

Obhajoba disertační práce Ing. Aleny Novákové

ZF JU v Českých Budějovicích, dne 18.6.2009

Zápis z vědecké rozpravy při obhajobě disertační práce:

prof. Ehrenbergerová – je dostupná jiná geneticky modifikovaná odrůda brambor než Amflora?

- pro svoji práci jsem velmi obtížně sehnala modifikaci s GNA, tuto modifikaci jsem pak použila v disertační práci; výhoda je, že pro detekci jiných transgenů lze jen zaměnit příslušný primerový pár, postup izolace DNA, PCR analýzy a detekce, případně kvantifikace pomocí RT-PCR pak zůstává stejný

prof. Ehrenbergerová – je možné klasickými postupy dosáhnout měny poměru amylosy a amylopektinu?

- ano, tohoto bylo dosaženo u ječmene

prof. Ehrenbergerová – uvádíte, že u většiny druhů není morfologická charakteristika dostatečná pro rozlišení odrůd, proč pak nejsou standardně používány molekulární markery?

- nejsou vypracovány standardní metody molekulární analýzy, je u určitá rezistence ze strany správních orgánů k použití jiných než morfologických markerů, biochemické a molekulární markery jsou doporučené pro popis odrůdy, ale nejsou závazné

Mgr. Sýkorová – proteinové markery - jsou vždy nestabilní?

- ne, např. u brambor jsou používány jako dobrý markerovací systém pro určení odrůdy a odrůdové pravosti

prof. Moudrý – ekologické zemědělství a GMO – lze říci, že globalizace má velký dopad na biodiverzitu

- vliv GMO na biodiverzitu je třeba chápat v pojetí celého pěstitelského systému, ne jen jedné konkrétní parcelky, co se týče omezení počtu elitních odrůd – to je typické nejen pro GMO odrůdy, ale i pro všechny hlavní plodiny – pěstování jen několika špičkových odrůd

prof. Kužel – detekce GMO – v produktu bude detekován transgen, co nám to řekne?

- legislativní hranice je 0,9%, v případě většího zastoupení transgenů je nutné tuto potravinu označit, u ekologického zemědělství není možné realizovat produkci s vyšší kontaminací než je 0,9%
- významné pro ozančování potravin a surovin, certifikace GMO-free produktů a produktů ekologického zemědělství

Ing. Kukulíková – kdy bude dostupný Katalog brambor

- je to výstup projektu NAZV a pro ÚKZUZ bude uvolněn v průběhu letošního roku

Ing. Krajníková – je obdobný katalog dostupný ještě v nějakém jiném státě

- katalogy brambor – jako katalogy – popisné, zahrnující pěstitelské, morfologické i molekulární údaje jsou v Evropě dostupné, tento Katalog má ale podobu vyhledávací databáze a podle zadaných znaků je možno vyhledat a určit příslušnou odrůdu

Doc. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.

- Dále mám dotaz, jaká je v současné době u nás realita a perspektivy pěstování geneticky modifikovaných rostlin, proč tato technologie začíná být významná a jaký má autorka vlastní názor na možnosti budoucí registrace a využití geneticky modifikovaných odrůd bramboru, jako je například průmyslová odrůda Amflora. Proč ji autorka v disertační práci nepoužila pro vlastní vývoj metody pro detekci transgenů u bramboru?
- Podle registru GMO (MZP) je v kapitole *Uvádění do ŽP* 22 modifikovaných plodin, z toho 7 modifikací bramboru, 12 kukuřice a dále pak modifikace lnu, slivoně a tabáku. Pro kapitolu *Uvádění do oběhu* v ČR platí seznam EU, který podle nejnovější novelizace zahrnuje pro dovoz a zpracování 4 modifikace kukuřice, 2 modifikace řepky a pro dovoz řezaných květů modifikovaný karafiát. Modifikace bramboru schválené v ČR pro uvádění do ŽP pro účely registračních pokusů jsou následující: fa BASF – brambor se změněným složením škrobu, - brambor se změněným složením škrobu AMFLORA, - brambor se zvýšenou odolností k plísni bramborové, - brambor se zvýšeným podílem amylopektinu, - brambor se zvýšeným podílem amylozy. Fa Vesa Velhartice ve spojení s UEB AVČR – brambor se změnou obsahem cukrů, - brambor se změnou odolnosti k plísni bramborové. GMO plodiny určené ke komerčnímu pěstování řeší EU katalog registrovaných odrůd.
 - GMO plodiny jsou perspektivní. Nebýt tabuizování této problematiky, šíření poplašných zpráv, překrucování vědeckých poznatků a výroby „vědeckých“ poznatků na míru odpůrců GMO, bylo by jejich rozšíření v EU jistě větší. Vzrůstající plocha BT kukuřice v ČR (2005: 150 ha, 2008: 8380 ha) je však jistou známkou uvědomění si přínosu GMO plodin. Pěstování plodin odolnějších k chorobám a škůdcům, potažmo rezistentních k herbicidům nejen, že zvyšuje ekonomičnost takového pěstování, ale pro mnohé „ekology“ jistě paradoxně, přispívá k ochraně životního prostředí a biodiverzity.
 - GMO odrůda brambor AMFLORA se řadí mezi modifikace brambor se změněným složením škrobu. Modifikace je provedena vnesením bramboru vlastního genu *gbss* (syntetázy) v antisence orientaci k fragmentu *gbss* promotoru bramboru, dochází tak k redukci podílu amylozy ve prospěch nárůstu amylopektinu. Námí zvolený systém detekce a kvantifikace GMO není pro tuto odrůdu vhodný, právě z důvodu vnesení genu, který se v plodině přirozeně vyskytuje, nadto, tato plodina nám nebyla poskytnuta, pro detekci takového druhu GMO plodiny by musel být zvolen jiný systém, který by nedetekoval přímo zájmový gen, ale některé jiné selekční markery, kontrolní elementy, které se v GMO plodinách vyskytují např. 35S promotor viru mozaiky kvěťáku (CaMV), T-*nos* terminátor genu pro nopalín syntázu z *Agrobacterium tumefaciens* a neomycin fosfotransferáza (*npII*) v závislosti na daném konstrukt. Fa BASF testuje další obdobné modifikace v tomto směru a za velmi perspektivní považují testovanou modifikaci bramboru se zvýšeným podílem amylopektinu v kombinaci s odolností k herbicidu imidazolinonu.

- Jaká je podstata molekulárních markerů a jaké jsou jejich výhody ve vztahu k morfologickým markerům ?
 - Techniky založené na polymorfismu proteinů: ve srovnání s DNA markery jsou méně polymorfní, ale závislé na prostředí a vývojové etapě rostliny.
 - DNA markery detekují polymorfismus na úrovni DNA. Nejsou ovlivněny prostředím ani vývojovou fází rostliny a jejich variabilita (podle zvoleného markerovacího systému) je relativně velmi vysoká.
 - Morfologické markery jsou jistě platným nástrojem pro posuzování plodin, ale pro účely rychlé a rutinní analýzy nejsou právě vhodné z důvodu velkého množství posuzovaných znaků a nutnosti sledování různých znaků po celou dobu vegetace. Pro velmi prošlechtěné plodiny je míra variability morfologických markerů pro odlišení genotypů nedostatečná.

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

- Jeví se nějaké možnosti v případě jinak vysoce polymorfních ISSR markerů na snížení resp. odstranění jejich variability resp. nestability u brambor?
 - Tento problém je i není řešitelný, z výsledků vyplývá, že optimalizací izolace DNA a PCR cyklu a především užití výhradně čerstvé DNA lze do jisté míry tento problém vyřešit (přes značnou pracnost). Nicméně, stejně jako u RAPD markerů, nelze dosáhnout dostatečné opakovatelnosti experimentů, o přenositelnosti na jiné pracoviště nemluvě.
- SSR markery byly na základě pilotní studie využity pro identifikaci více než 160 v ČR registrovaných odrůd s dostupným výsledkem na internetu. Bohužel bez přístupového hesla nebyla pro mě databáze přístupná, a proto bych se rád zeptal, zda byly všechny odrůdy jednoznačně determinovány a jaký byl počet SSR markerů využitých pro tuto identifikaci?
 - Databáze KOB bude pro veřejnost dostupná od r.2010 a dostupnost bude pravděpodobně podmíněna registrací.
 - V prezentaci bylo pro determinaci souboru 147 odrůd použito 9 SSR markerů, touto kombinací bylo možné rozlišit 102 odrůd.
 - V katalogu je v současné době uvedeno 164 odrůd a 7 SSR markerů, databáze se stále upravuje.
- Jako vysoce perspektivní se jeví využití IRAP markerů. Předpokládá se rovněž jejich zařazení do výše uvedené databáze?
 - Ano, budou vloženy.
- Při finální vyhodnocování podobnosti jednotlivých odrůd využíváte dva způsoby grafických výstupů Dendrogram resp. PCO analýzu. V čem v tomto konkrétním případě spatřujete výhodu z mého pohledu trochu duplicitní prezentaci výsledků? Je možné uvést podíly vysvětlující variability pro jednotlivé osy u PCO analýz?
 - Pro hodnocení podobnosti jsou využívány dvě odlišné statistické metody, klastrová/shluková analýza a ordinační analýza (PCO) výstupem těchto metod je pak dendrogram a ordinační diagram, za přínosné považují fakt, že výsledky obou analýz vykazují stejný trend a variabilitu hodnoceného

souboru je pak možné lépe interpretovat. Podíl variability vysvětlený jednotlivými osami ordinačního diagramu jsou pro ordinační diagram uvedeny v prezentaci pro SSR markery následující: pro osu 2 (x) 13,8% a pro osu 1 (y) 18,2%.

- V publikovaném metodickém výstupu (Čurn a kol. 2008) jsou velmi podrobně a pečlivě rozebrány jednotlivé izolační techniky DNA s následným doporučením nejvhodnějších z nich pro jednotlivé markerovací systémy. V této souvislosti bych se zeptal proč nebyly zařazeny rovněž do této práce i perspektivní IRAP markery?
 - IRAP resp. markery založené na polymorfismu transponibilních elementů budou mít svou vlastní metodiku, neb je to docela nové a zaslouží si samostatnou publikaci.

prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.

- Oponent nemá otázky



**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta**

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Ing. Alena Nováková**
Narozen(a): 14.3.1980 v Rakovníku

Studijní program: Fytotechnika
Studijní obor: Speciální produkce rostlinná
Forma studia: prezenční

Název disertační práce: Utilization of molecular markers in potato for vyriety identification and GMO detection and quantification

Výsledek obhajoby:

Prospěl (a)

~~**Neprospěl(a)**~~

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	doc. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; AF MZLU v Brně (oponent)	
Členové:	prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.; KGŠR FAPZ SPU v Nitre (oponent)	
	Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.; VÚRV Praha – Ruzyně (oponent)	
	doc. Ing. Jiří Diviš CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. Ing. Jana Ehrenbergerová, CSc.; AF MZLU v Brně	
	prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. Ing. Jan Moudrý, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	Mgr. Světlana Sýkorová, CSc.; ÚPB BC AV ČR, v. v. i. VÚZV	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 18.6.2009



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: **Ing. Alena Nováková**
Narozen(a): 14.3.1980 v Rakovníku

Studijní program: Fytotechnika
Studijní obor: Speciální produkce rostlinná
Forma studia: prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 8

počet platných hlasů: 5

počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 5

kladných: 5

záporných: 0

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	doc. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; AF MZLU v Brně (oponent)	
Členové:	prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.; KGŠR FAPZ SPU v Nitre (oponent)	
	Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.; VÚRV Praha – Ruzyně (oponent)	
	doc. Ing. Jiří Diviš CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. Ing. Jana Ehrenbergerová, CSc.; AF MZLU v Brně	
	prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. Ing. Jan Moudrý, CSc., ZF JU v Českých Budějovicích	
	Mgr. Světlana Sýkorová, CSc.; ÚPB BC AV ČR, v. v. i. VÚZV	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 18.6.2009