

Předběžná oponentura disertační práce

Vyhledávání a charakteristika genů zodpovědných za modré zabarvení obilky pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)



Školitel: Prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.

Doktorandka: Ing. Milena Musilová

Ústav biologie rostlin, AF MENDELU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Cíle

- Studium genetické variability genotypů pšenice s modrým zabarvením obilky mikrosatelitními markery
- Identifikace a charakteristika kandidátních sekvencí podílejících se na modrém zabarvení obilky
- Bioinformatická analýza kandidátních sekvencí
- Studium exprese kandidátních sekvencí



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Barevná pšenice



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

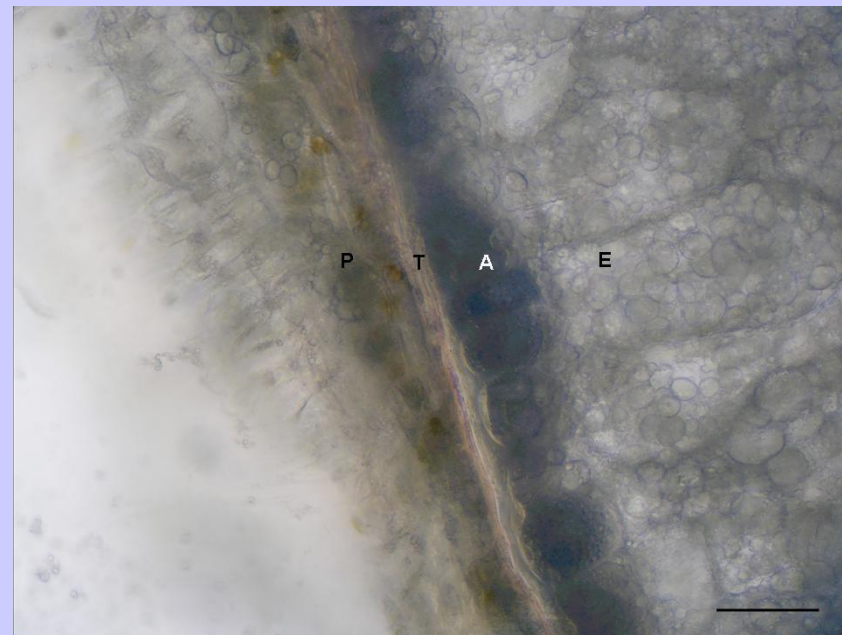
Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Modrá pšenice

- Různé zabarvení obalových vrstev
- Specifita modrého zabarvení
- Rozšíření sortimentu cereálních potravin



Obilky genotypu Tschemaks Blaukörniger Sommerweizen /TBS/ (úsečka = 2000 μm).



Příčný řez obilkou genotypu Tschemaks Blaukörniger Sommerweizen /TBS/ (úsečka = 200 μm).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Genetická podstata modrého zabarvení

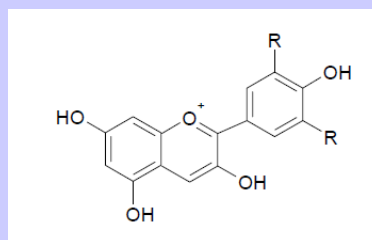
- Modré zabarvení řízeno kodominantně působícím genem *Ba1* (4BL) nebo jiným genem *Ba2* (4AL)
- Gen se slabší expresí modré barvy (*half-blue*)
- Výskyt zaznamenán ve vzorku *Triticum monococcum* L. spp. *aegilopoides*.



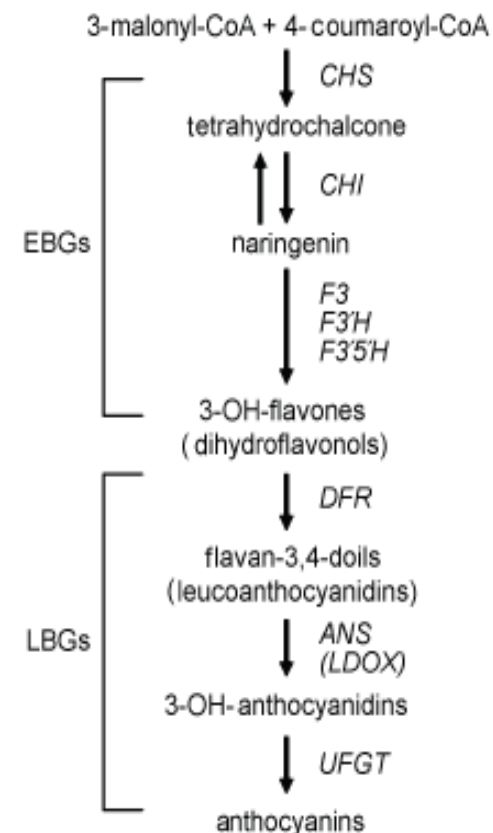
Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Anthokyny

- Studium biosyntetické dráhy
- Klíčový enzym chalkon syntáza
- Významné funkce v rostlinách
- Dominantní anthokyny
 - Delfinidin-3-glukosid
 - Kyanidin-3-glukosid



Struktura anthokyanidinů



Zjednodušené schéma biosyntézy anthokyanů (Nesi et al., 2001)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Význam ve šlechtění na pekařskou kvalitu

Charakteristika genetické variability vybraných lokusů

- HMW gluteninové podjednotky
 - Prokazatelný vliv na pekařskou kvalitu
 - Přímo součástí lepkových bílkovin
- Žitná translokace T1BLS.1RS (lokus Sec-1)
 - Pozitivní efekt na výnos a rezistenci
 - Negativní vliv na pekařskou kvalitu



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Studium genetické variability

- Materiál

Název	Zabarvení obilky	Forma	Zdroj
Novosibirskaýa 67, ANK-1A, ANK-1B, ANK-, ANK-1D, ANK-1E	Bílé, Červené	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger	Modré	jarní	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
48M, RU 440-5, RU 440-6, Barevná 9, Barevná 25	Modré	ozimá	ZVÚ Kroměříž, s.r.o.
<i>Thinopyrum ponticum</i>		ozimá	GB VÚRV, v.v.i.

- Metoda SSR markerů – Simple sequence repeats
- Statistické zpracování (program FreeTree)
 - DI - index diversity
 - PI - pravděpodobnost identity
 - PIC - polymorfní informační obsah
- Grafické zpracování do podoby dendrogramu (program TreeView)



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Genomická analýza

- Materiál
 - Genotypy
 - Novosibirskaja 67,
Tschemaks Blaukörniger Sommerweizen,
UC66049, Heroldo
 - Odběry vzorků z polního pokusu
dle časového plánu:
10., 15., 20., 25., 30.,
35., 40. den *post anthesis*
 - Fotodokumentace, uložení při -70 C



Tschemaks Blaukörniger
Sommerweizen, 5. odběr



UC66049, 5. odběr



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Analýza kandidátní sekvence

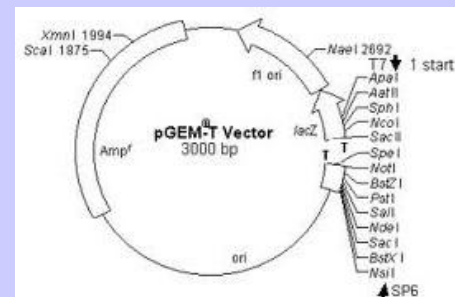
- Nahrazení degenerovaných primerů použitím přímých sekvencí genu pro CHS (databáze NCBI)
- Návrh primerů a optimálních teplot jejich nasedání
- Primerová kombinace pro CHS z *Hordeum vulgare* použita pro návrh a optimalizaci real-time PCR



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Analýza kandidátní sekvence

- Izolace RNA
- Reverzní transkripce do cDNA
- Gradientová PCR
- Ligace do vektoru pGEM-T
- Transformace *E. Coli*, výběr pozitivních kolonií
- Amplifikace plazmidů v *E. coli*
- Izolace plazmidové DNA
- Odeslání na sekvenaci, bioinformatická analýza Clustal W2
- Analýzy exprese pomocí qPCR, rel. kvantifikace vůči provoznímu genu, vyhodnocení pomocí DDCT



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

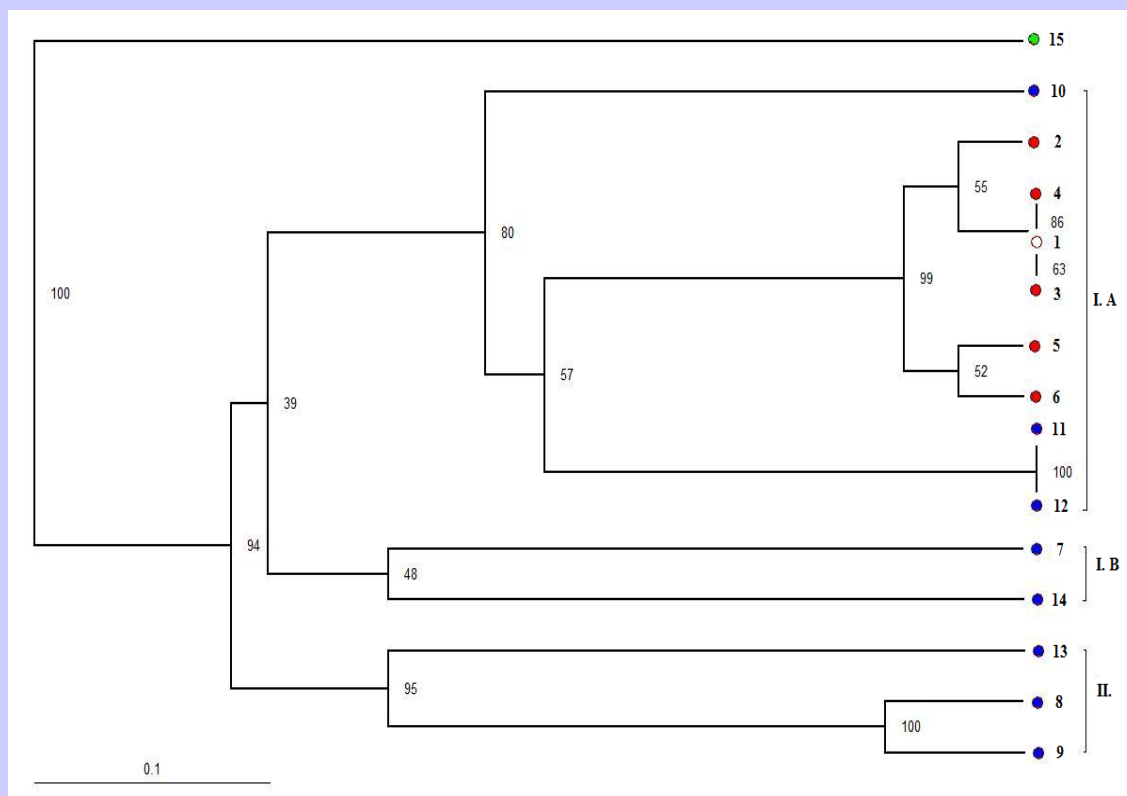
Identifikace alel pro predikci kvality

- Materiál
 - Novosibirskaja 67, UC66049, Tschermaks Blaukörniger Sommerweizen, Tschermaks Blaukörniger, 48M, RU 440-5, RU 440-6, Barevná 9, Barevná 25
 - Pozitivní kontrola tritikale Pawo
- Metody
 - SPLAT (Specific polymorphic locus amplification test)



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Výsledky genetické variability zabarvení



Dendrogram genetické variability genotypů sestavený na základě analýz SSR lokalizovaných na chromozomech 3A, 3B, 3D, 4A a 4B u pšenice



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

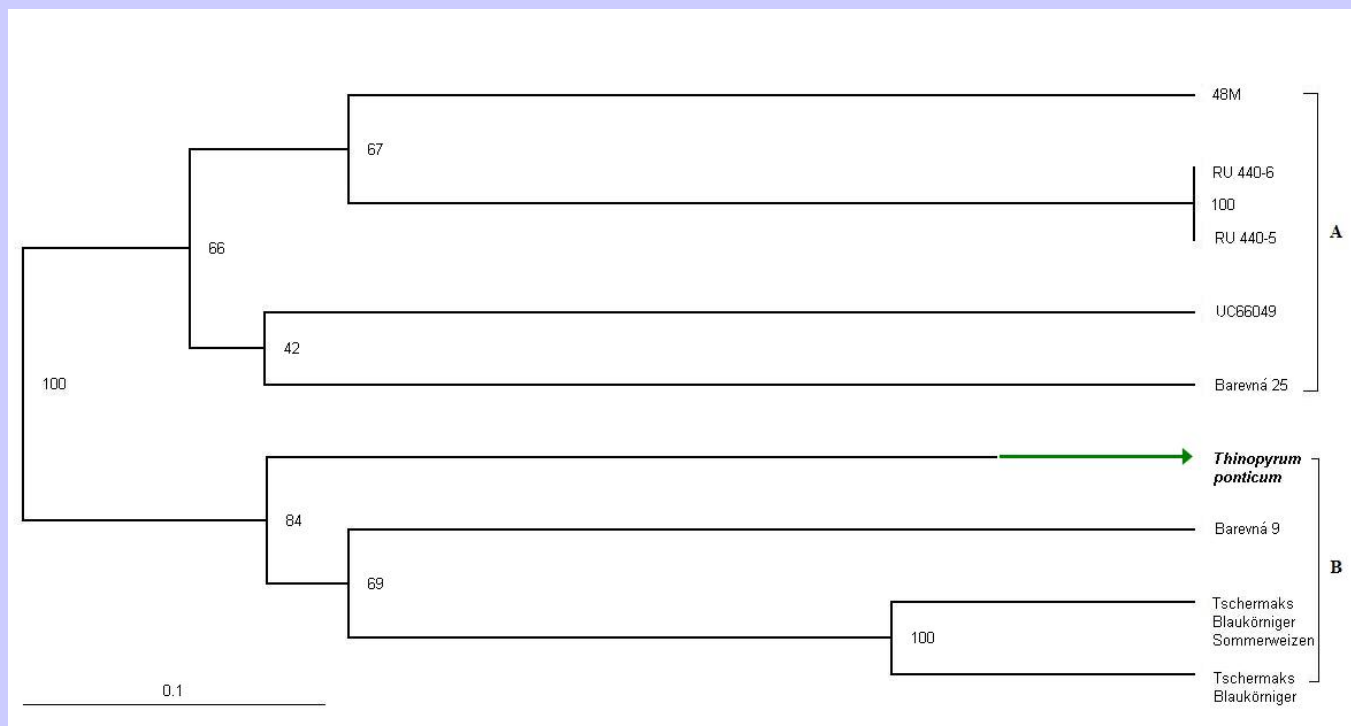


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Výsledky genetické variability zabarvení



Dendrogram příbuznosti genotypů pšenice s modrým aleuronem a *Th. ponticum* sestavený na základě analýz SSR lokalizovaných na chromozomech 4A a 4B u pšenice



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Sekvenční analýza kandidátních sekv.

- Sekvenční data fragmentu DNA o velikosti 196 bp
- Vzájemná podobnost mezi HvCHS sekvencemi genotypů s bílým perikarpem a modrým aleuronem 94 - 100%
- Variabilita sekvencí dána SNP (Single Nucleotide Polymorphism)
- Nejvíce SNP bylo zaznamenáno u sekvence genotypu N67 a UC
- Sekvenční data pro TBS nejsou pro porovnání k dispozici v celé délce z důvodu opakovaně neúspěšného klonování



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

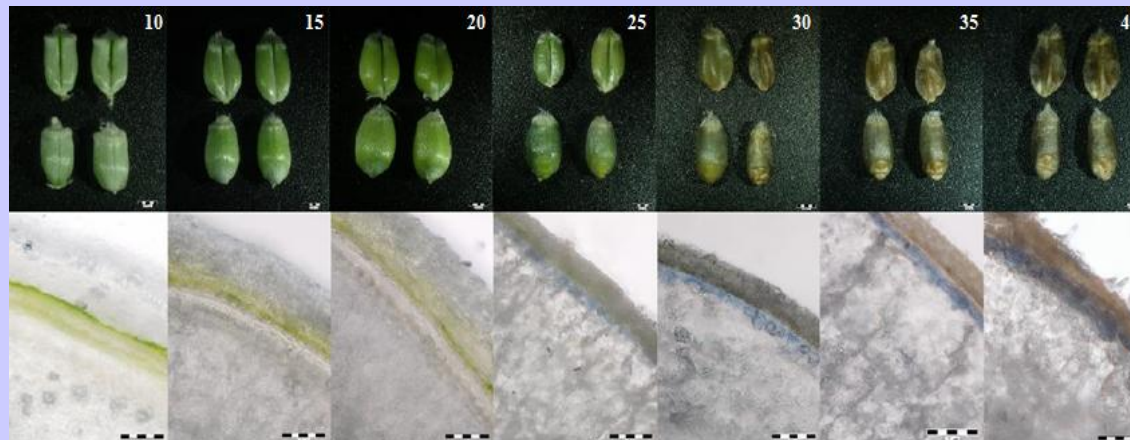
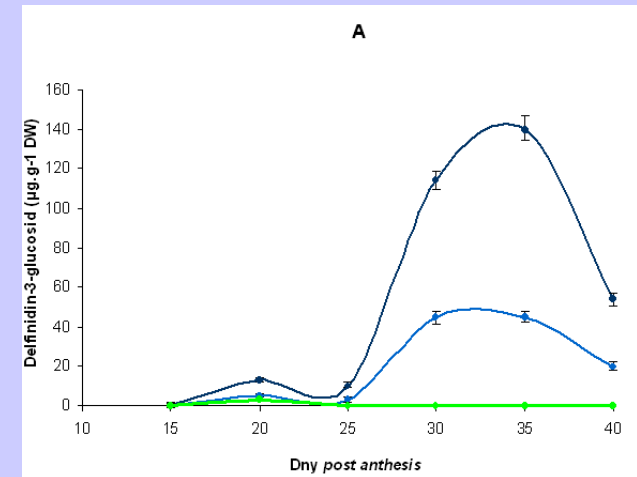
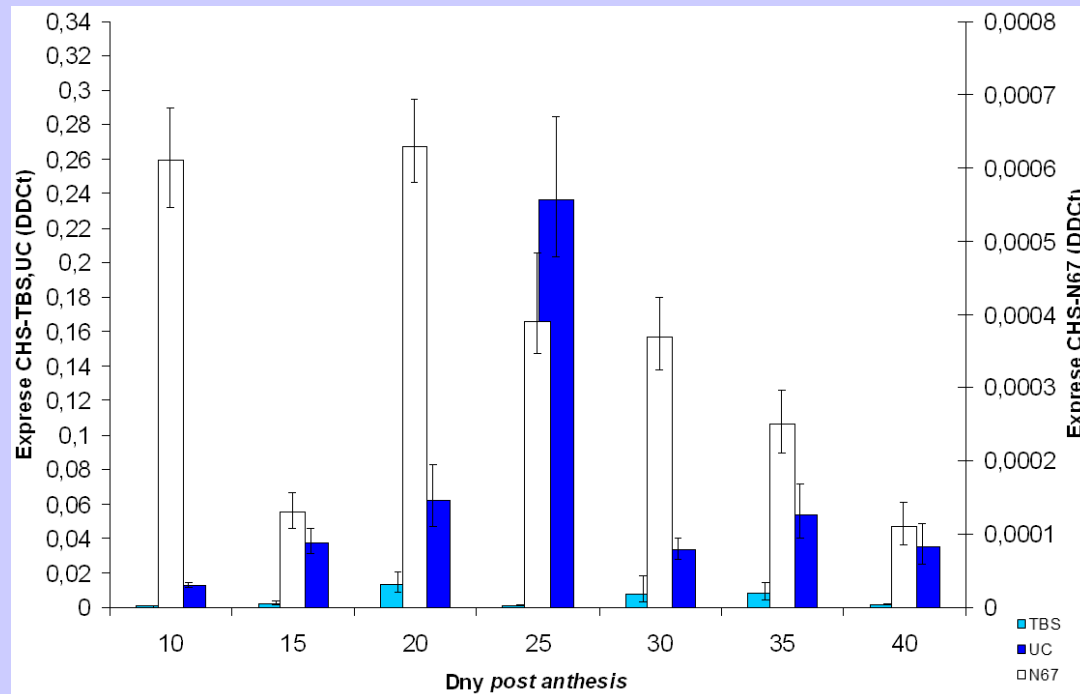
Sekvenční analýza kandidátních sekv.

- Porovnání sekvencí s BAC (Bacterial Artificial Chromosome) knihovnou pšenice seté v laboratoři molekulární cytogenetiky a cytometrie, Ústavu experimentální botaniky, Akademie věd ČR Olomouc
- Sekvence CHS nalezena v kopiích vždy na obou ramenech všech chromozomů 2. homeologické řady

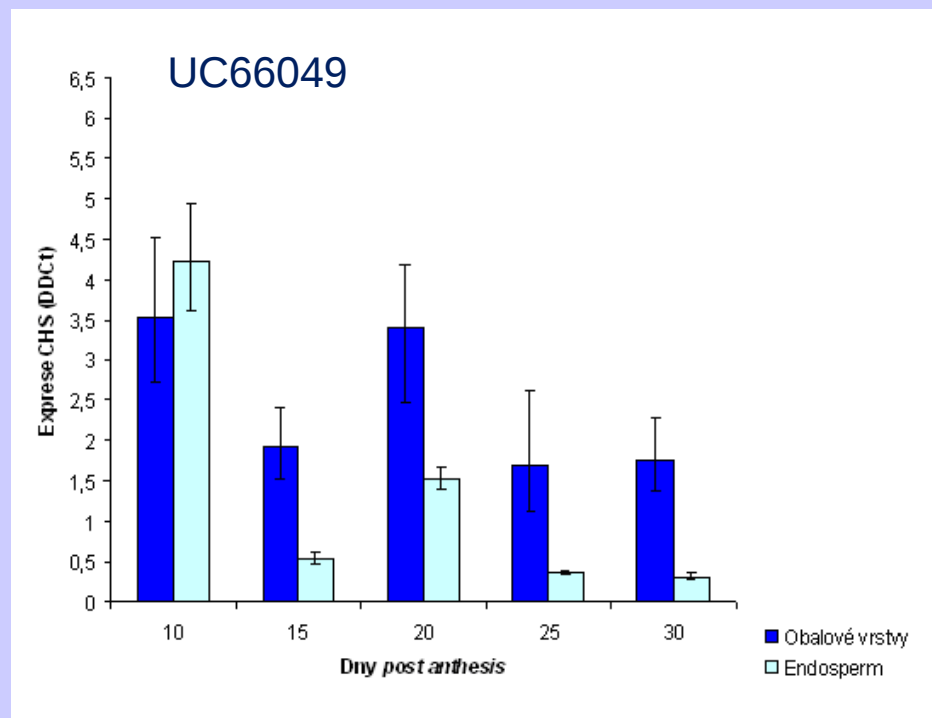
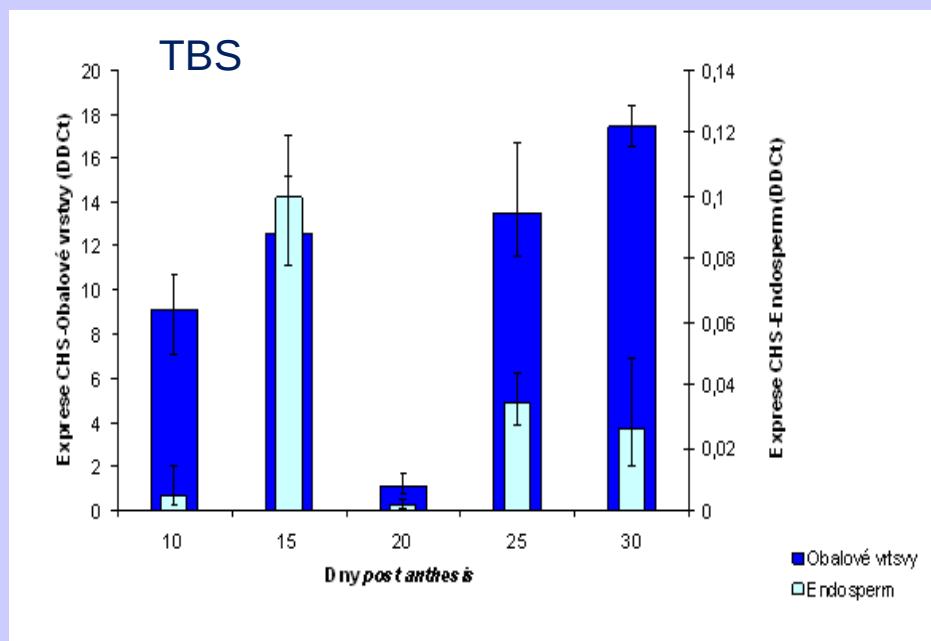


Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Analýza exprese genu CHS



Analýza exprese genu CHS



Predikce pekařské kvality

- Na základě detekce vybraných markerů - nejperspektivnější z hlediska pekařské kvality pšenice genotyp UC66049, RU 440-5 a RU 440-6
- Současně u těchto materiálů nebyla detekována přítomnost sekalinového lokusu *Sec-1* spojována se zhoršenou pekařskou kvalitou pšenice
- Dosažené výsledky také potvrdily vhodnost genotypu RU 440-6, jakožto nově zaregistrované odrůdy SKORPION v Rakousku



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Závěry

Vybrané genotypy s modrým zabarvením obilky podrobeny studiu z více perspektiv

- Analýza genetické variability
- Ukládání barviv v jednotlivých vrstvách obilky
- Sekvenační analýza a analýza exprese genu pro CHS
- Vybrány 3 (UC66049, RU 440-5 a RU 440-6) genotypy s modrým zabarvením obilky s genetickými predispozicemi pekařské kvality



Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Významné publikace

Genetic Variability in Common Wheat with Colored Caryopses Determined by Microsatellite Markers

Milena MUSILOVÁ, Václav TROJAN, Tomáš VYHNÁNEK, Ladislav HAVEL

IN: Czech Journal Of Plant Breeding And Genetics

Stav: přijat po jazykové korekci

Anthocyanins in wheat: a review

Milena MUSILOVÁ, Elena Khlestkina, Biguang Huang, Heinrich Grausgruber

IN: Journal of Cereal Science

Stav: submitován 15.2.2013

Studies Of Candidate Sequences From Wheat Anthocyanin Biosynthetic Pathway

Václav TROJAN, Milena Musilová, Tomáš VYHNÁNEK, Ladislav HAVEL

IN: Journal of Cereal Science

Stav: příprava manuskriptu



Podpořeno projekty:
- IGA AF č. IP 1/2010,
TP 7/2011, TP 1/2010
- GAČR č.
GD204/09/H002



**Excelence doktorského studia na AF MENDELU
pro navazující evropskou vědecko – výzkumnou kariéru
CZ.1.07/2.3.00/20.0005**



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky

Poznámky oponentů

Doc. Ing. Jan Bednář, CSc.

- cca 24 upozornění převážně formálního charakteru

Prof. RNDr. Zdeněk Sladký, Dr.Sc.

- cca 3 upozornění ryze formálního charakteru



Tato *prezentace* je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky