

Posudek Dizertační práce Barbory Balcárkové Klocové "Fyzická mapa chromozómu 4AL pšenice a poziční klonování genu ovlivňujícího výnos".

RNDr. Helena Štorchová CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i

Praha

Dizertační práce Barbory Balcárkové Klocové "Fyzická mapa chromozómu 4AL pšenice a poziční klonování genu ovlivňujícího výnos" byla vypracována na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty University Palackého a v Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Práci vedl Mgr. Miroslav Valárik Ph.D. Dizertační teze jsou sepsány v anglickém jazyce.

Dizertační práce je napsána anglicky. Sestává z krátkého přehledného úvodu a z vlastních výsledků. Ty jsou reprezentovány čtyřmi publikacemi v respektovaných mezinárodních časopisech (Plant Biotechnology Journal, Journal of Experimental Botany, Theoretical and Applied Genetics a Frontiers in Plant Science). Kandidátka je první autorkou článku ve Frontiers, v ostatních případech je spoluautorkou. Výsledky jsou doplněny dvěma plakátovými sděleními.

Rozsah výsledků je značný. Během práce na PhD projektu zvládla kandidátka řadu náročných metodik a výrazně přispěla ke konstrukci fyzické mapy chromozómu 4AL pšenice, připravené k finálnímu sekvenování. Své výsledky publikovala jako spoluautorka a v jednom případě i jako první autorka ve vynikajících časopisech. Tímto úsilím přispěla k úspěšnému řešení české části rozsáhlého mezinárodního projektu IWGSC, zaměřeného na získání úplné sekvence genomu pšenice.

Publikované práce prošly náročným recenzním řízením, proto se ve svém posudku zaměřím na vlastní rukopis dizertace. Úvodní část je sepsána přehledně a stručně, čtenář se seznámí s pohnutou historií domestikace pšenice, která stála na úsvitu lidské civilizace. Poté jsou srozumitelnou formou pojednány často komplikované postupy přípravy a analýzy BAC klonů, jejich skládání do celků reprezentujících strukturu chromozomu. Následuje vysvětlení, jak jsou na fyzické mapě chromozomu ukotveny genetické a molekulární markery. Je popsáno využití radiační hybridní mapy, která umožňuje mapovat málo rekombinující oblasti, chudé na geny a naopak bohaté na repetitivní sekvence. K této části mám jen drobnou výtku, týkající se jazykového stylu, slovosledu, malých chyb. Jsou zde zbytečné nepřesnosti např. v latinských názvech (T. zhukovkyii str. 10, Ae. tauschaii, str. 12). Je *Triticum soveticum* skutečně uznaným botanickým druhem pšenice?

Výsledky jsou představeny formou abstraktů publikovaných prací, a dále abstraktů z konferencí. Úplné publikace jsou přičleněny v Appendixu. V celkovém pohledu však není zcela jasné, 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 chromozómu 4AL pšenice a pozičnímu mapování.

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.

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?

Na závěr mohu jen shrnout, že kandidátka odvedla vynikající práci a doporučuji její dizertační teze k obhájení.

RNDr. Helena Štorchová CSc.

10. dubna 2017



OPONENSTKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÉ PRÁCI

Mgr. Barbara Balcárková (2017): Physical map of the wheat chromosomes 4AL and position cloning of a gene for yield. Dizertační práce PŘF UP v Olomouci.

Předložená dizertační práce je součástí koncepčně pojatého výzkumu Centra strukturní a funkční genomiky rostlin ÚEB AV ČR zaměřeného na studium genetické informace pšenice seté. Přestože se postupně daří stanovit jeho nukleotidovou sekvenci, vlivem velké komplexity genomu existuje jen málo informací, které by umožnily vývoj molekulárních markerů využitelných ve šlechtění. Předložená dizertační práce se zaměřuje na konstrukci fyzické mapy dlouhého ramene chromozomu 4A pšenice a vysoko-hustotní radiační mapy tohoto chromozomu. Cílem je zahuštění genetické mapy 5AL chromozomu a klonování genů zodpovědných za rezistenci k padlí travnímu (*QPm-tut-4A*) a ke rzi (*Yr51*), nebo genu ovlivňujícího výnos (*Qyi-4A-bga*).

FORMÁLNÍ HODNOCENÍ PRÁCE

Dizertační práce je sepsána v anglickém jazyce a je členěna do 7 částí (61 číslovaných stránek). V první kapitole (Introduction) autorka zdůrazňuje význam pšenice pro výživu lidstva a stručně diskutuje problematiku fyzické analýzy velkých genomů. Následuje obsáhlá kapitola (Literature review, 24 stran), ve které detailně popisuje taxonomické zařazení pšenice, zabývá se její evolucí domestikací, a charakterizuje její genom. Následuje popis konstrukce fyzické mapy, přístupů umožňujících ukotvení fyzické mapy na genetickou mapu. Na závěr literárního přehledu se zabývá posičným klonováním důležitých genů a uvádí v tabulce přehled pozičně klonovaných genů pšenice. Tato část literárního přehledu je zaměřena hlavně metodicky, zaměřuje se na popis algoritmů a softwarových nástrojů umožňujících vytváření fyzických map. Přehled použité literatury (References) obsahuje 99 záznamů.

Cíle práce (Aims of the Thesis) jsou jasně definovány (konstrukce fyzické mapy chromozomu 4A pšenice, konstrukce vysoko-hustotní RH mapy chromozomu 4A pšenice, využití fyzické mapy pro posiční klonování důležitých genů pšenice) a jejich naplnění je dobře kontrolovatelné.

Čtvrtá kapitola - Výsledky (Results) je zpracována netradičně. Představují ji 4 abstrakta původních vědeckých prací publikovaných v prestižních impaktovaných časopisech: *Frontiers in Plant Science* (IF: 4,495), *Plant Biotechnology Journal* (IF: 6,09), *Journal of Experimental Botany* (IF: 5,677), *Theoretical and Applied Genetics* (IF: 4,52); a dvě abstrakta příspěvků na mezinárodních konferencích (úplné texty vědeckých publikací se nacházejí v příloze práce). Osobně se domnívám, že zpracování výsledků ve formě několikastránkového textu, ve kterém autorka práce zdůrazní své hlavní výsledky, poukáže na jejich provázanost, a odpoví na otázku 'Co dál?' atd., by jistě práci prospělo. Odpadla by tak otázka: Které dílčí experimenty autorka navrhovala, prováděla a hodnotila a jak se podílela na přípravě publikací?

Palacky University, Olomouc | Czech Republic

Faculty of Science | Dept. of Cell Biology and Genetics

+420 585 634 900 | +420 585 634 901 (FAX)

Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc- Holic, Czech Republic

Následující kapitola (Conclusions) shrnuje vlastní výsledky. Ze závěrů je zřejmé, že cíle práce byly splněny: autorka se podílela na konstrukci fyzické mapy 4L chromozomu pšenice, která již je veřejně přístupná na webových stránkách; podílela se na vytvoření vysoko-hustotní fyzické mapy 4AL; a klonování významných genů pšenice: *QPm-tut-4A*, *Yr51* a *Qyi-4A-bga*.

V Příloze práce (Appendices) je uvedena jedna impaktovaná publikace, u které je Barbora Balcárková první autorkou a tři impaktované publikace, u kterých je spoluautorkou.

Práce je dobře členěna, přehledná a dobře čtivá. Oceňuji pečlivost, kterou autorka věnovala přípravě textu (mimo část výsledky) a minimum formálních chyb nebo překlepů.

HODNOCENÍ VLASTNÍ PRÁCE

Cíle, které si autorka stanovila, se týkají vysoce aktuální problematiky – studia 4A chromozomu pšenice. Záměrem bylo konstruovat fyzickou mapu a radiační hybridní mapu dlouhého ramene 4A chromozomu propojit ji s genetickou mapou, a získat tak možnost nacházet markery významných genů pšenice, případně je klonovat. Je jistě vynikajícím výsledkem, že se podařilo integrovat prakticky celou fyzickou a genetickou mapu dlouhého raménka 4L chromozomu pšenice (98,6 %). Vysoko-hustotní radiační hybridní mapa obsahovala 2317 markerů a umožnila integrovat 79,6 % malého ramene a 54,4 % dlouhého ramene 4A chromozomu. Integrace fyzických a genetických map potom umožnila lépe lokalizovat již zmíněné významné geny pšenice a navrhnout jejich markery využitelné ve šlechtění – selekci pomocí markerů (MAS).

Lze konstatovat, že se autorce disertační práce podařilo naplnit cíle v plném rozsahu. Interpretace získaných dat v předložených publikacích a uvedené závěry experimentální práce dokládají vysokou erudovanost doktorandky a velmi dobrou znalost studované problematiky.

DOTAZY A NÁMĚTY PRO DISKUSI

1. Jaké vlastnosti by měl splňovat genetický marker použitelný ve šlechtění (MAS)?
2. Na straně 58 uvádíte '... the flanking markers are successfully used in pre-breeding a breeding proces'; mohla byste upřesnit, které markery, kde a s jakou úspěšností byly použity?
3. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst) je celosvětově významný houbový 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?

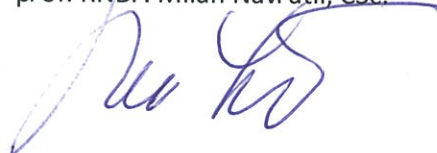
ZÁVĚR

Domnívám se, že studentka plně prokázala své tvůrčí schopnosti a předkládá práci, která podle § 47 VŠ zákona 11/98 Sb. Jednoznačně splňuje požadavky kladené v daném oboru na disertační práci. Proto

práci Mgr. Barbory Balcárkové doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby pak doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.

V Olomouci 7.4.2017

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, cursive letters, likely representing the name Milan Navrátil.

Posudek oponenta na disertační práci
(doktorský studijní obor P1527 Biologie)

Oponent a jeho pracoviště:

Mgr. Zdeněk Kubát, PhD.
Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135
61200 Brno

Autor práce:

Mgr. Barbora Balcárková

Název práce: Physical map of the wheat chromosome 4AL and positional cloning of a gene for yield

Oponentský posudek:

Disertační práce Mgr. Barbory Balcárkové se věnuje konstrukci fyzické mapy a radiační hybridní mapy pšeničného chromozomu 4A a využití této mapy pro klonování několika hospodářsky významných genů. To vše dalo vzniknout 4 publikacím uveřejněným v kvalitních impaktovaných časopisech.

Práce má rozsah 61 stran a je členěna do 7 kapitol. Je doplněna plným zněním publikací a dvěma konferenčními plakátovými sděleními. V úvodní kapitole se autorka čtivě a srozumitelně věnuje významu, evoluci a pravděpodobným scénářům domestikace kulturní pšenice, takže je čtenář dobře uveden do problematiky. Následuje srovnání a vyčerpávající popis strategií mapování obřích genomů, jakým je i genom pšenice. Autorka se podrobně věnuje fingerprintingu BAC knihoven a metodám konstrukce fyzických map – tradičnějšímu algoritmu „FingerPrinted Contigs“ a novému přístupu vhodnému pro velké genomy obsahující množství repetitivních sekvencí, Linear Topological Contig. Dále přehledně vysvětluje integraci fyzických a genetických map včetně využití vysokohustotních radiačních map u organismů s velkým podílem heterochromatických oblastí s nízkou frekvencí rekombinace a vyzdvihuje roli těchto map pro klonování důležitých genů. K této části práce bych měl následující otázky:

- 1) V úvodu píšete, že více než 1/3 pšeničného genomu vykazuje velice nízké frekvence rekombinace, což komplikuje přesné genetické mapování markerů. Čím se liší tato 1/3 genomu od zbytku genomu s vyšší frekvencí rekombinace? Jsou nějaké způsoby, jak zvýšit četnost rekombinace v těchto oblastech?
- 2) Zmiňujete novou úspornější metodu pozičního klonování genů (Sánchez-Martín 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 svoje vlastní výhody?

Výsledkem disertační práce je podrobná RH mapa chromozomu 4A integrovaná s fyzickou mapou a genetickými mapami. Díky těmto zdrojům se podařilo umístit do fyzické mapy a osekvenovat 2

hospodářsky významné geny a pro další dva byly nalezeny markery, které slouží dalším analýzám. Výsledky jsou uveřejněny ve 4 publikacích s vysokým IF, na nichž je studentka prvním autorem nebo spoluautorem. Výsledky publikací a jejich význam jsou přehledně shrnuty v závěru disertační práce, kterému následuje seznam zkratk. Disertační práce je napsána v anglickém jazyce a po formální stránce je takřka bezchybná, vyskytuje se zde jen několik nesprávných písmen.

K výsledkům bych měl následující poznámky. V publikaci Balcárková et al. (2017, *Frontiers in Plant Science*) jste zkonstruovali dosud nejpodrobnější RH mapu chromozomu 4A a porovnali ji s dostupnými mapami jiných autorů. Na obrázcích 3 a 4 v této publikaci jsou vidět diskrepance mezi jednotlivými mapami. Moje otázka zní:

- 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?
- 4) Doplnující otázka 1. Věděla byste pro jaké rostlinné chromozomy jsou časté a velké chromozomální přestavby typické?
- 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 i geny), tedy nikoli převážně bodovými mutacemi nebo odlišností (populačně-specifických) alel, jak se dříve předpokládalo. Existují nějaké studie na toto téma u pšenice?

V publikaci Randhawa et al. (2014, *Theor Appl Genet*) jste objevili markery ve vazbě s genem Yr51 kódujícím rezistenci ke rzi. Vzhledem k tomu, že už od publikování těchto markerů uplynula nějaká doba, moje otázka zní:

- 6) Povedlo se mezitím osekvenovat a identifikovat tento gen?

Závěr: Předloženou disertační prací prokázala studentka vysoké tvůrčí schopnosti. Práce také dozajista byla velice experimentálně i časově náročná a je vynikajícím a komplexním dílem, které se vyznačuje využitím nejmodernějších metod konstrukce fyzických a vysokohustotních radiačních map, jež jsou základním předpokladem efektivního šlechtění pšenice. Kvalitu dosažených výsledků dokumentují i 4 publikace ve vynikajících časopisech s IF 4-6. Práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na disertační práci v doktorském studijním oboru Botanika a

doporučuji ji k obhajobě.



Zdeněk Kubát, v Brně, 28. 4. 2017