



Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky
RNDr. Aleš Kovařík, CSc., Královopolská 135, 612 65 Brno,
Czech Republic, tel.: 541 517 178, e-mail: kovarik@ibp.cz

Oponentský posudek na disertační práci "Identifikace a studium exprese genů účastnících se kvetení u modelové rostliny merlík červený (*Chenopodium rubrum*)".

Autor: Mgr. David Cháb

Pracoviště: Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky

Cílem disertační práce bylo studium molekulárních mechanismů regulace indukce kvetení u merlíku, *Chenopodium rubrum*. Tento biologický druh je tradičním modelem pro výzkum fotoperiodicity, nosného tématu pracoviště UEB AVČR. Pro naplnění cílů autor vhodně zvolil moderní molekulárně biologické postupy založené na analýze transkripce regulačních genů v různých fázích vývoje květu a za různých fyziologických podmínek. Práce je rozdělena a genetickou a fyziologickou část, které jsou spjaty a tvoří jeden organický celek. Cenný je zisk nových sekvencí genů účastnících se kvetení u *C. rubrum*.

Přehled problematiky je popsán na 25ti stranách úvodu. Obsahuje řadu citací na recentní práce, což svědčí o dobrém teoretickém přehledu autora. Jsou uvedeny nejdůležitější výsledky z různých experimentálních systémů včetně *A. thaliana*, rýže, rajčete a dalších, na které bylo navázáno v experimentální části.

Vlastní výsledky jsou uvedeny na 65 stranách a jsou členěny do 9 kapitol, přičemž poslední dvě obsahují sekvenční data. V genetické části autor popisuje postup klonování genů účastnících se fotoperiodické indukce kvetení *C. rubrum*. K tomuto účelu využil celou řadu důvtipných metod jako jsou Codehop, konstrukce cDNA knihoven nebo 5' a 3' RACE. Uvedené postupy byly úspěšné a vedly k zisku kandidátních ortologů FTL, COL a LFY. *A. thaliana*. Kromě úrovně cDNA byla rovněž studována genomická organizace nově získaných genů. Zde se ukázal exon genu FTL jako užitečný fylogenetický marker v rodu *Chenopodium*. Vyvozené závěry ukazují, jako první, na možnou allopolyploidii v této skupině rostlin. Do genové banky bylo uloženo více než 50 nových sekvencí, což je jistě úctyhodný počet dostatečně dokumentující objem vykonané práce. Fyziologická část výsledků byla zaměřena na sledování hladiny exprese nově izolovaných genů za indukčních i neindukčních fotoperiodických režimů. Výsledky podporují hypotézu, že gen CrFTL1 je skutečně ortologem genu FT původem z *A. thaliana*. Funkce ostatních genů bude předmětem dalšího studia.

Disertační práce je po stylistické stránce velmi zdařilá. Oceňuji zvláště kvalitní češtinu, která v jných disertacích bývá na nízké úrovni nebo jsou tyto psány v angličtině. Snad jen slovo "alignment" by mohlo být nahrazeno slovem "přiřazení".

K disertaci je přiložena publikace v kvalitním odborném časopise PLANTA, kde je uchazeč hlavním autorem, a která pojednává o expresi ortologů genu FT u *C. rubrum*.

Hlavní připomínky

Str. 73, druhý řádek shora. Pozice 144 u genu CrFTL2 je údajně obsazena izoleucinem. Přiřazení na obrázku 18 však ukazuje něco jiného, totiž na valin, obdobně jako v genu CrFTL1. Vzájemné homologie mezi oběma geny jsou tedy výrazné. Fylogenetický strom na obrázku 19 se nedá hodnotit, poněvadž není zřejmé, s jakými daty (CrFTL2 s valinem nebo izoleucinem) program vlastně pracoval. Ačkoliv jsem neprováděl rigorózní výpočet, zdá se mi, že homologie mezi geny CrFTL1 a 2 jsou přece jen významné. Tvzení o funkční odlišnosti obou genů (v diskusi) je tudíž diskutabilní.

Str. 75 Přestože je alternativní sestřih u rostlin poměrně častým fenoménem, určité výsledky uvedené v této pasáži vzbuzují obavy. Je to zejména selhání kvalitativně odlišit sestřiženou formu RNA od formy nesestřižené v experimentu na obrázku 21. Alternativním vysvětlením zisku odlišných cDNA sekvencí může být nasednutí primerů na různá místa v důsledku částečné duplikace sekvence. Pro publikační účely bude zapotřebí potvrdit alternativní sestřih pomocí jiných dvojic primerů nebo nejlépe RNA Northern blotem.

Po přečtení kapitol 5.5 a 5.6 vzniká koncepční námitka, zda experimenty prováděné na transgenní Arabidopsis (nesoucí geny *Chenopodium*) skutečně reflektují jejich biologickou funkci v rodičovské druhu. Jinými slovy a do jaké míry (pokud vůbec) lze extrapolovat fyziologický efekt v xenogenním systému. Je totiž známo, že variabilita v regulačních mechanismech kvetení se projevuje často na úrovni ekotypu. Tak například "mutator" element v prvním intronu genu FLC je cílovou sekvencí regulačních molekul krátkých RNA, které indukují změny v chromatinu a epigenetické umlčování. Toto způsobuje rozdíly v časování kvetení mezi ekotypy Landsberg erecta a Columbia (Zhai a spol.: PLOS Genetics 2008, e1000056). Odlišnosti mezi ekotypy lze nalézt i u dalších regulačních genů. Experiment popsáný na straně 119 má navíc trochu vadu na kráse v tom, že pro konstrukci transgenní kazety byl použit promotor 35S, který řídí transkripci genu CrFTL1 a dalších. Je známo, že promotor 35S viru kvěťákové mozaiky je jedním z nejsilnějších promotorů vůbec a tudíž množství vznikajícího produktu je značně vzdálené (směrem nahoru) od fyziologických hladin endogenního proteinu. Je sice pravdou, že konstrukt 35S:CrFTL1 urychloval kvetení v linii N184, která nese mutaci v genu FT ukazující na pravděpodobnou komplementaci mutace transgenním CrFTL1. Ve výsledcích však chybí údaj z kontrolního experimentu, kde byl týž konstrukt vnášen do rostlin standardního genotypu Ler. Absence fenotypu v kontrolních rostlinách by podpořila důkazy o ortologní povaze genu CrFTL1. V opačném případě bude však nutné tvrzení v závěrech korigovat vzhledem k nesespecifickým účinkům vnášeného konstruktů.

Osobně se domnívám, že o mnoho elegantnějším přístupem pro studium funkce získaných genů by bylo snížení hladin jejich exprese v homologním systému *C. rubrum* například pomocí siRNA.

Hybridizační profily genů CrFTL1 a CRFL-like na obrázcích 23a a 24 se sobě až dojemně podobají. V obou případech jsou totiž vidět po štěpení enzymem HindIII dva proužky v oblasti cca 4 a 5 kb. Je to jen náhoda? Byla podobná koincidence patrná i při štěpení jinými enzymy?

Str. 91, obr 26. Pro porovnání by mohla být ukázána genomická struktura CrFTL1a.

Str. 70. Z popisu vzniká dojem, že autor zaměňuje pojmy cDNA a cDNA knihovna. cDNA je definována jako double-strandová DNA vzniklá na základě reverzní transkripce RNA. cDNA

knihovna je naproti tomu soubor již klonovaných cDNA v bakteriálních vektorech. Autor by měl při obhajobě vysvětlit, co bylo vlastně templátem pro amplifikaci hledaných genů?

Str. 71. Hovoří se zde o 100 x ředěné cDNA knihovně jako templatě pro PCR. Podobně jako v předchozím bodě, jednalo se o cDNA nebo plasmidovou DNA vyizolovanou z cDNA knihovny? Pokud byla k dispozici knihovna, t.j. cDNA v bakteriálních klonech, pak bych očekával standardní postup, tj. skrining pomocí hybridizační sondy. Naopak příprava knihovna je redundantní, pokud následuje amplifikace cDNA s CODEHOP primery.

Drobné připomínky

Vzhledem k tomu, že qPCR je relativně nová metoda, bylo by užitečné termíny, jako je například "cross-point", vysvětlit.

Str. 63, kvantitativní PCR – jaká byla délka ampliconů pro PCR? Pro přesné stanovení se délka produktu ideálně pohybuje 100-200 bp.

Str. 65, 4.1.7.Extrakce DNA probíhala sorbitolovou metodou. Avšak odkaz je na publikaci popisující metodu CTAB. Proč ?

Překlepy: str. 61, obr. 16 – mosaic

Str. 144, Závěry. Zkratka pro geny CONSTANS má být COL, nikoliv CO

Str. 128, Obr. 57, sekvence exonu nikoliv intronu je malým písmem.

Závěr

Práce Mgr. Davida Chába působí velmi zdařilým dojmem a obsahuje mnoho originálních výsledků, které byly nebo budou v budoucnu publikovány. Lze konstatovat, že doktorand se zhostil vytyčených úkolů na výbornou. Je to nepochybně i rovněž zásluha kvalitního vedení a pracovního týmu na ÚEB AVČR.

Práci doporučuji k obhajobě

BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.
Královopolská 135, 612 65 BRNO
IČ: 68081707, DIČ: CZ68081707

-1-

V Brně, dne 20. dubna, 2009



Aleš Kovařík