



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Ústav molekulární biologie rostlin

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 525

fax: +420 385 310 356

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna, a.s.

www.umbr.cas.cz | e-mail: umbr@umbr.cas.cz

Posudek disertační práce Mgr. Petra Cápala "*Analysis of plant genomes using flow-sorted chromosomes*"

Cílem doktorské práce Mgr. Cápala byl vývoj metod pro analýzu DNA z jednotlivých rostlinných chromozómů a jejich aplikace na výzkum genomu vybraných druhů obilovin. Základem práce jsou dvě proautoreské publikace v impaktovaných časopisech; v první z nich je prezentována metoda amplifikace DNA pomocí polymerázy phi29, která byla vylepšena tak, že ji lze použít pro amplifikaci genetického materiálu z jediného chromozómu. To umožňuje provádění následných analýz jako jsou detekce nebo *de novo* skládání sekvencí genů, což bylo demonstrováno na příkladu chromozómu 3B pšenice. V druhé práci byla tato metoda s úspěchem využita k detekci chromozómů nesoucích transgeny. Ve třetí publikaci (Dreissig et al. 2015) byla metoda amplifikace extrémně malých množství DNA aplikována na jednotlivá haploidní jádra izolovaná z pylových zrn, což v kombinaci s následnou detekcí vybraných molekulárních markerů umožnilo stanovení frekvence meiotické rekombinace podél chromozómu 3H ječmene. Tyto práce jsou doplněny dvěma přehlednými články (u obou je P. Cápál mezi spoluautory) zaměřenými na aplikace průtokové cytometrie v rostlinné genomice. Všechny pět zmíněných publikací prošlo mezinárodním recenzním řízením, což svědčí o jejich kvalitě.

Disertační práce je po formální stránce pečlivě zpracována. Úvod do problematiky je rozsáhlý a dokazuje výbornou orientaci autora jak v nejmodernějších metodách přípravy a analýzy chromozómů, tak v souvisejících postupech výzkumu komplexních genomů živočichů a rostlin. Tomuto textu lze snad vytknout jen příliš obšírné pasáže uzavírající jednotlivé kapitoly a uvádějící ty následující, kde se často opakují tytéž obecné informace (např. strany 20/21). Stejně tak styl úvodu občas sklouzává do příliš popularizační formy a místy postrádá relevantní citace, které buď chybí nebo jsou nahrazeny odkazem na review.

Z obsahového hlediska jde o kvalitní disertaci, jejíž hodnotu nijak nesnižuje fakt, že jde o převážně metodickou práci. Vyvinené metody jsou totiž z hlediska genomiky rostlin na špičkové úrovni a zapadají do kontextu současného vývoje oboru, takže lze očekávat jejich brzké širší využití. K textu práce a k prezentovaným publikacím mám následující dotazy a připomínky:

1. (k publikaci Cápál et al., *Plant J.* 2015) Práce prezentuje metodiku displacement amplifikace upravenou pro extrémně malá množství výchozího materiálu (několik pikogramů), zatímco standardní protokol doporučuje řádově tisíckrát víc templátu. Nikde jsem však nenašel popis podstaty tohoto vylepšení ve srovnání s protokolem výrobce kitu. O jaké změny se jednalo ?
2. (str. 839) Jak byla definována úspěšná amplifikace při stanovení "64% amplification success" ? Co podle vás vedlo k selhání amplifikační reakce ?
3. Na obr. 2 je znázorněno pokrytí chromozómu 3B amplifikovanou DNA, které ukazuje souhrnnou variabilitu, která je dle očekávání značná. Pro interpretaci výsledků a používání



metody by ale bylo užitečné zjistit úspěšnost amplifikace s ohledem na vlastnosti templátu, jako je třeba obsah GC, sekundární struktury, apod., což z obrázku nelze vyčíst. Sledovali jste tyto faktory ve vašich analýzách ?

4. V práci je zmiňována potenciální aplikace metody v kombinaci s mikrofluidickým zpracováním vzorků, které má poskytnout vyšší výtěžky a menší zkreslení. Proč se toto předpokládá (amplifikace komplexních templátů v malých objemech by spíše měly mít horší výtěžky, vzhledem k rychlejšímu vyčerpání reagentů) ?
5. (*k publikaci Cápál et al., Plant Methods, 2016*) V této práci předcházelo detekci transgenů v DNA amplifikované z jednotlivých chromozómů poměrně komplikované schéma třídění a ověřování identity různých frakcí chromozómů. Nebylo by jednodušší provést detekci transgenů přímo na několika desítkách náhodně vybraných chromozómů, a pak provést identifikaci pozitivního chromozómu na DNA z poolu pozitivních vzorků ?
6. Jak těžké by bylo modifikovat stávající postup tak, aby šlo identifikovat sekvence do kterých je transgen integrován, a tím zjistit i jeho přesné místo v genomu ?
7. (*Introduction, str. 30*) "...mapping sequences to translocated regions between field pea and garden pea (Macas et al. 1993)" - tato práce se nezabývala hrachem, ale využívala translokované linie bobu (field bean).

Závěrem lze konstatovat, že Mgr. Cápál při řešení své dizertační práce prokázal potřebné vědomosti, orientaci ve studované problematice a tvůrčí schopnosti a že **práce splňuje požadavky kladené na dizertační práce v oboru Molekulární a buněčná biologie.**

V Českých Budějovicích, 5. 12. 2016

RNDr. Jiří Macas, Ph.D.



Oponentský posudek na disertační práci

Název práce: *Analysis of plant genomes using flow-sorted chromosomes*
Autor: Mgr. Petr Cápál

Analýza sekvencí na úrovni jednotlivých chromosomů a buněk představuje aktuální vědecký směr generující mnoho nových poznatků a usnadňující studium komplexních biologických systémů. Mgr. Petr Cápál se ve své disertační práci zaměřuje na optimalizaci metody získání jednotlivých chromosomů či buněk pomocí průtokové cytometrie a jejich využití v genomice rostlin. Disertační práce je sepsána klasickou formou, kdy za anglicky napsaným přehledem studované problematiky a stanovením cílů práce následuje pět originálních publikací autora.

Úvodní část práce, která je napsána velmi precizně a čtivě, je přehledně rozdělena do tří hlavních kapitol. V první kapitole se autor zamýšlí nad původem komplexity rostlinných genomů, s důrazem na polyploidii, akumulaci transponovatelných elementů a subgenomy u polyploidních rostlin. Druhá kapitola je zaměřena na analýzu komplexních genomů a jejich rozdělení na úroveň jednotlivých chromosomů pomocí průtokové cytometrie. Poslední kapitola úvodní části disertační práce představuje detailní přehled metod analýzy jednoho chromosomu či jedné buňky a jejich aplikace v klinickém výzkumu, mikrobiologii a v genomice rostlin.

Publikace, které představují jádro disertační práce, jsou ukázkou vynikající vědecké práce na nejvyšší úrovni, která přináší původní a významné poznatky. První studie publikovaná v prestižním časopise *Plant Journal* (Cápál et al. 2015) představuje optimalizovaný protokol na amplifikaci a sekvenaci DNA z jednotlivých tříděných chromosomů a porovnání získaných sekvencí s referenční sekvencí chromosomu 3B pšenice. Proveditelnost této metody autor demonstuje i ve své druhé studii publikované v *Plant Methods* (Cápál et al. 2016), kde byly tříděné chromosomy použity jako templát pro PCR a FISH s cílem identifikovat chromosomy nesoucí transgen. Tato metodika je aplikovatelná k lokalizaci jakýchkoliv single-copy sekvencí u prakticky jakýchkoliv rostlin, u nichž je možné připravit suspenzi intaktních mitotických chromosomů. Metodika

zoptimalizovaná Mgr. Petrem Cápaem byla také úspěšně aplikována při analýze meiotických crossing-overů a frekvence rekombinace jednotlivých chromosomů v pylových jádrech ječmene (Dreissig et al. 2015, Plos One). Kromě tří originálních vědeckých studií je Mgr. Petr Cápal také autorem review publikovaném v časopise Biotechnology Advances (Doležel et al. 2014), které shrnuje pokroky chromosomové genomiky rostlin, vědního oboru, ve kterém se snoubí cytologie a genomika. Poslední publikovanou prací autora je kapitola v knize Applied Plant Cell Biology (Vrána et al. 2014), která popisuje aplikace metody průtokové cytometrie u rostlin.

Všechny autorovy publikace byly zveřejněny ve špičkových vědeckých časopisech. Získané výsledky tak prošly přísným recenzním řízením a mně nepřísluší je hodnotit. Mgr. Petr Cápal získal značné množství originálních výsledků, což svědčí nejen o výborné laboratorní dovednosti v oblasti nejpokročilejší cytologie a genomiky, ale i o jeho schopnosti získané výsledky správně interpretovat a při tom zúročit i svoje teoretické znalosti. Už jen značné množství citací v úvodu disertační práce odráží ohromný přehled autora. Předložená disertační práce je tak krásným dílem dokládajícím, že autor je již poměrně vyzrálou vědeckou osobností. Proto se domnívám, že není adekvátní se zabývat detaily práce. Ráda bych ale autorovi položila několik otázek, které mohou posloužit jako základ pro diskusi:

1. Autor shrnuje paleopolyploidní události, ke kterým došlo v evoluci nejvýznamnějších rostlinných skupin, neuvažuje však význam recentních celogenomových duplikací. Berouc v potaz veškeré paleo- i neopolyploidní události, jaký ploidní stupeň mají např. řepka nebo pšenice? Převažují v evoluci rostlin auto- nebo allopolyploidní události? Jak si autor vysvětluje triplicace genomů – jako jednu událost nebo dvě po sobě jdoucí duplikace? Proč je polyploidie u rostlin tak častá?
2. Jako jednu z příčin komplexních genomů rostlin autor uvádí akumulaci transponovatelných elementů (TEs). Jaký mají TEs význam v evoluci? Liší se jejich zastoupení mezi jednotlivými skupinami rostlin? Mohl by autor porovnat rostliny a živočichy ve vztahu k množství TEs, jejich distribuci na chromosomech a homogenizaci mezi chromosomy?
3. Autor se zabývá pouze mechanismy zvyšování velikosti/komplexity genomu. Jaké jsou však naopak mechanismy snižování velikosti genomu a jsou u velkých rostlinných genomů (např. *Fritillaria*) tyto mechanismy méně účinné?
4. Jednotlivé homeology v polyploidních genomech se mezi sebou obvykle odlišují. Jednou z příčin může být preferenční frakcionace jednoho subgenomu. Může se autor zamyslet nad tím, jak a proč k ní dochází?

Masarykova univerzita, Středoevropský technologický institut

Kamenice 735/5, 625 00 Brno, Česká republika
T: +420 549 49 2911, 6639, E: info@ceitec.muni.cz, www.ceitec.muni.cz
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224
V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.



5. Podmínkou nutnou pro aplikaci metody amplifikace DNA z jednoho tříděného chromosomu je získání suspenze intaktních mitotických jader. Tzn. předpokladem je mít z daného rostlinného druhu dostatečné množství semen nutných pro synchronizaci buněčného cyklu v kořenových špičkách. Jaká je šance takto analyzovat vzácné druhy, u kterých je s dispozicí málo semen, nebo druhy, které semena netvoří vůbec a rozmnožují se vegetativně? Představuje v tomto případě metoda mikrodisekce lepší alternativu pro izolaci jednotlivých chromosomů?

6. Mohl by autor stručně porovnat (ne)výhody metodiky získání jednotlivých pylových jader pomocí průtokové cytometrie s metodikou mikromanipulační extrakce mikrospor, tzn. přístupy využití ve Dressig et al. 2015 a Li et al. 2015?

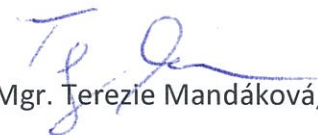
7. Má možnost studia rekombinace jednotlivých chromosomů v jednotlivých pylových zrnech praktické využití, např. ve šlechtitelství?

8. Studium organizace a chování jednotlivých chromosomů v průběhu interfáze, mitózy a meiózy je u velkých rostlinných genomů obtížné, protože nejsou k dispozici chromosomově specifické sondy. Mohou být takové sondy vyvinuty s využitím jednotlivých tříděných chromosomů?

Je mi potěšením konstatovat, že disertační práci Mgr. Petra Cápala hodnotím jako velmi zdařilou. Práce zcela jednoznačně splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. K úspěchu práce, která má obecný přínos pro širokou vědeckou obec, také nepochybně významně přispěla skutečnost, že byla vypracována ve špičkovém vědeckém týmu pod vedením prof. Jaroslava Doležela, na jehož průkopnickou práci v oblasti chromosomové genomiky nelze než vzhlížet s naprostým respektem a obdivem.

Z výše uvedených důvodů jednoznačně doporučuji disertační práci Mgr. Petra Cápala k obhajobě a hodnotím ji jako vynikající.

V Brně, dne 8. prosince 2016


Mgr. Terezie Mandáková, Ph.D.

Masarykova univerzita, Středoevropský technologický institut

Kamenice 735/5, 625 00 Brno, Česká republika
T: +420 549 49 2911, 6639, E: info@ceitec.muni.cz, www.ceitec.muni.cz
Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224
V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.

