených do biosyntézy námelových alkaloidů je upregulována ve sklerociu. Tyto výsledky potvrzují, že analýza dat metodou RNAseq byla správná, jelikož předchozí výzkumy prokázaly, že námelové alkaloidy se nevytváří v myceliu a nutným předpokladem pro jejich tvorbu je diferenciací sklerociálních buněk (Mantle a Tonolo, 1968). Z toho důvodu se dala očekávat zvýšená aktivita všech genů zapojených do biosyntézy námelových alkaloidů ve vzorcích sklerocia oproti myceliu. Pozorovaná skutečnost, že se míra exprese genů EAS klastru mezi vzorkami sklerocií kmene Gal404 a 20.1 nemění, může naznačovat, že exprese těchto genů není v tomto případě kmenově specifická a/nebo oba kmeny produkují podobné množství alkaloidů.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na analýzu dat z RNA sekvencování s ohledem na diferenciální expresi genů mezi dvěma vývojovými stádii dvou kmenů *Cp*, která byla analyzována s použitím dvou programů. Na základě výsledků RNAseq metody bylo vybráno několik genů pro relativní kvantifikaci genové exprese metodou real-time RT-qPCR, pak byly výsledky obou metod porovnány.

Teoretická část diplomové práce byla věnována vypracování literární rešerše zahrnující 4 kapitoly. První kapitola je věnována biologii *Cp* a popisu biosyntézy námelových alkaloidů, které tato houba produkuje. Ve druhé kapitole se práce věnuje popisu metody real-time RT-qPCR a analýze získaných dat. Třetí kapitola se zabývá vývojem a přehledem metod pro sekvencování nukleových kyselin. Poslední, čtvrtá kapitola teoretické části práce se zabývá kontrolou kvality dat pocházejících z RNAseq, zarovnáním „readů“ na referenční genom, kvantifikací počtu „readů“, normalizací dat a na závěr statistickým vyhodnocením diferenciálně exprimovaných genů.

V experimentální části práce byla provedena analýza RNAseq dat s ohledem na diferenciální expresi genů mezi myceliem a sklerociem *Cp* kmene Gal404 a také mezi sklerocií *Cp* kmene 20.1 a Gal404. K tomuto účelu byly použity dva programy, DESeq a edgeR. Počet DEGs vyhodnocených oběma programy se lišil, a bylo zjištěno, že oba používané programy poskytují velmi podobné hodnoty $\log_2\text{FoldChange}$, které vyjadřují změnu v expresi genů mezi srovnávanými vzorky, ale hladina významnosti zjištěných změn v genové expresi (*p*-adj) byla však často vyhodnocena rozdílně.

Na základě výsledků metody RNAseq bylo vybráno 23 genů pro relativní kvantifikaci genové exprese pomocí real-time RT-qPCR, výsledky obou metod byly porovnány a ukázalo se, že jsou srovnatelné.

7 LITERATURA

- Anders S., Huber W. (2010): Differential expression analysis for sequence count data. *BioMed Central Genome Biology*. **11**:R106. <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-10-r106>.
- Anders S., Pyl P. T., Huber W. (2014): HTSeq-a python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. **31**, 166 -169.
- Ansorge W. J. (2009): Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. **25**, 195 - 203.
- Babraham Bioinformatics home page: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/bad_sequence_fastqc.html (1. 3. 2016).
- Babraham Bioinformatics home page: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/good_sequence_short_fastqc.html (1. 3. 2016).
- Bassett R. A., Chain E. B., Corbett K., Dickerson A. G., Mantle P. G. (1972): Comparative metabolism of *Claviceps purpurea* in vivo and in vitro. *The Biochemical Journal*. **127**, 3P - 4P.
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. **30**, 2114 - 2120.
- Bové F. J. (1970): The story of ergot. Basel & New York, Karger, 297 stran.
- Branton D., Deamer D. W., Marziali A., Bayley H., Benner S. A., Butler T., Ventra M. D., Garaj S., Hibbs A., Huang X., Jovanovich S. B., Krstic P. S., Lindsay S., Ling X. S., Mastrangelo C. H., Meller A., Oliver J. S., Pershin Y. V., Ramsey J. M., Riehn R., Soni G. V., Cossa V. T., Wanunu M., Wiggin M., Schloss J. A. (2008): The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*. **26**, 1146 - 1153.
- Bullard J. H., Purdom E., Hansen K. D., Dudoit S. (2010): Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BioMed Central Bioinformatics*. **11**:94. <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-94>.
- Bustin S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. **25**, 169 - 193.
- Cardullo R. A., Agrawal S., Flores C., Zamecnick P. C., Wolf D. E. (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **85**, 8790 - 8794.
- Caplin B. E., Rasmussen R. P., Bernard P. S., Wittwer C. T. (1999): LightCycler™ Hybridization Probes. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Biochemica*. **1**, 5 - 8.
- Cock P. J. A., Fields Ch. J., Goto N., Heuer M. L., Rice P. M. (2010): The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*. **38**, 1767 – 1771.
- Correia T., Grammel N., Ortel I., Keller U., Tudzynski P. (2003): Molecular cloning and analysis of the ergopeptide assembly system in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Chemistry and Biology*. **10**, 1281 - 1292.
- de Groot A. N. J. A., van Dongen P. W. J., Vree T. B., Hekster Y. A., van Roosmalen J. (1998): Ergot alkaloids. Current status and review of clinical pharmacology and therapeutic use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology. *Drugs*. **56**, 523 - 535.
- Delseny M., Han B., Hsing Y. I. (2010): High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science*. **179**, 407 - 422.
- Dillies M. A., Rau A., Aubert J., Antier Ch. H., Jeanmougin M., Servant N., Keime C., Marot G., Castel D., Estelle J., Guernec G., Jagla B., Jouneau L., Laloë D., Gall C. L., Schaëffer B., Crom S. L., Guedj M., Jaffrézic F. (2012): A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Briefings in Bioinformatics*. **14**, 671-683.

- Duressa D., Anchieta A., Chen D., Klimes A., Pedrajas M. D. G., Dobinson K. F., Klosterman S. J. (2013): RNA-seq analyses of gene expression in the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *BioMed Central Genomics*. **14**:607. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-607>.
- Dworkin L. L., Gibler T. M., Van Gelder R. N. (2002): Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *Archives of Ophthalmology*. **120**, 1534 - 1539.
- Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., Dewinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D., Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Korlach J., Turner S. (2009): Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. **323**, 133 - 138.
- Ewing B., Green P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. **8**, 186 - 194.
- Farrer R. A., Kemen E., Jones J. D. G., Studholme D. J. (2009): *De novo* assembly of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a genome using Illumina/Solexa short sequence reads. *FEMS Microbiology Letters*. **291**, 103 - 111.
- Flicek P., Birney E. (2009): Sence from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature Methods*. **6**, 6 - 12.
- Fonseca N. A., Rung J., Brazma A., Marioni J. C. (2012): Tools for mapping high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **28**, 3169 - 3177.
- Franzmann C., Wächter J., Dittmer N., Humpf H. U. (2010): Ricinoleic acid as a marker for ergot impurities in rye and rye product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**, 4223 - 4229.
- Freeman W. M., Walker S. J., Vrana K. E. (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*. **26**, 112 - 125.
- Gan Q., Chepelev I., Wei G., Tarayrah L., Cui K., Zhao K., Chen X. (2010): Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in *Drosophila* gonads revealed by RNA-seq. *Cell Research*. **20**, 763 - 783.
- Gebler J. C., Poulter C. D. (1992): Purification and characterization of dimethyl allyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **296**, 308 - 313.
- Gibson U. E. M., Heid C. A., Williams P. M. (1996): A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. **6**, 995 - 1001.
- Ginzinger D. G. (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. **30**, 503 - 512.
- Gröger D., Floss H. G. (1998): Biochemistry of ergot alkaloids - achievements and challenges. In: *The alkaloids - chemistry and biology*. (Cordell G.A.) New York: Academic Press, 171-218.
- Guo Y., Li Ch., Ye F., Shyr Y. (2013): Evaluation of read count based RNAseq analysis methods. *BioMed Central Genomics*. **14**:S2. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-S8-S2>.
- Guttman M., Garber M., Levin J. Z., Donaghey J., Robinson J., Adiconis X., Fan L., Koziol M. J., Gnirke A., Nusbaum C., Rinn J. L., Lander E. S., Regev A. (2010): Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. *Nature Biotechnology*. **28**, 503 - 510.
- Haarmann T., Machado C., Lübke Y., Correia T., Schardl Ch. 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. *Journal of Chemical Biology*. **7**, 645 - 652.
- Haarmann T., Rolke Y., Giesbert S., Tudzynski P. (2009): Ergot: from witchcraft to biotechnology. *Molecular Plant Pathology*. **10**, 563 - 577.
- Hansen T. P. C., Koehler P. J. (2008): History of the use of ergotamine and dihydroergotamine in migraine from 1906 and onward. *Cephalalgia*. **28**, 877 - 886.
- Hardcastle T. J., Kelly K. A. (2010): baySeq: Empirical Bayesian methods for identifying differential expression in sequence count data. *BioMed Central Bioinformatics*. **11**:422. <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-422>.
- Havemann J., Vogel D., Loll B., Keller U. (2014): Cyclolization of D-lysergic acid alkaloid peptides. *Chemistry & Biology*. **21**. 146 - 155.
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996): Real-Time Quantitative PCR. *Genome Research*. **6**, 986 - 994.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. **11**, 1026 - 1030.
- Hod Y. (1992): A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques*. **13**, 852 - 854.
- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Geldfand D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**, 7276 - 7280.
- Homer N., Merriman B., Nelson S. F. (2009): BFAST: An alignment tool for large scale genome resequencing. *Plos One*. **4**, e7767. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0007767>.
- Cheng L. J., Robbers J. E., Floss H. G. (1980): End - product regulation of ergot alkaloid formation in intact cells and protoplasts of *Claviceps* species, strain SD 58. *Journal of Natural Product*. **43**, 329 - 339.
- Chepelev I., Wei G., Tang Q., Zhao K. (2009): Detection of single nucleotide variations in expressed exons of the human genome using RNA-Seq. *Nucleic Acids Research*. **37**, e106. <http://nar.oxfordjournals.org/content/37/16/e106>.
- Illumina home page: http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf (15. 2. 2016).
- InsideDNA home page: https://insidedna.me/tool_page_assets/pdf_manual/fastqc.pdf (27. 2. 2016).
- Isacson J., Cao H., Ohlsson L., Nordgren S., Svanvik N., Westman G., Kubista M., Sjöback R., Sehlstedt U. (2000): Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Molecular and Cellular Probes*. **14**, 321 - 328.
- Keller U. (1999): Biosynthesis of ergot alkaloids. In: *Ergot, the genus Claviceps*. (Křen V., Cvak L.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 95 - 163.
- Kim I. S., Kim S. U., Anderson J. A., (1981): Microsomal agroclavine hydroxylase of *Claviceps* species. *Phytochemistry*. **20**, 2311 - 2314.
- Kircher M., Kelso J. (2010): High-throughput DNA sequencing – concepts and limitation. *Bioessays*. **32**, 524 - 536.
- Knierim E., Lucke B., Schwarz J. M., Schuelke M., Seelow D. (2011): Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing. *Plos One*. **6**, e28240. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0028240>.
- Kobel H., Sanglier J. J., (1986): Ergot Alkaloids. In: *Biotechnology* vol. 4, 2nd ed., (Rehm H. J., Reed G., eds.), VCH, Weinheim, 569 - 609.
- Kubista M., Ståhlberg A., Bar T., (2001): Light-up probe based real-time qPCR. In: Genomics and Proteomics (Raghavachari R., Tan W. (Eds.)), *Proceedings of SPIE*, **4264**, 53 - 58.
- Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögren B., Stömbom L., Ståhlberg A., Zoric N. (2006): The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 95 - 125.

- Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S. L. (2009): Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *BioMed Central Genome Biology*. **10**:R25. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2009-10-3-r25>.
- Langmead B., Kasper D. H., Leek J. T. (2010): Cloud-scale RNA-sequencing differential expression analysis with Myrna. *BioMed Central Genome Biology*. **11**:R83. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-8-r83>.
- Lee M. R. (2009): The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *The Journal of the Royal College of Physicians Edinburgh*. **39**, 179 - 184.
- Leong D. T., Gupta A., Bai H. F., Wan G., Yoong L. F., Too H. P., Chew F. T., Hutmacher D. W. (2007): Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*. **28**, 203 - 210.
- Li H., Ruan J., Durbin R. (2008): Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality score. *Genome Research*. **18**, 1851 - 1858.
- Li H., Durbin R. (2009): Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. **25**, 1754 - 1760.
- Li R., Yu Ch., Li Y., Lam T. W., Yiu S. M., Kristiansen K., Wang J. (2009): SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics*. **25**, 1966 - 1967.
- Li J., Witten D. M., Johnstone I. M., Tibshirani R. (2012): Normalization, testing, and false discovery rate estimation for RNA-sequencing data. *Biostatistics*. **13**, 523 - 538.
- Liao Y., Smyth G. K., Shi W. (2013): featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. **30**, 923 - 930.
- Lin B., Zhang L. F., Chen X. (2014): LFCseq: a nonparametric approach for differential expression analysis of RNA-seq data. *BioMed Central Genomics*. **15**:S7. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-S10-S7>
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. **25**, 402 - 408.
- Lorenz N., Haarmann T., Pažoutová S., Jung M., Tudzynski P. (2009): The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyses 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-methylmethylallyltryptophan to chanoclavine I. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 1822 - 1830.
- Ma H., Shieh K. J., Chen G., Qiao X. T., Chuang M. Y. (2002): Application of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *The Journal of American Sciences*. **2**, 1 - 15.
- Ma Y., Xie H., Han X., Irwin D. M., Zhang Y. P. (2013): QcReads: An adapter and quality trimming tool for next-generation sequencing reads. *Journal of Genetics and Genomics*. **40**, 639 - 642.
- Maher Ch. A., Kumar-Sinha Ch., Cao X., Kalyana-Sundaram S., Han B., Jing X., Sam L., Barrette T., Palanisamy N., Chinnaiyan A. M. (2009): Transcriptome sequencing to detect gene fusion in cancer. *Nature*. **458**, 97 - 101.
- Mantle P. G., Tonolo A. (1968): Relationship between the morphology of *Claviceps purpurea* and the production of alkaloids. *Transactions of the British Mycological Society*. **51**, 499 - 505.
- Mantle P. G. (1976): Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *Journal of General Microbiology*. **93**, 321 - 334.
- Mardis E. R. (2007): The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*. **24**, 133 - 141.
- Martin J. A., Wang Z. (2011): Next-generation transcriptome assembly. *Genetics*. **12**, 671 - 682.
- Matuschek M., Wallwey Ch., Xie X., Li S.-M. (2011): New insights into ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea*: An agroclavine synthase EasG catalyses, via a non-enzymatic adduct with reduced glutathione, the conversion of chanoclavine-I aldehyde to agroclavine. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **9**, 4328 - 4335.

- Maxam A. M., Gilbert W. (1977): A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**, 560 - 564.
- McClure R., Balasubramanian D., Sun Y., Bobrovskyy M., Sumby P., Genco C. A., Vanderpool C. K., Tjaden B. (2013): Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Research*. **41**:e140. <http://nar.oxfordjournals.org/content/41/14/e140>.
- Merriman B., Rothberg J. M. (2012): Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*. **33**, 3397 - 3417.
- Metzker M. L. (2009): Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics*. **11**, 31 - 46.
- Montgomery R. A., Dallman M. J. (1997): Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymin ontogeny. *Cytokine*. **9**, 717 – 726.
- Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. (2008): Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. **5**, 621 - 628.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **51**, 263 - 273.
- Nonis A., Nardi B. D., Nonis A. (2014): Choosing between RT-qPCR and RNAseq: a back-of-the-envelope estimate towards the difinition of the break-even-point. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **406**, 3533 – 3536.
- Nygren, J., Svanvik, N., Kubista, M., (1998): The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*, **46**, 39 - 51.
- Ortel I., Keller U. (2009): Combinatorial assembly of simple and complex D - lysergic acid alkaloid peptide classes in the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**, 6650 - 6660.
- Oshlack A., Robinson M. D., Young M. D. (2010): From RNA-seq reads to differential expression results. *BioMed Central Genome Biology*. **11**:220. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-12-220>.
- Otsuka H., Quigley F. R., Gröger D., Anderson J. A., Floss H. G. (1980): In vivo and in vitro evidence for N-methylation as the second pathway - specific step in ergoline biosynthesis. *Planta Medica*. **40**, 109 - 119.
- Overbergh L., Giulietti A. P., Valckx D., Mathieu Ch. (2010): Real-time polymerase chain reaction. In: *Molecular Diagnostics*. 2nd ed., (Patrinos G. P., Ansorge W. J. eds.), Elsevier, London, UK, 87 - 107.
- Parker R. M., Barnes N. M. (1999): mRNA: detection by *in situ* and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology*. **106**, 247 - 283.
- Pažoutová S. (2001): The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. *Mycological Research*. **105**, 275 - 283.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*. **29**, 2002 - 2007.
- Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet Ch., Neuvians T. P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. **26**, 509 - 515.
- Quinlan A. R., Hall I. M. (2010): BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. **26**, 841 - 842.
- Rapaport F., Khanin R., Liang Y., Pirun M., Krek A., Zumbo P., Mason Ch. E., Socci N. D., Betel D. (2013): Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Biomed Central Genome Biology*. **14**:R95. <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2013-14-9-r95>
- Rasmussen R. (2001): Quantification on the LightCycler. In: *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. (Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K., eds.), Springer press, Heidelberg, 21 - 34.

- Riederer B., Han M., Keller U. (1996): D-lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**, 27524 - 27530.
- Ritchie M. E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law Ch. W., Shi W., Smyth G. K. (2015): Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. **43**, e47. <http://nar.oxfordjournals.org/content/43/7/e47>.
- Robinson M. D., Oshlack A. (2010): A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *BioMed Central Genome Biology*. **11**:R25. <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-3-r25>.
- Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. (2010): edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. **26**, 139 - 140.
- Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., Nyren, P. (1996): Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry*. **242**, 84 - 89.
- Rumble S. M., Lacroute P., Dalca A. V., Flume M., Sidow A., Brudno M. (2009): SHRiMP: Accurate mapping of short color-space reads. *PLOS Computational Biology*. **5**, e1000386. <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000386>.
- Saccomanno C. F., Bordonaro M., Chen J. S., Nordstrom J. L. (1992): A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*. **13**, 846 - 850.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**, 5463 - 5467.
- Syednasrollah F., Laiho A., Elo L. L. (2013): Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Briefings in Bioinformatics*. **16**, 59 - 70.
- Shendure J., Porreca G. J., Reppas N. B., Lin X., McCutcheon J. P., Rosenbaum A. M., Wang M. D., Zhang K., Mitra R. D., Church G. M. (2005): Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. **309**, 1728 - 1732.
- Shendure J., Ji H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. **26**, 1135 - 1145.
- Shrestha R. K., Lubinsky B., Bansode V. B., Moinz M. B., McCormack G. P., Travers S. A. (2014): QTrim: A novel tool for the quality trimming of sequence reads generated using the Roche/454 sequencing platform. *BioMed Central Bioinformatics*. **15**:33. <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-15-33>.
- Schardl Ch. 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 Ch. R., Farman M. L., *et al.* (2013): Plant-symbiotic fungi as chemical engineers: Multi genome analysis of the Clavicipitaceae reveals dynamics of alkaloid loci. *PLOS Genetics*. **9**, e1003323. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003323>.
- Schmieder R., Lim Y. W., Rohwer F., Edwards R. (2010): TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BioMed Central Bioinformatics*. **11**:341. <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-341>.
- Schmieder R., Edwards R. (2011): Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. **27**, 863 - 864.
- Schulze A., Downward J. (2001): Navigating gene expression using microarrays – a technology review. *Nature Cell Biology*. **3**, 190 – 195.
- Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd C., Connell C. R., Heiner C., Kent S. B., Hood L. E. (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. **321**, 674 - 679.
- Schiff P. L., (2006): Ergot and its alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*. **70**, 1 - 10.
- Soneson Ch., Dolorenzi M. (2013): A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BioMed Central Bioinformatics*. **14**:91. <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-91>.

- Ståhlberg A., Håkansson J., Xian X., Semb H., Kubista M. (2004): Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*. **50**, 509 - 515.
- Swerdlow H., Gesteland R. (1990): Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*. **18**, 1415 - 1419.
- Tenberge K. B. (1999): Biology and life strategy of the ergot fungi. In: *Ergot: the genus Claviceps*. (Křen V., Cvak L., eds.), Harwood AcademyPublisher, United Kingdom, 25 - 57.
- Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. **75**, 291 - 295.
- Thompson J. F., Steinmann K. E. (2010): Single molecule sequencing with a HeliScope Genetic Analysis System. *Current Protocols in Molecular Biology*. **92**, Unit7.10.
- Trapnell C., Pachter L., Salzberg S. L. (2009): TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. **25**, 1105 - 1111.
- Trapnell C., Salzberg S. L. (2009): How to map billions of short reads onto genomes. *Nature Biotechnology*. **27**, 455 - 457.
- Trapnell C., Williams B. A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M. J., Salzberg S. L., Wold B. J., Pachter L. (2010): Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*. **28**, 511 - 515.
- Tsukiboshi T., Shimanuki T., Uematsu T. (1999): *Claviceps sorghicola* sp. nov., a destructive ergot pathogen of sorghum in Japan. *Mycological Research*. **103**, 1403 -1408.
- Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T. (2000): Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acid Research*. **28**, 3752 - 3761.
- Tucker T., Marra M., Friedman J. M. (2009): Massively parallel sequencing: The next big thing in genetic medicine. *The American Journal of Human Genetics*. **85**, 142 - 154.
- Turcatti G., Romieu A., Fedurco M., Tairi A. P. (2008): A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research*. **36**, e25. <http://nar.oxfordjournals.org/content/36/4/e25>.
- Tyagi S., Kramer F. R. (1995): Molecule Beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. **14**, 303 - 308.
- Vanden Heuvel J. P., Tyson F. L., Bell D. A. (1993): Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. *Biotechniques*. **14**, 395 - 398.
- Vandesompele J., Preter K. D., Pattyn F., Poppe B., Roy N. V., Paepe A. D., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *BioMed Central Genome Biology*. **3**:research0034.1. <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Wallwey Ch., Li S. (2011): Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Natural Product Reports*. **28**, 496 - 510.
- Wang A. M., Doyle M. V., Mark D. F. (1989): Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **86**, 9717 - 9721.
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. (2009): RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. **10**, 57 - 63.
- Whelan J. A., Russell N. B., Whelan M. A. (2003): A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*. **278**, 261 - 269.
- Wikipedia home page: https://en.wikipedia.org/wiki/FASTQ_format (4. 2. 2016).
- Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. (2013): HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BioMed Central Bioinformatics*. **14**:33. <http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-14-33>
- Yendrek C. R., Ainsworth E., A. Thimmapuram J. (2012): The bench scientist's guide to statistical analysis of RNA-Seq data. *BioMed Central Research Notes*. **5**:506. <http://bmcrsnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-506>.

Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research.* **32**, e103.
<http://nar.oxfordjournals.org/content/32/12/e103>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BWT	Burrows-Wheelerova transformace
cDNA	komplementární DNA
<i>Cp</i>	<i>Claviceps purpurea</i>
CT	„cycle treshold“
DEGs	diferenciálně exprimované geny
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DMAT	dimethylallyltryptofanu
DMATS	4-(γ , γ -dimethylallyl)tryptofan syntasa
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
EAS	genový klastr „Ergot Alkaloid Synthesis“
LPS	neribosomální peptidová syntasa
LPS1	neribosomální peptidovou syntasa 1
LPS2	neribosomální peptidovou syntasa 2
MeDMAT	N-methyl-dimethylallyltryptofan
RNAseq	RNA sekvencování

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1 - Tabulka s DEGs mezi vzorky mycelia a sklerocia kmene Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu DESeq.

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody.

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_02481.1	8932,118818	37,68272665	-7,888955273	1,20E-15	uncharacterized_protein
CPUR_02520.1	3842,613975	19,77251936	-7,602447535	4,96E-13	related_to_copper_transport_protein
CPUR_05920.1	152049,0023	945,8801312	-7,328663268	1,17E-16	uncharacterized_protein
CPUR_05066.1	17699,06732	124,5151094	-7,151208709	6,12E-12	uncharacterized_protein
CPUR_07368.1	1632,792761	12,17815179	-7,066902681	2,20E-09	uncharacterized_protein
CPUR_03424.1	485,2011008	3,72518783	-7,025125843	1,87E-07	uncharacterized_protein
CPUR_05851.1	7987,634099	62,32560481	-7,001799459	3,95E-13	related_to_copper_transport_protein
CPUR_05808.1	166,8320668	1,432872952	-6,863342109	0,001522084	uncharacterized_protein
CPUR_05807.1	9250,749826	88,40079224	-6,7093672	9,30E-14	uncharacterized_protein
CPUR_04139.1	3950,700431	43,12623463	-6,517398886	4,85E-11	probable_cutinase_1_precursor
CPUR_06786.1	612,7146316	7,306665596	-6,389858312	1,03E-07	uncharacterized_protein
CPUR_07506.1	955,3825895	12,75158281	-6,227330345	6,01E-09	uncharacterized_protein
CPUR_00041.1	6858,399816	103,1631886	-6,054871835	3,58E-09	uncharacterized_protein
CPUR_07808.1	9427,418815	142,4208072	-6,048630982	4,96E-10	Protein_tyrosine_phosphatase_
CPUR_04059.1	11972,55407	183,5449655	-6,027453598	1,06E-10	uncharacterized_protein
CPUR_00109.1	4637,075454	75,07746947	-5,948691368	9,99E-10	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_06785.1	7389,713944	122,788052	-5,911276429	3,81E-10	uncharacterized_protein
CPUR_06798.1	2284,466057	38,2575669	-5,899968072	8,52E-07	uncharacterized_protein
CPUR_05852.1	2974,314445	49,8600329	-5,898529532	1,43E-09	related_to_ferric_reductase_FRE2_precursor
CPUR_01530.1	11904,51242	238,2750754	-5,642736675	3,99E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04398.1	537,641888	11,89270458	-5,498496795	2,86E-05	uncharacterized_protein
CPUR_01092.1	8189,357533	183,1096076	-5,482970879	1,39E-08	uncharacterized_protein
CPUR_03220.1	3711,106979	86,96989221	-5,415189734	2,20E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04150.1	9367,820046	238,694368	-5,294476931	2,22E-10	uncharacterized_protein
CPUR_02853.1	21250,97948	548,9069936	-5,274823808	3,30E-09	uncharacterized_protein
CPUR_08094.1	2289,895708	60,45991059	-5,243159237	4,37E-10	uncharacterized_protein
CPUR_07353.1	15607,64441	426,39847	-5,193906743	6,48E-09	uncharacterized_protein
CPUR_05862.1	1632,389118	45,7051241	-5,15848527	5,68E-08	uncharacterized_protein
CPUR_06787.1	7231,443581	202,7429264	-5,156560189	5,95E-08	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_04540.1	398,3069397	11,17640903	-5,155351985	0,000755426	uncharacterized_protein
CPUR_03569.1	550,2993653	16,47789803	-5,06161254	8,14E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06793.1	7034,440889	214,6367584	-5,034466683	9,15E-07	related_to_bile_acid_transporter
CPUR_00570.1	3635,169755	114,0502045	-4,994281797	3,02E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00860.1	1828,237515	58,17154156	-4,973996164	2,59E-07	related_to_long-chain-fatty-acid-CoA_ligase
CPUR_02595.1	13456,60611	441,008419	-4,931364586	5,75E-08	related_to_PMU1_-_high_copy_suppressor_of_ts_tps2_mutant_phenotype
CPUR_01696.1	466,6624658	15,61732872	-4,901159822	0,000215227	uncharacterized_protein
CPUR_01776.1	5379,628736	181,1033036	-4,892621843	7,92E-08	Alternative_oxidase_

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_07813.1	218,4323836	7,450939352	-4,873620628	0,008193088	uncharacterized_protein
CPUR_08658.1	5952,318886	208,1785427	-4,837558538	7,48E-08	related_to_a_putative_low-affinity_copper_transport_protein
CPUR_00121.1	2616,790844	94,12946559	-4,797008402	1,46E-07	uncharacterized_protein
CPUR_02622.1	3461,784299	133,6756317	-4,694707435	4,64E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04554.1	616,1084458	24,07029268	-4,677858724	8,18E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04807.1	15586,92912	622,3999883	-4,646350878	2,77E-07	uncharacterized_protein
CPUR_08093.1	971,7300985	38,82761578	-4,64540063	2,80E-06	uncharacterized_protein
CPUR_01647.1	34338,31406	1377,212939	-4,639995662	1,20E-06	Phosphate_permease_
CPUR_07587.1	2013,139528	81,382956	-4,628576673	6,84E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04555.1	852,8699776	34,95984527	-4,608555111	5,24E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05854.1	193,8098258	8,023524841	-4,594261733	0,006893182	uncharacterized_protein
CPUR_06705.1	13151,94469	554,926751	-4,566834974	1,80E-06	Protein_tyrosine_phosphatase_
CPUR_06977.1	1929,921107	82,52925436	-4,547492457	1,36E-06	Polygalacturonase_
CPUR_05831.1	8092,351633	346,173368	-4,546992366	2,72E-06	uncharacterized_protein
CPUR_07143.1	1272,403385	55,02091214	-4,531432248	0,000117693	uncharacterized_protein
CPUR_03026.1	887,3323844	38,54245042	-4,524954421	4,74E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03085.1	2440,883659	106,0238612	-4,52494264	1,88E-07	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_04556.1	20039,77922	875,448452	-4,516700571	2,82E-07	uncharacterized_protein
CPUR_03017.1	8314,755586	364,9323071	-4,509973074	1,77E-07	uncharacterized_protein
CPUR_01592.1	122,8827488	5,444353527	-4,496377832	0,033909774	uncharacterized_protein
CPUR_00387.1	101660,4554	4638,65572	-4,453908014	1,39E-08	probable_ALCOHOL_DEHYDROGENASE_I_-_ADH1
CPUR_01091.1	7800,275814	378,8273698	-4,363912665	2,12E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06318.1	1551,672191	75,93606586	-4,352894736	1,53E-06	uncharacterized_protein
CPUR_06262.1	135208,3854	6744,522464	-4,325324519	1,77E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06943.1	15359,23595	781,7171406	-4,296315968	2,32E-06	Putative_multicopperoxidase_
CPUR_04774.1	333,0856718	17,3376218	-4,263915373	0,040362459	uncharacterized_protein
CPUR_00939.1	2333,720064	123,7909222	-4,236654089	9,20E-06	related_to_triacylglycerol_lipase_V_precursor
CPUR_06794.1	20354,40401	1085,609624	-4,228763659	1,90E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00204.1	19011,3671	1031,741774	-4,203708438	2,20E-06	related_to_alkaline_phosphatase_D_precursor
CPUR_05483.1	530,9384317	28,94403364	-4,197206679	0,00156176	uncharacterized_protein
CPUR_01093.1	3612,699563	200,3052104	-4,172805428	9,09E-05	uncharacterized_protein
CPUR_00388.1	9200,917887	520,536391	-4,14370686	4,32E-06	related_to_antioxidant_protein_and_metal_homeostasis_factor
CPUR_07401.1	7800,826364	443,5771621	-4,136369967	1,38E-06	Alpha-ketoglutarate-dependent_taurine_dioxygenase_
CPUR_06942.1	10280,42023	591,5975885	-4,119139256	3,03E-06	Putative_iron_transferase_
CPUR_04691.2	2667,347466	154,449612	-4,110197621	7,95E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06300.1	14876,95031	881,6060008	-4,076800958	3,83E-05	uncharacterized_protein
CPUR_08150.1	1096,325862	66,19422086	-4,049827599	0,000195766	uncharacterized_protein
CPUR_06301.1	1526,699077	92,98626753	-4,037254244	4,87E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02272.1	514,4088524	32,09438121	-4,002522819	0,003721926	related_to_S.pombe_pac2_protein
CPUR_08723.1	307,4859143	19,19965202	-4,001368255	0,014384419	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
 baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_07940.1	632,8794802	39,54447502	-4,000382745	0,000214015	uncharacterized_protein
CPUR_00082.1	832,126314	52,58601458	-3,984051475	0,000745334	related_to_integral_membrane_protein_PTH11
CPUR_01572.1	1944,241954	123,7903585	-3,97323691	0,000670031	related_to_single-stranded_DNA-binding_protein_MSSP-1
CPUR_03553.1	1324,994345	85,39500027	-3,955690787	7,68E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04141.1	1485,865563	96,7159649	-3,941405726	0,000161719	related_to_integral_membrane_protein_PTH11
CPUR_05525.1	24676,56176	1641,41921	-3,910125747	0,000758306	related_to_DDR48_-_heat_shock_protein
CPUR_05156.1	3027,834952	203,025837	-3,898551324	9,95E-05	related_to_major_facilitator_MirA
CPUR_05147.1	654,5136834	43,98624025	-3,895299157	0,000698788	related_to_zinc_cluster_transcription_factor
CPUR_08536.1	3676,193489	248,0076194	-3,889756352	9,31E-07	Endo-1,4-beta-xylanase_
CPUR_00945.1	9704,600337	676,5707595	-3,842356068	1,53E-05	probable_thioredoxin
CPUR_06795.1	6272,767634	442,8693219	-3,824149152	5,26E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07495.1	21208,08829	1515,406967	-3,806837391	1,50E-06	related_to_sensor_protein_hoxX
CPUR_01105.1	229,9100022	16,47620695	-3,802613174	0,004346324	uncharacterized_protein
CPUR_00664.1	9387,310302	681,1486249	-3,784670319	0,00020787	related_to_5'-nucleotidase_precursor
CPUR_03554.1	1470,135382	106,741566	-3,783755029	6,84E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02059.1	2839,243544	206,8950168	-3,778535803	0,000481127	related_to_flavonol_synthase-like_protein
CPUR_00529.1	1361,575297	100,7260362	-3,756768215	0,000642944	uncharacterized_protein
CPUR_04160.1	1395,320307	103,7343648	-3,749630532	0,000687547	uncharacterized_protein
CPUR_07339.1	348,3580125	26,22058857	-3,731798772	0,027693495	uncharacterized_protein
CPUR_02843.1	2337,298084	176,5150099	-3,726978965	8,54E-06	probable_endochitinase_class_V_precursor
CPUR_03797.1	2224,65865	170,4994801	-3,705744742	6,84E-05	Glycerophosphoryl_diester_phosphodiesterase_family_protein_
CPUR_04796.1	339,9303385	26,3628894	-3,688658722	0,037711893	uncharacterized_protein
CPUR_06261.1	9983,449165	780,9943626	-3,676154296	2,80E-05	related_to_tripectidyl-peptidase_I
CPUR_01529.1	490,4240704	38,39761297	-3,674941257	0,005448319	uncharacterized_protein
CPUR_06233.1	1620,636048	128,0929232	-3,661297458	0,000569465	uncharacterized_protein
CPUR_03550.1	3876,349176	306,477855	-3,660843794	4,61E-05	3,4-dihydroxy-2-butanone_4-phosphate_synthase_
CPUR_07367.1	1440,971332	114,4748523	-3,653939025	0,002549474	uncharacterized_protein
CPUR_05455.1	4160,809866	332,6916792	-3,644606675	0,000130694	uncharacterized_protein
CPUR_07770.1	885,6948268	73,21290263	-3,596639864	0,001930067	uncharacterized_protein
CPUR_06814.1	10316,60123	861,5201315	-3,581939438	0,000124415	uncharacterized_protein
CPUR_02192.1	2603,905567	218,061843	-3,577867878	0,000106373	uncharacterized_protein
CPUR_06524.1	4449,691039	381,2633948	-3,544845238	0,000195184	Swim_zinc_finger_domain_protein_
CPUR_00643.1	6408,501168	550,6061482	-3,540894352	3,32E-05	probable_theta_class_glutathione_s-transferase
CPUR_06663.1	9141,633033	794,025192	-3,525195221	2,72E-05	O-acetylhomoserin_(Thiol)-lyase_
CPUR_05921.1	24542,87683	2135,421662	-3,522711488	2,77E-05	related_to_aldehyde_reductase
CPUR_07602.1	1970,016989	171,5023502	-3,521907819	0,001891588	uncharacterized_protein
CPUR_07595.1	1388,79003	121,2137238	-3,518203541	0,002502324	uncharacterized_protein
CPUR_05157.1	1243,25246	109,609003	-3,503681078	0,000456008	related_to_enoyl-CoA_hydratase
CPUR_05746.1	26008,71149	2299,832051	-3,499394513	1,11E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02034.1	618,2471912	55,16293113	-3,486412758	0,003388216	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_04436.1	248,6081606	22,20741692	-3,484760155	0,026549136	related_to_DRPLA_protein
CPUR_06982.1	329,5369212	29,51492805	-3,480923384	0,043668405	uncharacterized_protein
CPUR_07600.1	4250,204425	382,6911945	-3,473279622	2,40E-05	uncharacterized_protein
CPUR_00685.1	1161,4583	105,6011864	-3,45923941	0,005853458	related_to_hsp70_protein
CPUR_00751.1	501,247876	45,7051241	-3,455096395	0,001994785	probable_acetylxyln_esterase_precursor
CPUR_02002.1	491,4285806	44,84455479	-3,453977042	0,012009641	uncharacterized_protein
CPUR_08151.1	414,1623645	38,39986774	-3,431023213	0,012722411	uncharacterized_protein
CPUR_02123.1	3755,259663	348,7361923	-3,428704667	0,00028697	uncharacterized_protein
CPUR_07516.1	2101,65094	197,4355187	-3,412069615	0,004252905	related_to_histidinol-phosphatase
CPUR_06333.1	11821,43677	1114,121963	-3,407426311	0,00128599	uncharacterized_protein
CPUR_00486.1	8470,739519	801,4907874	-3,401730084	7,42E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02457.1	294,8170576	28,94093333	-3,348636645	0,032844498	uncharacterized_protein
CPUR_04027.1	1745,573546	172,3632014	-3,340177438	0,006007262	Cation-transporting_ATPase_pma1_
CPUR_05169.1	744,0613623	73,50539599	-3,339499538	0,006007262	uncharacterized_protein
CPUR_02212.1	1990,209184	197,57331	-3,332460103	0,000215437	uncharacterized_protein
CPUR_06350.1	2695,544374	268,3555427	-3,328359068	0,001319332	uncharacterized_protein
CPUR_08481.1	2899,424089	288,6978291	-3,328134203	0,000278553	related_to_cell_wall_mannoprotein
CPUR_05158.1	717,8444532	74,79230411	-3,262709532	0,006825267	related_to_multidrug_resistance_protein
CPUR_03757.1	158878,0528	16585,0183	-3,259967337	2,86E-05	probable_pyruvate_decarboxylase
CPUR_02323.1	12672,51679	1332,506176	-3,249488951	0,000397825	uncharacterized_protein
CPUR_05832.1	1387,518889	146,4325696	-3,244199032	0,002369277	uncharacterized_protein
CPUR_04247.1	1199,25556	126,94437	-3,23987081	0,015004629	uncharacterized_protein
CPUR_07160.1	450,4334437	47,71058254	-3,238932742	0,010064208	uncharacterized_protein
CPUR_05798.1	1187,379169	126,8020692	-3,227130514	0,002680368	uncharacterized_protein
CPUR_06499.1	4203,329049	455,4695848	-3,206105777	0,000875607	Magnesium-translocating_P-type_ATPase_family_protein_
CPUR_00237.1	3744,840681	410,055263	-3,191014083	8,41E-05	related_to_vacuolar_membrane_protein_HMT1
CPUR_01646.1	2913,013143	322,8083789	-3,173762279	0,002447463	uncharacterized_protein
CPUR_00859.1	829,3725162	92,13077145	-3,170265241	0,006007262	related_to_aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucB
CPUR_02153.1	19291,74012	2158,628004	-3,15979673	0,002614475	uncharacterized_protein
CPUR_04695.1	16851,79068	1887,267233	-3,158531276	0,000670031	6-phosphofructokinase_
CPUR_06978.1	3410,63884	385,2500729	-3,146174858	1,53E-06	Polygalacturonase_
CPUR_00989.1	3324,642258	376,2634182	-3,143384173	0,001622381	uncharacterized_protein
CPUR_03778.1	5369,994141	607,7635458	-3,143338466	0,000159881	Sodium/phosphate_symporter,_putative_
CPUR_01797.1	5711,518972	646,5984896	-3,142932437	0,000494841	uncharacterized_protein
CPUR_06893.1	6767,264048	767,1218476	-3,141045026	0,00165227	probable_glucosamine-phosphate_N-acetyltransferase
CPUR_01089.1	1412,045966	160,3256594	-3,138709807	0,005975614	related_to_ECM32_-_DNA_dependent_ATPase/DNA_helicase_B
CPUR_02093.1	1621,055233	184,539944	-3,134928219	0,00238433	uncharacterized_protein
CPUR_06277.1	609,4619571	69,49166065	-3,132624407	0,038338476	related_to_threonine_dehydratase
CPUR_08343.1	1132,111685	129,3820861	-3,129306505	0,007309715	uncharacterized_protein
CPUR_07430.1	684,192895	78,2306355	-3,128597533	0,015225495	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_04443.1	381,319485	43,98454918	-3,115931523	0,044918287	related_to_DRPLA_protein
CPUR_01194.1	305,4404799	35,53299445	-3,103660096	0,045923708	uncharacterized_protein
CPUR_06018.1	2488,236	290,2817401	-3,099597598	0,000473235	uncharacterized_protein
CPUR_01243.1	11238,484	1321,419362	-3,088287144	0,000106294	related_to_non-hemolytic_phospholipase_C_precursor
CPUR_02736.1	3161,412029	373,3756883	-3,081869178	0,005428522	uncharacterized_protein
CPUR_07594.1	4993,089441	591,1492657	-3,078338387	0,003309407	uncharacterized_protein
CPUR_02211.1	5995,555147	710,7914797	-3,076395051	0,000527037	Glucosamine_6-phosphate_synthetase_
CPUR_06762.1	5756,172313	683,145628	-3,074844721	0,003309407	Carboxyphosphoenolpyruvate_phosphonmutase,_putative_
CPUR_01155.1	2045,141831	242,9915776	-3,073222683	0,000551267	uncharacterized_protein
CPUR_05486.1	3134,800757	374,9587538	-3,06356994	0,0032281	uncharacterized_protein
CPUR_03106.1	2054,41435	246,5806653	-3,058595599	0,000687547	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_03776.1	23068,70092	2785,856356	-3,049743986	0,000473661	Thiol_peroxidase_
CPUR_04951.1	30307,07496	3683,47953	-3,040513489	9,78E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06367.1	3313,285861	402,8954077	-3,039785414	0,002468416	related_to_nitrate_assimilation_regulatory_protein_nirA
CPUR_03221.1	2480,496207	310,899891	-2,996106735	5,56E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03275.1	49487,01957	6243,745909	-2,986566424	0,002066995	probable_heat_shock_protein_30
CPUR_02506.1	7095,04108	896,1880471	-2,984937648	0,007941546	uncharacterized_protein
CPUR_00095.1	2699,297883	344,0072888	-2,972073157	0,001622381	uncharacterized_protein
CPUR_01800.1	1045,062658	134,5404287	-2,957477778	0,025252443	uncharacterized_protein
CPUR_01507.1	2276,427417	293,1488953	-2,957065935	0,001711115	uncharacterized_protein
CPUR_02735.1	2834,136468	367,0772479	-2,948753626	0,001348978	probable_MUP1_-_High_affinity_methionine_permease
CPUR_05141.1	3299,368869	432,8254008	-2,930333008	0,001000601	uncharacterized_protein
CPUR_05517.1	608,3527212	80,23440287	-2,922615164	0,038012014	uncharacterized_protein
CPUR_08581.1	8854,741861	1168,835444	-2,921378416	0,000184738	related_to_ERO1_protein,_required_for_protein_disulfide_bond_formation_in_the_ER
CPUR_05680.1	5500,900532	731,7198801	-2,910304455	0,000423335	uncharacterized_protein
CPUR_01879.1	4220,830958	563,9466636	-2,903896423	0,003308389	related_to_GIT1_-_Glycerophosphoinositol_transporter_also_able_to_mediate_low-affinity_phosphate_trans
CPUR_00803.1	3246,298845	440,7235355	-2,88084997	0,001119027	Branched-chain-amino-acid_aminotransferase_
CPUR_07551.1	6398,669681	876,2918287	-2,868288681	0,000755405	probable_protein_disulfide_isomerase-related_protein_A
CPUR_04553.1	1160,394688	159,0376239	-2,867175584	0,020571919	uncharacterized_protein
CPUR_03024.1	4319,113943	593,0279248	-2,864563431	0,002836522	uncharacterized_protein
CPUR_04811.1	2038,520129	281,5416379	-2,856101996	0,00165227	uncharacterized_protein
CPUR_07642.1	21113,4681	2926,281287	-2,851023216	0,000778141	related_to_mixed-linked_glucanase_precursor_MLG1
CPUR_00667.1	1437,44047	200,5898121	-2,841181971	0,00443192	uncharacterized_protein
CPUR_04120.1	1479,658813	207,6079302	-2,833331093	0,005858299	related_to_peptide_transporter
CPUR_05499.1	6625,578733	930,0241417	-2,832706406	0,01003642	uncharacterized_protein
CPUR_05795.1	2014,772392	283,4115598	-2,829646358	0,011766961	uncharacterized_protein
CPUR_03396.1	14281,06708	2023,320547	-2,819306978	0,007040237	uncharacterized_protein
CPUR_04937.1	2360,419954	334,6926281	-2,81813488	0,003462266	uncharacterized_protein
CPUR_05014.1	1128,827077	160,1847678	-2,817015629	0,005534164	related_to_glucan_1,4-alpha-glucosidase
CPUR_00641.1	714,4870531	101,4378223	-2,816312191	0,005675823	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_06788.1	2029,671277	291,5717486	-2,799323245	0,008343305	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_06804.1	6766,001198	977,8944995	-2,7905527	0,001932028	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_08227.1	5702,00916	824,9901856	-2,789021495	0,00360711	probable_flavohemoglobin
CPUR_07802.1	11207,8835	1626,491683	-2,784678514	0,000625798	Asparagine_synthetase_
CPUR_06421.1	639,2094098	93,27706981	-2,776694272	0,041921852	uncharacterized_protein
CPUR_06316.1	3431,497145	501,4672022	-2,774610903	0,016335416	uncharacterized_protein
CPUR_08715.1	2144,219733	314,4971521	-2,769333898	0,010999279	uncharacterized_protein
CPUR_02328.1	6301,69083	931,046741	-2,758813474	0,045688748	related_to_15-hydroxyprostaglandin_dehydrogenase
CPUR_00777.1	1510,287667	223,8054542	-2,754506267	0,008826736	related_to_RNA-3`-phosphate_cyclase_1
CPUR_04127.1	581,9921845	87,54135031	-2,732963237	0,025705214	Aminoglycoside_phosphotransferase_(Fragment)_
CPUR_07707.1	1604,324847	242,1366453	-2,728072951	0,001600288	uncharacterized_protein
CPUR_06783.1	376,3265911	57,30984486	-2,715130337	0,042452987	probable_subtilisin-like_serine_protease
CPUR_01094.1	2536,383613	387,8529193	-2,709191395	0,010645692	uncharacterized_protein
CPUR_00642.1	1623,314671	248,3037768	-2,708764575	0,012991666	related_to_URE2_-_nitrogen_catabolite_repression_regulator
CPUR_06473.1	2451,441328	382,8444873	-2,678799844	0,011263738	related_to_siroheme_synthase_(Uroporphyrin-III_C-methyltransferase)
CPUR_06272.1	62085,61746	9699,604983	-2,678261198	0,003993986	CCG-6_clock-controlled_protein_6_(ccg-6)
CPUR_01836.1	9395,21745	1472,166052	-2,673986144	0,001403448	uncharacterized_protein
CPUR_01798.1	10080,93044	1597,828024	-2,657444759	0,006873697	uncharacterized_protein
CPUR_07452.1	38296,73295	6087,734934	-2,653243874	0,001203324	uncharacterized_protein
CPUR_08659.1	2207,158769	353,3256134	-2,643120169	0,020214409	3-hydroxyanthranilate_3,4-dioxygenase_
CPUR_02806.1	913,9661325	146,4322877	-2,641907009	0,012640241	uncharacterized_protein
CPUR_05834.1	2879,794178	461,5023072	-2,641555939	0,009246714	uncharacterized_protein
CPUR_00913.1	3215,558862	515,7911404	-2,640210601	0,021001114	uncharacterized_protein
CPUR_04855.1	1449,51938	232,5458383	-2,639987596	0,014703597	uncharacterized_protein
CPUR_00240.1	1323,518375	213,4853868	-2,632168999	0,007941546	Pyridoxine_
CPUR_07570.1	2198,289292	356,042576	-2,62625958	0,026549136	Oligopeptide_transporter_OPT-like_protein_
CPUR_06177.1	1333,135293	216,776626	-2,620542089	0,027120957	uncharacterized_protein
CPUR_04183.1	1658,961735	270,0763995	-2,618841129	0,026377758	Sodium/phosphate_symporter,_putative_
CPUR_08660.1	4442,402046	723,4159813	-2,618442591	0,007765975	2-keto-4-pentenoate_hydratase_
CPUR_06062.1	1093,348816	178,9577991	-2,61106242	0,048656484	related_to_malic_acid_transport_protein
CPUR_04789.1	1774,309308	290,7165343	-2,609572499	0,007676181	UDP-Glc/Gal_endoplasmic_reticulum_nucleotide_sugar_transporter_
CPUR_05105.1	522,7135582	85,82133908	-2,606612264	0,047837204	uncharacterized_protein
CPUR_03415.1	4664,845713	766,3948419	-2,605669609	0,008507137	related_to_calcium-independent_phospholipase_A2
CPUR_03287.1	3828,127095	631,5703752	-2,599623323	0,004704901	Delta_1-pyrroline-5-carboxylate_dehydrogenase_
CPUR_00205.1	1826,165053	305,4648384	-2,579738937	0,014609071	uncharacterized_protein
CPUR_04005.1	278,6676912	46,99315961	-2,56802307	0,027606351	uncharacterized_protein
CPUR_03242.1	904,6411266	153,3055684	-2,560935486	0,021791507	uncharacterized_protein
CPUR_00857.1	393,6466067	66,76680635	-2,559698103	0,032251525	uncharacterized_protein
CPUR_04795.1	902,9737353	153,1652405	-2,559595098	0,020571919	uncharacterized_protein
CPUR_03755.1	4230,84882	723,5478539	-2,547786794	0,017964799	related_to_uroporphyrinogen_III_synthase

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_01125.1	10830,817	1857,003033	-2,544093997	0,001260603	related_to_malate_dehydrogenase_(oxaloacetate-decarboxylating)_(NADP+)
CPUR_04111.1	3504,457924	603,8915476	-2,536829917	0,001119027	related_to_peptide_transporter
CPUR_00823.1	4786,532319	832,8669001	-2,522822987	0,003009668	uncharacterized_protein
CPUR_03549.1	2385,351961	416,6569068	-2,517270352	0,007000601	Hexaprenyldihydroxybenzoate_methyltransferase_
CPUR_03859.1	5168,424144	913,6741703	-2,499972793	0,020968482	related_to_kinetoplast-associated_protein_KAP
CPUR_08159.1	1084,317399	192,5640325	-2,493376957	0,010386451	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_04131.1	4172,071347	746,4594469	-2,48262804	0,013518519	related_to_sterol_delta_5,6-desaturase
CPUR_01462.1	1328,071812	238,554322	-2,476943429	0,030221373	probable_potassium_transporter_TRK-1
CPUR_03989.1	3309,748419	600,3396636	-2,462870666	0,026962003	related_to_mouse_T10_protein
CPUR_00143.1	3512,831083	637,4379673	-2,462277348	0,015945439	uncharacterized_protein
CPUR_06377.1	1713,78724	313,0696342	-2,452632527	0,048656484	uncharacterized_protein
CPUR_05822.1	1274,179948	233,1113777	-2,450477713	0,015722758	uncharacterized_protein
CPUR_05180.1	4361,872059	800,4786163	-2,446012685	0,00659023	Vacuolar_transporter_chaperone_4_
CPUR_00203.1	2118,367212	395,1604304	-2,422442303	0,033066946	uncharacterized_protein
CPUR_03251.1	1022,182419	190,9908316	-2,420077393	0,019749663	related_to_SLS1_protein_precursor
CPUR_05106.1	1355,275024	253,3158727	-2,419576262	0,039907423	uncharacterized_protein
CPUR_03430.1	360,3640587	67,48112898	-2,416899114	0,040524831	uncharacterized_protein
CPUR_05368.1	5059,526841	951,1776743	-2,411215714	0,00409018	uncharacterized_protein
CPUR_00773.1	18283,53181	3444,802386	-2,408051652	0,032893868	uncharacterized_protein
CPUR_07509.1	5420,698942	1036,187485	-2,387193819	0,011705378	uncharacterized_protein
CPUR_02015.1	6612,782039	1266,993583	-2,383848132	0,013539238	related_to_cytosolic_nonspecific_dipeptidase
CPUR_02593.1	588,8345046	113,0456433	-2,38095682	0,035113598	uncharacterized_protein
CPUR_06483.1	6754,657205	1297,623806	-2,380010363	0,013043407	Phosphoadenosine_phosphosulfate_reductase_
CPUR_01542.1	2584,034412	496,7408353	-2,379060027	0,045965162	uncharacterized_protein
CPUR_04211.1	3013,464424	580,8520278	-2,375180444	0,023774859	uncharacterized_protein
CPUR_03543.1	3836,764786	742,017118	-2,370365948	0,013264883	Arrestin_domain-containing_protein_
CPUR_05060.1	2873,074897	556,3511686	-2,368527898	0,032844498	related_to_pyridoxamine-phosphate_oxidase
CPUR_06482.1	4316,057419	839,8957284	-2,361431922	0,039777268	Phosphoserine_phosphatase_
CPUR_00559.1	16224,57188	3160,31214	-2,360041446	0,036372892	uncharacterized_protein
CPUR_04535.1	2105,222202	412,3540603	-2,352016996	0,028703497	uncharacterized_protein
CPUR_01353.1	566,2733124	111,0384938	-2,350438636	0,026672338	uncharacterized_protein
CPUR_03558.1	1413,02747	277,0936721	-2,350343843	0,008455393	related_to_CCC2_-_P-type_ATPase_involved_in_export_of_Cu++_from_the_cytosol_into_intracellular_secret
CPUR_07201.1	9367,348586	1841,361747	-2,346867672	0,001316187	related_to_G1/S-specific_cyclin_pas1
CPUR_03557.1	4736,47422	932,00057	-2,34541079	0,004458441	related_to_MET10_-_sulfite_reductase_flavin-binding_subunit
CPUR_03058.1	2424,037662	481,8434662	-2,330775666	0,024936092	uncharacterized_protein
CPUR_01674.1	3241,477278	644,7525246	-2,329834038	0,049468008	BolA_domain_protein_
CPUR_07044.1	3804,707084	757,9537155	-2,32760373	0,018865246	related_to_acyl-coenzyme_A:6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase_precursor
CPUR_06349.1	2074,465617	415,076378	-2,32129101	0,028542617	Histone-lysine_N-methyltransferase,_H3_lysine-79_specific_
CPUR_00241.1	4491,325591	911,5529046	-2,300743017	0,016591957	Pyridoxine_biosynthesis_protein_PDX1_
CPUR_01138.1	1343,795024	272,8029449	-2,30038197	0,032009812	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_04165.1	801,7570167	163,3382156	-2,295302702	0,048478061	probable_subtilisin-like_serine_protease
CPUR_00713.1	1437,142118	292,8640118	-2,294899911	0,045923708	4F5_domain_protein_
CPUR_04173.1	1099,906369	224,2340478	-2,294303458	0,044918287	uncharacterized_protein
CPUR_01697.1	2989,905302	620,3981939	-2,2688334	0,014850754	Homoserine_kinase_
CPUR_07433.1	2771,541584	575,4031647	-2,268043593	0,038565147	related_to_1-phosphatidylinositol_phosphodiesterase_precursor
CPUR_02566.1	2460,545644	513,22127	-2,261325411	0,044918287	uncharacterized_protein
CPUR_01357.1	6406,796656	1338,357702	-2,259139446	0,006825267	uncharacterized_protein
CPUR_03025.1	1569,149666	330,1091258	-2,248968037	0,043391692	uncharacterized_protein
CPUR_05690.1	5450,894531	1161,569083	-2,230418047	0,011105149	uncharacterized_protein
CPUR_03060.1	701,2783539	149,5753073	-2,22911517	0,017984277	uncharacterized_protein
CPUR_04638.1	2105,342753	464,2237793	-2,181162795	0,028600726	Uncharacterized_protein_
CPUR_02922.1	1116,907691	247,7216085	-2,172718332	0,04670545	uncharacterized_protein
CPUR_02926.1	1722,62272	383,1200699	-2,168738255	0,047090485	related_to_heterokaryon_incompatibility_protein
CPUR_08054.1	9410,789747	2101,459614	-2,162924067	0,009051197	related_to_positive_effector_protein_GCN20
CPUR_00963.1	1561,220798	350,7348864	-2,154221744	0,029969684	probable_cell_wall_protein_UTR2
CPUR_00873.1	1807,639861	407,0480618	-2,150836222	0,01962711	uncharacterized_protein
CPUR_00941.1	2070,014629	474,1022882	-2,126370702	0,011766961	uncharacterized_protein
CPUR_03556.1	628,5107775	144,4217561	-2,121649394	0,047837204	Sarcosine_oxidase_
CPUR_01617.1	2252,009971	519,3706452	-2,116376835	0,016667889	Squalene_epoxidase_
CPUR_06632.1	2534,697908	585,008064	-2,115285397	0,049349392	probable_acetylornithine_aminotransferase_precursor
CPUR_04441.1	1308,635598	302,4553824	-2,113269181	0,035113598	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_06937.1	4237,854721	980,5483286	-2,111673487	0,001934364	Inositolphosphorylceramide-B_C-26_hydroxylase_
CPUR_00651.1	1246,757969	293,8567355	-2,084996552	0,018917865	Purine_transporter_
CPUR_06060.1	8715,127333	2062,5621	-2,079084186	0,009842937	C-4_sterol_methyl_oxidase_
CPUR_05351.1	5731,863332	1370,1641	-2,064655521	0,026962003	uncharacterized_protein
CPUR_06395.1	1856,17462	443,850208	-2,06418766	0,020291436	related_to_Zinc_finger_protein
CPUR_05054.1	6862,213855	1640,936784	-2,064154426	0,007765975	uncharacterized_protein
CPUR_08623.1	3406,773848	817,9343002	-2,05834931	0,002587824	uncharacterized_protein
CPUR_00679.1	51803,02169	12607,7317	-2,038727514	0,01362423	78_kDa_glucose-regulated_protein_
CPUR_06424.1	1213,482142	301,5979134	-2,008454525	0,029273999	related_to_dna_mismatch_repair_homologue_(hpms2)
CPUR_05365.1	12487,15092	3116,845216	-2,002285931	0,032893868	related_to_glucan_1,3-beta-glucosidase
CPUR_07090.1	2212,579776	562,2100234	-1,976548393	0,038534667	uncharacterized_protein
CPUR_03546.1	5774,275266	1471,554854	-1,972298563	0,007832882	probable_vivid_PAS_protein_VVD
CPUR_06951.1	3365,227383	858,5304047	-1,970762856	0,044918287	uncharacterized_protein
CPUR_02616.1	4479,169938	1147,334177	-1,964945746	0,036368115	Myo-inositol-phosphate_synthase_
CPUR_08351.1	3305,315816	850,1946573	-1,958923026	0,032844498	related_to_myc-type_bHLH_transcription_factor
CPUR_08305.1	1002,657622	258,893508	-1,953398358	0,045688748	related_to_PUF3_-_transcript-specific_regulator_of_mRNA_degradation
CPUR_06813.1	1430,411386	375,6620844	-1,928922709	0,029274039	uncharacterized_protein
CPUR_05565.1	31225,22797	8267,345734	-1,917215979	0,041028264	uncharacterized_protein
CPUR_08768.1	1185,477114	321,2157307	-1,88385336	0,008457682	retrotransposon_HobS_hobase

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
 baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_06614.1	6940,821835	1906,453638	-1,86421505	0,044832665	related_to_myc-type_bHLH_transcription_factor
CPUR_01400.1	8235,476646	2304,172101	-1,837603674	0,038507798	Valyl-tRNA_synthetase_
CPUR_08870.1	674,9086783	193,5601383	-1,801910429	0,02618218	uncharacterized_protein
CPUR_03963.1	2175,115006	649,3233439	-1,744082701	0,036308726	uncharacterized_protein
CPUR_02900.1	6016,658152	1805,698008	-1,736405759	0,035163058	uncharacterized_protein
CPUR_02238.1	4199,921085	1296,333516	-1,695925283	0,030039264	uncharacterized_protein
CPUR_03030.1	1062,797166	331,8189905	-1,679397925	0,03616125	uncharacterized_protein
CPUR_04275.1	4750,175851	12214,17444	1,362503527	0,002788969	related_to_mismatched_base_pair_and_cruciform_dna_recognition_protein
CPUR_07723.1	793,6734243	2298,638152	1,534161973	0,021001114	uncharacterized_protein
CPUR_08396.1	621,3450706	1854,745103	1,577754319	0,038012014	uncharacterized_protein
CPUR_02728.1	431,1408924	1330,62047	1,625867824	0,031759342	uncharacterized_protein
CPUR_06303.1	1705,286914	5360,809064	1,652436259	0,005892103	uncharacterized_protein
CPUR_05385.1	452,46981	1448,139164	1,67830681	0,018435638	probable_maleylacetoacetate_isomerase
CPUR_07445.1	3609,854588	11757,65345	1,703587532	0,040247427	uncharacterized_protein
CPUR_07530.1	2074,623147	6935,079566	1,741063138	0,047048504	related_to_cell_wall_glycoprotein
CPUR_00738.1	332,7166616	1152,982273	1,793004313	0,043153989	related_to_acetylhydrolase
CPUR_08309.1	2742,591218	9541,72775	1,798710918	0,045688748	related_to_Ras-GTPase-activating_protein_binding_protein_2
CPUR_05139.1	363,9652252	1295,102132	1,831193353	0,048360403	probable_isoaleryl-CoA_dehydrogenase
CPUR_04095.1	949,5220914	3393,045093	1,837307132	0,037115378	uncharacterized_protein
CPUR_02017.1	2227,321766	8110,986115	1,864567335	0,020968482	related_to_cornifin_B
CPUR_02251.1	1619,567919	5958,064019	1,879234654	0,035849787	uncharacterized_protein
CPUR_00232.1	1112,475264	4101,635544	1,882426047	0,011280727	uncharacterized_protein
CPUR_06020.1	670,0639991	2498,223121	1,898531531	0,032844498	related_to_chitinase
CPUR_05430.1	993,2026791	3716,220904	1,903676205	0,039777268	uncharacterized_protein
CPUR_03406.1	843,8387367	3181,312098	1,914582691	0,036964994	uncharacterized_protein
CPUR_05375.1	470,641746	1800,866544	1,935990073	0,032251525	uncharacterized_protein
CPUR_00092.1	23171,93061	90011,22814	1,957726727	0,017427783	uncharacterized_protein
CPUR_02758.1	462,6559457	1816,173905	1,972890715	0,020002402	Arginine_permease,_putative_
CPUR_00433.1	452,99141	1778,688721	1,973258456	0,008064224	uncharacterized_protein
CPUR_05744.1	2416,445836	9536,625776	1,980592249	0,031218053	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_01940.1	512,568459	2040,40147	1,993036435	0,017178275	uncharacterized_protein
CPUR_04489.1	433,0519087	1752,720321	2,016983934	0,025252443	related_to_triacylglycerol_lipase
CPUR_00037.1	1464,290921	6031,423481	2,042296321	0,003165041	uncharacterized_protein
CPUR_05500.1	553,5271111	2286,002095	2,04610084	0,005576692	uncharacterized_protein
CPUR_00605.1	2254,028484	9376,358365	2,056521964	0,00156176	uncharacterized_protein
CPUR_03082.1	594,4880038	2474,443631	2,057384574	0,011296764	related_to_aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucB
CPUR_03151.1	232,326758	982,8998311	2,080889072	0,028168512	uncharacterized_protein
CPUR_06023.1	904,490848	3854,616139	2,091409386	0,02120618	related_to_kynureninase
CPUR_08544.1	228,0104006	972,300799	2,092303073	0,036924136	related_to_monocarboxylate_transporter_2
CPUR_08318.1	700,5016788	3001,064572	2,099013948	0,04487589	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_01312.1	1790,923625	7811,966591	2,124981966	0,016407086	related_to_ACB_4-hydroxyacetophenone_monooxygenase
CPUR_03772.1	133,2465797	596,3011259	2,16194256	0,019964402	uncharacterized_protein
CPUR_00576.1	568,8450047	2559,238706	2,169607203	0,011940501	related_to_nucleolar_100K_polymyositis-scleroderma_protein
CPUR_07960.1	1599,159163	7210,961332	2,17287807	0,034749853	Oleate-induced_peroxisomal_protein_
CPUR_04723.1	418,0255396	1885,220906	2,173070593	0,031087192	uncharacterized_protein
CPUR_08904	1535,666805	6935,100799	2,175051624	0,000481127	Tryptophan_dimethylallyltransferase_2_dmaW2
CPUR_06335.1	468,1384714	2134,680001	2,189012584	0,045923708	uncharacterized_protein
CPUR_05021.1	618,7438273	2835,73499	2,196308581	0,035163058	uncharacterized_protein
CPUR_06019.1	349,3146586	1602,033946	2,197305628	0,025733993	uncharacterized_protein
CPUR_00310.1	270,7662045	1245,436823	2,201532254	0,002543805	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_05559.1	388,3713979	1791,547937	2,205697786	0,022857125	related_to_MEAB_protein
CPUR_08198.1	835,9507992	3879,115025	2,214237617	0,030068433	Putative_lysosomal_cobalamin_transporter_
CPUR_08584.1	171,0983196	803,1228941	2,230795176	0,03454179	uncharacterized_protein
CPUR_04073.1	1684,848395	7927,973494	2,234333358	0,024637419	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_1_
CPUR_01072.1	246,9863928	1165,055046	2,237894653	0,009370612	related_to_CAX4_protein
CPUR_01600.1	778,5239458	3754,783648	2,269916462	0,026548801	related_to_hypothetical_protein_yqey
CPUR_01188.1	134,1257752	649,3512466	2,275412561	0,028805746	uncharacterized_protein
CPUR_06408.1	763,0124613	3722,846505	2,28662761	0,007213594	Ribitol_kinase_
CPUR_02483.1	2136,081308	10607,45459	2,312040035	0,036535052	related_to_cell_wall_protein_cwl1
CPUR_08142.1	230,5683316	1149,64312	2,317919802	0,034018828	related_to_dimethylglycine_dehydrogenase,_mitochondrial_precursor
CPUR_04061.1	149,439117	746,3791522	2,320350854	0,04487589	uncharacterized_protein
CPUR_02794.1	2826,799681	14126,52693	2,321165259	0,030221373	related_to_tRNA-splicing_endonuclease_beta_chain
CPUR_03869.1	1311,972621	6572,460744	2,324696007	0,03037346	Protein_yop-1_
CPUR_00353.1	827,0106287	4203,849664	2,345733301	0,025252443	Stomatin-like_protein_
CPUR_00356.1	362,543876	1856,487662	2,356348218	0,01915259	uncharacterized_protein
CPUR_07395.1	276,1735908	1422,760824	2,365045882	0,017806359	uncharacterized_protein
CPUR_01284.1	325,3663259	1678,769421	2,367267239	0,038876588	related_to_reticuline_oxidase_(berberine_bridge_enzyme)
CPUR_03699.1	535,4348662	2778,348202	2,375444427	0,021908531	Phophoketolase_
CPUR_00948.1	282,7517678	1475,066183	2,383171737	0,00538023	related_to_2,5-diketo-D-gluconic_acid_reductase
CPUR_07543.1	1988,769592	10494,09362	2,399629518	0,032893868	uncharacterized_protein
CPUR_05176.1	1327,393141	7131,767003	2,425663846	0,00128599	Sphingolipid_long_chain_base-responsive_protein_PIL1_
CPUR_01222.1	803,1032619	4333,793656	2,43197306	0,005911532	uncharacterized_protein
CPUR_02417.1	214,086475	1155,357138	2,432073318	0,047351181	uncharacterized_protein
CPUR_00657.1	220,154396	1190,505507	2,434986736	0,048737774	uncharacterized_protein
CPUR_07349.1	213,0136178	1154,863751	2,438705086	0,025705214	uncharacterized_protein
CPUR_00256.1	529,1185918	2877,25533	2,443030236	0,044983858	Very-long-chain_3-oxoacyl-CoA_reductase_
CPUR_00183.1	281,5604943	1536,778899	2,448392786	0,022445896	related_to_trichodiene_oxygenase_cytochrome_P450
CPUR_01458.1	1247,776311	6831,315075	2,452804009	0,02058382	related_to_members_of_the_aldo/keto_reductase_family
CPUR_05575.1	194,9578576	1071,282303	2,4581045	0,02598606	related_to_senescence_marker_protein_30
CPUR_07393.1	284,5534713	1566,619578	2,460883208	0,005274107	related_to_fluG_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_04062.1	117,6302634	654,3410767	2,475783561	0,011595258	uncharacterized_protein
CPUR_04086.1	1350,302825	7578,149628	2,488562636	0,000636094	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_01235.1	412,3129029	2326,223689	2,496178318	0,024936092	probable_homocitrate_synthase_mitochondrial_precursor
CPUR_05945.1	108,004453	611,781227	2,501925041	0,047351181	Putative_acyl-CoA_dehydrogenase_
CPUR_05997.1	106,5945185	605,2162231	2,505317408	0,013919804	Phosphate_transport_protein_MIR1_
CPUR_02085.1	247,7517238	1435,383071	2,53446881	0,008755877	uncharacterized_protein
CPUR_04085.1	1835,586034	10654,11357	2,537097925	0,000551267	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_3_
CPUR_04698.1	127,9188844	743,3355929	2,538784428	0,018747607	related_to_general_repressor_of_transcription
CPUR_02097.1	856,0269945	5041,56973	2,5581448	0,010703757	related_to_glutamate_carboxypeptidase_II
CPUR_07545.1	157,6094754	929,5823013	2,56022833	0,002477282	uncharacterized_protein
CPUR_03481.1	1251,452334	7385,40559	2,561073811	0,015134884	uncharacterized_protein
CPUR_02361.1	314,7679383	1865,016411	2,566827823	0,007704561	uncharacterized_protein
CPUR_01708.1	18113,47123	107814,002	2,573409602	0,000111628	Cell_surface_protein_putative_
CPUR_07155.1	6973,986568	41521,76905	2,573812421	0,028935892	related_to_LAP3_-_member_of_the_GAL_regulon
CPUR_08003.1	145,4211822	868,524721	2,578329484	0,040294811	uncharacterized_protein
CPUR_07828.1	429,2525996	2583,394367	2,589369118	0,012373543	related_to_Beta-mannosidase_precursor
CPUR_03118.1	183,3139586	1112,984684	2,602045189	0,011766961	MFS_quinate_transporter_
CPUR_06505.1	136,6244627	841,7673413	2,623205715	0,042452987	uncharacterized_protein
CPUR_07223.1	2490,541697	15374,32227	2,625991344	9,57E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07144.1	798,4976559	4952,500838	2,632797142	0,005562828	related_to_neutral_ceramidase
CPUR_07561.1	582,4887852	3614,36404	2,633439644	0,007816056	uncharacterized_protein
CPUR_07394.1	1687,080663	10546,21776	2,644124831	0,011766961	Peroxidase/catalase_
CPUR_03900.1	796,5433273	5018,406511	2,655404596	0,007093858	related_to_PEST_phosphatase_interacting_protein
CPUR_06889.1	243,2987077	1556,79321	2,677776761	0,001119027	uncharacterized_protein
CPUR_06132.1	838,4700049	5391,976955	2,684983251	0,001219913	related_to_beta-1,3-glucanase
CPUR_04074.1	1775,560143	11440,31191	2,687780252	0,004523795	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_1_
CPUR_03744.1	630,4674527	4070,191506	2,690602877	0,005759018	Phosphatidylserine_synthase_
CPUR_03516.1	237,3697213	1535,591451	2,693586611	0,020291436	Neutral_ceramidase_
CPUR_03771.1	2737,332435	17822,00773	2,702817314	7,42E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04235.1	451,9185882	2954,300209	2,708681633	0,005381062	Putative_fructose-1,6-bisphosphatase_
CPUR_02588.1	154,2839375	1012,269922	2,71393426	0,003874718	related_to_lincomycin-condensing_protein_lmbA
CPUR_00640.1	2741,215705	18046,2628	2,718812337	0,000494841	related_to_phosphatidylserine_decarboxylase_2
CPUR_00757.1	209,8953968	1410,441499	2,748404396	0,002712844	related_to_laccase_precursor
CPUR_01654.1	107,892829	726,56802	2,751498886	0,034476843	GPR/FUN34_family_protein_
CPUR_07529.1	117,2179762	795,0607563	2,761871277	0,010330917	related_to_tetracycline_resistance_protein_from_transposon_Tn4351/Tn4400
CPUR_06547.1	93,50195982	639,3067618	2,773439843	0,029273999	related_to_G_protein_coupled_receptor_like_protein
CPUR_02072.1	453,5563225	3101,437236	2,773583309	0,000552429	uncharacterized_protein
CPUR_03642.1	240,7886055	1654,854394	2,780865256	0,019945835	uncharacterized_protein
CPUR_03480.1	835,3083303	5745,006443	2,78192778	0,004481418	uncharacterized_protein
CPUR_02071.1	234,6159234	1642,895456	2,807867841	0,004252905	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_02585.1	414,8981797	2913,566908	2,811957209	0,000695034	uncharacterized_protein
CPUR_04688.1	226,3909086	1596,252004	2,817800502	0,009842937	uncharacterized_protein
CPUR_05111.1	155,3590353	1098,430259	2,821765221	0,000593988	uncharacterized_protein
CPUR_06137.1	922,5353348	6593,740261	2,837420983	7,68E-05	uncharacterized_protein
CPUR_08219.1	768,531401	5516,385777	2,84354724	0,021908531	Auxin_Efflux_Carrier_superfamily_protein_
CPUR_00903.1	1515,337705	10887,37934	2,84494548	0,002160408	related_to_linoleate_diol_synthase
CPUR_04307.1	358,847052	2585,138053	2,848800353	0,028415544	uncharacterized_protein
CPUR_04754.1	571,8197393	4139,450957	2,855807098	0,011766961	Nitrate_reductase_
CPUR_04026.1	241,4491754	1756,27897	2,862730581	0,005562828	probable_carboxypeptidase
CPUR_07107.1	307,8116476	2246,825616	2,867768427	0,013415213	probable_farnesyltranstransferase_(al-3)
CPUR_07410.1	1442,280915	10551,70504	2,871052049	0,000215213	uncharacterized_protein
CPUR_04225.1	170,1166388	1246,673281	2,873487263	0,000749522	related_to_benzoate_4-monooxygenase_cytochrome_P450
CPUR_05848.1	220,1020155	1630,590505	2,889150258	0,044918287	uncharacterized_protein
CPUR_05113.1	1492,805817	11164,39654	2,902806855	0,001471417	uncharacterized_protein
CPUR_05576.1	6188,518629	46345,90479	2,904775853	6,89E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04609.1	732,2899788	5513,721864	2,912539535	0,000981389	uncharacterized_protein
CPUR_01075.1	261,7280299	1998,396167	2,932702271	0,03073147	related_to_acid_phosphatase
CPUR_03717.1	92,85280459	714,364502	2,943643	0,020082157	uncharacterized_protein
CPUR_01864.1	380,4129082	2927,949157	2,944252396	0,006869173	related_to_acetylxytan_esterase_precursor
CPUR_04067.1	510,085632	3971,028587	2,960701378	0,000224241	L-amino-acid_oxidase
CPUR_05178.1	1903,736307	14952,17691	2,973449979	0,007277792	Hexokinase_
CPUR_02331.1	277,5243171	2201,433278	2,987757026	0,001144814	uncharacterized_protein
CPUR_02889.1	1398,814366	11185,05465	2,999295882	0,000234478	ThiJ/PfpI_family_protein_
CPUR_04499.1	2335,890814	18710,16011	3,001777159	0,000184866	uncharacterized_protein
CPUR_06642.1	520,490464	4195,210995	3,010799735	0,004523795	Xanthine_dehydrogenase_
CPUR_03508.1	599,2735808	4869,511736	3,022490442	0,00010038	uncharacterized_protein
CPUR_05374.1	743,1299275	6054,084012	3,026222319	8,23E-05	probable_glucan_1,4-alpha-glucosidase
CPUR_06259.1	146,7103892	1197,488958	3,028969409	0,008992919	probable_glutaminase_A
CPUR_06568.1	63,05745249	516,0743328	3,032840088	0,024637419	mating_type_protein
CPUR_03809.1	143,2436409	1175,285205	3,036467897	0,008342228	uncharacterized_protein
CPUR_04154.1	315,4967846	2619,913603	3,053822029	0,016418712	uncharacterized_protein
CPUR_03624.1	197,4064404	1650,814447	3,063937005	0,009246714	uncharacterized_protein
CPUR_08326.1	224,8306602	1893,073382	3,073819641	0,003577092	uncharacterized_protein
CPUR_08474.1	126,0761797	1070,291271	3,085635837	0,002225483	uncharacterized_protein
CPUR_01828.1	4993,353231	42444,06961	3,087482119	0,001000601	probable_brefeldin_A_resistance_protein
CPUR_01299.1	460,0774965	3920,905624	3,091238119	9,95E-05	related_to_nitrate_assimilation_regulatory_protein_nirA
CPUR_00577.1	1690,510927	14455,26255	3,096063567	0,000511246	Trehalose-6-phosphate_synthase_1_
CPUR_03034.1	131,989235	1135,871193	3,10530707	0,021908531	uncharacterized_protein
CPUR_08040.1	1077,197351	9401,476592	3,125604777	0,000124537	Meiotically_up-regulated_protein_
CPUR_01438.1	737,0482453	6473,590819	3,134735216	0,006825267	probable_aspartic_proteinase_precursor

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
 baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_00022.1	260,4274436	2324,238241	3,157804565	0,002468416	uncharacterized_protein
CPUR_01995.1	197,7526566	1806,155913	3,191153455	0,002759669	related_to_gluconate_5-dehydrogenase
CPUR_01281.1	530,1458608	4857,795686	3,19584056	0,001402907	uncharacterized_protein
CPUR_04410.1	251,3095779	2326,375322	3,210546309	0,000111628	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_03432.1	275,3900528	2612,407735	3,24583173	0,000139982	NADH-cytochrome_B5_reductase,_putative_
CPUR_04524.1	37,41445333	359,6339184	3,264861492	0,006461605	uncharacterized_protein
CPUR_04624.1	139,3987788	1342,206589	3,267316917	0,006090032	Amino-acid_permease_inda1_
CPUR_03524.1	89,43160917	890,6016746	3,315923584	0,004983307	uncharacterized_protein
CPUR_01181.1	4155,521002	42944,15195	3,369360409	0,000123744	related_to_NAD(P)H-dependent_oxidoreductase
CPUR_05321.1	839,7023502	8756,070028	3,382333562	8,43E-05	Aspartate-tRNA_ligase_
CPUR_02897.1	377,9688771	3985,666658	3,398481706	0,000236862	uncharacterized_protein
CPUR_04719.1	310,9275927	3292,250286	3,404423461	0,001255529	Urea_active_transporter_
CPUR_02643.1	796,1219718	8458,635542	3,409363577	2,81E-05	Deacetylase_complex_subunit_Sds3,_putative_
CPUR_01210.1	2249,340699	23986,58408	3,414653617	0,000243922	related_to_dnase1_protein
CPUR_05082.1	517,1148568	5537,252516	3,420613655	4,51E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05401.1	36,00224297	388,0180496	3,429965069	0,00128599	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_00722.1	105,1481347	1138,221286	3,436285903	0,000755405	related_to_dehydrogenase
CPUR_01290.1	65,37848018	718,1051914	3,457307447	0,010014277	related_to_SUC2_-_invertase_(sucrose_hydrolyzing_enzyme)
CPUR_04523.1	53,98741564	607,095164	3,491227619	0,001260603	related_to_alpha-amylase_A_precursor
CPUR_06691.1	425,7516424	4820,581294	3,501123125	0,000638552	uncharacterized_protein
CPUR_07528.1	2505,693063	28907,52953	3,528163713	7,68E-05	L-xylulose_reductase_
CPUR_02967.1	59,21486631	688,4592364	3,53933991	0,005565811	uncharacterized_protein
CPUR_08549.1	1636,131813	19200,79181	3,552804919	4,17E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04687.1	54,79829954	645,7446845	3,558760832	0,005133589	uncharacterized_protein
CPUR_06946.1	78,99491485	943,01664	3,577451538	0,030819431	uncharacterized_protein
CPUR_06257.1	68,53090999	821,2458323	3,582987395	0,000350455	uncharacterized_protein
CPUR_05421.1	107,7971715	1292,669771	3,583962539	0,00020787	uncharacterized_protein
CPUR_00209.1	639,4281767	7787,668097	3,606337175	1,79E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00593.1	69,78821931	868,4193419	3,637336433	0,00165227	Cytochrome_P450_family_protein_
CPUR_08532.1	84,00142869	1059,25378	3,656490602	0,001609794	uncharacterized_protein
CPUR_02332.1	101,0868875	1302,279743	3,687371612	0,000494841	uncharacterized_protein
CPUR_07974.1	361,7944761	4749,571956	3,714555214	0,000174504	uncharacterized_protein
CPUR_02019.1	364,5710681	4798,633363	3,718351608	0,003033821	uncharacterized_protein
CPUR_02469.1	149,3685295	1985,056779	3,732232151	0,000921501	uncharacterized_protein
CPUR_05431.1	303,9029902	4042,091163	3,733419084	9,11E-05	related_to_phenol_2-monooxygenase
CPUR_05402.1	32,33048897	435,0202283	3,750115255	0,0049947	uncharacterized_protein
CPUR_07465.1	1067,673955	14419,2357	3,755451645	3,19E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04969.1	392,6626854	5370,370245	3,773659143	0,000149464	uncharacterized_protein
CPUR_04610.1	375,4519119	5246,15192	3,804559543	2,94E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04525.1	21,91886464	306,7492099	3,806814652	0,026962003	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
 baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_05420.1	265,354231	3752,963613	3,822038845	2,24E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06870.1	395,669353	5644,773981	3,834548587	7,46E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04413.1	277,1872045	3988,304453	3,846842978	6,82E-06	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_08232.1	1113,764294	16536,34208	3,892124286	0,000212794	uncharacterized_protein
CPUR_07426.1	18,06717495	268,9363018	3,895821664	0,016323989	uncharacterized_protein
CPUR_05433.1	138,4876856	2064,777785	3,898156922	2,60E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02316.1	505,1019476	7705,373996	3,931218473	0,000243922	Sorbitol_dehydrogenase_
CPUR_02003.1	108,9087186	1694,075091	3,959306467	0,000212794	uncharacterized_protein
CPUR_04250.1	40,96547979	656,0937821	4,001421431	1,77E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04000.1	193,4841632	3108,713776	4,006030401	7,81E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04007.1	184,0952208	2975,161843	4,014444071	5,26E-05	Mitochondrial_dicarboxylate_transporter_
CPUR_03109.1	446,2446768	7270,416682	4,026131186	7,09E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00925.1	222,2249004	3709,814799	4,061254781	2,95E-05	Acyl-CoA_dehydrogenase_
CPUR_00619.1	148,4801951	2491,495241	4,068669403	3,67E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04713.1	40,41880974	680,8397845	4,0742166	0,007182115	uncharacterized_protein
CPUR_03777.1	265,6115819	4479,463113	4,075935867	0,001529914	related_to_oxalate_decarboxylase
CPUR_00460.1	42,04057754	715,40063	4,088896995	0,000171803	probable_D-amino-acid_oxidase
CPUR_08788.1	50,86005582	867,0571809	4,091522189	0,019749663	uncharacterized_protein
CPUR_03919.1	616,6801505	10577,39385	4,100317987	2,68E-05	related_to_suppressor_protein_PSP1
CPUR_02655.1	253,8766124	4374,346357	4,106868054	5,24E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00091.1	370,5957827	6387,316366	4,10729154	1,11E-05	Calcium-transporting_ATPase_3_
CPUR_04574.1	4489,158178	77957,17874	4,118165044	1,87E-07	Protein_bli-3_
CPUR_07050.1	130,6111982	2274,361016	4,122110776	2,31E-05	MFS_multidrug_transporter,_putative_
CPUR_07178.1	37,75611769	678,2772421	4,167092757	9,01E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05776.1	4543,140795	82502,19935	4,182670658	2,93E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05947.1	26,80009919	515,633338	4,266035298	0,007941546	Aquaglyceroporin_
CPUR_03009.1	67,99561933	1323,272937	4,282525048	0,002427161	uncharacterized_protein
CPUR_05432.1	47,23157883	919,5654374	4,283128575	0,000996875	o-methyltransferase_that_catalyse_the_methylation_of_nor-rubrofusarin_resulting_in_formation_of_rubrofusarin
CPUR_03040.1	157,5980607	3124,141735	4,30913822	3,89E-05	related_to_TRI13_-_cytochrome_P450
CPUR_01422.1	136,950196	2803,043472	4,355270883	0,000872564	uncharacterized_protein
CPUR_06379.1	109,8608129	2263,926832	4,365078555	3,16E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04753.1	249,018172	5194,915007	4,382777214	1,10E-05	uncharacterized_protein
CPUR_00613.1	29,11429924	640,4682798	4,459327321	0,000209465	uncharacterized_protein
CPUR_05990.1	30,48550846	688,8692281	4,49803462	0,001396116	uncharacterized_protein
CPUR_04053.1	58,48370881	1383,180273	4,563810584	9,01E-05	related_to_triacylglycerol_lipase_II_precursor
CPUR_01124.1	116,4093682	2875,419511	4,626493384	7,22E-06	uncharacterized_protein
CPUR_06360.1	216,4849179	5421,099366	4,646247027	8,85E-07	probable_DNA-directed_RNA_polymerase_I,_II,_III_18kD_subunit
CPUR_05112.1	202,6976864	5084,69991	4,648761105	4,19E-07	uncharacterized_protein
CPUR_05989.1	17,42712323	441,1696036	4,661927051	0,000644912	uncharacterized_protein
CPUR_01071.1	8762,453566	239686,9881	4,773672887	8,66E-10	Glucose_repressible_protein_Grg1_

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
 baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_04079.1	287,4576184	7985,252931	4,795916934	1,28E-08	Chanoclavine-I_synthase_oxidoreductase_
CPUR_08148.1	231,2174868	6465,813909	4,805509569	3,29E-08	probable_endopeptidase_K
CPUR_02337.1	278,3033034	8165,546366	4,874819483	4,01E-08	uncharacterized_protein
CPUR_08633.1	909,886961	26858,5942	4,88355266	1,27E-10	uncharacterized_protein
CPUR_02587.1	72,23452628	2188,001476	4,920781327	9,49E-06	related_to_salicylate_1-monooxygenase
CPUR_00649.1	189,1085622	6530,026879	5,10980234	1,77E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04063.1	333,1835699	11639,12396	5,126521405	1,97E-07	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_04083.1	198,9348266	7161,531334	5,169900339	4,41E-09	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_2_
CPUR_08625.1	95,20117813	3461,058753	5,184090195	3,56E-08	related_to_PRY1_-_strong_similarity_to_the_plant_PR-1_class_of_pathogen_related_proteins
CPUR_02834.1	92,4336897	3466,14557	5,228769663	1,92E-08	uncharacterized_protein
CPUR_01541.1	21,44736923	833,8906269	5,280985572	8,81E-07	related_to_endo-1,6-alpha-D-mannanase
CPUR_04078.1	331,5094569	13512,43785	5,349094146	4,82E-10	Dimethylallyltryptophan_N-methyltransferase_
CPUR_05437.1	314,7633159	13343,18378	5,405691724	4,09E-07	polyketide_synthase_that_catalyse_the_condensation_of_one_acetyl-CoA_and_six_malonyl-CoA
CPUR_05424.1	147,7012088	6308,025144	5,416434873	6,01E-09	uncharacterized_protein
CPUR_08449.1	50,26328111	2349,515711	5,546714753	3,07E-08	related_to_extracellular_metalloproteinase
CPUR_05418.1	37,55338789	1766,511414	5,555816194	5,29E-07	related_to_peroxisomal_short-chain_alcohol_dehydrogenase
CPUR_00620.1	789,179301	37160,72218	5,557281612	1,10E-09	uncharacterized_protein
CPUR_00005.1	13,09938637	629,5181304	5,586676793	0,000243922	related_to_PRY1_-_strong_similarity_to_the_plant_PR-1_class_of_pathogen_related_proteins
CPUR_08853.1	3216,169115	160041,7557	5,636961281	8,00E-11	uncharacterized_protein
CPUR_04892.1	68,42156185	3514,99625	5,682928303	1,14E-08	uncharacterized_protein
CPUR_07663.1	60,93456754	3149,811159	5,691860641	4,70E-07	uncharacterized_protein
CPUR_05423.1	61,4903411	3391,002994	5,785208438	7,03E-08	related_to_maackiain_detoxification_protein_1
CPUR_02582.1	100,3261083	5646,196739	5,814510401	1,94E-07	probable_beta-glucosidase_precursor
CPUR_03774.1	278,8727676	15973,3878	5,839919457	5,82E-11	related_to_short-chain_alcohol_dehydrogenase
CPUR_08580.1	256,7055849	15700,01574	5,934507512	1,07E-09	uncharacterized_protein
CPUR_02833.1	425,4327368	26168,66151	5,942765272	1,06E-10	uncharacterized_protein
CPUR_01220.1	107,2436738	6712,861468	5,967963418	7,27E-10	related_to_cytochrome_b-large_subunit
CPUR_04021.1	151,2431317	9489,949787	5,971458921	4,62E-10	related_to_benzoate_4-monooxygenase_cytochrome_P450
CPUR_06790.1	36,94750967	2870,137783	6,279499059	7,65E-11	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_05436.1	101,8544944	8200,889459	6,331198844	1,24E-10	uncharacterized_protein
CPUR_08634.1	589,312969	48150,19511	6,352363818	1,57E-11	Catalase_
CPUR_05442.1	10,23168863	843,1303165	6,364639464	1,61E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03482.1	34,42830394	2846,22357	6,369310069	1,58E-08	uncharacterized_protein
CPUR_05711.1	42,13168333	3607,680692	6,420022286	6,48E-09	related_to_diaminopropionate_ammonia-lyase
CPUR_08903	47,01519376	4089,564776	6,442676441	3,84E-10	Tryptophan_dimethylallyltransferase_2_dmaW2
CPUR_08329.1	141,4555926	12352,46812	6,448306305	1,42E-10	uncharacterized_protein
CPUR_05710.1	178,3712047	16220,41569	6,50678425	8,98E-10	related_to_E.coli_dioxygenase
CPUR_05708.1	220,5666833	22426,97016	6,667876031	4,96E-10	related_to_naringenin,2-oxoglutarate_3-dioxygenase
CPUR_05417.1	106,4464451	10827,99054	6,668493951	1,52E-10	uncharacterized_protein
CPUR_05569.1	8,562092061	907,4816727	6,727761349	3,07E-07	uncharacterized_protein

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
 baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_08327.1	32,02982574	3754,309113	6,872987681	8,03E-10	uncharacterized_protein
CPUR_08867.1	1,284655191	157,3080299	6,936067322	0,039624817	uncharacterized_protein
CPUR_07657.1	21,53847502	2686,725504	6,962789016	1,80E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04075.1	413,6932156	52065,72693	6,9756289	9,40E-13	Putative_oxygenase_
CPUR_05422.1	72,82447335	9441,232451	7,018408027	1,86E-12	probable_aflatoxin_efflux_pump_AFLT
CPUR_05425.1	16,48640828	2171,226889	7,041089554	6,18E-11	uncharacterized_protein
CPUR_05419.1	125,1604994	16560,08111	7,047786608	7,16E-12	uncharacterized_protein
CPUR_04076.1	195,5819428	27521,03371	7,13661767	4,21E-12	Tryptophan_dimethylallyltransferase_dmaW1
CPUR_07553.1	16,61396345	2646,25764	7,315413433	4,85E-11	uncharacterized_protein
CPUR_04032.1	214,3415854	34763,52129	7,341518633	4,40E-14	Fatty_acid_hydroxylase_
CPUR_04080.1	40,67619595	6776,79469	7,38027449	9,17E-13	Chanoclavine-I_dehydrogenase_
CPUR_05550.1	703,9844289	120659,9355	7,421187482	5,38E-14	uncharacterized_protein
CPUR_05426.1	101,9387726	17650,99927	7,435903163	7,58E-14	uncharacterized_protein
CPUR_05549.1	803,9119406	160579,9902	7,642038936	9,34E-15	uncharacterized_protein
CPUR_01221.1	314,8704588	63360,61534	7,652684126	8,24E-17	uncharacterized_protein
CPUR_03018.1	17,80978873	3989,802652	7,807503175	2,84E-11	uncharacterized_protein
CPUR_02338.1	131,5222914	29937,34391	7,83049508	1,05E-14	uncharacterized_protein
CPUR_04077.1	113,4414611	28261,3797	7,960740069	1,17E-16	Agroclavine_dehydrogenase_easG
CPUR_05435.1	38,79249018	10164,92264	8,033606131	2,52E-14	uncharacterized_protein
CPUR_05434.1	6,808217336	2282,447956	8,389089157	1,05E-12	uncharacterized_protein
CPUR_08721.1	0,428218397	153,009411	8,481057897	0,012394412	uncharacterized_protein
CPUR_05427.1	45,34559718	17041,14988	8,553844492	1,05E-14	uncharacterized_protein
CPUR_05429.1	145,9700928	58152,92226	8,638035069	3,89E-16	probable_tetrahydroxynaphthalene_reductase
CPUR_06046.1	3,810688557	1561,218315	8,678404874	2,54E-10	uncharacterized_protein
CPUR_04082.1	31,72233488	13172,88132	8,697856264	8,24E-17	Elymoclavine_monooxygenase_
CPUR_05428.1	42,00412816	18055,65775	8,747704139	1,20E-15	probable_scytalone_dehydratase
CPUR_03367.1	1,241378176	589,2908995	8,890893489	2,20E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04084.1	34,38275105	16855,1543	8,937289136	2,54E-16	Chanoclavine-I_aldehyde_oxidoreductase_
CPUR_04081.1	147,8652133	72882,11122	8,945138256	1,58E-18	Catalase_
CPUR_08821.1	0,856436794	739,4018704	9,7537962	6,18E-08	related_to_phosphatase_2a_inhibitor
CPUR_07662.1	20,16271404	18934,80086	9,875134684	5,07E-19	uncharacterized_protein
CPUR_07656.1	13,91254614	18497,52809	10,3767303	2,32E-20	uncharacterized_protein
CPUR_05444.1	0,214109198	307,8811341	10,48981097	3,35E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05449.1	1,284655191	2300,728101	10,8064936	9,94E-13	uncharacterized_protein
CPUR_05446.1	0,214109198	460,4608241	11,07051592	5,75E-07	related_to_stress_response_protein_rds1p
CPUR_05817.1	0,214109198	680,0924859	11,63316846	4,71E-09	uncharacterized_protein
CPUR_07984.1	0,642327595	2934,624081	12,15757881	3,94E-18	uncharacterized_protein
CPUR_03366.1	0,642327595	3778,612148	12,52225954	1,15E-18	related_to_putidaredoxin_reductase
CPUR_03362.1	0	81,23868224	Inf	0,01670349	uncharacterized_protein
CPUR_06823.1	0	168,362431	Inf	2,83E-05	RCA-1_regulator_of_conidiation

Tab 15: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody (*Pokračování*).

Identifikační číslo	baseMeanMycelium_404	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_08753.1	0	223,3537493	Inf	0,000129715	uncharacterized_protein
CPUR_08841.1	0	148,2929087	Inf	0,000292248	uncharacterized_protein

9.2 Příloha 2 - Tabulka s DEGs mezi vzorky mycelia a sklerocia kmene Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu edgeR.

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million").

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_02481.1	-7,863009725	8,586401873	7,76E-07	uncharacterized_protein
CPUR_02520.1	-7,539352721	7,361579218	2,22E-18	related_to_copper_transport_protein
CPUR_05920.1	-7,34261105	12,67490724	4,52E-09	uncharacterized_protein
CPUR_07368.1	-7,130322738	6,119139876	1,07E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05066.1	-7,103341813	9,566106037	1,70E-08	uncharacterized_protein
CPUR_03424.1	-7,015647454	4,402290546	1,58E-08	uncharacterized_protein
CPUR_05851.1	-6,992835602	8,423059558	7,97E-16	related_to_copper_transport_protein
CPUR_05807.1	-6,718982218	8,644046847	1,54E-06	uncharacterized_protein
CPUR_06786.1	-6,697831921	4,719155712	4,51E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04139.1	-6,514617224	7,409648551	1,16E-15	probable_cutinase_1_precursor
CPUR_05808.1	-6,45965927	2,924021182	0,005302172	uncharacterized_protein
CPUR_07506.1	-6,234838969	5,386686232	2,59E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07808.1	-6,02060856	8,670519358	2,64E-12	Protein_tyrosine_phosphatase_
CPUR_00041.1	-6,011071292	8,209193198	1,60E-10	uncharacterized_protein
CPUR_04059.1	-6,006442177	9,023297895	3,20E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00109.1	-5,933715413	7,647926128	6,94E-14	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_06785.1	-5,9059685	8,320698919	3,41E-13	uncharacterized_protein
CPUR_05852.1	-5,905107864	7,009106822	1,00E-15	related_to_ferric_reductase_FRE2_precursor
CPUR_06798.1	-5,807111428	6,623370527	1,34E-05	uncharacterized_protein
CPUR_01530.1	-5,62072398	9,013777035	6,08E-11	uncharacterized_protein
CPUR_06159.1	-5,501616976	0,504994594	0,036595455	uncharacterized_protein
CPUR_01092.1	-5,46696194	8,475536913	4,38E-11	uncharacterized_protein
CPUR_03220.1	-5,409524747	7,348132729	4,51E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04398.1	-5,355389934	4,576254237	0,000145196	uncharacterized_protein
CPUR_04150.1	-5,305950894	8,682746157	1,37E-06	uncharacterized_protein
CPUR_08094.1	-5,292503655	6,655417294	2,23E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02853.1	-5,263621048	9,863925627	5,61E-07	uncharacterized_protein
CPUR_07353.1	-5,183508048	9,418607104	6,72E-09	uncharacterized_protein
CPUR_05862.1	-5,166016069	6,171195558	1,13E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06787.1	-5,131424154	8,308656084	3,87E-09	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_06793.1	-5,002014113	8,267938121	5,21E-08	related_to_bile_acid_transporter
CPUR_04540.1	-4,985550386	4,144749688	0,000926168	uncharacterized_protein
CPUR_03569.1	-4,974317	4,625383898	0,012792271	uncharacterized_protein
CPUR_00570.1	-4,967547605	7,313986828	1,44E-08	uncharacterized_protein
CPUR_00860.1	-4,953778261	6,340777335	6,57E-06	related_to_long-chain-fatty-acid-CoA_ligase
CPUR_02595.1	-4,922667653	9,208936389	1,16E-09	related_to_PMU1_-_high_copy_suppressor_of_ts_tps2_mutant_phenotype
CPUR_01776.1	-4,883087497	7,890471265	9,43E-10	Alternative_oxidase_

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_01696.1	-4,862188663	4,371958141	1,97E-06	uncharacterized_protein
CPUR_08658.1	-4,84034059	8,034581262	1,15E-09	related_to_a_putative_low-affinity_copper_transport_protein
CPUR_00121.1	-4,828588051	6,848486105	1,52E-08	uncharacterized_protein
CPUR_02622.1	-4,699597697	7,257451283	4,22E-10	uncharacterized_protein
CPUR_04554.1	-4,69510881	4,774997093	7,08E-08	uncharacterized_protein
CPUR_08093.1	-4,66485212	5,443317797	3,31E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04807.1	-4,63672131	9,431355065	1,00E-08	uncharacterized_protein
CPUR_01647.1	-4,622641875	10,56966911	1,09E-07	Phosphate_permease_
CPUR_01592.1	-4,613145365	2,514746373	0,006368231	uncharacterized_protein
CPUR_07587.1	-4,591041037	6,473974863	5,84E-08	uncharacterized_protein
CPUR_05854.1	-4,584034046	3,173394364	0,034106874	uncharacterized_protein
CPUR_04555.1	-4,581706833	5,246207485	2,12E-09	uncharacterized_protein
CPUR_06705.1	-4,547387895	9,189101277	1,13E-07	Protein_tyrosine_phosphatase_
CPUR_06977.1	-4,535515877	6,435924792	0,003964651	Polygalacturonase_
CPUR_03085.1	-4,53415698	6,772281557	7,32E-05	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_05831.1	-4,519646256	8,492516236	7,09E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04556.1	-4,505065352	9,805367512	9,25E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03017.1	-4,503828101	8,53816996	0,000248974	uncharacterized_protein
CPUR_03026.1	-4,477855102	5,314594032	3,73E-07	uncharacterized_protein
CPUR_00387.1	-4,460240973	12,14987101	8,95E-05	probable_ALCOHOL_DEHYDROGENASE_I_-_ADH1
CPUR_07143.1	-4,455455822	5,823625273	2,22E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06318.1	-4,363503688	6,128722644	9,07E-05	uncharacterized_protein
CPUR_01091.1	-4,348482603	8,439822028	7,65E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06262.1	-4,322887528	12,56719657	6,41E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07807.1	-4,296322131	0,660433723	0,021397564	uncharacterized_protein
CPUR_06943.1	-4,289468113	9,423185079	1,20E-07	Putative_multicopperoxidase_
CPUR_00939.1	-4,233797306	6,711327224	3,88E-10	related_to_triacylglycerol_lipase_V_precursor
CPUR_06794.1	-4,222314714	9,834219909	1,53E-07	uncharacterized_protein
CPUR_00204.1	-4,196232003	9,737815551	2,05E-07	related_to_alkaline_phosphatase_D_precursor
CPUR_01093.1	-4,147933668	7,340611848	3,28E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04774.1	-4,140403391	3,898035654	0,008684753	uncharacterized_protein
CPUR_07401.1	-4,139613614	8,455355751	2,75E-07	Alpha-ketoglutarate-dependent_taurine_dioxygenase_
CPUR_00388.1	-4,13079711	8,697548793	2,64E-06	related_to_antioxidant_protein_and_metal_homeostasis_factor
CPUR_04691.2	-4,124126578	6,91830862	6,69E-05	uncharacterized_protein
CPUR_01588.1	-4,123956904	2,877159342	0,006368231	uncharacterized_protein
CPUR_05453.1	-4,118443588	1,965823717	0,024031462	uncharacterized_protein
CPUR_06942.1	-4,110431154	8,858226467	1,08E-06	Putative_iron_transferase_
CPUR_04945.1	-4,073285363	1,838912161	0,020251626	uncharacterized_protein
CPUR_06300.1	-4,05795157	9,389272374	2,29E-06	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_06301.1	-4,038178162	6,110845223	1,60E-09	uncharacterized_protein
CPUR_08150.1	-4,034721689	5,632508822	8,31E-09	uncharacterized_protein
CPUR_02456.1	-4,025852097	3,567593228	0,01062853	uncharacterized_protein
CPUR_07940.1	-4,001734766	4,863573831	0,000978688	uncharacterized_protein
CPUR_02272.1	-3,968109535	4,544164269	2,65E-05	related_to_S,pombe_pac2_protein
CPUR_01572.1	-3,964517142	6,453500596	2,01E-05	related_to_single-stranded_DNA-binding_protein_MSSP-1
CPUR_07109.1	-3,945602022	2,938227014	0,005418143	uncharacterized_protein
CPUR_03553.1	-3,935455994	5,922337163	7,54E-05	uncharacterized_protein
CPUR_08723.1	-3,935298383	3,817661428	0,001739043	uncharacterized_protein
CPUR_00082.1	-3,932781522	5,25754655	0,013497825	related_to_integral_membrane_protein_PTH11
CPUR_04293.1	-3,927323802	3,284412066	0,014851575	uncharacterized_protein
CPUR_04141.1	-3,904182711	6,086339867	6,29E-05	related_to_integral_membrane_protein_PTH11
CPUR_08536.1	-3,90103873	7,394829654	0,007287096	Endo-1,4-beta-xylanase_
CPUR_05525.1	-3,889093207	10,12487433	0,000211788	related_to_DDR48_-_heat_shock_protein
CPUR_05147.1	-3,883346316	4,907217333	3,84E-06	related_to_zinc_cluster_transcription_factor
CPUR_05156.1	-3,881228581	7,104407542	4,27E-08	related_to_major_facilitator_MirA
CPUR_00945.1	-3,831010737	8,794405266	0,000148495	probable_thioredoxin
CPUR_03084.1	-3,829267238	2,614572475	0,029354055	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_06795.1	-3,815720407	8,158538862	7,76E-07	uncharacterized_protein
CPUR_07495.1	-3,811760533	9,920230061	1,52E-05	related_to_sensor_protein_hoxX
CPUR_03554.1	-3,781519772	6,079463576	2,68E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00664.1	-3,768528768	8,74150838	6,19E-06	related_to_5`-nucleotidase_precursor
CPUR_02059.1	-3,756755719	7,017258627	3,72E-07	related_to_flavonol_synthase-like_protein
CPUR_02843.1	-3,736313933	6,753097076	0,001007206	probable_endochitinase_class_V_precursor
CPUR_00529.1	-3,722045497	5,964796437	1,38E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04160.1	-3,719526898	5,998792656	6,25E-08	uncharacterized_protein
CPUR_02521.1	-3,715773966	1,815926391	0,03596735	uncharacterized_protein
CPUR_03797.1	-3,702894974	6,67715703	1,24E-07	Glycerophosphoryl_diester_phosphodiesterase_family_protein_
CPUR_01529.1	-3,687509037	4,493541186	0,000255303	uncharacterized_protein
CPUR_06261.1	-3,674131866	8,839897394	3,04E-06	related_to_tripeptidyl-peptidase_I
CPUR_04796.1	-3,672419334	3,958127355	0,005457961	uncharacterized_protein
CPUR_07339.1	-3,66252843	4,007325411	0,002521396	uncharacterized_protein
CPUR_07367.1	-3,658843845	6,039855338	0,002247933	uncharacterized_protein
CPUR_03550.1	-3,650183288	7,487469425	0,007202166	3,4-dihydroxy-2-butanone_4-phosphate_synthase_
CPUR_05455.1	-3,633400875	7,581110055	8,75E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06233.1	-3,630423459	6,223999773	6,26E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06520.1	-3,625264407	3,342231956	0,009130798	uncharacterized_protein
CPUR_07770.1	-3,609700618	5,347452416	4,34E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02192.1	-3,587254082	6,906501187	3,24E-06	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_06814.1	-3,575420305	8,892718772	8,38E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04944.1	-3,559233091	3,143199973	0,020579933	uncharacterized_protein
CPUR_00643.1	-3,542151614	8,212350827	6,22E-06	probable_theta_class_glutathione_s-transferase
CPUR_06524.1	-3,533555143	7,68584229	2,18E-06	Swim_zinc_finger_domain_protein_
CPUR_06663.1	-3,527749744	8,724663952	1,32E-05	O-acetylhomoserin_(Thiol)-lyase_
CPUR_05921.1	-3,518023588	10,15514187	0,000396273	related_to_aldehyde_reductase
CPUR_04436.1	-3,514623482	3,541606756	0,012311649	related_to_DRPLA_protein
CPUR_07602.1	-3,51002799	6,506958207	5,47E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05746.1	-3,502852963	10,23625126	4,79E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07595.1	-3,494413533	6,006230486	7,77E-07	uncharacterized_protein
CPUR_05157.1	-3,489284745	5,862558149	0,000414211	related_to_enoyl-CoA_hydratase
CPUR_07600.1	-3,476292953	7,632662571	0,001863259	uncharacterized_protein
CPUR_02002.1	-3,471157244	4,508144105	0,002086188	uncharacterized_protein
CPUR_06982.1	-3,469311609	3,933317213	0,006625129	uncharacterized_protein
CPUR_00751.1	-3,464223444	4,568298339	0,006512316	probable_acetylxytan_esterase_precursor
CPUR_02034.1	-3,458559274	4,861749114	0,000679003	uncharacterized_protein
CPUR_04938.1	-3,431932912	2,284641512	0,036595455	probable_alpha-L-arabinofuranosidase
CPUR_02123.1	-3,421724214	7,449878721	2,98E-06	uncharacterized_protein
CPUR_00685.1	-3,408588746	5,761984732	0,001070251	related_to_hsp70_protein
CPUR_03057.1	-3,399513598	3,419192997	0,01367969	uncharacterized_protein
CPUR_07516.1	-3,39905468	6,608330871	4,08E-05	related_to_histidinol-phosphatase
CPUR_00486.1	-3,398551689	8,628184963	2,71E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06333.1	-3,396138027	9,10115861	0,000173989	uncharacterized_protein
CPUR_08151.1	-3,392848673	4,304236941	0,044646102	uncharacterized_protein
CPUR_08684.1	-3,391049128	3,918594658	0,039055927	uncharacterized_protein
CPUR_02457.1	-3,380487843	3,781272664	0,023050139	uncharacterized_protein
CPUR_02212.1	-3,346923431	6,541266687	8,55E-06	uncharacterized_protein
CPUR_02847.1	-3,334542707	4,855102941	0,008517623	uncharacterized_protein
CPUR_08481.1	-3,332139732	7,084173488	5,21E-06	related_to_cell_wall_mannoprotein
CPUR_06350.1	-3,322978731	6,976764378	8,90E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04027.1	-3,322455412	6,348228629	2,03E-05	Cation-transporting_ATPase_pma1_
CPUR_03757.1	-3,262905814	12,86933619	0,0002445	probable_pyruvate_decarboxylase
CPUR_07160.1	-3,251695935	4,416842944	0,001147468	uncharacterized_protein
CPUR_04400.1	-3,250960946	3,395627715	0,023697229	uncharacterized_protein
CPUR_08603.1	-3,239869988	4,143516959	0,032246859	uncharacterized_protein
CPUR_02323.1	-3,237453953	9,224137029	0,000285664	uncharacterized_protein
CPUR_05158.1	-3,232935186	5,090128613	0,000165808	related_to_multidrug_resistance_protein
CPUR_05832.1	-3,22029285	6,037809048	2,06E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04247.1	-3,218435032	5,816061956	5,92E-05	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_05798.1	-3,207942419	5,814098274	7,89E-06	uncharacterized_protein
CPUR_06499.1	-3,20478081	7,628908017	9,63E-05	Magnesium-translocating_P-type_ATPase_family_protein_
CPUR_00237.1	-3,19566333	7,475049607	0,002390473	related_to_vacuolar_membrane_protein_HMT1
CPUR_01646.1	-3,156216226	7,107926278	9,08E-06	uncharacterized_protein
CPUR_03778.1	-3,149530097	7,990741869	0,000167731	Sodium/phosphate_symporter,_putative_
CPUR_04695.1	-3,148388517	9,64160692	0,000110971	6-phosphofructokinase_
CPUR_02153.1	-3,147107081	9,832511492	0,000264717	uncharacterized_protein
CPUR_01797.1	-3,142434059	8,079323357	8,18E-05	uncharacterized_protein
CPUR_00859.1	-3,142020283	5,314233463	0,010241615	related_to_aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucB
CPUR_04158.1	-3,138535844	2,598509419	0,049728652	uncharacterized_protein
CPUR_04443.1	-3,135029832	4,170499947	0,027572175	related_to_DRPLA_protein
CPUR_01089.1	-3,133612916	6,062634523	2,03E-05	related_to_ECM32_-_DNA_dependent_ATPase/DNA_helicase_B
CPUR_02093.1	-3,130828212	6,265848685	2,40E-06	uncharacterized_protein
CPUR_06893.1	-3,125341218	8,327563665	0,00010863	probable_glucosamine-phosphate_N-acetyltransferase
CPUR_00989.1	-3,12214489	7,310383421	0,011289367	uncharacterized_protein
CPUR_08343.1	-3,10028839	5,753549057	1,50E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07430.1	-3,099267982	5,029122886	0,000105935	uncharacterized_protein
CPUR_06018.1	-3,09616289	6,896725854	0,002428435	uncharacterized_protein
CPUR_01243.1	-3,091729558	9,064901018	0,000300142	related_to_non-hemolytic_phospholipase_C_precursor
CPUR_01194.1	-3,087422983	3,882644123	0,013493099	uncharacterized_protein
CPUR_01155.1	-3,085034524	6,607227955	2,30E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06277.1	-3,082758885	4,860171846	0,000606042	related_to_threonine_dehydratase
CPUR_02736.1	-3,075534165	7,229216075	0,000323896	uncharacterized_protein
CPUR_07594.1	-3,074925222	7,88815198	0,001156072	uncharacterized_protein
CPUR_02211.1	-3,074116735	8,158553935	6,51E-05	Glucosamine_6-phosphate_synthetase_
CPUR_04444.1	-3,070495078	4,001460927	0,016627272	related_to_DRPLA_protein
CPUR_06762.1	-3,06436131	8,096763402	0,000146867	Carboxyphosphoenolpyruvate_phosphonomutase,_putative_
CPUR_03106.1	-3,056533913	6,623744419	0,000465337	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_05486.1	-3,05090581	7,223825299	2,03E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03776.1	-3,046317317	10,10450012	0,00017402	Thiol_peroxidase_
CPUR_04951.1	-3,042377713	10,50401881	0,002558377	uncharacterized_protein
CPUR_06367.1	-3,031062771	7,306046692	2,57E-05	related_to_nitrate_assimilation_regulatory_protein_nirA
CPUR_06051.1	-3,026751007	6,369096211	0,014899881	uncharacterized_protein
CPUR_03221.1	-3,015095005	6,900823506	0,00527765	uncharacterized_protein
CPUR_03275.1	-2,977339744	11,21135898	0,000323896	probable_heat_shock_protein_30
CPUR_02506.1	-2,977054617	8,405380675	0,002002534	uncharacterized_protein
CPUR_00095.1	-2,968209771	7,020456514	1,28E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04161.1	-2,950230053	4,434016741	0,003599484	uncharacterized_protein
CPUR_01507.1	-2,948000158	6,782101199	0,000355873	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_02735.1	-2,943549437	7,096112461	9,27E-05	probable_MUP1_-High_affinity_methionine_permease
CPUR_05141.1	-2,937459154	7,308957246	0,000780337	uncharacterized_protein
CPUR_08581.1	-2,925700938	8,741501147	0,001400337	related_to_ERO1_protein,_required_for_protein_disulfide_bond_formation_in_the_ER
CPUR_01800.1	-2,92437311	5,653914334	8,60E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05517.1	-2,918129449	4,87245879	0,001146562	uncharacterized_protein
CPUR_05680.1	-2,909331805	8,060707184	0,020579933	uncharacterized_protein
CPUR_01879.1	-2,891482219	7,673675247	0,000177283	related_to_GIT1_-Glycerophosphoinositol_transporter_also_able_to_mediate_low-affinity_phosphate_trans
CPUR_00803.1	-2,87676393	7,302486655	0,001905947	Branched-chain-amino-acid_aminotransferase_
CPUR_07551.1	-2,86409566	8,282683536	0,008191287	probable_protein_disulfide_isomerase-related_protein_A
CPUR_03024.1	-2,855644539	7,711068131	0,000165808	uncharacterized_protein
CPUR_04553.1	-2,854604187	5,811611098	6,96E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04811.1	-2,852512166	6,636679581	0,00284549	uncharacterized_protein
CPUR_07642.1	-2,847960755	10,00175676	0,000711786	related_to_mixed-linked_glucanase_precursor_MLG1
CPUR_00641.1	-2,836995134	5,127198017	0,000878497	uncharacterized_protein
CPUR_00667.1	-2,833008212	6,133475377	0,000276146	uncharacterized_protein
CPUR_04923.1	-2,832865283	4,960920207	0,0007242	uncharacterized_protein
CPUR_04120.1	-2,829373628	6,17050084	1,79E-05	related_to_peptide_transporter
CPUR_05499.1	-2,817973887	8,329107224	0,000495945	uncharacterized_protein
CPUR_04937.1	-2,816431124	6,844105344	2,57E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03396.1	-2,814622595	9,434329083	0,004368099	uncharacterized_protein
CPUR_03411.1	-2,81376634	9,093631636	0,007373633	uncharacterized_protein
CPUR_05014.1	-2,811668282	5,789542263	0,000500245	related_to_glucan_1,4-alpha-glucosidase
CPUR_05795.1	-2,804972569	6,619278503	0,000504505	uncharacterized_protein
CPUR_04579.1	-2,795005342	6,638167249	0,000948983	uncharacterized_protein
CPUR_06788.1	-2,786020665	6,630340207	3,76E-05	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_07802.1	-2,783109199	9,101704196	0,026061495	Asparagine_synthetase_
CPUR_08227.1	-2,781852762	8,119504554	0,000289875	probable_flavohemoglobin
CPUR_06804.1	-2,780636439	8,374754725	0,041956183	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_06316.1	-2,765437274	7,384429776	0,001070251	uncharacterized_protein
CPUR_08715.1	-2,754021387	6,712935389	5,10E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06421.1	-2,740812354	4,98072673	0,008455094	uncharacterized_protein
CPUR_04127.1	-2,737991269	4,840200294	0,001007206	Aminoglycoside_phosphotransferase_(Fragment)_
CPUR_00777.1	-2,737025292	6,218681903	0,004875971	related_to_RNA-3`-phosphate_cyclase_1
CPUR_02328.1	-2,734357808	8,265904635	0,003994192	related_to_15-hydroxyprostaglandin_dehydrogenase
CPUR_07707.1	-2,733621312	6,308721256	0,011560414	uncharacterized_protein
CPUR_06783.1	-2,728138578	4,218529928	0,016997533	probable_subtilisin-like_serine_protease
CPUR_06198.1	-2,716391282	3,725618052	0,040722656	uncharacterized_protein
CPUR_07688.1	-2,715156314	4,695172397	0,003956062	uncharacterized_protein
CPUR_01094.1	-2,698551442	6,961637208	7,81E-05	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_00642.1	-2,691653038	6,323032452	0,000211788	related_to_URE2_-_nitrogen_catabolite_repression_regulator
CPUR_01836.1	-2,672625216	8,857852008	0,002053715	uncharacterized_protein
CPUR_06272.1	-2,665842078	11,58451402	0,021970215	CCG-6_clock-controlled_protein_6_(ccg-6)
CPUR_06473.1	-2,662650842	6,920763163	0,000409441	related_to_siroheme_synthase_(Uroporphyrin-III_C-methyltransferase)
CPUR_02674.1	-2,654257583	4,29735632	0,030162756	uncharacterized_protein
CPUR_07452.1	-2,650607696	10,88998482	0,015455864	uncharacterized_protein
CPUR_01798.1	-2,649462789	8,957957911	0,000898167	uncharacterized_protein
CPUR_00913.1	-2,634277749	7,30805518	0,00189092	uncharacterized_protein
CPUR_06049.1	-2,633182471	8,078346833	0,035126008	uncharacterized_protein
CPUR_05834.1	-2,629447083	7,157369216	0,000504505	uncharacterized_protein
CPUR_08659.1	-2,627429929	6,770609002	9,78E-05	3-hydroxyanthranilate_3,4-dioxygenase_
CPUR_00240.1	-2,625651439	6,044624229	0,004678728	Pyridoxine_
CPUR_04855.1	-2,621821116	6,174707206	0,006330122	uncharacterized_protein
CPUR_07570.1	-2,616606102	6,763295158	0,000294432	Oligopeptide_transporter_OPT-like_protein_
CPUR_05105.1	-2,615276148	4,697746882	0,00492014	uncharacterized_protein
CPUR_06177.1	-2,614871914	6,043548487	0,000251634	uncharacterized_protein
CPUR_04961.1	-2,613119902	10,80123869	0,040536805	Heat_shock_protein_101_
CPUR_04183.1	-2,61021242	6,359240659	0,000233178	Sodium/phosphate_symporter,_putative_
CPUR_08660.1	-2,60784197	7,785227531	0,001147468	2-keto-4-pentenoate_hydratase_
CPUR_04789.1	-2,599642969	6,472184471	0,04729098	UDP-Glc/Gal_endoplasmic_reticulum_nucleotide_sugar_transporter_
CPUR_03415.1	-2,596442728	7,855800841	0,0007242	related_to_calcium-independent_phospholipase_A2
CPUR_03287.1	-2,593616902	7,574856777	0,002149588	Delta_1-pyrroline-5-carboxylate_dehydrogenase_
CPUR_06062.1	-2,582254885	5,765643795	0,000506518	related_to_malic_acid_transport_protein
CPUR_02391.1	-2,581096335	4,731285273	0,004875971	uncharacterized_protein
CPUR_00205.1	-2,575704317	6,505163464	0,000124357	uncharacterized_protein
CPUR_02675.1	-2,571528429	6,886563395	0,006278841	Efflux_pump_antibiotic_resistance_protein,_putative_
CPUR_03242.1	-2,560580067	5,499071734	0,000439801	uncharacterized_protein
CPUR_04795.1	-2,549613936	5,504529857	0,003956062	uncharacterized_protein
CPUR_04111.1	-2,54774746	7,451388586	0,004180868	related_to_peptide_transporter
CPUR_01125.1	-2,54574238	9,083225806	0,016997533	related_to_malate_dehydrogenase_(oxaloacetate-decarboxylating)_(NADP+)
CPUR_03755.1	-2,53949971	7,719903554	0,001112447	related_to_uroporphyrinogen_III_synthase
CPUR_05394.1	-2,525033245	4,410624063	0,014477887	uncharacterized_protein
CPUR_00823.1	-2,522241286	7,907754563	0,004218959	uncharacterized_protein
CPUR_07687.1	-2,511345046	4,489662094	0,027810549	uncharacterized_protein
CPUR_03549.1	-2,510535823	6,909587142	0,024769612	Hexaprenyldihydroxybenzoate_methyltransferase_
CPUR_06050.1	-2,507314951	6,294830893	0,037814612	uncharacterized_protein
CPUR_06527.1	-2,498121241	6,536675844	0,002013196	related_to_hsp70_protein
CPUR_08159.1	-2,495722655	5,776604121	0,004352526	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_03859.1	-2,492214392	8,015141674	0,002037386	related_to_kinetoplast-associated_protein_KAP

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_04131.1	-2,481038656	7,707669374	0,003197705	related_to_sterol_delta_5,6-desaturase
CPUR_07322.1	-2,480816797	5,02615248	0,00194453	uncharacterized_protein
CPUR_02087.1	-2,477407224	4,626173494	0,008578408	uncharacterized_protein
CPUR_01462.1	-2,473599468	6,060365314	0,000343737	probable_potassium_transporter_TRK-1
CPUR_04057.1	-2,472026339	4,572064115	0,010350937	uncharacterized_protein
CPUR_00143.1	-2,456083167	7,466045719	0,001111873	uncharacterized_protein
CPUR_05822.1	-2,449293542	6,011335702	0,000691434	uncharacterized_protein
CPUR_03989.1	-2,449146318	7,381874251	0,001580526	related_to_mouse_T10_protein
CPUR_04539.1	-2,446951994	4,030083647	0,04919755	uncharacterized_protein
CPUR_05180.1	-2,44584319	7,781290142	0,001791149	Vacuolar_transporter_chaperone_4_
CPUR_01653.1	-2,4382875	6,231287115	0,003004429	related_to_protein_MCH2_(monocarboxylate_permease_homolog)
CPUR_06377.1	-2,429262284	6,437480408	0,001568102	uncharacterized_protein
CPUR_05368.1	-2,418234848	7,995791797	0,017556897	uncharacterized_protein
CPUR_06474.1	-2,415233795	4,935574574	0,017556897	uncharacterized_protein
CPUR_03251.1	-2,414446884	5,706372813	0,02420066	related_to_SLS1_protein_precursor
CPUR_00203.1	-2,411125526	6,743763175	0,000323896	uncharacterized_protein
CPUR_05106.1	-2,406808548	6,102099399	0,000341145	uncharacterized_protein
CPUR_06782.1	-2,402354609	5,550506026	0,001347204	uncharacterized_protein
CPUR_00773.1	-2,389570858	9,858316391	0,021319111	uncharacterized_protein
CPUR_02593.1	-2,383305831	4,919877131	0,023436686	uncharacterized_protein
CPUR_06483.1	-2,380764198	8,417583962	0,012531913	Phosphoadenosine_phosphosulfate_reductase_
CPUR_07509.1	-2,380356004	8,107105211	0,004341643	uncharacterized_protein
CPUR_06002.1	-2,379726341	6,864843217	0,000948983	related_to_pyrazinamidase/nicotinamidase
CPUR_02015.1	-2,378865756	8,390932987	0,002705342	related_to_cytosolic_nonspecific_dipeptidase
CPUR_03543.1	-2,370672288	7,60554062	0,003634077	Arrestin_domain-containing_protein_
CPUR_01542.1	-2,369656249	7,034410435	0,001257911	uncharacterized_protein
CPUR_04211.1	-2,364554754	7,261980107	0,001806269	uncharacterized_protein
CPUR_04420.1	-2,363350064	5,482721441	0,002298824	uncharacterized_protein
CPUR_01353.1	-2,36256201	4,868568879	0,032837631	uncharacterized_protein
CPUR_03558.1	-2,359135069	6,176673519	0,003074585	related_to_CCC2_-_P-type_ATPase_involved_in_export_of_Cu++_from_the_cytosol_into_intracellular,_secret
CPUR_05060.1	-2,356322955	7,192945541	0,001294452	related_to_pyridoxamine-phosphate_oxidase
CPUR_07201.1	-2,353739495	8,903975575	0,040215508	related_to_G1/S-specific_cyclin_pas1
CPUR_06482.1	-2,350020392	7,778616158	0,002786836	Phosphoserine_phosphatase_
CPUR_03557.1	-2,349101348	7,917554329	0,005256105	related_to_MET10_-_sulfite_reductase_flavin-binding_subunit
CPUR_02606.1	-2,348870204	5,164312813	0,003164299	uncharacterized_protein
CPUR_00559.1	-2,346874988	9,68990772	0,006330122	uncharacterized_protein
CPUR_07366.1	-2,343461064	5,097122993	0,02930381	uncharacterized_protein
CPUR_04535.1	-2,342765344	6,748096506	0,000562332	uncharacterized_protein
CPUR_03058.1	-2,322896088	6,95519011	0,001069268	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_01674.1	-2,317206665	7,371338908	0,002902993	BolA_domain_protein_
CPUR_07044.1	-2,316740227	7,610228184	0,022937955	related_to_acyl-coenzyme_A:6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase_precursor
CPUR_06349.1	-2,312783802	6,732600913	0,000800271	Histone-lysine_N-methyltransferase,_H3_lysine-79_specific_
CPUR_02835.1	-2,308640188	6,085952991	0,003317955	related_to_para-aminobenzoic_acid_synthetase
CPUR_01086.1	-2,293303727	5,100140183	0,004218959	uncharacterized_protein
CPUR_01138.1	-2,291397769	6,114688844	0,003956062	uncharacterized_protein
CPUR_03471.1	-2,285959166	5,092001296	0,00712883	uncharacterized_protein
CPUR_04165.1	-2,285816479	5,375711594	0,015626498	probable_subtilisin-like_serine_protease
CPUR_08618.1	-2,284349383	4,887904183	0,010618649	uncharacterized_protein
CPUR_08342.1	-2,280618813	5,777358189	0,000959937	Phosphate_transporter_
CPUR_04173.1	-2,280082428	5,830777109	0,017686804	uncharacterized_protein
CPUR_00713.1	-2,279985787	6,211318494	0,003016381	4F5_domain_protein_
CPUR_02074.1	-2,279566524	6,571288213	0,002338215	uncharacterized_protein
CPUR_03100.1	-2,278091561	4,694768374	0,013488106	uncharacterized_protein
CPUR_01118.1	-2,263505273	7,426320622	0,004566342	uncharacterized_protein
CPUR_01697.1	-2,263184542	7,273361581	0,032246859	Homoserine_kinase_
CPUR_07433.1	-2,259018451	7,157111427	0,001739043	related_to_1-phosphatidylinositol_phosphodiesterase_precursor
CPUR_03060.1	-2,254454195	5,183147337	0,021607197	uncharacterized_protein
CPUR_02566.1	-2,251321626	6,986694201	0,001234612	uncharacterized_protein
CPUR_08242.1	-2,249144669	4,466309791	0,034642057	uncharacterized_protein
CPUR_03025.1	-2,244202511	6,340007092	0,001000375	uncharacterized_protein
CPUR_00268.1	-2,243408794	5,512717299	0,003352138	uncharacterized_protein
CPUR_06034.1	-2,207326933	6,398204278	0,003988566	probable_histidinol-phosphate_transaminase
CPUR_07365.1	-2,197811833	6,945680624	0,035446158	uncharacterized_protein
CPUR_00938.1	-2,193116444	6,795780263	0,001411321	K,_P-type_ATPase_(mediates_high-affinity_potassium_or_sodium_uptake)
CPUR_06329.1	-2,189646057	4,873445033	0,036340903	related_to_amidohydrolase_family_protein
CPUR_00021.1	-2,18704241	5,562136059	0,003519161	uncharacterized_protein
CPUR_04543.1	-2,183583207	5,798175344	0,009378423	uncharacterized_protein
CPUR_02922.1	-2,177560399	5,862022739	0,002786836	uncharacterized_protein
CPUR_07073.1	-2,174585875	5,77440166	0,00189092	related_to_transcription_factor_medusa
CPUR_04638.1	-2,174332377	6,782685693	0,014877533	Uncharacterized_protein_
CPUR_02926.1	-2,165804374	6,488203868	0,001640454	related_to_heterokaryon_incompatibility_protein
CPUR_04251.1	-2,165729051	5,672954981	0,010589525	polyketide_synthase
CPUR_00963.1	-2,159797736	6,348080283	0,003447503	probable_cell_wall_protein_UTR2
CPUR_03289.1	-2,159705982	5,893254748	0,003197705	uncharacterized_protein
CPUR_05503.1	-2,157689708	5,657010054	0,003176459	uncharacterized_protein
CPUR_05516.1	-2,154036953	6,710685597	0,005904182	uncharacterized_protein
CPUR_00873.1	-2,152757767	6,566602485	0,00910518	uncharacterized_protein
CPUR_08107.1	-2,138856366	7,554235874	0,008684753	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_06201.1	-2,133621966	5,753113452	0,002437128	uncharacterized_protein
CPUR_03556.1	-2,131379283	5,054655366	0,029354055	Sarcosine_oxidase_
CPUR_01617.1	-2,121510133	6,886272383	0,005207198	Squalene_epoxidase_
CPUR_04441.1	-2,115936978	6,106198883	0,003631596	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_03565.1	-2,115105051	6,837214782	0,005764777	non-ribosomal_peptide_synthetase
CPUR_06180.1	-2,111990882	5,370368438	0,006790848	uncharacterized_protein
CPUR_07165.1	-2,111468042	6,173721858	0,036743931	related_to_DHA14-like_major_facilitator_efflux_transporter
CPUR_06632.1	-2,10536466	7,059419085	0,007483242	probable_acetylornithine_aminotransferase_precursor
CPUR_00651.1	-2,094714777	6,044593075	0,020098365	Purine_transporter_
CPUR_01945.1	-2,09186123	7,339448418	0,007024021	Transporter_ATM1_
CPUR_06060.1	-2,083324223	8,841974021	0,022876727	C-4_sterol_methyl_oxidase_
CPUR_03620.1	-2,075550358	5,459282759	0,005372341	uncharacterized_protein
CPUR_03078.1	-2,065794405	4,976079585	0,021970215	uncharacterized_protein
CPUR_05351.1	-2,060229771	8,245086198	0,02255662	uncharacterized_protein
CPUR_03092.1	-2,057185856	4,830271757	0,021970215	uncharacterized_protein
CPUR_06661.1	-2,054587734	8,624214004	0,013362587	related_to_rna-binding_protein_fus/tls
CPUR_04988.1	-2,054461791	5,498112531	0,019316	related_to_nitrate_assimilation_regulatory_protein_nirA
CPUR_00761.1	-2,052321879	5,897905645	0,004423098	uncharacterized_protein
CPUR_05487.1	-2,048671097	7,33650181	0,018138562	uncharacterized_protein
CPUR_00901.1	-2,020370794	5,846052608	0,019704739	related_to_polyamine_oxidase_precursor
CPUR_07214.1	-2,013844193	4,738733373	0,040150734	uncharacterized_protein
CPUR_05804.1	-2,013598433	5,084850688	0,03213925	uncharacterized_protein
CPUR_01383.1	-2,002015622	6,61438937	0,004646554	uncharacterized_protein
CPUR_06285.1	-2,000886448	6,403376647	0,017717582	uncharacterized_protein
CPUR_05365.1	-1,998147718	9,378434256	0,024309345	related_to_glucan_1,3-beta-glucosidase
CPUR_08727.1	-1,993336466	8,64442948	0,020982605	uncharacterized_protein
CPUR_06779.1	-1,983956142	5,351901226	0,02420066	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_08692.1	-1,981890833	7,91307876	0,02614895	uncharacterized_protein
CPUR_03546.1	-1,98033694	8,270876039	0,044121969	probable_vivid_PAS_protein_VVD
CPUR_07090.1	-1,979346871	6,886352894	0,007285262	uncharacterized_protein
CPUR_02302.1	-1,978643694	5,655123808	0,01258102	uncharacterized_protein
CPUR_06066.1	-1,973517087	5,381126898	0,018148535	uncharacterized_protein
CPUR_08305.1	-1,967242773	5,748514123	0,019561211	related_to_PUF3_-_transcript-specific_regulator_of_mRNA_degradation
CPUR_02616.1	-1,966918662	7,902662465	0,027572175	Myo-inositol-phosphate_synthase_
CPUR_00432.1	-1,963405339	6,910305051	0,00610503	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_07586.1	-1,961522542	7,985180446	0,0187201	uncharacterized_protein
CPUR_07685.1	-1,960218574	6,306653107	0,007203053	Formyltetrahydrofolate_deformylase_
CPUR_08351.1	-1,96000477	7,469361081	0,017961367	related_to_myc-type_bHLH_transcription_factor
CPUR_08662.1	-1,954914771	5,625641159	0,037852121	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_06729.1	-1,952691113	5,285187192	0,028486357	uncharacterized_protein
CPUR_08824.1	-1,944629204	6,300499319	0,009390967	uncharacterized_protein
CPUR_06813.1	-1,940560814	6,267762137	0,016788274	uncharacterized_protein
CPUR_01561.1	-1,935667022	6,65356587	0,036241913	Deoxyhypusine_hydroxylase_
CPUR_04560.1	-1,927392738	5,882201865	0,010055608	related_to_nonribosomal_peptide_synthetase_MxcG_(component_of_the_myxochelin_iron_transport_regulon)
CPUR_02472.1	-1,92251103	5,506626683	0,048746509	related_to_RNA_polymerase_II_holoenzyme/mediator_subunit
CPUR_01241.1	-1,919612621	5,017288314	0,027729381	uncharacterized_protein
CPUR_03517.1	-1,918917886	5,474822592	0,019190773	uncharacterized_protein
CPUR_05686.1	-1,915423407	7,117622655	0,039862867	uncharacterized_protein
CPUR_01532.1	-1,910648559	7,348801592	0,02604928	uncharacterized_protein
CPUR_04718.1	-1,909188567	6,328572074	0,014112544	related_to_D-arabinono-1,4-lactone_oxidase
CPUR_04243.1	-1,907128747	6,398166471	0,023709641	related_to_fluconazole_resistance_protein_(FLU1)
CPUR_07704.1	-1,90481353	5,786522848	0,008455094	uncharacterized_protein
CPUR_06200.1	-1,885922012	6,393014374	0,011473534	uncharacterized_protein
CPUR_01738.1	-1,879090406	5,064978012	0,030280037	uncharacterized_protein
CPUR_00540.1	-1,878010043	7,216313708	0,020251626	Fumarate_hydratase_
CPUR_02092.1	-1,877773448	8,727654274	0,032246859	uncharacterized_protein
CPUR_02705.1	-1,877471004	5,812440272	0,024851235	uncharacterized_protein
CPUR_04480.1	-1,873223137	8,136306001	0,02715969	uncharacterized_protein
CPUR_06607.1	-1,865757186	7,805619607	0,023709641	uncharacterized_protein
CPUR_07769.1	-1,862883211	4,994276858	0,044673404	uncharacterized_protein
CPUR_05682.1	-1,858707156	5,130490848	0,040203848	uncharacterized_protein
CPUR_04616.1	-1,858340014	6,137062177	0,021665427	related_to_glu/asp-tRNA_amidotransferase_subunit_A
CPUR_06653.1	-1,857964417	4,783498588	0,046262077	related_to_cholinesterase
CPUR_06904.1	-1,846708653	7,068913222	0,014516664	uncharacterized_protein
CPUR_04694.1	-1,841499029	5,827236822	0,01204499	uncharacterized_protein
CPUR_03952.1	-1,830975536	5,541688126	0,021157122	uncharacterized_protein
CPUR_08482.1	-1,805393178	6,302096137	0,015380656	uncharacterized_protein
CPUR_06213.1	-1,785727717	8,445123074	0,045635482	uncharacterized_protein
CPUR_02965.1	-1,763416481	5,314038357	0,044069689	uncharacterized_protein
CPUR_04427.1	-1,761776581	7,283023035	0,025030599	uncharacterized_protein
CPUR_08456.1	-1,75946896	4,981736968	0,046509675	uncharacterized_protein
CPUR_01015.1	-1,75912238	6,231399066	0,016717832	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_06920.1	-1,758016465	5,273249416	0,040393821	uncharacterized_protein
CPUR_04220.1	-1,752771556	6,974769838	0,021970215	related_to_BCS1_protein_precursor
CPUR_02122.1	-1,738256874	7,06141632	0,02331432	uncharacterized_protein
CPUR_02697.1	-1,735393788	6,061587745	0,025435364	uncharacterized_protein
CPUR_00652.1	-1,727588595	7,758132787	0,049460965	uncharacterized_protein
CPUR_05179.1	-1,720752587	6,155268972	0,019941057	related_to_protein-arginine_N-methyltransferase

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_04432.1	-1,720140713	5,947089744	0,019598012	uncharacterized_protein
CPUR_05518.1	-1,719575189	6,566839317	0,043582602	uncharacterized_protein
CPUR_07588.1	-1,712234775	6,538233565	0,040267938	uncharacterized_protein
CPUR_07450.1	-1,706537025	6,38843587	0,025834825	uncharacterized_protein
CPUR_03055.1	-1,699324724	7,728109715	0,045173407	uncharacterized_protein
CPUR_04779.1	-1,696593148	5,947262222	0,049064995	uncharacterized_protein
CPUR_08630.1	-1,674832339	6,756589218	0,034161398	Branched-chain-amino-acid_aminotransferase_
CPUR_04312.1	-1,668803083	6,593519388	0,037087555	Amino_acid_permease,_putative_
CPUR_01549.1	-1,6687305	5,896293404	0,027729381	uncharacterized_protein
CPUR_00522.1	-1,664173366	7,274675759	0,048601365	uncharacterized_protein
CPUR_03618.1	-1,658760353	6,494652771	0,04450567	uncharacterized_protein
CPUR_03115.1	-1,657819049	6,074862386	0,029947571	related_to_acid_sphingomyelinase
CPUR_06480.1	-1,656032583	6,518312458	0,024729263	related_to_ERF2_-_protein_involved_in_palmitoylation_and_localization_of_Ras2p
CPUR_02726.1	-1,633222323	6,202441472	0,048263131	related_to_pathway-specific_regulatory_protein_nit-4
CPUR_05687.1	-1,630446276	6,648471877	0,044646102	uncharacterized_protein
CPUR_02721.1	-1,625228635	6,839535279	0,029354055	Threonine_ammonia-lyase_
CPUR_06741.1	-1,622746465	6,830669761	0,039179626	uncharacterized_protein
CPUR_06263.1	-1,612299757	7,21905547	0,045173407	uncharacterized_protein
CPUR_01107.1	-1,599891931	5,893122813	0,035130617	uncharacterized_protein
CPUR_04353.1	-1,594735289	6,652004603	0,034106874	related_to_phenol_2-monooxygenase
CPUR_07411.1	-1,594186051	6,13117373	0,036241913	uncharacterized_protein
CPUR_00348.1	-1,589732661	5,902870223	0,042169601	related_to_LTE1_GDP/GTP_exchange_factor
CPUR_00297.1	-1,570539323	6,125862153	0,044646102	uncharacterized_protein
CPUR_03068.1	-1,551912185	6,856077436	0,040203848	uncharacterized_protein
CPUR_02621.1	-1,540527155	6,618260712	0,04201332	UDP-glucose_6-dehydrogenase_
CPUR_00767.1	1,531973026	6,420731711	0,044617987	uncharacterized_protein
CPUR_08115.1	1,534696259	6,733115527	0,040940873	AAA_family_ATPase_
CPUR_08531.1	1,538510776	6,708275304	0,041220693	related_to_D-mandelate_dehydrogenase
CPUR_04016.1	1,562030911	6,52150632	0,041220693	uncharacterized_protein
CPUR_04737.1	1,574394553	6,443099211	0,04363067	uncharacterized_protein
CPUR_01134.1	1,581619061	5,886321779	0,036949926	uncharacterized_protein
CPUR_03820.1	1,592076002	7,020813353	0,040722656	Inosine_triphosphate_pyrophosphatase_
CPUR_00499.1	1,593856604	6,384105369	0,031670922	uncharacterized_protein
CPUR_00213.1	1,598463251	7,17346479	0,047391626	uncharacterized_protein
CPUR_03947.1	1,617693081	6,140798883	0,044121969	Steroid_alpha_reductase_family_protein_
CPUR_06603.1	1,619493876	6,77939104	0,027669948	2-methylcitrate_dehydratase_
CPUR_05952.1	1,623062163	6,762773213	0,028608874	Dicarboxylic_amino_acid_permease_
CPUR_01490.1	1,632633773	5,913332143	0,027439911	uncharacterized_protein
CPUR_00259.1	1,63796964	5,699031025	0,030174635	Putative_uncharacterized_protein_

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_07837.1	1,643368609	7,075704578	0,033963591	probable_homocitrate_synthase,_mitochondrial_precursor
CPUR_08310.1	1,646132634	6,345919819	0,041288022	60S_acidic_ribosomal_protein_P0,_putative_
CPUR_08566.1	1,647847665	7,104097122	0,034986953	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_05857.1	1,654392044	7,574294858	0,048084228	uncharacterized_protein
CPUR_04236.1	1,655311469	6,312876365	0,04523439	related_to_peroxin-11
CPUR_01727.1	1,657918157	5,80244889	0,042169601	Cytochrome_b5,_putative_
CPUR_06890.1	1,662966428	5,690637644	0,046509675	related_to_n-alkane-inducible_cytochrome_P450
CPUR_01858.1	1,672929433	6,613100328	0,022286037	related_to_galactokinase
CPUR_01992.1	1,678001663	6,564775978	0,036751149	uncharacterized_protein
CPUR_06472.1	1,689478012	5,95958062	0,025717942	probable_RSM22_-_mitochondrial_ribosomal_protein,_small_subunit
CPUR_07559.1	1,690949951	7,324751661	0,03768765	MFS_transporter_
CPUR_00552.1	1,694279738	5,222345432	0,047795577	uncharacterized_protein
CPUR_02193.1	1,696800712	6,115920896	0,039179626	High_affinity_methionine_permease_
CPUR_03641.1	1,705080206	7,288304632	0,032246859	Succinate-semialdehyde_dehydrogenase_NADP_
CPUR_05290.1	1,711548439	5,763784767	0,025714583	related_to_helicases
CPUR_01453.1	1,712291022	6,832687679	0,04870522	uncharacterized_protein
CPUR_05227.1	1,720346555	6,16205896	0,036315236	Ammonium_permease_MepC_
CPUR_08523.1	1,721719464	6,637706288	0,032355873	related_to_single-stranded_DNA_binding_protein_12k_chain
CPUR_04835.1	1,726179703	6,810012938	0,039650158	uncharacterized_protein
CPUR_02143.1	1,729621117	7,047360109	0,025261492	Amidase_protein_
CPUR_07077.1	1,750370002	6,018259574	0,017521249	probable_acetyl-CoA_C-acyltransferase,_peroxisomal
CPUR_07580.1	1,752969217	7,096091083	0,022685272	uncharacterized_protein
CPUR_03509.1	1,755081399	5,279676676	0,037766557	2-oxoisovalerate_dehydrogenase_beta_subunit_
CPUR_05728.1	1,758064541	5,117758891	0,04201332	uncharacterized_protein
CPUR_02254.1	1,766610441	6,384828197	0,024073129	uncharacterized_protein
CPUR_07039.1	1,766639383	6,27647318	0,027572175	related_to_transcriptional_repressor
CPUR_03126.1	1,781099119	8,711534259	0,040203848	uncharacterized_protein
CPUR_04815.1	1,785031235	6,202486492	0,032099386	uncharacterized_protein
CPUR_06440.1	1,785056113	6,903258848	0,037538363	Zinc-binding_alcohol_dehydrogenase,_putative_
CPUR_07641.1	1,786296761	7,43869811	0,040203848	uncharacterized_protein
CPUR_01200.1	1,790532571	5,932315132	0,031906382	related_to_P_glauca_late_embryogenesis_abundant_protein_and_YBR177c_and_YPL095c
CPUR_03899.1	1,791154246	8,198665888	0,036221666	uncharacterized_protein
CPUR_07498.1	1,793669466	5,824439303	0,014211692	related_to_protein-tyrosine_phosphatase
CPUR_06222.1	1,798925401	5,177349198	0,036340903	uncharacterized_protein
CPUR_04767.1	1,800156654	8,396182927	0,044630136	Glutamate_5-kinase_
CPUR_03572.1	1,805056022	6,025939157	0,022331951	uncharacterized_protein
CPUR_01214.1	1,806470791	7,6967983	0,028274538	related_to_methionine_adenosyltransferase_regulatory_beta_subunit
CPUR_01528.1	1,807917039	6,619664241	0,021952799	uncharacterized_protein
CPUR_07757.1	1,808664768	6,445067247	0,022283114	Class_2_chitin_synthase_

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_00018.1	1,810157194	5,893883785	0,027729381	related_to_triacylglycerol_lipase
CPUR_00723.1	1,813108272	5,167528181	0,040482416	related_to_alpha-N-arabinofuranosidase/_alpha-L-arabinofuranosidase
CPUR_03938.1	1,81370015	6,460267804	0,016704039	related_to_aldose_1-epimerase
CPUR_07628.1	1,814163889	6,827669263	0,01149942	related_to_molybdopterin_biosynthesis_protein
CPUR_08143.1	1,81722135	7,611529747	0,032837631	uncharacterized_protein
CPUR_00738.1	1,81913294	5,998701052	0,033757162	related_to_acetylhydrolase
CPUR_00233.1	1,824345101	6,607063679	0,021397564	uncharacterized_protein
CPUR_07725.1	1,825583899	10,6100611	0,043582602	Perilipin_MPL1-like_protein_
CPUR_05384.1	1,827182667	6,212382845	0,024197681	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_02868.1	1,827846066	5,486053666	0,04201332	uncharacterized_protein
CPUR_06149.1	1,848350642	5,527168696	0,023848826	uncharacterized_protein
CPUR_05139.1	1,853490528	6,153791806	0,020289842	probable_isovaleryl-CoA_dehydrogenase
CPUR_04095.1	1,855592363	7,544611325	0,04201332	uncharacterized_protein
CPUR_00928.1	1,857232149	5,943153743	0,011953489	uncharacterized_protein
CPUR_02608.1	1,863894548	6,767790086	0,036751149	uncharacterized_protein
CPUR_06292.1	1,864740202	6,961407496	0,010833377	uncharacterized_protein
CPUR_03795.1	1,866201041	5,778625214	0,021747781	Amine_oxidase_
CPUR_06410.1	1,866987831	5,480614187	0,019037247	uncharacterized_protein
CPUR_00920.1	1,870460678	9,760112251	0,040378616	Vacuolar_protease_A_
CPUR_01196.1	1,875245359	7,018994465	0,0121146	Plasma_membrane_proteolipid_3_
CPUR_04563.1	1,877453762	6,347824245	0,010740616	Vitamin_B6_transporter,_putative_
CPUR_04023.1	1,883414424	8,906771649	0,0493322	related_to_non-ribosomal_peptide_synthetase
CPUR_05411.1	1,885398095	5,514903169	0,019598012	uncharacterized_protein
CPUR_02251.1	1,891504036	8,339743457	0,034181728	uncharacterized_protein
CPUR_05208.1	1,89500033	6,402003744	0,015604788	uncharacterized_protein
CPUR_08193.1	1,903351242	4,89318472	0,04503564	uncharacterized_protein
CPUR_05376.1	1,906312599	5,109710239	0,023532105	uncharacterized_protein
CPUR_04572.1	1,906639303	8,441081682	0,027974338	related_to_class_I_alpha-mannosidase_1B
CPUR_03897.1	1,909910244	5,993985245	0,015285817	related_to_RIS1_-_similarity_to_RAD5_protein
CPUR_01423.1	1,912933277	5,833980739	0,036595455	related_to_gibberellin_20-oxidase
CPUR_04224.1	1,916314749	8,045739796	0,024690857	related_to_growth_regulation_protein_WHI2
CPUR_06020.1	1,91632067	7,086456856	0,017842339	related_to_chitinase
CPUR_05430.1	1,917621719	7,656092511	0,022331951	uncharacterized_protein
CPUR_04950.1	1,919957662	5,286925136	0,018672975	probable_nitrate_transport_protein_crnA
CPUR_00816.1	1,925293076	7,864895245	0,021148933	3-ketoacyl-CoA_thiolase_
CPUR_03406.1	1,926540977	7,424698436	0,032348623	uncharacterized_protein
CPUR_07883.1	1,937092585	9,367316512	0,033092115	Putative_bZip_transcription_factor_
CPUR_01280.1	1,946486007	5,094915106	0,022685272	uncharacterized_protein
CPUR_08192.1	1,950497695	8,39253249	0,032837631	Fumarate_reductase_Osm1,_putative_

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_05375.1	1,955028448	6,604274657	0,01284046	uncharacterized_protein
CPUR_01081.1	1,961250111	8,169005065	0,024093829	Saccharopine_dehydrogenase_
CPUR_06022.1	1,967435797	6,575251059	0,00718561	uncharacterized_protein
CPUR_03330.1	1,967900789	7,560110313	0,032246859	Dipeptidyl_peptidase_
CPUR_06153.1	1,969177847	6,549976153	0,006368452	uncharacterized_protein
CPUR_05091.1	1,979503203	6,179935889	0,012564233	Putative_peroxisomal_membrane_protein_PMP47B_
CPUR_01497.1	1,988093001	4,652586082	0,04064175	uncharacterized_protein
CPUR_03039.1	1,990470328	5,514730964	0,008806887	related_to_TRI13_-_cytochrome_P450
CPUR_02758.1	1,990832799	6,604300654	0,030553593	Arginine_permease,_putative_
CPUR_05138.1	1,995817293	7,15655189	0,008467082	D-arabinitol_dehydrogenase_ArbD,_putative_
CPUR_07682.1	1,99938695	10,53832312	0,023168973	related_to_diacylglycerol_pyrophosphate_phosphatase_DPP1
CPUR_00433.1	2,000577183	6,583876626	0,03123071	uncharacterized_protein
CPUR_05348.1	2,007980003	4,592046695	0,040150734	uncharacterized_protein
CPUR_01940.1	2,010305698	6,768023128	0,027658551	uncharacterized_protein
CPUR_08389.1	2,010862507	6,680479356	0,009208078	related_to_glutathione_S-transferase
CPUR_05114.1	2,011869438	6,003366432	0,005711452	uncharacterized_protein
CPUR_06778.1	2,018938563	8,704421026	0,020784895	Acetyl-CoA_carboxylase_
CPUR_01701.1	2,019142216	6,147904141	0,003519161	uncharacterized_protein
CPUR_04295.1	2,027541641	6,399274997	0,019941057	uncharacterized_protein
CPUR_08642.1	2,029224587	5,595924189	0,016164852	NADPH-dependent_D-xylose_reductase_
CPUR_07526.1	2,034705173	7,31114667	0,008080893	Lysine_amidinotransferase_
CPUR_04489.1	2,036251439	6,548034604	0,010195746	related_to_triacylglycerol_lipase
CPUR_04200.1	2,043722109	6,6415743	0,00570904	Fe-containing_alcohol_dehydrogenase,_putative_
CPUR_01289.1	2,04487296	7,084965958	0,00510306	related_to_SUC2_-_invertase_(sucrose_hydrolyzing_enzyme)
CPUR_04311.1	2,058316485	6,200510134	0,025834825	related_to_alpha-glucosidase_b
CPUR_04196.1	2,058787137	5,672785087	0,019301074	2-oxoisovalerate_dehydrogenase_alpha_subunit_
CPUR_00037.1	2,064770554	8,330896946	0,044994151	uncharacterized_protein
CPUR_05500.1	2,067308282	6,924649947	0,036743931	uncharacterized_protein
CPUR_03082.1	2,07851495	7,041157667	0,012291771	related_to_aerobactin_siderophore_biosynthesis_protein_iucB
CPUR_04497.1	2,08588177	4,701265881	0,048425453	related_to_vegetatible_incompatibility_protein_HET-E-1
CPUR_02128.1	2,086973817	5,023253228	0,017417297	uncharacterized_protein
CPUR_02132.1	2,090910124	5,330536087	0,007034858	uncharacterized_protein
CPUR_06023.1	2,105020792	7,670471104	0,010336902	related_to_kynureninase
CPUR_07300.1	2,106519761	6,739311032	0,002600268	Translation_initiation_factor_RLI1_
CPUR_03151.1	2,107634797	5,70755633	0,008418917	uncharacterized_protein
CPUR_08318.1	2,107916454	7,303883087	0,007156696	uncharacterized_protein
CPUR_07360.1	2,111567367	4,865980386	0,014657435	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_03110.1	2,111737605	6,014968352	0,008578408	Biotin_synthase,_putative_
CPUR_08544.1	2,115137748	5,691622401	0,006516544	related_to_monocarboxylate_transporter_2

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_07075.1	2,117563535	5,654269767	0,004116937	P-type_Na+-ATPase_
CPUR_08184.1	2,124763492	7,128866459	0,009354673	uncharacterized_protein
CPUR_03788.1	2,125149305	6,146508695	0,00986957	related_to_fluconazole_resistance_protein
CPUR_04653.1	2,136487558	7,329508835	0,006905153	related_to_putative_C2H2_zinc_finger_protein_flbC
CPUR_01312.1	2,137524944	8,6829597	0,012230747	related_to_ACB_4-hydroxyacetophenone_monooxygenase
CPUR_00890.1	2,147776694	6,732413034	0,001568102	uncharacterized_protein
CPUR_04722.1	2,150621462	10,44878302	0,018672975	uncharacterized_protein
CPUR_07138.1	2,150754609	9,091937517	0,012994869	uncharacterized_protein
CPUR_03372.1	2,151080214	5,983158114	0,007880256	uncharacterized_protein
CPUR_01536.1	2,159295846	6,701187775	0,041220693	uncharacterized_protein
CPUR_07960.1	2,179883195	8,554998843	0,007965294	Oleate-induced_peroxisomal_protein_
CPUR_05951.1	2,181267162	5,125412322	0,009313798	uncharacterized_protein
CPUR_04723.1	2,185987417	6,618253934	0,005418143	uncharacterized_protein
CPUR_00576.1	2,187230363	7,065634572	0,005994258	related_to_nucleolar_100K_polymyositis-scleroderma_protein
CPUR_03525.1	2,191858675	6,041826122	0,001393337	Electron_transfer_flavoprotein_
CPUR_07330.1	2,193797957	5,492861848	0,013200518	probable_annexin_XIV
CPUR_06335.1	2,198228219	6,797547761	0,001416367	uncharacterized_protein
CPUR_05021.1	2,205670197	7,205728266	0,002940466	uncharacterized_protein
CPUR_01926.1	2,21032554	5,922355852	0,001762593	related_to_cytochrome_P450_52A12,_alkane_hydroxylase_1
CPUR_06019.1	2,213377218	6,394784648	0,006673116	uncharacterized_protein
CPUR_02927.1	2,220250336	6,790655651	0,001476342	related_to_cytosolic_Cu/Zn_superoxide_dismutase
CPUR_02747.1	2,221789504	6,249401677	0,001591717	related_to_carboxylic_acid_transporter_protein
CPUR_05559.1	2,222240067	6,544641257	0,002053562	related_to_MEAB_protein
CPUR_08198.1	2,22395362	7,657525678	0,004222053	Putative_lyosomal_cobalamin_transporter_
CPUR_00474.1	2,226799082	5,545609921	0,003157647	uncharacterized_protein
CPUR_06139.1	2,236151594	4,993939338	0,007203053	related_to_peroxisomal_ATP_carrier
CPUR_04073.1	2,242998906	8,683022403	0,005740594	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_1_
CPUR_07573.1	2,253104245	6,895173151	0,001077883	Oligopeptide_transporter_OPT-like_protein_
CPUR_03961.1	2,254763441	8,151590926	0,014885998	Aldehyde_dehydrogenase_
CPUR_01884.1	2,261518093	5,62272259	0,001832712	related_to_D-arabinitol_2-dehydrogenase
CPUR_08002.1	2,261732498	5,101723855	0,02000244	uncharacterized_protein
CPUR_01600.1	2,280149608	7,603984417	0,004538095	related_to_hypothetical_protein_yqey
CPUR_08308.1	2,297881476	5,351336522	0,008477828	uncharacterized_protein
CPUR_01188.1	2,303647865	5,082020219	0,012297211	uncharacterized_protein
CPUR_06408.1	2,304083364	7,589389533	0,005126276	Ribitol_kinase_
CPUR_04485.1	2,306326412	12,34340962	0,02059534	uncharacterized_protein
CPUR_02479.1	2,314723674	5,813016801	0,001863259	uncharacterized_protein
CPUR_02483.1	2,316421599	9,087221454	0,004869098	related_to_cell_wall_protein_cwl1
CPUR_05946.1	2,3228817	6,056252554	0,005322931	Glycerol_kinase_

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_03869.1	2,32901125	8,392158912	0,005037338	Protein_yop-1_
CPUR_02794.1	2,331622882	9,510117881	0,039075562	related_to_tRNA-splicing_endonuclease_beta_chain
CPUR_08142.1	2,334663746	5,880279214	0,002316202	related_to_dimethylglycine_dehydrogenase_mitochondrial_precursor
CPUR_00353.1	2,352057781	7,745126861	0,003197705	Stomatin-like_protein_
CPUR_07668.1	2,366729336	5,331264481	0,002264127	NAD(P)_transhydrogenase_
CPUR_00356.1	2,369138639	6,577424629	0,00167895	uncharacterized_protein
CPUR_01284.1	2,375159276	6,420303912	0,00047521	related_to_reticuline_oxidase_(berberine_bridge_enzyme)
CPUR_08548.1	2,380647999	6,060725589	0,001098043	related_to_O-methylsterigmatocystin_oxidoreductase
CPUR_03699.1	2,38098524	7,136492692	0,01258102	Phophoketolase_
CPUR_07395.1	2,382523286	6,188576959	0,000623243	uncharacterized_protein
CPUR_01736.1	2,382989371	5,165009832	0,003176056	related_to_ethanolamine_kinase
CPUR_07543.1	2,402853688	9,056630223	0,00335046	uncharacterized_protein
CPUR_01762.1	2,403011514	5,690737164	0,001230379	uncharacterized_protein
CPUR_00948.1	2,409964985	6,239089636	0,00221896	related_to_2,5-diketo-D-gluconic_acid_reductase
CPUR_06223.1	2,416156941	7,961708359	0,014583273	probable_trehalose-6-phosphate_phosphatase
CPUR_00508.1	2,424606908	5,630293303	0,001112638	probable_uracil_permease
CPUR_07653.1	2,427355914	4,841641553	0,005957448	probable_succinate-fumarate_transporter
CPUR_03704.1	2,429791557	5,984771866	0,007625888	related_to_zinc_transporter
CPUR_00657.1	2,434885893	5,922075681	0,000846442	uncharacterized_protein
CPUR_05176.1	2,440153607	8,497421445	0,013571121	Sphingolipid_long_chain_base-responsive_protein_PIL1_
CPUR_03793.1	2,442542838	7,440201154	0,022911282	probable_aldehyde_dehydrogenase
CPUR_02417.1	2,442653863	5,863690047	0,002844741	uncharacterized_protein
CPUR_00256.1	2,444597661	7,182680451	0,000806511	Very-long-chain_3-oxoacyl-CoA_reductase_
CPUR_07349.1	2,447336009	5,889025631	0,01608391	uncharacterized_protein
CPUR_01222.1	2,447407421	7,785202597	0,002545647	uncharacterized_protein
CPUR_01458.1	2,455986324	8,425290594	0,004423184	related_to_members_of_the_aldo/keto_reductase_family
CPUR_00183.1	2,461457675	6,279022136	0,000513502	related_to_trichodiene_oxygenase_cytochrome_P450
CPUR_05575.1	2,475044142	5,76036572	0,000455649	related_to_senescence_marker_protein_30
CPUR_07393.1	2,485364453	6,313312717	0,00104421	related_to_fluG_protein
CPUR_08814.1	2,494933239	5,185327742	0,002316202	uncharacterized_protein
CPUR_01235.1	2,502699477	6,868564641	0,000300448	probable_homocitrate_synthase_mitochondrial_precursor
CPUR_04086.1	2,506126033	8,578374081	0,010270943	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_04062.1	2,509814355	5,043721886	0,023063257	uncharacterized_protein
CPUR_05945.1	2,524812083	4,938919083	0,009289828	Putative_acyl-CoA_dehydrogenase_
CPUR_05997.1	2,541910682	4,941426688	0,006081509	Phosphate_transport_protein_MIR1_
CPUR_04085.1	2,551757114	9,060081172	0,012522629	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_3_
CPUR_02085.1	2,55245662	6,178861764	0,00039998	uncharacterized_protein
CPUR_04698.1	2,562273784	5,23052171	0,001416367	related_to_general_repressor_of_transcription
CPUR_02097.1	2,564283295	7,973611704	0,001591717	related_to_glutamate_carboxypeptidase_II

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_07155.1	2,573664814	11,01135766	0,002807141	related_to_LAP3_-_member_of_the_GAL_regulon
CPUR_02361.1	2,582433132	6,538549169	0,001038549	uncharacterized_protein
CPUR_08057.1	2,592483178	4,873044868	0,001582319	Folic_acid_synthesis_protein_
CPUR_08003.1	2,592838495	5,430918388	0,002632248	uncharacterized_protein
CPUR_07545.1	2,593951996	5,54013896	0,014913897	uncharacterized_protein
CPUR_07828.1	2,598041065	7,004708588	0,000439801	related_to_Beta-mannosidase_precursor
CPUR_06505.1	2,617914165	5,397787227	0,001257911	uncharacterized_protein
CPUR_03118.1	2,622162123	5,797214577	0,000207048	MFS_quinate_transporter_
CPUR_07777.1	2,624611179	5,884470465	0,000446561	uncharacterized_protein
CPUR_07561.1	2,639532864	7,479059188	0,003455569	uncharacterized_protein
CPUR_07144.1	2,641973614	7,940469462	0,000736342	related_to_neutral_ceramidase
CPUR_07394.1	2,645484463	9,022162922	0,003239241	Peroxidase/catalase_
CPUR_07223.1	2,648001847	9,58360899	0,013362587	uncharacterized_protein
CPUR_03900.1	2,662997871	7,956453663	0,00053233	related_to_PEST_phosphatase_interacting_protein
CPUR_04074.1	2,694594854	9,139391274	0,001073343	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_1_
CPUR_03744.1	2,699173404	7,648787121	0,000462385	Phosphatidylserine_synthase_
CPUR_03516.1	2,701596328	6,232754346	0,002705342	Neutral_ceramidase_
CPUR_06132.1	2,703756996	8,067237704	0,002002534	related_to_beta-1,3-glucanase
CPUR_06889.1	2,706735673	6,287284913	0,014984393	uncharacterized_protein
CPUR_06058.1	2,713030646	5,350853714	0,000323896	related_to_linoleate_diol_synthase
CPUR_04235.1	2,716788406	7,177680623	0,002633717	Putative_fructose-1,6-bisphosphatase_
CPUR_00640.1	2,733960384	9,798412699	0,00221896	related_to_phosphatidylserine_decarboxylase_2
CPUR_02588.1	2,745504678	5,649001618	0,000415085	related_to_lincomycin-condensing_protein_lmbA
CPUR_01654.1	2,74690631	5,167706306	0,000562332	GPR/FUN34_family_protein_
CPUR_07405.1	2,767089064	5,203475083	0,021665427	uncharacterized_protein
CPUR_00757.1	2,773981925	6,121264034	0,000133293	related_to_laccase_precursor
CPUR_03642.1	2,778251169	6,343497587	5,37E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07529.1	2,781975053	5,297678987	0,000407697	related_to_tetracycline_resistance_protein_from_transposon_Tn4351/Tn4400
CPUR_06547.1	2,782474229	4,977689025	0,000455321	related_to_G_protein_coupled_receptor_like_protein
CPUR_02072.1	2,784204552	7,238363412	0,027806074	uncharacterized_protein
CPUR_01853.1	2,798684652	4,329484307	0,023748955	Myo-inositol_oxygenase_
CPUR_08139.1	2,804898878	4,999175039	0,025714583	related_to_sugar_transport_protein_STP1
CPUR_06492.1	2,81549922	5,826473989	0,000180842	related_to_sucrose_transporter_SUT1D
CPUR_02071.1	2,818448292	6,313410738	0,015718976	uncharacterized_protein
CPUR_04688.1	2,824966371	6,286109464	1,80E-05	uncharacterized_protein
CPUR_02585.1	2,832373926	7,15591981	0,000396273	uncharacterized_protein
CPUR_08219.1	2,840512272	8,066263488	0,0005155	Auxin_Efflux_Carrier_superfamily_protein_
CPUR_04307.1	2,840888421	6,975854585	0,000317843	uncharacterized_protein
CPUR_00903.1	2,851697884	9,04693657	0,000609227	related_to_linoleate_diol_synthase

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_06137.1	2,853272403	8,326212727	0,012694196	uncharacterized_protein
CPUR_04754.1	2,856332081	7,645359969	0,000563355	Nitrate_reductase_
CPUR_05111.1	2,856994233	5,770075205	0,027363435	uncharacterized_protein
CPUR_07107.1	2,870621255	6,76492123	4,79E-05	probable_farnesyltranstransferase_(al-3)
CPUR_03521.1	2,875747493	5,157187673	0,003183522	probable_beta-glucosidase_precursor
CPUR_04026.1	2,87609613	6,415117026	3,16E-05	probable_carboxypeptidase
CPUR_04022.1	2,878218223	5,861009327	0,000339993	related_to_AM-toxin_synthetase_(AMT)
CPUR_05848.1	2,880511852	6,297686915	0,000108497	uncharacterized_protein
CPUR_07410.1	2,888921355	9,007595232	0,001007206	uncharacterized_protein
CPUR_04225.1	2,909565347	5,927835532	0,000439801	related_to_benzoate_4-monooxygenase_cytochrome_P450
CPUR_05576.1	2,914043147	11,12742422	0,01767571	uncharacterized_protein
CPUR_01075.1	2,921854351	6,590347015	5,29E-05	related_to_acid_phosphatase
CPUR_04609.1	2,930426644	8,077429431	0,010537313	uncharacterized_protein
CPUR_05570.1	2,932741157	5,142860169	0,016915277	related_to_polyketide_synthase
CPUR_01864.1	2,94838317	7,137409439	0,00010159	related_to_acetylxytan_esterase_precursor
CPUR_03717.1	2,963763721	5,103829058	0,000691434	uncharacterized_protein
CPUR_05178.1	2,973632814	9,488288594	0,000317843	Hexokinase_
CPUR_04067.1	2,986390071	7,602660479	0,025508156	L-amino-acid_oxidase
CPUR_02331.1	3,006184011	6,725155875	9,15E-05	uncharacterized_protein
CPUR_06642.1	3,013855587	7,648814258	0,000147652	Xanthine_dehydrogenase_
CPUR_02889.1	3,018510084	9,082846747	0,001125651	ThiJ/PfpI_family_protein_
CPUR_04499.1	3,020418509	9,823038118	0,000899452	uncharacterized_protein
CPUR_06259.1	3,041024598	5,840232637	2,70E-05	probable_glutaminase_A
CPUR_03508.1	3,043899189	7,87532955	0,00046215	uncharacterized_protein
CPUR_04154.1	3,046638598	6,965938496	2,78E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03809.1	3,048707	5,813752823	1,84E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05374.1	3,049091988	8,193059223	0,000745231	probable_glucan_1,4-alpha-glucosidase
CPUR_06568.1	3,059353859	4,626728044	0,001804837	mating_type_protein
CPUR_03624.1	3,065242311	6,300500693	6,22E-06	uncharacterized_protein
CPUR_08326.1	3,085445927	6,492662665	9,88E-05	uncharacterized_protein
CPUR_01828.1	3,093532074	10,98393289	0,000146962	probable_brefeldin_A_resistance_protein
CPUR_03451.1	3,099354492	3,837678647	0,013645872	probable_pheromone_receptor
CPUR_03034.1	3,102239021	5,752966144	2,69E-05	uncharacterized_protein
CPUR_00577.1	3,105667244	9,431384418	0,000120157	Trehalose-6-phosphate_synthase_1_
CPUR_08474.1	3,111233806	5,683507857	1,14E-05	uncharacterized_protein
CPUR_01299.1	3,114971572	7,560139867	0,000338549	related_to_nitrate_assimilation_regulatory_protein_nirA
CPUR_01438.1	3,132118446	8,263450913	9,33E-05	probable_aspartic_proteinase_precursor
CPUR_08040.1	3,136789496	8,803942954	0,000790296	Meiotically_up-regulated_protein_
CPUR_00022.1	3,163386582	6,788678228	1,49E-06	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_01995.1	3,195131593	6,423491186	1,31E-06	related_to_gluconate_5-dehydrogenase
CPUR_01281.1	3,201025237	7,847029703	1,73E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03371.1	3,228084997	3,231615252	0,049485027	related_to_chitinase
CPUR_04410.1	3,236210115	6,804488383	0,002037386	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_04624.1	3,264650925	5,983889243	1,27E-06	Amino-acid_permease_inda1_
CPUR_04399.1	3,266978608	5,97669551	0,009378423	uncharacterized_protein
CPUR_03432.1	3,269660525	6,95338337	1,43E-05	NADH-cytochrome_B5_reductase,_putative_
CPUR_04524.1	3,319078282	4,107712448	0,008684753	uncharacterized_protein
CPUR_07758.1	3,326601517	6,506381458	0,000901249	related_to_SUC2_-_invertase_(sucrose_hydrolyzing_enzyme)
CPUR_03524.1	3,331177345	5,388435912	8,92E-06	uncharacterized_protein
CPUR_01181.1	3,379419236	10,97723179	3,26E-05	related_to_NAD(P)H-dependent_oxidoreductase
CPUR_05321.1	3,390496306	8,673684028	0,000374197	Aspartate-tRNA_ligase_
CPUR_04719.1	3,403123398	7,271406869	1,05E-05	Urea_active_transporter_
CPUR_02897.1	3,41028587	7,542485343	7,66E-06	uncharacterized_protein
CPUR_01210.1	3,417163671	10,12311546	0,000190551	related_to_dnase1_protein
CPUR_02643.1	3,426763883	8,632874576	4,27E-05	Deacetylase_complex_subunit_Sds3,_putative_
CPUR_01290.1	3,434448009	5,071809882	1,60E-05	related_to_SUC2_-_invertase_(sucrose_hydrolyzing_enzyme)
CPUR_05082.1	3,446982555	8,02570549	0,000318923	uncharacterized_protein
CPUR_00722.1	3,448520242	5,745168621	2,64E-06	related_to_dehydrogenase
CPUR_05401.1	3,484653296	4,22235582	0,030162756	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_06691.1	3,5024868	7,811573837	6,96E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04523.1	3,509198079	4,850410306	0,001195338	related_to_alpha-amylase_A_precursor
CPUR_02967.1	3,513204314	5,013027823	5,34E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07528.1	3,538926606	10,39515175	1,46E-05	L-xylulose_reductase_
CPUR_06946.1	3,541878852	5,438812879	6,36E-05	uncharacterized_protein
CPUR_08549.1	3,571338958	9,80477014	9,15E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04687.1	3,57320429	4,906368984	1,11E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07554.1	3,59415361	1,354761924	0,045508845	uncharacterized_protein
CPUR_05421.1	3,61104711	5,913625517	4,51E-07	uncharacterized_protein
CPUR_00593.1	3,625310726	5,338943001	4,89E-06	Cytochrome_P450_family_protein_
CPUR_06257.1	3,629105429	5,24296765	0,001202123	uncharacterized_protein
CPUR_00209.1	3,632005378	8,504319795	0,000141453	uncharacterized_protein
CPUR_08532.1	3,6456162	5,617228203	3,60E-07	uncharacterized_protein
CPUR_02332.1	3,680934748	5,920310959	1,85E-06	uncharacterized_protein
CPUR_02019.1	3,706410496	7,776521086	1,90E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07974.1	3,717258887	7,778176629	7,78E-06	uncharacterized_protein
CPUR_02469.1	3,735035417	6,504535596	2,29E-07	uncharacterized_protein
CPUR_05431.1	3,739743861	7,547162849	6,97E-06	related_to_phenol_2-monooxygenase
CPUR_07465.1	3,776435173	9,383173439	5,12E-05	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_04969.1	3,777830162	7,939733411	1,28E-06	uncharacterized_protein
CPUR_08020.1	3,79829419	2,371824982	0,045313828	uncharacterized_protein
CPUR_04610.1	3,816649412	7,922874675	6,07E-05	uncharacterized_protein
CPUR_04525.1	3,826058053	3,810236881	0,003166181	uncharacterized_protein
CPUR_05420.1	3,83660561	7,435248588	2,46E-06	uncharacterized_protein
CPUR_06870.1	3,838806509	8,000565797	0,00010904	uncharacterized_protein
CPUR_04413.1	3,868753797	7,514895374	1,56E-06	related_to_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1
CPUR_07426.1	3,889994368	3,645167213	0,003176459	uncharacterized_protein
CPUR_08232.1	3,891003483	9,557210034	5,57E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05488.1	3,917972461	3,214122896	0,045508351	uncharacterized_protein
CPUR_05433.1	3,927230999	6,561106845	5,21E-08	uncharacterized_protein
CPUR_02316.1	3,927653691	8,439871228	0,00017402	Sorbitol_dehydrogenase_
CPUR_02003.1	3,975310037	6,262722786	4,82E-08	uncharacterized_protein
CPUR_04713.1	4,014527264	4,943802575	6,34E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04007.1	4,019092999	7,08027405	8,28E-09	Mitochondrial_dicarboxylate_transporter_
CPUR_03109.1	4,037986078	8,364380714	6,65E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04000.1	4,038668386	7,145528294	1,13E-05	uncharacterized_protein
CPUR_03777.1	4,056723918	7,658132861	0,000354055	related_to_oxalate_decarboxylase
CPUR_00619.1	4,069504564	6,82735297	1,94E-08	uncharacterized_protein
CPUR_00925.1	4,072184432	7,38829931	3,40E-07	Acyl-CoA_dehydrogenase_
CPUR_08788.1	4,075688091	5,269851052	0,004770137	uncharacterized_protein
CPUR_04250.1	4,084133168	4,92259161	0,000558864	uncharacterized_protein
CPUR_03919.1	4,103848961	8,901632921	1,79E-07	related_to_suppressor_protein_PSP1
CPUR_00091.1	4,116121405	8,168315701	1,33E-06	Calcium-transporting_ATPase_3_
CPUR_00460.1	4,119850006	5,034270551	1,33E-06	probable_D-amino-acid_oxidase
CPUR_02655.1	4,121245749	7,636819681	1,68E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04574.1	4,134040993	11,78700036	8,78E-06	Protein_bli-3_
CPUR_07050.1	4,145643064	6,68214114	1,01E-08	MFS_multidrug_transporter,_putative_
CPUR_05776.1	4,180799246	11,85150758	3,95E-06	uncharacterized_protein
CPUR_03009.1	4,227199055	5,887203204	3,20E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05432.1	4,228132778	5,380593079	0,000506518	o-methyltransferase_that_catalyse_the_methylation_of_nor-rubrofusarin_resulting_in_formation_of_rubrofusarin
CPUR_07178.1	4,246782775	4,943747435	4,68E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05947.1	4,259028757	4,52158381	0,000115953	Aquaglyceroporin_
CPUR_03040.1	4,303414746	7,131885353	2,02E-09	related_to_TRI13_-_cytochrome_P450
CPUR_01422.1	4,3452781	6,952169176	0,000659975	uncharacterized_protein
CPUR_06379.1	4,356780416	6,667821632	2,76E-10	uncharacterized_protein
CPUR_04753.1	4,388710617	7,851635345	1,54E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05990.1	4,423129175	4,944110979	4,22E-07	uncharacterized_protein
CPUR_00613.1	4,428860233	4,860869148	2,04E-06	uncharacterized_protein

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_04053.1	4,541653436	5,943717409	1,19E-10	related_to_triacylglycerol_lipase_II_precursor
CPUR_05989.1	4,586504583	4,327835892	0,000412888	uncharacterized_protein
CPUR_01124.1	4,622739609	6,999276385	2,95E-11	uncharacterized_protein
CPUR_06360.1	4,650639195	7,927463548	5,95E-06	probable_DNA-directed_RNA_polymerase_I,_II,_III_18kD_subunit
CPUR_05112.1	4,66645663	7,816822816	3,59E-08	uncharacterized_protein
CPUR_01071.1	4,79109896	13,37847659	9,01E-06	Glucose_repressible_protein_Grg1_
CPUR_04079.1	4,820126599	8,472392035	5,46E-08	Chanoclavine-I_synthase_oxidoreductase_
CPUR_08148.1	4,827806976	8,16995083	1,05E-08	probable_endopeptidase_K
CPUR_02587.1	4,877221007	6,599505409	1,44E-08	related_to_salicylate_1-monooxygenase
CPUR_02337.1	4,892818732	8,49794552	3,28E-09	uncharacterized_protein
CPUR_08633.1	4,904588362	10,2169095	0,00018027	uncharacterized_protein
CPUR_02605.1	4,965601803	0,777513116	0,044477032	uncharacterized_protein
CPUR_00649.1	5,11044837	8,168491023	1,19E-10	uncharacterized_protein
CPUR_02972.1	5,113215873	1,391361832	0,041874639	uncharacterized_protein
CPUR_04063.1	5,12625425	9,000241193	6,95E-10	Putative_uncharacterized_protein_
CPUR_04083.1	5,193919888	8,303701337	1,12E-09	Lysergyl_peptide_synthetase_subunit_2_
CPUR_08625.1	5,218017391	7,240146902	1,16E-07	related_to_PRY1_-_strong_similarity_to_the_plant_PR-1_class_of_pathogen_related_proteins
CPUR_02834.1	5,241083924	7,264100817	2,58E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04078.1	5,372147291	9,215994985	4,49E-09	Dimethylallyltryptophan_N-methyltransferase_
CPUR_01541.1	5,373897048	5,207355583	9,43E-10	related_to_endo-1,6-alpha-D-mannanase
CPUR_05437.1	5,394588679	9,188310749	5,61E-07	polyketide_synthase_that_catalyse_the_condensation_of_one_acetyl-CoA_and_six_malonyl-CoA_resulting_in_formation_of_nor-rubrofusarin
CPUR_05424.1	5,430232932	8,115222801	3,34E-11	uncharacterized_protein
CPUR_05445.1	5,439579249	-0,306050623	0,043582602	uncharacterized_protein
CPUR_05418.1	5,485394317	6,282690032	3,73E-07	related_to_peroxisomal_short-chain_alcohol_dehydrogenase
CPUR_08449.1	5,539964765	6,692138219	6,37E-13	related_to_extracellular_metalloproteinase
CPUR_00620.1	5,570759779	10,67277298	5,69E-10	uncharacterized_protein
CPUR_00005.1	5,619717606	4,752259685	0,000885451	related_to_PRY1_-_strong_similarity_to_the_plant_PR-1_class_of_pathogen_related_proteins
CPUR_07663.1	5,644861592	7,103328148	8,55E-06	uncharacterized_protein
CPUR_08853.1	5,65767398	12,78123952	4,85E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04892.1	5,662624059	7,273441542	3,40E-09	uncharacterized_protein
CPUR_05423.1	5,742907707	7,214036825	1,05E-06	related_to_maackiain_detoxification_protein_1
CPUR_02582.1	5,779702873	7,937305761	9,58E-08	probable_beta-glucosidase_precursor
CPUR_03774.1	5,853404268	9,431305296	2,98E-06	related_to_short-chain_alcohol_dehydrogenase
CPUR_08580.1	5,938815931	9,414323701	1,34E-12	uncharacterized_protein
CPUR_02833.1	5,960998068	10,17126555	9,32E-06	uncharacterized_protein
CPUR_01220.1	5,978980662	8,190691995	1,90E-13	related_to_cytochrome_b-large_subunit
CPUR_04021.1	5,989370437	8,681968006	2,94E-11	related_to_benzoate_4-monooxygenase_cytochrome_P450
CPUR_03482.1	6,286963589	6,949263167	2,19E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06790.1	6,294912115	6,97930436	6,10E-09	probable_dis1-suppressing_protein_kinase_dsk1

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_05436.1	6,330460857	8,478107694	2,17E-13	uncharacterized_protein
CPUR_05711.1	6,356945515	7,283317988	1,28E-13	related_to_diaminopropionate_ammonia-lyase
CPUR_08634.1	6,358022318	11,01426024	2,63E-08	Catalase_
CPUR_05442.1	6,371528074	5,162691102	7,99E-05	uncharacterized_protein
CPUR_08903	6,400700707	7,481021425	9,09E-09	Tryptophan_dimethylallyltransferase_2_dmaW2
CPUR_08867.1	6,44614173	2,720423079	0,006081509	uncharacterized_protein
CPUR_08329.1	6,446965022	9,060875797	3,45E-14	uncharacterized_protein
CPUR_05710.1	6,491994473	9,448030201	3,69E-12	related_to_E.coli_dioxygenase
CPUR_05417.1	6,645490833	8,87288444	1,19E-10	uncharacterized_protein
CPUR_05708.1	6,661199638	9,905387902	8,84E-11	related_to_naringenin,2-oxoglutarate_3-dioxygenase
CPUR_04663.1	6,726073792	2,100413192	0,027729381	uncharacterized_protein
CPUR_05569.1	6,778726247	5,277870553	4,38E-11	uncharacterized_protein
CPUR_08327.1	6,781846525	7,341991529	3,05E-09	uncharacterized_protein
CPUR_07657.1	6,81555029	6,856149569	2,04E-12	uncharacterized_protein
CPUR_05425.1	6,975791357	6,576293041	0,000704531	uncharacterized_protein
CPUR_04075.1	6,985222925	11,13448988	3,74E-15	Putative_oxygenase_
CPUR_05422.1	7,023774782	8,67348822	7,97E-16	probable_aflatoxin_efflux_pump_AFLT
CPUR_05419.1	7,03408903	9,487279251	2,00E-09	uncharacterized_protein
CPUR_04076.1	7,130379528	10,21195009	2,65E-14	Tryptophan_dimethylallyltransferase_dmaW1
CPUR_07553.1	7,162022191	6,843301487	4,56E-13	uncharacterized_protein
CPUR_04080.1	7,339486967	8,199463246	1,18E-12	Chanoclavine-I_dehydrogenase_
CPUR_04032.1	7,359541529	10,54423869	2,85E-14	Fatty_acid_hydroxylase_
CPUR_05550.1	7,423624084	12,32770692	4,57E-09	uncharacterized_protein
CPUR_05426.1	7,44176097	9,576326278	3,32E-15	uncharacterized_protein
CPUR_03365.1	7,483535898	1,776012599	0,000368166	uncharacterized_protein
CPUR_05549.1	7,648391482	12,74389305	5,49E-12	uncharacterized_protein
CPUR_01221.1	7,676821755	11,41256619	3,80E-09	uncharacterized_protein
CPUR_08721.1	7,745749055	2,667030128	0,011547468	uncharacterized_protein
CPUR_03018.1	7,797145625	7,405207282	3,67E-13	uncharacterized_protein
CPUR_02338.1	7,836055125	10,33367091	4,77E-17	uncharacterized_protein
CPUR_05443.1	7,911655669	2,064838676	0,027806074	uncharacterized_protein
CPUR_05435.1	7,985039313	8,779004456	2,85E-14	uncharacterized_protein
CPUR_04077.1	7,99774705	10,2531855	2,65E-14	Agroclavine_dehydrogenase_easG
CPUR_05450.1	8,071985035	0,157643615	0,040203848	related_to_pyruvate_decarboxylase
CPUR_05434.1	8,100719209	6,622407416	2,89E-19	uncharacterized_protein
CPUR_06046.1	8,412056115	6,04759281	2,65E-14	uncharacterized_protein
CPUR_08816.1	8,474161893	0,57659986	0,011908104	uncharacterized_protein
CPUR_05427.1	8,492704624	9,514343977	1,76E-13	uncharacterized_protein
CPUR_05429.1	8,630613876	11,2940119	6,68E-12	probable_tetrahydroxynaphthalene_reductase

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciatně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million") (*Pokračování*).

Identifikační číslo	Log2FoldChange	Log2CPM	Padj	Anotace genů
CPUR_04003.1	8,638689673	0,716822195	0,025426112	uncharacterized_protein
CPUR_05428.1	8,691721962	9,599256505	2,63E-16	probable_scytalone_dehydratase
CPUR_05986.1	8,736855817	0,980893867	0,001400337	uncharacterized_protein
CPUR_04082.1	8,743344139	9,144806052	1,27E-19	Elymoclavine_monooxygenase_
CPUR_04084.1	8,873911031	9,503119961	6,55E-16	Chanoclavine-I_aldehyde_oxidoreductase_
CPUR_04081.1	8,970905844	11,61696995	4,28E-18	Catalase_
CPUR_06833.1	8,974097735	1,04814323	0,031669406	uncharacterized_protein
CPUR_06861.1	9,038038365	1,114897083	0,027443225	uncharacterized_protein
CPUR_08821.1	9,214691262	4,9548926	0,001717064	related_to_phosphatase_2a_inhibitor
CPUR_08799.1	9,355667698	1,43687466	0,022161128	uncharacterized_protein
CPUR_06983.1	9,377428193	1,458957396	0,021872005	uncharacterized_protein
CPUR_03367.1	9,384886332	4,6583295	1,76E-13	uncharacterized_protein
CPUR_05444.1	9,518369269	3,683098952	0,007287096	uncharacterized_protein
CPUR_03362.1	9,685880946	1,858834753	8,12E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05448.1	9,687230531	1,773378493	0,017431679	probable_general_amino_acid_permease
CPUR_07662.1	9,97164224	9,657813529	1,73E-20	uncharacterized_protein
CPUR_05446.1	10,07506224	4,267644249	0,000643124	related_to_stress_response_protein_rds1p
CPUR_05449.1	10,32408338	6,595333214	3,07E-05	uncharacterized_protein
CPUR_07656.1	10,52599971	9,626432019	5,50E-22	uncharacterized_protein
CPUR_08841.1	10,55263645	2,701164399	3,69E-06	uncharacterized_protein
CPUR_05817.1	10,59483697	4,835070199	2,31E-07	uncharacterized_protein
CPUR_06823.1	10,76138904	2,938138846	0,001591717	RCA-1_regulator_of_conidiation
CPUR_08753.1	11,11080555	3,215568524	0,001246554	uncharacterized_protein
CPUR_07984.1	11,36845896	6,976017162	4,52E-28	uncharacterized_protein
CPUR_03366.1	11,73316266	7,333898145	8,19E-27	related_to_putidaredoxin_reductase

9.3 Příloha 3 - Tabulka s DEGs mezi vzorky sklerocií kmene 20.1 a Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu DESeq.

Tab 17: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR.
baseMean = průměrné normalizované hodnoty dvou replikátů. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody.

Identifikační číslo	baseMeanSklerocium_20.1	baseMeanSklerocium_404	Log ₂ FoldChange	Padj	Anotace genů
CPUR_05920.1	8450,350902	715,396116	-3,56219706	3,44E-07	uncharacterized_protein
CPUR_04961.1	28602,11562	4443,129834	-2,686473659	0,006054585	Heat_shock_protein_101_
CPUR_03275.1	29998,44412	4748,660856	-2,659295047	0,002196399	probable_heat_shock_protein_30
CPUR_07509.1	4804,214485	788,5727747	-2,606984754	0,011145407	uncharacterized_protein
CPUR_02075.1	3533,042856	598,458105	-2,561589089	0,019922168	uncharacterized_protein
CPUR_00387.1	20693,10589	3517,786483	-2,556410376	0,001537861	probable_ALCOHOL_DEHYDROGENASE_I_-_ADH1
CPUR_07495.1	6497,602077	1148,42781	-2,500247222	0,003005778	related_to_sensor_protein_hoxX
CPUR_06946.1	3291,776592	713,435719	-2,206011072	0,016637897	uncharacterized_protein
CPUR_08733.1	117,6173038	992,898881	3,077546474	0,021206351	uncharacterized_protein
CPUR_05113.1	912,2880613	8559,209939	3,229916292	0,000392858	uncharacterized_protein
CPUR_08326.1	132,6964453	1434,286074	3,434131175	0,006024676	uncharacterized_protein
CPUR_05111.1	67,85613679	842,2856713	3,633758422	0,005952631	uncharacterized_protein
CPUR_02610.1	93,49067736	1234,704373	3,723199336	0,001421096	uncharacterized_protein
CPUR_04399.1	64,84030849	1021,018408	3,976974113	0,004677359	uncharacterized_protein
CPUR_06376.1	159,8389	3106,832843	4,280754157	4,53E-06	uncharacterized_protein
CPUR_04061.1	25,63454057	572,5966654	4,481358322	0,002723371	uncharacterized_protein
CPUR_03405.1	19,60288396	568,2108993	4,857288682	0,001421096	uncharacterized_protein
CPUR_08788.1	19,60288396	653,2993877	5,058606464	0,001891901	uncharacterized_protein
CPUR_05871.1	15,07914151	508,4833784	5,075574415	0,001421096	uncharacterized_protein
CPUR_05442.1	6,031656604	635,1519827	6,718403744	5,92E-05	uncharacterized_protein
CPUR_05402.1	3,015828302	334,0016306	6,791157041	0,001421096	uncharacterized_protein
CPUR_05446.1	1,507914151	346,7175865	7,845062911	0,001537861	related_to_stress_response_protein_rds1p
CPUR_08834.1	88,96693491	56749,6934	9,317127633	4,60E-24	uncharacterized_protein
CPUR_05449.1	1,507914151	1732,392774	10,16599605	1,91E-12	uncharacterized_protein
CPUR_05444.1	0	231,8168239	Inf	0,009422673	uncharacterized_protein
CPUR_06841.1	0	243,858363	Inf	0,005952631	uncharacterized_protein
CPUR_08024.1	0	313,7591076	Inf	0,000319339	uncharacterized_protein
CPUR_08821.1	0	556,7314256	Inf	3,12E-06	related_to_phosphatase_2a_inhibitor

9.4 Příloha 4 - Tabulka s DEGs mezi vzorky sklerocií kmene 20.1 a Gal404 při padj < 0,05, výsledek programu edgeR

Tab 16: Výčet signifikantně diferenciálně exprimovaných genů (padj < 0,05) při srovnání vzorků mycelia a sklerocia Gal404. Barevně zvýrazněny geny, které byly vybrány pro analýzu metodou real-time RT-qPCR. Log₂CPM = Logaritmus o základu 2 průměrných normalizovaných hodnot počtů readů všech vzorků. Log₂FoldChange = logaritmus změny exprese genu o základu 2. Padj = upravená hodnota pval pomocí Benjamini-Hochberg metody. CPM ("Count per million").

Identifikační číslo	log ₂ FoldChange	Log ₂ CPM	Padj	Funkce genu
CPUR_05920.1	-3,561671919	8,434675647	0,024438683	uncharacterized_protein
CPUR_03275.1	-2,65561798	10,43399235	0,04502581	probable_heat_shock_protein
CPUR_07509.1	-2,602436078	7,804665754	0,04502581	uncharacterized_protein
CPUR_02075.1	-2,557027852	7,372812288	0,04502581	uncharacterized_protein
CPUR_08326.1	3,435078422	6,720492482	0,04502581	uncharacterized_protein