

Záznam o průběhu obhajoby

Mgr. Barbora Balcárková

Botanika

Studijní obor:

Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci

Školící pracoviště:

Předseda komise:

prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.

- 1) Zahájení
- 2) Představení uchazeče a komise
- 3) Vystoupení uchazeče
- 4) Poslední poslední
- 5) Odpovědi na připomínky a dotazy komise
- 6) Diskuse
- 7) Uzávěrka jednání komise
- 8) Tajné hlasování a jeho vyhodnocení
- 9) Vyhlášení výsledku
- 10) Ukončení obhajoby

V Olomouci dne 21.6.2017

Aleš Lebeda

podpis předsedy komise

Odpovědi na otázky oponentů

RNDr. Helena Štorchová CSc. a prof. RNDr. Milan Navrátil CSc.

1. a) ... jakou částí konkrétně přispěla kandidátka k uvedeným článkům. Prosím proto o velmi stručný shrnující komentář, jaké metodice se věnovala nejvíce, případně v čem vidí svůj největší přínos k sestavení mapy chromosomu 4AL pšenice a pozičnímu mapování.
1. b) Které dílčí experimenty autorka navrhovala, prováděla a hodnotila a jak se podílela na přípravě publikací?
 - Randhawa et al., 2014 – vytipování kandidátních BAC klonů, BAC-end sekvence, vývoj markerů v blízkosti genu rezistence
 - Shorinola et al., 2016 - identifikace kandidátního kontigu fyzické mapy a identifikace možných dalších prodloužení kandidátního kontigu a pokrytí oblasti genu, chromosome walking ve fyzické mapě
 - Abrouk et al., 2016 - deleční mapa vyvinutá pro ukotvení fyzické mapy byla využita i pro vylepšení GenomeZipperu dlouhého ramene 4A chromosomu
 - Balcárková et al., 2017 – izolace DNA RH linií a delečních linií, příprava DNA pro SNP analýzu, ruční analýza SNP markerů, konstrukce deleční a RH mapy, porovnání RH mapy s genetickými mapami. Příprava publikace.

Největší přínosem je orientace v celé fyzické mapy 4A chromosomu a konstrukce radiační hybridní mapy pro ukotvení fyzické mapy a identifikace markerů v těsné vazbě na klonované geny.

RNDr. Helena Štorchová CSc.

Otázky a poznámky

1. ...jsou zde zbytečné nepřesnosti např. v latinských názvech (*T. zhukovskii* str.10, *Ae. tauschii* str. 12). Je *Triticum soveticum* skutečně uznaným botanickým druhem pšenice?

Odpověď: Překlepy v názvech vznikly nepozorností a byly při opravách přehlédnuty. Správný název je *T. zhukovskii* a *Ae. tauschii*.

Triticum soveticum je uměle vytvořena pšenice člověkem. Uznaným botanickým druhem není.

2. Poslední otázka se vztahuje k současnému pokroku sekvenování rostlinných genomů. Je zřejmé, že metodika skládání, analýzy a postupného sekvenování BAC klonů je velmi náročná a pracná. Jak vidí kandidátka budoucnost v tomto směru? Je možné, že dlouhá čtení (reads) získaná pomocí PacBio či Oxford Nanopore nahradí BAC klony? Jejich dosavadní vysoká chybovost může být vylepšena korekcí pomocí krátkých Illumina reads, které jsou namapovány na dlouhé úseky, což ovšem může představovat problém v případě dlouhých oblastí repetitivních sekvencí.

Odpověď: Budoucnost je již teď. Firma NRGene poskytuje služby pro sekvenování i skládání.

Využívá krátkých Illumina readů, mate-pair sekvenování a softwaru pro skládání sekvencí Magicassembly. Kvalita sekvence může být dále podpořena sekvenováním metodou Hi-C.

PacBio nebo Oxford Nanopore nicméně BAC knihovny úplně ne nahradí. Stále jsou důležitou genomickým nástrojem hlavně pro poziční klonování.

3. Na poslední stránce Úvodu (str. 32) je zmíněna zcela nová metoda pozičního mapování MutChromSeq, která byla recentně publikována i za účasti autorů z Centra Haná. Využívá tato metoda některých postupů sekvenování dlouhých reads v reálném čase?

Odpověď: Ne tato metoda využívá Illumina sekvenování tedy krátké ready. Ale autoři naznačují, že do postupu mohou být zapojeny i sekvenační metody dlouhého čtení, ale poukazují na vysokou cenu těchto metod.

prof. RNDr. Milan Navrátil CSc.

Otázky a poznámky

1. Jaké vlastnosti by měl splňovat genetický marker použitelný ve šlechtění (MAS)?

Odpověď: V ideálním případě by marker neměl segregovat od genu, tedy by měl být přímo ze zájmového genu.

2. Na straně 58 uvádíte "... the flanking markers are successfully used in pre-breeding and breeding proces"; mohla byste upřesnit, které markery, kde a s jakou úspěšností byly použity?

Odpověď: Protože tento projekt byl ve spolupráci se soukromou firmou. Máme jen informace, že díky naší fyzické mapě byli schopni vyvinout markery blíže genu. Oblast byla redukována z 30 cM na 0,5 cM. Marker je tedy již vhodný pro MAS.

3. *Puccinia striiformis f. sp. tritici* (Pst) je celosvětově významným houbovým patogen pšenice, u které bylo popsáno více než 50 *Yr* genů - genů rezistence. Některé tyto geny jsou rozšířeny celosvětově jiné pouze lokálně, nacházejí se na různých chromozomech. Zajímalo by mne, zda tento gen navozující rezistenci vůči australskému patotypu Pst byl cíleně hledán, nebo "měl štěstí", že se nachází na chromozomu 4A? Jsou v České republice používány markery rezistence vůči Pst ve šlechtění?

Odpověď: Rezistence byla známa, jen byla přesně určena poloha genu. Gen měl štěstí v tom, že se nacházel na chromozomu 4AL v oblasti, kde se nachází i rezistence vůči padlí travnímu, o který se zajímá můj školitel. A tak jsme navázali spolupráci s kolegy z Austrálie a pomohli jim s vývojem dalších markerů a pomocí fyzické mapy přesněji určili polohu genu. U nás markery nejsou moc používány. A to hlavně proto, že markerů je málo a nejsou dost blízko genů. Tudíž může docházet k segregaci mezi markerem a genem.

Mgr. Zdeněk Kubát PhD

Otázky

1. V úvodu píšete, že více než $\frac{1}{3}$ pšeničného genomu vykazuje velice nízké frekvence rekombinace, což komplikuje přesné genetické mapování markerů. Čím se liší tato $\frac{1}{3}$ genomu od zbytku genomu s vyšší frekvencí rekombinace? Jsou některé způsoby, jak zvýšit četnost rekombinace v těchto oblastech?

Odpověď: Oblasti s nižší frekvencí rekombinace se vyznačují vyšším výskytem repetitivních elementů.

Frekvence rekombinace se dá zvýšit vyvinutím speciální *Ph1* populace. *Ph1* je gen, který zabráňuje párování homeologních chromosomů. Když je supresor tohoto genu přítomen, je tvořeno více homeologního párování. Například v *Ph1* populaci, která byla použita pro poziční klonování genu na chromozomu 4A, bylo detekováno zvýšení rekombinace až 27x v telomerické oblasti.

2. Zmiňujete novou úspornou metodu pozičního klonování genů (Sánchez-Martin et al., 2016). Mohla byste mi přiblížit rozdíl v experimentální a časové náročnosti této nové metody ve srovnání s postupem využívajícím fyzické a genetické mapy? Jsou tyto dva přístupy z hlediska výstupů rovnocenné, nebo má každý z nich vlastní výhody?

Odpověď:

Poziční klonování	MutChromSeq
Určení polohy genu na chromosomu z genetického mapování	
Vývoj markeru ve vazbě s genem	mutagenese
Genetická mapa oblasti genu	Výběr linií s mutovaným genem
Saturace oblasti markery	Třídění chromosomů
Fyzická mapa oblasti genu	Sekvence chromosomu
Zmenšování oblasti	Kandidátní gen
Sekvence kandidátních klonů	
Kandidátní gen	

Klasické poziční klonování je časově velmi náročné a vyžaduje vývoj nových markerů a neustálý screening mapovací populace, nebo vývoj nových mapovacích populací. Klasické poziční klonování je závislé na rekombinaci, když se dostanete blízko genu, je pravděpodobnost rekombinace nižší. Fyzická mapa oblasti genu je možno sestavit z dostupných BAC knihoven, ale může se stát, že gen v této knihovně nenajdeme. Klasické poziční klonování může trvat 10 a více let.

MutChromSeq je méně časově náročná. Nejvíce času zabere vývoj mutantů. Zbytek postupu je v podstatě za měsíc hotový (za měsíc máte kandidátní gen). Vhodné i pro nerekombinující oblasti genomu ale vyžaduje dominantní fenotyp.

3. Čím jsou diskrepance v pořadí markerů způsobeny? Je to způsobeno citlivostí metod, nemůže jít o přestavby způsobené ozářením nutným pro RH mapování, nebo je to jednoduše vysvětlitelné variabilitou biologického materiálu (pšeničných linií) používaného pro konstrukci map? Kolik je známo o vnitrodruhové variabilitě pšeničného genomu - respektive o potenciálních přestavbách genomu většího měřítka? A jak je na tom pšenice s variabilitou velikosti genomu - například díky aktivitě mobilních elementů?

Odpověď: Diskrepance v pořadí markerů v mapách jsou nejčastěji způsobeny genomickou variabilitou použitých mapovacích populací. Syntenie genomů pšeničných linií na makro úrovni je celkem dobře zachovaná i mezi příbuznými druhy. Popsané v pracích Devos a Gale poslední dekády 20. století. Na druhé straně časté odchylky od syntenie na úrovni mikrokolinearity byly popsány u pšenice hlavně v pracích zaměřených na klonování genů ale i při analýze haplotypů. Například v práci Tsombalova et al., 2016 testováním 216 kultivarů identifikovali tři hlavní haplotypy na konci 4A chromosomu a signifikantní odchylky ve

velikosti tohoto chromosomu mezi kultivary. Takže odchylky v pořadí markerů jsou s největší pravděpodobností výsledkem aktivace transponovatelných elementů, indelů, translokací a inverzí. Přestavby způsobené ozářením nutným pro RH mapování mohou být zdrojem umělé variability, a proto jsme použili deleční mapu pro kontrolu spolehlivosti RH mapy.

4. Doplnující otázka 1. Věděla byste pro jaké rostlinné chromozomy jsou časté a velké chromozomální přestavby typické?

Odpověď: U pšenice je to přestavba chromozomu 4A. U chromosomu 4A došlo k několika translokacím a inverzi. Pak u některých odrůd pšenice můžeme narazit na translokaci 1BS/1RS. Tato translokace přinesla do pšenice geny rezistence proti suchu, ale došlo ke ztrátě kvality.

U jiných rostlinných genomů, například u pohlavních chromosomů.

5. Doplnující otázka 2. Porovnáním složených genomů různých lidských populací navzájem se nedávno zjistilo, že více než 90% lidské vnitrodruhové genetické variability je způsobeno genomovými přestavbami malého rozsahu (inzerce, delece, inverze v řádu desítek až tisíců bazí, které zahrnují geny), tedy nikoli převážně bodovými mutacemi nebo odlišností (populačně-specifických) alel, jak se dříve předpokládalo. Existují nějaké studie na toto téma u pšenice?

Odpověď: U pšenice jsou podobné studie pouze na úrovni genů.

6. Povedlo se mezitím osekvenovat a identifikovat tento gen (z článku Randhawa et al., 2014)?

Odpověď: Gen není osekvenovaný a ani identifikovaný. V oblasti byla zjištěna duplikace, která stěží mapování. Pokud to půjde, uvažují kolegové o využití metody MutChromSeq.