

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce

Transcriptomic analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): tool for crop improvement

Autor: Mgr. Filip Zavadil K o k á š

Univerzita Palackého Olomouc, Přírodovědecká fakulta

Oponent: Doc. RNDr. Jana Ř e p k o v á, CSc.

MU Brno, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky
a molekulární biologie

Problematikou předložené práce je srovnávací analýza transkriptomu dvou významných obilovin, ječmene a pšenice, se zaměřením na témata související s tolerancí k suchu. Téma práce splňuje požadavek na aktuálnost a potřeby studia genomů významných plodin v oblasti funkční genomiky obilovin.

Práce je psaná v anglickém jazyce a členěna do tří tematických kapitol na základě tří hlavních řešených témat - 1. Transkriptom transgenních linií ječmene zaměřený na studium cytokininů v souvislosti se stresovým faktorem sucha, 2. Vytvoření softwaru změřeného na spolehlivou funkční anotaci genů, 3. Transkriptom inbredních linií pšenice s odlišným typem kořenového systému.

Ve stručném **úvodu** je zmíněna řešená problematika zaměřená na sekvenování a bioinformatickou analýzu a jsou zde formulovány **cíle práce**, které se shodují se třemi výše zmíněnými tematickými směry, čtvrtým cílem je srovnání strategie „assembly“ zaměřené na vytvoření referenčního transkriptomu hexaploidní pšenice.

Členění disertační práce na tři tematické kapitoly vychází ze tří publikovaných prací. V první publikaci v New Biotechnology 2016 (IF₂₀₁₇ = 3,73) je doktorand 2. autorem, v dalších dvou publikacích je prvním autorem - Data in Brief 2016 (data paper, Web of Science, bez IF) a Journal of Computational Biology 2018 (IF₂₀₁₇ = 1,19).

Literární přehled je společný všem třem tematickým částem. Na 37 stranách přináší aktuální přehled témat souvisejících s disertační prací, sekvenování nukleových kyselin a jeho historie, sekvenování první až čtvrté generace, jejich hlavní platformy a jejich srovnání, sekvenování RNA a jeho design a kritické kroky. Těžištěm disertační práce je zpracování sekvenačních dat, takže i úvodní část přináší přehled bioinformatických nástrojů nezbytných při zpracování sekvencí transkriptomu a funkční anotaci transkriptů. Literární přehled obsahuje relevantní starší i aktuální publikace.

Jednotlivé tematické kapitoly jsou členěny na Úvod, který na 2 až 3 stranách popisuje téma a formuluje cíl práce. Materiál a metody popisují použitý materiál a metodologii, část Výsledky a diskuse popisuje získané výsledky, které jsou zároveň diskutovány. Formulace jsou stručné, ale výstižné, logicky na sebe navazují.

V první tematické kapitole “Transcriptomic analysis of barley transgenic lines with altered cytokinin status and apparent tolerance to drought” je stručně a výstižně popsána problematika cytokininů a jejich role při abiotickém stresu sucha, inaktivace cytokininových receptorů, interakce s dalšími fytohormony, vliv poměrů kořenů a nadzemní části rostliny na toleranci k suchu. Tato speciální úvodní část specifikuje obecný literární přehled a vyúsťuje v

experimentální část zaměřenou na důkladnou analýzu transkriptomu, která ve výsledkové části popisuje, jak se transkriptom transgenních linií ječmene s vysokou expresí genu *cytokinin dehydrogenase 1* (CKX1) podílí na toleranci k suchu, která souvisí se změnami morfologie kořenů.

Výsledky a závěry vycházejí z experimentu, který umožnil srovnávací analýzu transkriptomu standardních a transgenních rostlin ječmene vystavených stresu a po 14denní revitalizaci. Bylo připraveno 16 RNA knihoven z nadzemních částí rostlin pěstovaných v půdě a 12 RNA knihoven z kořenů rostlin pěstovaných v živném roztoku. Byl zpracován přiměřený počet experimentálních variant ve třech nezbytných biologických replikátech. Výsledky přináší celkovou funkční anotaci genů, klasifikaci do obvyklých kategorií.

V rámci diskuse je zřetelná snaha pochopit, které geny a jejich produkty jsou stěžejní pro konkrétní obranné mechanismy rostliny jako je změna morfologie kořenů, lignifikace, zvýšená exprese genů pro aquaporin a negativní ovlivnění genů pro proteiny fotosyntézy, změny v expresi genů pro sekundární metabolity odvozené od fenylalaninu.

Ve 2. tematické kapitole „SATrans: a tool design for fast functional annotation od RNA-seq data sets“ jsou v úvodu zhodnoceny volně dostupné nástroje pro studium transkriptomu a jejich aplikace. Nástroj vytvořený autorem se zaměřil na aplikaci při předpovědi ORF a podobnost sekvencí při prohledávání nukleotidových i proteinových databází. Předkládaný software může nahradit některý z již dostupných, ale překonává je svojí efektivitou. Funkčnost nástroje byla ověřena na vlastních experimentálních datech ze sekvenování transkriptomu ječmene a transkriptomu houbového organismu *Claviceps purpurea* získaného z přístupné databáze. Při srovnání nástroje SATrans pro anotaci genů vlastních experimentálních dat se zvýšil rozsah anotovaných genů o 22%. Při srovnání s dalšími nástroji pro anotaci genů v několika parametrech byla kvalita funkční anotace genů stejná nebo lepší.

3. tematická kapitola „Transcriptomic analysis of different wheat inbred lines with different root system“ je stručně představen význam pšenice, její genom, základní mechanismy rostliny vypořádat se s působením stresového faktoru sucha, význam kořenového systému pro rostlinu. Některé zmíněné souvislosti jsou hodně zkratkovité, např. na s. 80 přechod od popisu cíle práce charakterizovat linie pšenice z hlediska odolnosti k suchu s využitím linií s různou architekturou kořenů k potřebám genového inženýrství, přes přístupy zahrnující mimo jiné RNA-seq, k pochopení mechanismů biotických a abiotických stresů, identifikaci nových genů, atd. až k editaci genomů. Nicméně cíl je jasně formulován, a jednalo se o srovnání transkriptomů *de novo* a *ab initio* čtyř inbredních linií pšenice a dlouhými a krátkými kořeny (2 hluboce kořenící a 2 mělce kořenící). Vzhledem k tomu, že různá architektura kořenů byla vztažena k toleranci k suchu, je nasnadě otázka, zda se jednalo o genotypy pšenice s různou tolerancí k suchu, zda předcházelo hodnocení na tuto toleranci. Je uvedeno, že z komerčních důvodů rodokmen původu genotypů není znám, avšak znalosti o fenotypu z hlediska tolerance k suchu a jiným abiotickým faktorům by byly přínosné pro interpretaci výsledků. Na základě funkční anotace byl kombinovaný přístup vyhodnocen jako nejlepší.

Citovaná literatura je rozsáhlá a svědčí o důkladném nastudování tématu. Je psaná jednotným stylem.

Připomínky

Str. 82, Fig. 17 – Vhodné by bylo zařazení nějakého známého standardu.

Dotazy

1. Na s. 79 jsou stručně popsány adaptivní mechanismy rostliny pro rezistenci k suchu. Problematika je však mnohem širší. Jaké jiné mechanismy se podílejí na toleranci rostlin k suchu?
2. V práci jsou použity dvě transgenní linie ječmene, jedna s genem pro protein CKX1 cíleným do vakuol a druhá s cytosolickým proteinem. Je mezi liniemi rozdíl v toleranci k suchu?
3. Bylo zjištěno, že enzyme PAL hraje významnou roli ve studovaném stresu. Jaké další funkce má tento enzyme – do jakého jiného typu stresu je zapojen?
4. V práci je podrobně srovnán transkriptom genotypů pšenice s různou architekturou kořene, avšak není provedena žádná experimentální validace skutečné exprese genů. V závěru práce je plánováno využití qPCR. Které geny by autor doporučil jako kandidátní pro ověření jejich funkce v odolnosti k suchu. Je možné využít pro validaci i jinou metodu než qPCR?
5. Z výsledků je patrné, že dochází k překrývání mechanismů jako odpověď na určitý stresový faktor. Pro které stresové faktory je toto překrývání obranných mechanismů zřetelné?
6. Je delší kořenový systém vždy předpokladem vyšší tolerance genotypu k suchu?
7. Jakou roli hraje v odolnosti k suchu kyselina abscisová a byla zjištěna změna exprese genů pro její biosyntézu?
8. V práci jsem nezaznamenala konkrétní popis možné aplikace výsledků funkční anotace genů, což je formulováno v názvu disertační práce. Jak využít získané poznatky ve šlechtění? Co je přínosnější pro šlechtění genotypů tolerantních k suchu - mechanismy založené na funkci genů pro cytokininy nebo na jiných mechanismech (nebo skupinách genů)?

Závěrečné hodnocení

Silnou stránkou práce jsou rozsáhlé znalosti nástrojů/SW a jejich praktická aplikace, i schopnost praktického vytvoření SW s požadovanými charakteristikami. Schopnost aktivní tvorby nástroje SATtrans pro funkční anotaci genů a srovnávací funkční analýzu transkriptomů může přispět ke kvalitě funkční anotace dat. Přínosná je i možnost dalšího rozšíření o nové moduly. V práci převládá bioinformatická a molekulární úroveň analýz, úroveň fenotypová je minimální kromě první tematické části, kde je materiál a varianty jeho ošetření – vodní deficit, revitalizace, živný roztok, zemina – vhodně naplánován. Celkově považuji zvolené metodologie jednotlivých tematických částí za správné.

Interpretace výsledků je spíše popisná, což vyplývá z nutnosti interpretace srovnávaných transkriptomů a provedení funkční anotace genů. Rozsáhlá a logická je interpretace výsledků v souvislosti se znaky souvisejícími s odolností k suchu, výsledky jsou dobře diskutovány z hlediska mechanismů adaptace rostlin k suchu. Především v první tematické kapitole je zřetelně lepší interpretace výsledků vzhledem ke srovnávaným variantám. Za nevýhodu považuji neznalost nebo spíš nezveřejnění údajů o skutečné odolnosti k suchu u linií pšenice s různou architekturou kořenů. Bylo by pak možné lépe stanovit korelaci exprese klíčových genů s fenotypovou hodnotou odolnosti k suchu. Také chybí skutečná validace exprese některých kandidátních genů pro odolnost k suchu.

Disertační práce splnila stanovené cíle. Získané výsledky prošly recenzním řízením, jsou publikovány a diskutovány v časopisech s impakt faktorem. Doktorand prokázal schopnosti řešit zadaný problém a splnil požadavky kladené na disertační práce.

Doporučuji práci k obhajobě a udělení titulu Ph.D.

V Brně dne 27. května 2019