

Oponentský posudek

Disertační práce: „Utilization of Molecular Markers in Potato for Variety Identification and GMO Detection and Quantification“

Autor disertační práce: Ing. Alena Nováková

Oponent: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Předložená práce Ing. Aleny Novákové se zabývá problematikou využití molekulárních markerů pro identifikaci současného sortimentu registrovaných odrůd brambor včetně možnosti specifické detekce přítomnosti transgenů pro lektin u geneticky modifikované odrůdy bramboru Desirée. Velký důraz byl v práci věnován sumarizaci a porovnání metodických postupů využití současných molekulárních markerů zahrnující testování osmi specifických DNA izolačních postupů a hodnocení polymorfismu významných molekulárních markerů (RAPD, SSR, ISSR a AFLP) včetně popisu separačních, detekčních a vyhodnocovacích technik. Řešenou problematiku vidím jako vysoce aktuální a to jak ve vztahu k obchodní činnosti spojenou s požadavkem odrůdové deklarace vyplývající ze zákona, tak především k efektivní šlechtitelské činnosti s využitím molekulárních markerů resp. těchto optimalizovaných technik pro asistovanou selekci. Prosazení molekulárních technik jako selekčních nástrojů ve šlechtění brambor logicky nahrává obrovská konkurence v počtu nabízených odrůd a tak jejich kratší životnost resp. nižší efektivita na trhu, což nutí i šlechtitele urychlovat vývoj a snižovat náklady u nově vyšlechtěných materiálů. Zvolené postupy řešení v této práci považuji za správné, odpovídající současným směrům výzkumu této problematiky. Z obecného hlediska se mi dlouhodobě líbí vědecká kontinuita týmu kolem profesora Čurna.

Z formálního hlediska je úvodní část práce členěna standardně, výsledková resp. diskusní část je pak doložena konkrétními výstupy ve formě dvou již publikovaných prací (vědecká publikace, uznaná metodika), odkazem na vypracovanou internetovou databázi screeningu registrovaných odrůd brambor a třemi ukončenými výstupy předloženými k schvalování. Tento způsob členění práce s příložením vlastní publikační činnosti mě osobně velmi rezonuje, protože je tak zároveň jednoznačně potvrzena schopnost doktorandky úspěšně vědecky pracovat. Možná drobnou osobní připomínku bych měl k volbě jazyka pro prezentaci disertační práce, kdy při volbě angličtiny bych asi zvolil rovněž alespoň zkrácený překlad i doložených metodik, jež jsou zpracovány v češtině.

Z testování vybraných molekulárních markerů (RAPD, SSR, ISSR a IRAP) jako potencionálních markerů pro možnou identifikaci v ČR registrovaných odrůd brambor byly z pilotních studií vybrány SSR a IRAP. Naopak RAPD a ISSR markery vykazovaly intraodrůdovou variabilitu a nestabilitu v závislosti na stáří a původu DNA. K této části práce včetně prezentovaných metodických výstupů bych měl několik otázek.

Jeví se nějaké možnosti v případě jinak vysoce polymorfních ISSR markerů na snížení resp. odstranění jejich variability resp. nestability u brambor?

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?

Jako vysoce perspektivní se jeví využití IRAP markerů. Předpokládá se rovněž jejich zařazení do výše uvedené databáze?

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?

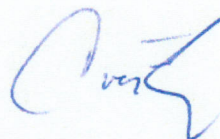
V publikovaném metodickém výstupu (Čurn a kol. 2008) jsou velmi podrobně a pečlivě rozebrány jednotlivé izolační techniky DNA s následným doporučením nejvhodnějších z nich pro jednotlivé markerovací systémy. V této souvislosti bych se zeptal proč nebyly zařazeny rovněž do této práce i perspektivní IRAP markery?

V případě vypracované metodiky detekce GMO u brambor je možno ocenit validované postupy izolace DNA vhodné pro detekci a kvantifikaci transgenů, včetně navržení specifického duplexu primerů pro detekci vneseného lektinového transgenu. RT – PCR pak potvrdila vysokou detekční i kvantifikační schopnost přítomného transgenu. Spolehlivost detekce v praxi tak dle mého soudu bude především závislá na reprezentativním primárním odběru vzorků na stanovišti.

Celkově nemám k práci žádných závažnějších připomínek, doktorandka jednoznačně prohloubila studovanou problematiku a počty výstupů v podobě velkého počtu prezentací na konferencích, vypracované metodiky i vědecké publikace jsou toho jednoznačným dokladem. Předložená disertační práce více než splňuje požadovanou odbornou úroveň a připravenost doktorandky pro samostatnou vědeckou práci. Po úspěšné obhajobě disertační práce tak doporučuji Vědecké radě ZF Jihočeské univerzity disertační práci schválit a Ing. Aleně Novákové udělit titul Ph.D.

V Praze 12. 6. 2009

Ing. Václav Dvořáček, Ph.D



POSUDOK NA DIZERTAČNÚ PRÁCU

Názov dizertačnej práce: Utilization of molecular markers on potato for variety identification and GMO detection and quantification

Autorka dizertačnej práce: Ing. Alena Nováková

Pracovisko autorky dizertačnej práce: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

Študijný program: Fytotechnika

Odbor doktorandského štúdia: Speciální produkce rostlinná

Školiteľ doktorandky: prof Ing. Vladislav Čurn, PhD., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

Oponent dizertačnej práce: prof. RNDr. Milan Bežo, CSc., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Posudzovaná dizertačná práca je predložená ako súbor vedeckých prác a metodík práce DNA analýz so špecifickým zameraním na detekciu odrôd ľuľka zemiakového a identifikáciu geneticky modifikovaných rastlín. V prvej časti dizertačnej práce je uvedený literárny prehľad k problematike molekulárnych markérov, ktoré využívajú polymorfizmus DNA. Následne sú uvedené texty článkov zverejnené v časopisoch a vo forme metodík.

Aktuálnosť zvolenej témy

Téma dizertačnej práce je aktuálna z pohľadu riešenia otázok prehĺbenia poznatkov o uplatňovaní DNA markérov v základnom výskume a riešení praktických úloh identifikácie genotypov rastlín konkrétne zbierok odrôd ľuľka zemiakového, ako aj stanovovania prítomnosti cudzorodých génov v geneticky transformovaných rastlinách. Prístup autorky dizertačnej práce k téme a výber samotnej témy je odborne opodstatnený, má jasný a motivačný prístup k riešeniu vedeckého a spoločenského problému. Oceňujem nadväznosť krokov riešenia dizertačnej práce od určenia problému, vytvorenia hypotézy na jeho riešenie, dynamiku prehľbovania metodických postupov na overenie hypotéz a vyjadrenie konštruktívnych záverov uplatnenia výsledkov dizertačnej práce pre ďalší rozvoj vedy a spoločenské uplatnenie.

Splnenie sledovaných cieľov

Ciele dizertačnej práce boli splnené. Zrozumiteľná formulácia zamerania dizertačnej práce zhrnutá do cieľov umožnila posudzovateľovi dobrú orientáciu pri zhodnotení ich splnenia. Uplatňovanie metód molekulovej biológie a genetiky v posudzovaní zhody a rozdielov medzi genotypmi nie je konzervatívny stav ale dynamický proces uplatňovania rozvíjajúcich sa poznatkov o genómoch rastlín. Polymorfizmus DNA jedinečných a opakujúcich sa poradí nukleotidov je bezhraničný priestor pre vyvíjanie nových metodických postupov a tvorbu markérov pre riešenie všeobecných a špecifických úloh, ako sú napríklad oblasti evolučných vzťahov, určovania vzťahov kvality a kvantity produkčných znakov rastlín, a identifikácie identity organizmu a ďalších súvislostí. Práve v týchto súvislostiach sa odvíjalo riešenie dizertačnej práce pre naplnenie cieľov s uplatnením presných a exaktných metód.

Aktuálnosť zvolených metód práce

Skupina metód, ktoré boli použité v rámci riešenia dizertačnej práce má spoločného menovateľa v analýze polymorfizmu DNA pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a štiepenia DNA reštrikčnými enzýmami. Na základe PCR boli uplatnené metódy rozlišujúce

polymorfizmus DNA s náhodnými prajmermi (RAPD) a prajmermi, ktoré boli odvodené na základe opakujúcimi sa poradiami nukleotidov usporiadanými za sebou alebo satelitov (SSR, ISSR) a opakujúcimi sa poradiami nukleotidov usporiadanými rozptýlene, predovšetkým retrotranspozónov (IRAP). Jedinečnosť štiepenia poradí nukleotidov reštrikčnými enzýmami bola základom uplatnenia metódy RFLP. Za opodstatnené a vhodné považujem použitie techník PCR, konkrétne multiplex PCR, duplex PCR a RT PCR pri detekcii a kvantifikácii GM ľuľka zemiakového. Všetky použité metódy patria k štandardným uznávaným s dobrou opakovateľnosťou (okrem RAPD) a kvalitnou reprodukovateľnosťou.

Prínos pre ďalší rozvoj vedného odboru

Výsledky dizertačnej práce sú prínosom v dvoch rovinách, jednak obohacujú poznávanie polymorfizmu genómu jadra bunky ľuľka zemiakového a súčasne sú zdrojom exaktných prístupov pri identifikácii registrovaných odrôd, vystavovaní certifikátov pravosti, vydávaní pasportov, riešení prítomnosti transgénov v rastlinách a ďalších možnostiach rastlinnej produkcie (identifikácia patogénov v rastlinách, odhad genetickej podobnosti a vzdialenosti pre šľachtiteľské programy a iné). Predpokladám ďalší rozvoj metód molekulovej biológie a genetiky na riešiteľskom pracovisku, ktoré podnietila autorka dizertačnej práce. Kvalita dizertačnej práce, infraštruktúra vedeckej základne riešiteľského pracoviska, medzinárodná spolupráca autorky a spoluriešiteľov sú zárukou rozvíjania tvorivého potenciálu pracoviska.

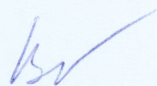
K dizertačnej práci nemám zásadné pripomienky. Publikované práce boli oponované a metodiky sú overované laboratórnymi postupmi.

Záver

Dizertačná práca je vedecké dielo prehlbujúce ľudské poznanie v oblasti molekulovej biológie v rastlinnej produkcii. Publikovaním získané výsledky pútajú pozornosť v domácich a medzinárodných súvislostiach. Sú podkladom pre genetický výskum a ich cieľavedomé uplatňovanie v rastlinnej produkcii.

Na základe posúdenia dizertačnej práce Utilization of molecular markers on potato for variety identification and GMO detection and quantification navrhujem Ing. Alene Novákovej udeliť titul "*philosophiae doctor*" v skratke PhD v odbore Speciální produkce rostlinná.

Nitra 10. jún 2009



prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce

Ing. Alena Nováková

Utilization of molecular markers in potato for variety identification and GMO detection and quantification

Oponent: Doc. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.
Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství
AF - MZLU v Brně

V Brně dne : 27. 5. 2009

Předložená disertační práce, kterou Ing. Alena Nováková vypracovala na téma: „**Utilization of molecular markers in potato for variety identification and GMO detection and quantification**“, je velmi aktuální a celkově zpracovaná na vysoké vědecké úrovni. Práce se zabývá možnostmi využití molekulárních markerů pro charakterizaci odrůd bramboru. Hlavním přínosem předložené disertační práce je skutečnost, že autorka optimalizovala studované metodické postupy včetně izolace DNA, pro využití v konkrétních podmínkách. Práce má celkový rozsah 177 stránek textu, který je vhodně doplněn množstvím tabulkových, obrázkových a grafických příloh. Autorka rozdělila svoji disertační práci, která byla částečně napsaná v angličtině, celkem do 9 kapitol. V seznamu použité literatury uvádí v kap. 4 na str. 24-38, citace celkem 173 autorů, což svědčí o jejím zodpovědném přístupu k zadanému tématu práce i vedení ze strany školitelů. V předložené disertační práci, která byla podpořena projekty NAZV, GAČR a EU-MATEO, byly stanoveny jednotlivé cíle práce odpovídající cílům uvedených projektů. Podrobně jsou zpracovány kapitoly popisující vědecké hypotézy a jednotlivé dílčí cíle jsou naplněny citacemi již publikovaných oponovaných vědeckých prací.

V první části se autorka zaměřila na vyhodnocení a ověření doporučených molekulárních markerů a metodických postupů, využitelných pro účely popisu, identifikace a následných aplikací markerů na celý soubor dostupných a registrovaných odrůd bramboru v České republice. Tato část práce přináší řadu hodnotných výsledků a nových poznatků, které jsou teoretickým i praktickým přínosem v oboru. V další části se zabývala možnostmi využití jiných DNA markerovacích systémů vhodných pro řešenou problematiku. Cílem bylo vyvinutí metody použitelné pro účely hodnocení reálně dostupných transgenů u bramborů v ČR. Zvolen byl dostupný GNA gen - lektin ze sněženky, vzhledem ke skutečnosti, že jiné transgeny v této době nebyly u nás oficiálně dostupné. Do studie autorka zařadila postupně ještě i analýzu mikrosatelitů ISSR, která se podle dostupných literárních zdrojů jevila pro sledovaný účel jako vhodná, protože poskytovala vyšší počet amplifikovaných druhů. Při opakovaných analýzách však autorka zjistila nestabilitu tohoto markerovacího systému hlavně v závislosti na stáří a původu DNA, jakož i značnou variabilitu uvnitř sledovaných odrůd. Další sledovanou oblastí se stala analýza transponibilních elementů, tj. retrotransposonů a to především analýza IRAP, která zajišťuje velmi dobré možnosti přesné identifikace jednotlivých odrůd bramboru ve velkém souboru jejich genotypů. Tato analýza byla použita pro následný screening souboru 164 registrovaných odrůd brambor v České republice. Dalším řešeným úkolem byla aktuální problematika testování GMO u brambor, kde autorka zvolila metodu multiplex, respektive duplex PCR. Pro následnou kvantifikaci GMO u bramboru zvolila metodu Real-Time PCR. Obě tyto testované metody se ukázaly pro řešení dané problematiky jako vhodné, které s ohledem na požití poskytují dostatečné detekční a kvantifikační limity.

K disertační práci mám do diskuse následující dotazy a připomínky:

1.) Autorka se v předložené disertační práci dopustila pouze některých drobných formálních nedostatků, jako například v obsahu práce v kap. 6.

2.) 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 ?

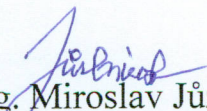
3.) Jaká je podstata molekulárních markerů a jaké jsou jejich výhody ve vztahu k morfologickým markerům ?

4.) Jaký má autorka názor na současnou potřebu a důležitost nástrojů pro identifikaci odrůd bramboru a dalších polních plodin u nás, tj. čistotu odrůdy, osiva a sadby, pravost odrůdy v obchodním styku a ve vztahu ke spotřebiteli.

Závěrem je možno konstatovat, že disertační práce kterou Ing. Alena Nováková předložila, má vysokou teoretickou i praktickou hodnotu zvláště pro šlechtitele bramboru, ale i jejich pěstitele. Je zpracována na vysoké vědecké úrovni, přináší řadu nových cenných teoretických i praktických poznatků. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce ve studovaném oboru. Vlastní výzkumné výsledky autorky znamenají významný zdroj informací, které budou jistě nacházet konkrétní využití i v zemědělské praxi. Uvedené dotazy a připomínky nesnižují celkovou vysokou teoretickou, vědeckou i praktickou úroveň předložené disertační práce, mají být spíše přínosem pro autorku v její další vědecké práci.

Na základě uvedených skutečností **proto doporučuji** oponentní radě Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích **disertační práci Ing. Aleny Novákové přijmout k dalšímu řízení a po jejím úspěšném obhájení udělit jmenované akademický titul „Doktor“.**

V Brně dne: 27.5. 2009


Vypracoval: Doc.Ing. Miroslav Jůzl, CSc.
Ústav pěstování, šlechtění rostlin a
roślinolékařství AF-MZLU v Brně