

Posudek na disertační práci

Název práce: THE APPLICATION OF MOLECULAR TECHNIQUES IN PLANT BREEDING

Doktorandka: Ing. Lenka Havlíčková

Pracoviště: Jihočeská Univerzita
Zemědělská fakulta
Biotechnologické centrum
České Budějovice

Školitel: Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Konzultant: Dr. Luigi Cattivelli, Ph.D.

Konzultant: Caterina Marè, Ph.D.

Oponent: RNDr. Ilja Prášil, CSc.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
161 06 Praha

Disertační práce ing. Lenky Havlíčkové je zaměřena na aktuální oblast současné genetiky a šlechtění – na užití technik a přístupů molekulární genetiky při šlechtění rostlin – microarray, expresní QTLs a molekulární markerování genu. Tři témata, kde byly jednotlivé techniky aplikovány, jsou rovněž aktuální: exprese genů suchovzdornosti u pšenice tvrdé, mapování kandidátních genů suchovzdornosti pšenice a detekce autoinkompatibility u řepky olejky.

Disertace je napsána ve velmi moderním pojetí a to nejen svým obsahem, ale i formou zpracování. Je přehledná, vhodně rozčleněna do devíti kapitol, napsána je v čtivé angličtině. Velmi oceňuji jednoznačně napsané cíle práce a v závěru přehledně uvedené odpovídající závěry. Práce je názorně doplněna deseti přílohami. Disertace se dá předkládat jako vzorová.

Doktorandka využila spolupráci se zahraničím a část výsledků prezentuje ve spolupráci s předními výzkumnými centry v Itálii. K tomu směřuje můj první dotaz: Jaký podíl na uvedených experimentech mají (mají-li vůbec) pracovníci z jiných organizací, např. u kultivačních a fyziologických měření? Užití nejmodernějších technik molekulární genetiky je

skutečně jedinečné a představuje špičku současných metod a přístupů. Práce potvrzuje, že doktorandka zvládla zadané téma výborně. Nejen to, práce přináší řadu nových a originálních výsledků od identifikace genů exprimovaných během sucha, přes analýzu kandidátních genů suchovzdornosti pšenice až po aplikace molekulárních markerů při detekci autoinkompatibility řepky.

Nezbývá než se zeptat na uplatnění těchto výsledků v dalších programech (včetně šlechtitelských) na uvedených pracovištích. Výsledky si bezesporu zaslouží větší publicitu a to i formou vědeckých publikací. Uvítal bych proto vyjádření doktorandky o rozpracovanosti zveřejnění výsledků v impaktovaných časopisech.

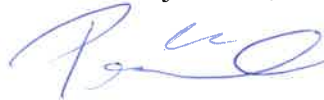
Závěrečné konstatování:

Předložená disertační práce Ing. Lenky Havlíčkové splňuje podmínky kladené na disertaci, ukazuje, že doktorandka je schopna samostatně řešit odbornou problematiku a proto doporučuji, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělení jmenované akademický titul Ph.D.

V Praze 6. listopadu 2011



RNDr. Ilja Prášil, CSc.



Posudek doktorské disertační práce

„The application of molekular techniques in plant breeding“

autorky Ing. Lenky Havlíčkové

Oponent: Ing. Ladislav Kučera, CSc.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně

a) aktuálnost zvoleného tématu

Aktuálnost zvoleného tématu je vysoká, vzhledem ke stále rostoucímu významu aplikace moderních postupů v rámci šlechtění pšenice i řepky olejky. Důsledky abiotických stresů v rozhodujících vývojových fázích rostlin a poškození produkčních porostů pšenice jsou výzvou pro genetiky i šlechtitele. U pšenice je šlechtění na odolnost vůči suchu komplikována především nízkou heritabilitou jednotlivých znaků a tím i nedostatkem dostatečně odolných genetických zdrojů.

Předložená práce přináší původní výsledky studia změn genové exprese u dvou odrůd tvrdé pšenice s odlišnou odpovědí na suchu s využitím technologie DNA mikročipů.

Autorka kromě výše uvedených studií zaměřila své úsilí i na praktické aplikace získaných poznatků při vyhledávání potenciálních genů, které by mohly být využity pro šlechtitelské programy.

Poslední částí práce se autorka věnovala problematice studia mechanismu účinku genů ovlivňujících autoinkompatibilitu u řepky olejky a na vývoj a na využití molekulárních markerů AI v rámci šlechtění odrůd.

b) zvolené metody, zpracování

Práce je zpracována v rozsahu 159 stran s bohatou tabulkovou a obrazovou dokumentací. Členění odpovídá zavedenému schématu, jsou zde zařazeny úvodní kapitoly literárního přehledu (230 citací), vědecké hypotézy a cíle, popsán použitý materiál a metody, dosažené výsledky a diskuse. V rámci jednotlivých kapitol jsou uvedeny hlavní klíčové poznatky a doporučení.

Ke zpracování nemám připomínky, text je srozumitelný a umožňuje dobrou orientaci.

Mám jen drobné připomínky k některým částem. Podle mého názoru nebylo nutné do příloh zahrnout obsažné popisy protokolů rutinních komerčních souprav použitých při experimentální práci.

Literární přehled je velmi rozsáhlý a kvalitní a jistě by mohl být publikován. Jen bych doporučil prověřit kompletnost uváděných pramenů pro použité pasáže textu.

Jen bych upozornil na určité terminologické váhání autora především u termínů delta Ct (ΔCt). Výše uvedený termín je ve většině případů uváděn u expresních analýz, kde je prováděna normalizace k referenčnímu genu, jak autorka například uvádí na straně 87.. Na straně 73 je však pro ΔCt uvedeno, že se jedná o rozpětí (range) hodnot Ct. Definice pro ΔCt (patrně rovněž se zde jedná o rozpětí hodnot) na straně 65 chybí.

Zvolené metody jsou plně odpovídající dílčím cílům disertace a jsou dokladem výhodnosti využití spolupráce s výzkumnými pracovišti.

c) výsledky disertace a získané nové poznatky

Získané výsledky jsou velmi cenné a přinášejí nové poznatky z oblasti šlechtění pšenice na odolnost vůči abiotickým stresům. Autorka dokládá nejen svou schopnost využít poznatků molekulární genetiky, ale je schopna i samostatného rozhodování při volbě postupů a metod hodnocení.

Výsledky potvrdily potenciál nových moderních analytických metod zkoumání exprese genů pro výběr a validaci genů u pšenice i možnosti uplatnění asistované selekce ve šlechtění autoinkompatibilních linií řepky olejky.

Dotazy:

Budou, nebo jsou výsledky již zpracovány a publikovány?

Proč nebyly pro výběr referenčních genů použity i specializované nástroje hodnocení, například geNorm či Normfinder?

Proč byly pro expresní analýzy vybrány jako referenční geny *cyclophilin* a *TIM17* (viz str. 66). Pro *cyclophilin* nesvědčí data prezentovaná v tabulce 13. ve vztahu ke kritériím výběru na straně 73. Je tu také rozpor v uvedeném počtu vzorků, u tabulky č.13 jsou použity 4 vzorky a na straně 65 uvádí, že pro qRT-PCR analýzy stability referenčních genů bylo použito celkem 16 vzorků.

Jak byly propočítávány delta Ct (normalizace k referenčnímu genu)? V kapitole 4.3.3. na straně 86 nejsou použité postupy stanovení relativní exprese dostatečně popsány.

Proč se autorka domnívá, že negativní delta Ct u *TaFBPase-1* je spojeno s narušením distribuce u populace RIL?

d) význam pro další rozvoj vědy

Poznatky prezentované v předložené práci mají význam nejen pro rozšíření znalostí o odolnosti vůči abiotickým stresům u pšenice, ale lze je využít i pro detailnější studium genetické determinace tolerance a pro vyhledávání nových využitelných zdrojů odolnosti. Výsledky nepochybně přispějí i ke zvýšení účinnosti nepřímých výběrových postupů a pro výběr vhodných strategií šlechtění u řepky olejky.

e) splnění sledovaného cíle disertace

Prezentované pracovní hypotézy a cíle, jsou jasně formulovány a umožňují odpovídající posouzení volby metod a shodu s výsledky práce.

Jak autor v předložené práci dokládá,

- byl vypracován kvalitní literární přehled k dané problematice,
- byly zvládnuty a optimalizovány metody výběru referenčních genů a kandidátních genů u pšenice tvrdé
- a byla ověřena možnost integrace MAS u řepky olejky s využitím informací o přítomnosti vhodných alel souboru genů řídicích SI

Závěr hodnocení:

Předložená disertační práce „**The application of molecular techniques in plant breeding**“, autorky Ing. Lenky Havlíčkové, svým zaměřením, dosaženými výsledky a způsobem zpracování splňuje kritéria kladená na disertační práce. Je bezpochyby přínosem nejen pro výzkum

determinace odolnosti vůči abiotickým stresům, ale i pro rozvoj MAS ve šlechtění odrůd řepky olejky v ČR. V průběhu řešení byly získány původní poznatky, které obstojí i v mezinárodním měřítku.

Souhlasím, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělen jmenované akademický titul „Doktorka“.

V Praze dne 7.11.2011



Ing. Ladislav Kučera, CSc.

PhD thesis review: THE APPLICATION OF MOLECULAR TECHNIQUES IN PLANT BREEDING, by Lenka Havlíčková.

Reviewer: Andrea Carra, PhD, researcher, Research Unit for Wood Production Outside Forests, CRA, Strada Frassineto 35, 15033, Casale Monferrato, Italy.

This thesis describes the application of molecular markers to genetics and breeding of two major crops, durum wheat and oilseed rape. While aiming to this purpose, the author addresses two basic themes of plant biology: response to water stress and mechanisms of self-incompatibility. These topics are presented in their complexity in the background section, which defines their practical importance and gives a comprehensive overview of their genetic and molecular bases.

The scientific background of the work is up to date, including, for instance, the recent discovery of ABA receptors, which was immediately recognized as a milestone in research on plant abiotic stress responses, and the unveiling of transcriptional silencing mechanisms underlying plant self-incompatibility.

The techniques applied are sound and the experiments are carefully prepared, so that they lay on a solid methodological basis. For instance, the selection of the reference genes for qRT-PCR analysis of gene expression in water stressed wheat plants is very accurate.

Microarray analysis was first used to gain a general view of gene expression changes in two wheat cultivars with different degree of drought tolerance, 'Ofanto' and 'Cappelli'. Then qRT-PCR was used to validate the results, but also to gain further insight. Indeed, following an interesting experimental design, qRT-PCR was used to detect the expression of drought responsive genes in plants collected at an earlier stage of development, comparing to microarray, adding a further level of complexity. This allowed to validate the majority of the genes identified in the microarray experiment, but also revealed a different behaviour of the two cultivar when exposed to water stress at a different stage.

The set of drought responsive genes identified are good candidates to be used as markers. In addition, some of them would deserve further investigation to elucidate their functions in drought tolerance.

The application of the HEL gene as expression marker in eQTL analysis of a collection of RILs is an example of how expression data can be used for genetic mapping of useful traits. Thus, the practical impact of the results obtained from the microarray and qRT-PCR experiments can be immediately appreciated.

The work on oilseed rape is introduced by a thorough description of the major objectives in breeding programmes for this crop. The technological aspects of importance (glucosinolate and erucic acid content) for industry transformation, linked to desirable genetic traits, are met by the increasing adoption of hybrid cultivars, which requires the use of self-incompatible genotypes for their production. Thus, the identification of molecular markers for the selection of self-incompatibility alleles in crossing populations is of great interest.

The experimental work, which was conducted by comparing molecular and biological data (seed production in isolated flowers), resulted in the validation of a set of markers useful to discriminate self-compatible plants. In addition, preliminary data were obtained for markers potentially useful to select self-incompatible plants.

The results are discussed properly with reference to their practical applicability in the breeding programmes, as well as in their biological aspects. Irregular segregation of marker linked with self-incompatibility traits is interpreted in terms of allele variability at the loci considered. Thus, beside offering useful tools to oilseed breeding, the results help to shed light on the intricate molecular basis of self-incompatibility in plants.

In view of these observations, I accept the work presented in this thesis as being of sufficient depth and quality for the granting of the PhD degree, and consider it ready for defense.

Andrea Carra

