

Oponentský posudek disertační práce

Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky

Doktorand: Ing. Tomáš Nix

Oponent: Dr. Ing. Pavel Horčíčka Š.S. Stupice

Téma disertační práce s názvem **Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky** je aktuální a přínosné pro šlechtitele ozimé řepky a tím následně i pro pěstitelskou praxi. Doktorand **Ing. Tomáš Nix** rozdělil svoji práci do sedmi částí a připojil seznam zkratk pro lepší orientaci v textu.

Literární přehled je rozčleněn do 4 hlavních částí týkajících se původu řepky, historie šlechtění řepky, hybridního šlechtění a rezistence k *Phoma lingam*. Tento přehled je zpracován na základě poměrně rozsáhlého počtu literárních pramenů 117, z nichž je většina zahraničních.

Oddíl věnující se původu řepky je zpracován přehledně a doktorand se v této problematice dobře orientuje. Zde bych pouze duplicitu obdobných schémat.

Oddíl historie šlechtění se věnuje mezníkům ve šlechtění, ale konstatování současných trendů šlechtění s odvoláním na zdroj z roku 1997 se nejeví příliš aktuálně. Jaké jsou šlechtitelské cíle a postupy u řepky v současné době?

V části týkající se hybridního šlechtění doktorand shrnuje základní poznatky v této oblasti velmi erudovaným způsobem

V části týkající se rezistence k *Phoma lingam* jednoznačně konstatuje, že založení není komplexně známo, ale je známa řada markerů. Jaké pak je jejich obecné použití. Celkově literární přehled splňuje po obsahové stránce požadavky na disertační práci. S ohledem na možnosti počítačové techniky by se nemělo objevovat v disertační práci tolik překlepů a formálních nedostatků (zejména přehled literatury, formálně není jednotný, chybí někteří autoři).

V kapitole Cíl práce jsou v krátkosti definovány 2 hlavní cíle a také dílčí cíle. Chybí zde větší konkrétnost jednotlivých cílů a hypotéz.

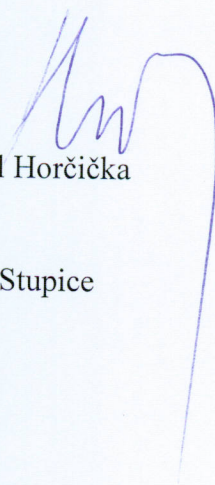
Kapitola Materiál a metodika je zpracována velmi podrobně, jsou zde uvedeny jednotlivé postupy.

Výsledky a diskuse je rozčleněn do 2 hlavních oddílů a zahrnuje celkem 24 obrázků. Bohužel zde zcela chybí výsledky v tabulkách např. na str.35. by byla vhodnější tabulka než slovní popis. Je zřejmé, že doktorand odvedl v experimentální části velký počet měření a stanovení, ale jsou dokumentovány pouze obrázky. Hodnocení rezistence k *Phomě* doporučuji rozšířit o tabulky testů, které umožní čtenáři lépe zhodnotit dosažené výsledky. Formulace alespoň částečná shoda bez další kvantifikace nepatří do vědecké práce. Je shoda na 47% ještě shodou ?

V závěru autor stručně shrnuje dosažené výsledky, zde by bylo možné díky obsáhlým experimentům dojít ke konkrétnějším závěrům.

Disertační práci přes některé nedostatky doporučuji k obhajobě, hodnotím ji jako dobrou a doporučuji na jejím základě a po úspěšné obhajobě udělit Ing. Tomáši Nixovi akademický titul "**Doktor**".

Ve Stupicích 13.3.2009


Dr. Ing. Pavel Horčíčka

Šlechtitelská stanice Stupice

Oponentský posudek

Doktorské disertační práce Ing. Tomáše Nixe „Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky“

Disertační práce se zabývá problematikou využití molekulárních markerů vybraných znaků u hospodářsky významné plodiny ozimé řepky. Prvním cílem práce byla analýza genů *SLG* a stanovení možností jejich využití jako molekulárních markerů autoinkompatibility (AI) u řepky.

Dílčími cíli byla charakteristika genů *SLG* u odrůd a linií řepky, porovnání sekvencí a stanovení možnosti využití nalezeného polymorfismu ve šlechtění, zjištění korelace mezi fenotypovým projevem AI a molekulárními daty a testování metody PCR-RFLP za účelem odhalení genetické odlišnosti materiálu, potenciálně použitelného v hybridním šlechtění.

Dalším cílem bylo hledání molekulárního markeru odolnosti řepky k houbové chorobě *Phoma lingam*.

Dílčími cíli bylo vyhledání RAPD markeru pro odlišení náchylných a odolných odrůd, ověření segregace markeru v R1 generaci štěpící populace kříženců a rozpracování metodiky pro navržení specifického markeru odolnosti k *P. lingam*.

Disertační práce sestává ze 75 stran textu, včetně obrázků sekvencí genů *SLG* a elektroforeogramů, seznam použité literatury obsahuje 116 citací.

V literární rešerši autor podává stručný přehled o původu a systematice řepky, historii šlechtění řepky a podstatě hybridního šlechtění, uvádí mechanismy umožňující řízené opylování, se zaměřením na sporofytickou autoinkompatibilitu a její molekulární základ. Další část je věnována rezistenci řepky k chorobě *Phoma lingam*, její podstatě a možnostem molekulárního markerování.

Kapitola Materiál a metody obsahuje charakteristiku použitého rostlinného materiálu, popis skleníkových a laboratorních metod, extrakce DNA a molekulárních analýz.

V části Výsledky a diskuse je popsána analýza genů *SLG* I, které se osvědčily jako selekční marker autoinkompatibility. Potvrdil se předpoklad, že gen *SLG* I se amplifikuje u autokompatibilních (AK) rostlin, zatímco u AI rostlin ne. Tato metoda neumožňuje odhalit částečně AI rostliny, ale stoprocentně vyselektuje zcela AK jedince. Tuto část práce považují za nejpřínosnější z hlediska využitelnosti ve šlechtitelské praxi. Vzhledem ke skutečnosti, že v populaci dihaploidů, odvozených z F1 kříženců AI linií s AK donory kvality, se vyskytuje pouze cca 10 – 20 % vysoce AI rostlin, včasná negativní selekce AK rostlin může značně zefektivnit šlechtitelský proces. Omezí se tak pěstování velkého počtu balastních rostlin až do fáze kvetení.

Podářilo se osekvenovat funkční alelu *SLG* II genu z genomu *Brassica rapa* u dvou autoinkompatibilních linií Start a Tandem. Sekvence *alely SLG* II z genomu *B. rapa* u linií Start a Tandem byly stejné, ale lišily se od sekvence *alely SLG* II u linie WRG. Sekvenování alel *SLG* II je nejpřesnější metodou určování S-haplotypu, ale také finančně nejnáročnější. Autor využil informací ze sekvenování pro zpřesnění metody PCR-RFLP, která je daleko levnější a pro rutinní využití vhodnější.

Nebyly sice identifikovány všechny alely u AI linií, které nejsou v dihaploidním stavu, ale byla rozpracována metoda PCR-RFLP, která alespoň částečně pomůže rozlišit S-haplotypy. Tato metoda je užitečná při určování hybridů mezi AI liniemi a určování S-haplotypů v časně fázi ontogeneze u dihaploidních linií. Za pozitivní považují přímou návaznost v praktickém šlechtění hybridní řepky na bázi autoinkompatibility. Pomocí PCR-RFLP může být například zjišťován původ AI linie a možnost kontaminace cizosprašením s jinou AI linií.

Při vyhledávání RAPD markeru odolnosti k *Phoma lingam* byly rozlišeny odolné a náchylné odrůdy. Vytypovaný RAPD marker se sice na 100 % neshodoval s fenotypem v R1 štěpící generaci, ale přece je zde patrná jistá shoda. Ve fenotypovém projevu infekce jednotlivých rostlin R1 generace se neprojeví příliš rozdílné příznaky. Problémem jsou zřejmě výchozí materiály málo kontrastní v odolnosti/náchylnosti.

Po odborné stránce nemám k práci žádné závažné připomínky a hodnotím ji kladně.

K formální stránce mám některé konkrétní připomínky:

Textu by prospěla korektura překlepů a pravopisných chyb, které by se v disertační práci neměly vyskytovat. V literárním přehledu použitý termín „divoká“ řepka platí pro živočichy, pro rostliny se používá výraz planá. Uvedené schéma výroby hybridního osiva na základě CMS Ogu-INRA odpovídá kompozitním hybridům typu Synergy, bez obnovy fertility, dnes již nevyužívaným. Po získání zlepšených obnovitelů fertility se sníženým obsahem glukosinolátů, se již produkují pouze restaurované, pylově fertily hybridy s 00 kvalitou. V přehledu systémů umožňujících kontrolované opylování by stála za zmínku sterilita indukovaná transgenozí, tzv. Seed-link systém, kombinovaný s herbicidní rezistencí.

V práci by měl být uveden, kromě seznamu použité literatury, též seznam autorových vlastních publikací.

K práci mám několik dotazů:

Je analýza *SLG* I genu, osvědčená u linií původem z odrůdy Tandem pro selekci AI/AK rostlin, využitelná i pro další S haplotypy? Jaký vliv na spolehlivost této metody mohou mít modifikační geny či genetické pozadí?

Lze jako selekčního markeru AI/AK rostlin využít i další geny S lokusu?

V práci je uvedeno, že RAPD markery vykazují horší opakovatelnost. Jaké jsou vaše praktické zkušenosti s tímto problémem?

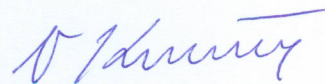
Jaká je pravděpodobnost, že se podaří nalézt spolehlivé markery pro odlišení náchylných a odolných genotypů vůči *Phoma lingam* při kvantitativní podstatě odolnosti?

Disertační práce přispěla k rozšíření poznatků o možnostech využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky. Lze konstatovat, že stanovené cíle práce byly splněny. Autor prokázal během doktorandského studia i při zpracování disertace dobrou schopnost vědecké práce.

Uvedené dotazy a připomínky slouží pouze jako námět pro obecnou diskusi k problematice obhajované práce a v žádném případě nesnižují kvalitu dosažených výsledků.

Doktorskou disertační práci „Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky“ hodnotím kladně a doporučuji, aby po jejím posouzení a úspěšné obhajobě byl Ing. Tomáš Nixovi udělen titul Ph.D.

Praha 7.3.2009



Ing. Vratislav Kučera, CSc.

Výzkumný ústav rostlinné výroby
161 06 Praha 6-Ruzyně

Oponentský posudek

Disertační práce: „Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky“

Autor disertační práce: Ing. Tomáš Nix

Oponent: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Předložená disertační práce Ing. Tomáše Nixe na téma: „Využití molekulárních markerů ve šlechtění hybridní řepky“ se zabývala dvěma hospodářsky významnými problematikami, a to genetickým studiem autoinkompatibility řepky olejné (*Brassica napus*) s využitím analýzy polymorfismu SLG genů jako možných molekulárních markerů a hledáním vhodných molekulárních RAPD markerů odolnosti k houbové chorobě *Phoma lingam*.

V kontextu s obecnou snahou stálého zvyšování intenzity produkce zemědělských plodin směřujícímu jednoznačně v případě řepky k hybridnímu šlechtění a využití efektu heterose lze především první z výše uvedených cílů považovat za vysoce aktuální. Velmi kladně hodnotím možnost zapojení mladých vědeckých pracovníků (doktorandů) do vzájemné kooperace dalších výzkumných pracovišť, v tomto případě VÚOL Opava a VÚRV v.v.i. Praha. Tento systém kooperace bohužel není zcela běžný a mohl by být tak vzorovým modelem pro výzkumnou činnost v dalších oblastech.

Využití SLG genů jako molekulárních markerů pro detekci sporofytické autoinkompatibility (SI) vychází již řadu let ze známých studií, jež identifikovaly dva příbuzné geny (SLG a SRK) tzv. komplexu S-lokusu, které jsou exprimovány na povrchu buněk blizny představující receptorový komplex, kde S-glykoproteid (SLG) působí jako transportní bílkovina přenášející určitý protein pylu (samčí ligand –SP11) na S-receptor kinázu (SRK). Takovýto mechanismus pak logicky předpokládá vysoký polymorfismus celého komplexu. Komplikované allotetraploidní složení genomu řepky a i s tím spojený velký počet alel v S-lokusu ovlivňující autoinkompatibilitu jednoznačné molekulární markerování značně komplikuje. Možnosti této práce tak byly především v návaznosti k již získaným dílčím výsledkům na pracovišti a jejich další prohloubení. V tomto kontextu tak i tuto práci chápu a hodnotím.

Zvolené postupy řešení v této práci považuji za správné, odpovídající současným směrům výzkumu této problematiky. Cenná je již výše zmíněná spolupráce s oběma výzkumnými institucemi, což přineslo výběr a přípravu vhodného souboru testovaných materiálů a metodicky precizní charakterizaci fenotypového projevu autoinkompatibility. Naopak zařazení problematiky markerování odolnosti materiálů k houbové chorobě *Phoma lingam* mi v kontextu této práce připadá trochu jako zbytečný appendix tříštící zaměření doktoranda na zcela jinou problematiku. Z formálního hlediska je disertační práce členěna konvenčně. Rešeršní část práce je stručnější, nicméně výstižná. V metodické části práce bych doporučoval např. pomocí nadpisů vztahovat jednotlivé postupy k definovaným cílům a ve výsledkové části by tak tyto popisy nemusely být znovu široce opakovány.

Získané výsledky SLG I genů v kombinaci s fenotypovým projevem autoinkompatibility hodnocených materiálů jsou dle mého soudu velmi cenné. Při dodržení podmínek pro selektované populace zmiňované autorem je amplifikovaný gen SLG I minimálně šikovným nástrojem pro pozitivní výběr autokompatibilních materiálů. V této souvislosti bych se zeptal na fenotypovou podstatu dané hranice mezi plně resp. částečně autoinkompatibilními materiály z pohledu počtu vytvořených semen. Rovněž bych

doporučoval po molekulární stránce zhodnotit u tohoto materiálu s rozdílnou úrovní autoinkompatibility komplexy genů SRK a SCR, pokud se tak již neděje v některých z paralelních prací. Pozitivně hodnotím nalezení alelického polymorfismu genu SLG I u dvou testovaných materiálů s odlišnou alelickou sestavou, než byla zmiňovaná alela A10. Souhlasím s navrhovanou potenciální možností využití tohoto přístupu pro kontrolu samosprášení čistoty a detekci některých odrůd. Škoda jen, že se nepodařilo dokončit celou sekvenci těchto odlišných alel. Rovněž rozsáhlejší analýza většího počtu materiálů odrůdy Global by možná mohla odhalit i některé další odlišné alely. Pro další hodnocení z pohledu autoinkompatibility by možná bylo zajímavé tyto materiály s odlišnou alelickou skladbou separovat a vyhodnotit jejich vlastnosti včetně křížení s nějakou autoinkompatibilní linií. V tomto směru doporučuji k prostudování i zajímavý článek čínských autorů Zhang et al. 2008 v časopise Teor. Appl. Genet.

V případě hodnocení SLG II autor využil zkušenosti předchozích pracovníků této laboratoře, potvrdil rozšíření nefunkční alely S 15 u širšího testovaného souboru odrůd včetně tří autoinkompatibilních materiálů. Zároveň však danou problematiku úspěšně obohatil o oblast sekvenace pravděpodobně funkční izolované alely SLG genu třídy II s prokázáním její vzájemné identity u AI odrůd Tandem a Start. Přes asi prokázanou kompatibilitu mezi oběma materiály by bývalo vhodné a jasně vypovídající otestovat tuto vlastnost na zkoušených autentických materiálech. Nabízí se i zde u těchto materiálů molekulární mapování genů SP11 a SRK. Velmi pěkný je pak praktický důkaz využití RFLP analýzy k potvrzení odlišnosti S-haplotypů a hybridizace materiálů ve srovnání s RAPD metodou.

V případě hledání molekulárního markeru k fomové hnilobě, jež patří mezi nejvýznamnější choroby řepky, se nemohu ubránit již dříve uvedenému dojmu tématického odbočení práce. Využití techniky RAPD je jedním z možných a využívaných přístupů k hledání markerování této rezistence. V souvislosti s v této práci zjištěnou problematickou opakovatelností některých RAPD primerů bych se rád zeptal zda vytvořený dendrogram genetických vzdáleností odpovídá skutečné fylogenetické příbuznosti hodnocených materiálů případně je více zatížen zvoleným spektrem RAPD primerů. V případě ověřování segregace zvoleného primer OPA 14 mi nebylo jasné, zda je na obrázku 5.24. zachycena segregace tohoto markeru u F1 kříženců nebo již u F2 štěpící populace vytvořené pylovou embryogenezí. Uvedené rozdíly v infekci u těchto materiálů byly pouze na úrovni 2 stupňů z bonitační stupnice, jaký je tedy běžně používaný rozsah a byly v rámci tohoto testu vyhodnoceny paralelně i výchozí rodičovské materiály? V případě hodnocení shody markerové a fenotypové segregace jste zvolil v případě fenotypové reakce jako segregáčnické kritérium index napadení 1,5. Je to standardní hodnota, jež běžně odděluje tolerantní a náchylné genotypy nebo to byla hodnota, při které byla získána největší shoda markeru s fenotypem?

Celkově nemám k práci žádných závažnějších připomínek, doktorand se mohl i v diskusní části opřít o předchozí výsledky provedené na tomto pracovišti a studovanou problematiku prohloubit. Předložená disertační práce splňuje dle mého soudu požadovanou odbornou úroveň a připravenost doktoranda pro samostatnou vědeckou práci. Rovněž předpokládám, že tyto získané poznatky budou brzy publikovány ve vědeckém tisku. Na základě výše uvedeného a po úspěšné obhajobě disertační práce doporučuji Vědecké radě ZF Jihočeské univerzity disertační práci schválit a Ing. Tomáši Nixovi udělit titul Ph.D.

V Praze 17. 3. 2009

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

