

Posudek disertační práce Miroslavy Karafiátové „Cytogenetic analysis of crop genomes“

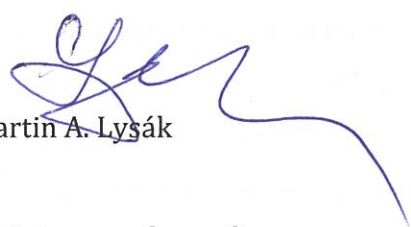
Předložená disertační práce Miroslavy Karafiátové je kumulativního charakteru, obsahuje úvodní literární rešerši (35 stran), cíle práce na pěti řádcích, obecné závěry ve dvou odstavcích (str. 72) a pět přiložených publikací doktorandky. Dvě publikace jsou prvoautorské, z toho jedna je ve formě rukopisu připraveného k recenznímu řízení v odborném časopise. Čtyři přiložené práce byly publikovány v impaktovaných časopisech s dobrým (*Chromosome Research*) až velmi dobrým impaktem (*Plant Physiology*). Soubor publikací tvořící jádro disertační práce je možné označit jako vysoce kvalitní a ve srovnání s jinými disertačními pracemi jako nadstandardní.

V úvodním přehledu se autorka pokusila podat krátkou, a myslím užitečnou, charakteristiku obilnin a plodin, které byly analyzovány v pěti zmíněných publikacích. Další část popisuje jaderný genom rostlin. Tato část práce by podle mého názoru mohla být obsáhlejší, propracovanější a lépe osvědčující autorčinu znalost problematiky. Zarážející je absence citací u mnoha zmíněných faktů (např. str. 21 neobsahuje jedinou citaci). Sám nejsem přítelem uvádění citací ke každému faktu či skutečnosti, nicméně opačná strategie je zejména v případě diplomových a disertačních prací poněkud problematická. Tato část práce k mému překvapení neobsahuje snad jedinou zmínku o podobnosti a evoluci struktury genomu rostlin (genomová/genová kolinearita/syntenie), ačkoliv přiložené publikace se této problematice věnují. Část 2.3 se zabývá popisem nejdůležitějších klasických i moderních cytogenetických metod. Zatímco historické exkurzy do oblasti cytogenetiky savců jsou sympatické, postrádal jsem část o přípravě hybridizačních sond vycházející z analýz next-generation dat, stejně jako obsáhlejší rozbor srovnávací cytogenetiky rostlin (srovnávací mezidruhovná FISH/painting). Autorka zde ignorovala poměrně rozsáhlý počet prací z čeledí lilkovitých, brukvovitých aj.

První ze dvou prvoutorských prací pojednává o fyzickém mapování nerekombinujících oblastí chromosomů ječmene pomocí FISH. Autoři úspěšně použili krátké kódující sekvence (2 - 3,5 kb) k fyzickému mapování centromerické oblasti chromosomu 7H. Tento přístup umožňuje mapovat strukturu chromosomových úseků s nízkou frekvencí rekombinace. Ve druhé prvoutorské, dosud nepublikované, práci doktorandka a její spolupracovníci využívají chromosomově specifické kódující sekvence k malování chromosomu 1H ječmene. Práce je originální kombinací třídění chromosomů pomocí průtokové cytometrie a získání chromosomově specifických sekvencí (sond) pomocí přístupu "gene capture". Takto získané chromosomové sondy byly použity k malování chromosomu 1H v přítomnosti blokující DNA. Ačkoliv je tento metodický přístup technicky a finančně náročný, představuje tato práce významný počín v malování chromosomů rostlin s velkým genomem.

V obou prvoautorských publikacích prokázala Miroslava Karafiátová schopnost tvůrčí vědecké práce a současně obě práce osvědčují autorčinu odbornou erudici v oblasti rostlinné molekulární cytogenetiky. Předložená disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru.

Z těchto důvodů disertační práci doporučuji k obhajobě.



Martin A. Lysák

V Brně, 18.8.2014

VS Cytogenomika rostlin
Středoevropský technologický institut (CEITEC)
Kamenice 5
Masarykova univerzita
Brno 625 00

Tel. 549 494 154
E-mail martin.lysak@ceitec.muni.cz



BIOLOGY CENTRE ASCR

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ22 0710 0000 0000 0552 7231 | SWIFT CODE – CNBACZPP | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 771 111 (telephone exchange) | www.bc.cas.cz | e-mail: bc@bc.cas.cz

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. M. Karafiátové

Cytogenetic analysis of crop genomes

Předložená disertační práce byla zaměřena na studium genomů hospodářsky významných druhů rostlin pomocí cytogenetických technik. Vytýčené cíle zahrnovaly 1) cytogenetické mapování unikátních sekvencí na chromozómech ječmene, 2) vyvinutí metody selektivního barvení chromozómů (whole chromosome painting, WCP) u ječmene, 3) cytogenetickou analýzu kostřavy a jílku 4) cytogenetickou analýzu dvou odrůd cizrny, Kabuli a Desi.

Práce je napsaná v anglickém jazyce, a i když se místy vyskytují překlepy či gramatické chyby, působí celkově dobrým dojmem. Literární přehled (35 stran) je zpracován podrobně a srozumitelně, což svědčí o dobré orientaci doktorandky v dané problematice. Za literárním přehledem následuje seznam cílů a zejména shrnutí nejpodstatnějších výsledků. Z nich bych rád vypíchl především vyvinutí velmi originálního postupu získání sondy vhodné pro WCP. Nový postup, založený na selektivním vychytávání fragmentů genů z DNA chromozómů vytříděných pomocí průtokové cytometrie, je příslibem širšího využití metody WCP i u druhů s velkými genomy a vysokým podílem repetitivní DNA. Za větší zmínku jistě stojí i využití metody FISH pro fyzikální mapování a určení pořadí vybraných genů na chromozómu 7 ječmene. Doktorandka dokázala lokalizovat 22 z 25 cDNA sekvencí, jejichž délka činila pouhých 2 – 3,5 Kb. Detekování takto krátkých sekvencí na chromozómech není běžné ani jednoduché. Dokonalé zvládnutí této metody tudíž naznačuje výbornou experimentální zručnost doktorandky.

Cytogenetická analýza se významně uplatnila také při studiu chromozómu 4F kostřavy luční a při mapování rekombinačních míst mezi homeologními chromozómy kostřavy luční a jílku mnohokvětého u uměle vytvořených substitučních linií. U cizrny umožnila detailní analýza velikosti chromozómů odhalit, že rozdíly mezi odrůdami Kabuli a Desi jsou větší, než se předpokládalo. Analýza dat získaných sekvenováním DNA z jednotlivých chromozómů obou odrůd cizrny navíc odhalila chyby v dříve publikovaných složených sekvencích.

Podrobně jsou výsledky popsány a zasazeny do širšího kontextu ve čtyřech vědeckých článcích publikovaných v impaktovaných časopisech (Chromosome Research, IF: 2,847;

Cytogenetic and Genome Research, IF: 1,885; Plant Biotechnology Research, IF: 5,181; Plant Physiology, IF: 7,084) a jednom hotovém rukopise. U dvou z těchto prací je doktorandka uvedena jako hlavní autor. Bylo by nicméně vhodné kdyby doktorandka během obhajoby blíže specifikovala svůj podíl na jednotlivých experimentech či výsledcích.

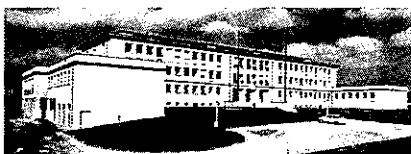
Vzhledem k tomu, že většina výsledků již byla publikovaná a tudíž prošla přísným recenzním řízením, moje role jako oponenta je velmi usnadněna. Nezbyvá mi než konstatovat, že disertační práce M. Karafiátové je velmi zdařilá a proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě. Nicméně, mám pár otázek:

1. V práci Karafiátová a kol. (2013) jste ukázali, že velmi důležitou roli při detekci relativně krátkých (ca 3kb) unikátních sekvencí hraje typ fluorochromu. Nejlépe se osvědčil fluorochrom „Texas Red“. Na druhé straně sondy značené pomocí Alexa488 nebyly detekovatelné, ačkoli tento fluorochrom má podobnou hodnotou QY jako Texas Red. Jaké jiné faktory než je QY by teoreticky mohly být klíčové pro využitelnost určitého fluorochromu pro úspěšnou detekci unikátních sekvencí? Jsou v literatuře popsány úspěšné experimenty s přímou detekcí unikátních sekvencí o velikosti ca 3 kb pomocí sondy značené jiným fluorochromem než je Texas Red?
2. Detekce krátkých unikátních sekvencí na chromozómech představuje často problém i v laboratořích, kde je metoda FISH dobře zaběhnutá. Stává se dokonce, že dva kolegové ve stejné laboratoři postupující podle stejného protokolu stabilně dosahují výsledků velmi rozdílné kvality. To svědčí o tom, že některé v protokolech chybějící detaily mohou hrát velmi podstatnou roli. Co kromě typu značení sondy považujete za klíčové pro úspěšnou detekci? Liší se nějak protokol pro detekci unikátních sekvencí od „běžného“ protokolu pro FISH?
3. Velmi nízká reprodukovatelnost metody WCP u ječmene je bohužel poměrně vážnou vadou na kráse unikátního postupu. Kde vidíte největší prostor pro zlepšení? Co přesně je myšleno jedním experimentem, když píšete, že pouze 10 % experimentů bylo úspěšných (nová sonda i blokovací DNA, nebo třeba jen jedna z komponent mixu nová)?

V Českých Budějovicích, dne 20. srpna 2014.



Pavel Neumann



Biofizikální ústav Akademie věd České republiky
RNDr. Jiří Široký, CSc.
Oddělení vývojové genetiky rostlin
Královopolská 135, 612 65 Brno
tel. 541517194, fax: 541240500, e-mail: siroky@ibp.cz

Posudek na disertační práci Mgr. Miroslavy Karafiátové "Cytogenetic analysis of crop genomes"

Mgr. Karafiátová si pro svoji práci zvolila náročné téma molekulárně cytogenetických analýz rostlinných chromosomů. Práce má několik základních částí. V první autorka předkládá zevrubný literární přehled o jaderných genomech a jejich - zejména - cytogenetických analýzách. Po Cílech práce následují Výsledky a závěry a celkem čtyři publikované a jedna dosud nepublikovaná, do tisku odeslaná práce. Počet i kvalita předložených publikací jsou impozantní. Zde rád konstatuji, že se mi, zejména z hlediska publikací předložená práce líbí.

Vzhledem k tomu, že v posudcích oponentů by měla zaznít i kritika, tak zde tedy je. Především se mi zdá, že anglický text (práce je v angličtině) obsahuje přemíru gramatických chyb. Zajímavě sice, ale málo anglicky působí některé novotvary (colourability). Některé ilustrace v úvodní části jsou poněkud nepřehledné, přinejmenším jim chybí legenda. To platí například pro tabulku na straně 26; i když je převzatá z literatury, termíny jako MDR či WGS nejsou vysvětleny a tak je tabulka pro čtenáře málo srozumitelná. Podobně je tomu na obrázku na straně 45. Nu, a pokud jde o kritiku, výhrady mám také ke dvěma odstavcům nazvaným "General Conclusion". Očekával bych nějaké kritické shrnutí dosažených výsledků ve světle recentní literatury, prostě nějaké počteníčko.

Pokud se týká předložených publikací, zde již žádná kritika na místě není. Všechny práce se větší nebo menší měrou týkají hybridisací *in situ* a jsou publikovány v časopisech Chromosome Research, Cytogenetic and Genome Research, Plant Biotechnology Journal a Plant Physiology, tedy v periodikách s pěknými IF. Dále se však zaměřím především na prvoautorské práce "Mapping nonrecombining regions in barley using multicolor FISH" (Chromosome Res 2013) a preprint "Chromosome painting in barley – the new milestone in cytogenetics of cereals". V první z uvedených prací autoři dosáhli vysoké citlivosti FISH za použití flourochrómů s velkým kvantovým ziskem. Podařilo se jim tak brilantně vizualizovat poměrně velmi krátké jednokopiové oblasti na chromosomech ječmene.

Nicméně, ojediněle se vyskytly slabé signály i na neočekávaných místech v genomu - na jiných chromosomech. Autorka se domnívá, že se jedná o částečnou homologii. Zde bych namítl, že se bude jednat o úseky natolik krátké, že by jejich detekce měla být pod rozlišovací schopností metody. Navrhuje disertantka nějaké jiné vysvětlení? Tolik moje otázka. Ve druhé zmíněné práci jdou autoři ještě dále - pokusili se totiž o "malování" specifických ječmenných chromosomů. Dosáhli toho jednak použitím výhradně jednokopiové DNA z jednoho chromosomu a specifickou blokadí repetice ostatních chromosomů. Ukázalo se, že blokování nespecifické hybridizace pomocí obecné DNA ostatních chromosomů je nedostatečné, až reasociovaná DNA $C_{0t} = 100$ v hybridizačním roztoku umožnila specifické malování 1H. Moje otázka zde zní: Jak velký rozdíl (ve smyslu repetice a jednokopiové DNA) je v obou blokovacích DNAs? Každopádně, jestliže autoři již v nadpise práce konstatují, že jde o "New Milestone in Cytogenetics ...", domnívám se, že to není nikterak nadnesené.

Celkově hodnotím předloženou disertaci jako velmi zdařilou. Předložené publikace obsahují řadu zcela prioritních výsledků. Závěrem mi nezbývá, než konstatovat, že disertační práci doporučuji k obhajobě, hodnotím ji jako vynikající a doporučuji na jejím základě udělit Mgr. Karafiátové vědecko-akademickou hodnost PhD.

V Brně 19. 8. 2014

Jiří Široký