

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce

Identifikace genů rezistence k nádorovitosti pomocí asociativní transkriptomiky

Autor: Mgr. Ing. Ondřej H e j n a

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Oponent: Doc. RNDr. Jana Ř e p k o v á, CSc.

MU Brno, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie

Problematikou a cílem předložené práce je identifikace kandidátních genů pro rezistenci k závažné chorobě nádorovitosti košťálovin vyskytující se u brukvovitých plodin, jejímž původcem je půdní biotrofní patogen *Plasmiodiophora brassicae*. Metodický přístup je založen na získání transkriptomu širokého souboru 245 genotypů druhu *Brassica napus* a asociačním mapování lokusů rezistence jednak pomocí jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v transkriptomu a pomocí expresních profilů s odlišnou mírou exprese.

Studované onemocnění je závažné v celosvětovém měřítku a možnost pěstování rezistentních odrůd vyžaduje pochopení determinace rezistence, získání vhodných donorů rezistence a identifikaci efektivních genů rezistence využitelných ve šlechtění. Toto sleduje i předložená disertační práce a využívá k tomu klasické přístupy fenotypového hodnocení rezistence a následné pokročilé genomické přístupy umožňující asociační mapování a identifikaci kandidátních genů rezistence. Téma práce splňuje požadavek na aktuálnost a potřeby studia genomů významných plodin v oblasti funkční genomiky brusnic.

Práce je psaná v českém jazyce celkem na 112 stranách a je klasicky členěna na Úvod, Literární přehled, Hypotézy a cíle, Materiál a metody, Výsledky a Diskuse. Ve stručném úvodu je na jedné straně formulován problém pěstování řepky olejky z hlediska nedostatečné odolnosti současných odrůd k onemocnění známému jako nádorovitost košťálovin. Chybí zde nastínění potenciálu genomických přístupů v rezistentním šlechtění vedle těch klasických.

Literární přehled na 36 stranách podrobně shrnuje širokou problematiku popisu patogena *P. brassicae*, hostitele, mechanismů odolnosti, metod detekce i ochrany, typy imunitních odpovědí, výsledky a problémy šlechtění proti nádorovitosti včetně známých genů rezistence u řepky olejky. Text v kapitole „Části imunitního systému“ je dosti nepřehledný počtem zkratk, podstata je špatně srozumitelná. Tato část by měla být napsána stručněji a výstižněji i vzhledem k zaměření vlastní práce. Ve struktuře literárního přehledu zcela chybí rešerše prací zabývajících se sekvenováním genomu popř. transkriptomu u rodu *Brassica*, asociačním mapováním a využitím genomických přístupů ve šlechtění. Vzhledem k těmto připomínkám považuji literární přehled z hlediska struktury za nevyvážený.

Cíle práce vycházejí ze stanovených hypotéz a jsou jasně formulovány.

Metody jsou prezentovány pouze na 5,5 stranách. Dostatečně je popsán postup přípravy rostlinného materiálu, inokula, vlastní inokulace a hodnocení úrovně napadení. Chybí však informace o rozdělení testovaných genotypů i podle obsahu glukosinolátů a kyseliny erukové, což je uvedeno ve výsledcích.

Chybí důležité metodické postupy pro zpracování sekvenačních dat transkriptomu a programy použité k jejich hodnocení. Je odkázáno na 2 práce, což je obvyklé v publikacích. Tady je nutné postup stručně uvést.

Příprava knihoven byla provedena pomocí kitu Illumina mRNA-Seq, výrobce není uveden. Např. chybí informace, zda byly SNP generovány pro celý transkriptom, což předpokládám. Jak byla provedena kvantifikace exprese? Chybí postup, jakým byly asociované lokusy lokalizovány na chromozomy řepky olejky.

Výsledky jsou prezentovány na 28 stranách. Je z nich zřejmé, že byly získány významné výsledky při hodnocení genotypů z hlediska rezistence k patogenu, kdy bylo nalezeno 46 genotypů *B. napus* rezistentních k *P. plasmidiophora*.

Z dat sekvenování transkriptomů (RNAseq) byly identifikovány SNP markery a expresní profily genů, které byly použity ve dvou asociačních analýzách. Na základě 256 tisíc SNP markerů byla provedena celogenomová asociační analýza. Výsledkem této analýzy bylo nalezení 86 markerů SNP signifikantně asociovaných se znakem, které byly lokalizovány do 9 různých oblastí na šesti chromozomech. Tyto oblasti zahrnovaly 392 genů a mezi nimi byly identifikovány na dvou chromozomech dva lokusy s majorgeny pro rezistenci a sedm genů s malým účinkem.

Pro druhou asociační analýzu byly použity expresní profily 53 889 genů *B. napus*, které vykazovaly určitou míru změny exprese. Touto asociační analýzou bylo identifikováno dalších 19 potenciálních genů rezistence. Tato část je popsána velmi stručně pouze na dvou stranách.

Na základě známých anotovaných genů a proteinových sekvencí bylo identifikováno 82 kandidátních genů rezistence k nádorovitosti košťálovin. Výsledky asociačních analýz lze považovat za velmi významné z hlediska identifikace potenciálních genů rezistence využitelných pro další šlechtění.

K výsledkové části mám připomínky formálního charakteru. Nadpisy tabulek a obrázků jsou velmi jednoduché – neobsahují všechny potřebné informace. U obr. 8 a 9 je nutné doplnění legendy. Není zřejmé, proč je každá skupina uvedena ve dvou obrázcích. Čtenář si to musí sám vydedukovat.

Tabulky s lokusy mají některé lokusy zvýrazněné zeleně, podsvícené světle šedou nebo tmavě šedou barvou. Není vysvětleno proč.

Řada formulací je nepřesná. Např. na str. 53 „Oba tyto lokusy jsou signifikantně rezistentní“ – nedá se takto formulovat. Jde o signifikantní asociaci s nějakým lokusem, oblastí chromozomu, zde jsou desítky genů. Takových nepřesných formulací je mnoho.

Často se uvádí „... z grafu je patrné“ Není uvedeno z kterého grafu.

Tab. 29 – nejsou vysvětleny zkratky

Tab. 30 – chybí uvedení pozice na chromozomu

Citovaná literatura není psaná jednotným stylem.

V **Diskusi** je uspokojivě diskutována fenotypová variabilita rezistence k nádorovitosti. U diskuse asociačních analýz se překrývají výsledky a další podrobnější popis funkce kandidátních genů identifikovaných v devíti lokusech statisticky významně asociovaných s rezistencí.

Připomínky

V práci chybí seznam zkratk.

V práci psané česky by obrázky měly být upraveny a popsány česky; obr. 3, 4, 5 a další.

Je častý nesprávný slovosled – R geny hostitele; PTI, DTI a ETI imunitní reakce; CC-NBS-LRR receptor, apod.

Správně se píše kb a Mb místo k báze, M báze.

Místo „Systemická rezistence SAR“ používat systémová získaná rezistence

Str. 35 – místo dominantní lokus používat dominantní alela

Místo genotypy citlivé používat genotypy náchylné

Str. 57 „signifikantní SNP marker ($-\log_{10}P = 7,62$) obsahuje gen *Cab002008.1*“; marker neobsahuje gen.

Str. 57 V práci je uvedeno: ... „jako kandidátní geny pro tento pokus byly určeny rezistentní geny, které se nacházejí mezi zmíněnými geny, ale neobsahují v testované rezistentní SNP markery.“ Geny ani marker nejsou rezistentní, a celá formulace je zavádějící, nesrozumitelná.

Časté jsou nepřesné formulace – např. pravděpodobný stínový lokus, silná asociace apod.

Dotazy

- 1) Jak byly v práci rozlišeny chromozomy genomů A a C?
- 2) V práci se uvádí, že výběr kandidátních genů byl proveden i na základě anotací typu „abscisic acid“, „auxin“ a „gibberellin“. Tyto funkce jsou spojeny nejen s obrannými mechanismy k patogenům.
- 3) Asociační analýzou prostřednictvím SNP a rozdílných expresních profilů byly identifikovány kandidátní geny. Byly některé geny identifikovány oběma přístupy?
- 4) V práci se uvádí, že některé plodiny inhibují životaschopnost trvalých spor *P. brassicae* v půdě (máta peprná, saturejka zahradní nebo tymián obecný). Jaké látky nebo mechanismy zde působí?
- 5) Jak lze řešit skutečnost, že monogenně determinovaná rasově specifická rezistence je u odrůd překonána během několika málo let pěstování?
- 6) Které části práce zpracoval autor samostatně a na kterých se podílel?

Závěrečné hodnocení

Významným výstupem práce je získání rezistentních genotypů a identifikace asociovaných SNP markerů a kandidátních genů se známou pozicí v genomu řepky olejně.

V práci je znatelný rozpor mezi částí hodnocení rezistence a zpracováním dat transkriptomu a asociačních analýz. Projevuje se to ve všech částech práce od literárního přehledu po diskusi chybějícími částmi a nepřesnými formulacemi.

Disertační práce splnila stanovené cíle. Získané výsledky prošly recenzním řízením, jsou publikovány a diskutovány v časopise *Molecular Breeding* s impakt faktorem (IF₂₀₁₈ 1,862).

**MUNI
SCI**

Doktorand prokázal schopnosti řešit zadaný problém a splnil požadavky kladené na disertační práci.

Doporučuji práci k obhajobě a po úspěšném obhájení udělení titulu Ph.D.

V Brně dne 4. listopadu 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Krejčí', written in a cursive style.



Posudek na disertační práci Mgr. Ing. Ondřeje Hejny: “Identifikace genů rezistence k nádorovitosti pomocí asociativní transkriptomiky“

Disertační práce řeší téma, které je z pohledu současného pěstování brukvovitých plodin nejenom v rámci polního pěstování, ale také v zelinářství vysoce aktuální. Problematika šlechtění brukvovitých rostlin na nádorovitost je či bude jedním ze stěžejních směrů šlechtění, také s ohledem na masivní výskyt tohoto patogena v rámci České republiky. Z tohoto pohledu jsou výsledky uvedené v předložené disertační práci nejenom aktuální, ale také podnětné pro aplikovaný, ale i teoretický výzkum.

Předložená disertační práce je členěna a psána standardním způsobem a je napsána na 117 číslovaných stranách textu, z toho 4 stránky představují přílohy. Oceňuji velké množství prostudované literatury, které zahrnuje 227 zdrojů uvedených v přehledu použité literatury. Jedná se především o zdroje z posledního období, ale i staršího data, která vhodným způsobem konfrontuje se současnou úrovní vědeckého poznání.

V úvodu svého posudku bych chtěl konstatovat, že předložená disertační práce je psána velmi krásnou češtinou, bez výrazných překlepů či prohřešků proti gramatice. Avšak někdy věty působí jakoby nedokončeným dojmem nebo souvětí jsou zakončována v jiném pádu. Také po formální stránce se jedná o velmi kvalitně zpracovanou práci. I přesto se v textu některé chyby či překlepy objevují. V rámci terminologie bych nepoužíval pro rostliny výraz polodivoký (s. 39). Chtěl bych upozornit disertanta na skutečnost, že vědecké názvy vyšších taxonomických celků, ale také jména rostlin se píšou kurzívou (s. 2, 5, 13). Máta peprná je kříženec, takže vědecké jméno je *Mentha x piperita*. Prosím o vysvětlení pojmů vápenaté deriváty a nakažené půdy.

Prosím také o vysvětlení dvojího psaní fyzikálních jednotek, kdy jednou je to psáno slovně a podruhé příslušným fyzikálním označením.

V literárním přehledu se autor zabývá nejenom problematikou šlechtění řepky olejky, ale především životním cyklem a rozšířením sledovaného patogena, kterým byla nádorovitost košťálovin. Velmi detailně je popsána problematika šlechtění na rezistenci řepky vůči nádorovitosti a získávání genetických zdrojů rezistence. Disertant vhodným způsobem



využívá nejenom současnou, ale také starší literaturu. Navržené cíle a hypotézy jsou jasně formulovány a navazují na ní zvolené metody zpracování.

Zvolené metodické postupy jsou odpovídající a poskytují komplexní pohled na sledovanou problematiku. V textu postrádám bližší popis použitých statistických metod, neboť ve výsledkové části je na ně odkaz. Prosím o doplnění v rámci obhajoby práce.

Výsledková část je zpracována velmi detailně a opírá se nejenom o grafické znázornění dosažených výsledků, ale také o tabelární zhodnocení výsledků. Grafy jsou dle mého soudu občas hůře čitelné a ne vždy jejich kvalita byla vysoká. Obdobně i písmo v tabulkách mohlo být větší. Jedná se o můj osobní názor. Při hodnocení získaných výsledků disertant uvádí spíše procentické rozdíly hodnot než hodnoty naměřené. Možná by bylo vhodné tuto část doplnit právě o získaná data z měření a stanovení. V textu se objevují odkazy na statistické analýzy, ale použité statistické metody nebyly nikde uvedeny.

Dá se ze získaných výsledků u sledovaných genotypů řepky stanovit nějaký trend či závislost, která by byla využitelná v rámci dalšího šlechtění či výběru šlechtitelského materiálu?

Diskuse je v rámci celé práce sice relativně krátká, zahrnující 14 stran textu, ale přesto je dostačující. Autor své výsledky srovnává s literárními údaji a snaží se je zobecnit a zhodnotit, avšak často se jedná spíše o popis dané skutečnosti než diskutování rozdílů. Je to poněkud na škodu celé práci, neboť z předložené práce vyplývá zájem o danou problematiku.

Závěry jsou shrnující a postihují významné dosažené výsledky, možná bych je uvedl pro přehlednost do bodů a seřadil bych je podle cílů a hypotéz. Poněkud v této části postrádám potvrzení či vyvrácení vědeckých hypotéz a splnění cílů. Prosím o doplnění v rámci obhajoby disertační práce.

V uvedené disertační práci však postrádám kapitulu věnovanou rozvoji dané vědní disciplíny a uplatnění výsledků v praxi. Bývá totiž zvykem, že uvedená kapitola je součástí disertační práce. Prosím disertanta, aby se v rámci obhajoby své práce zaměřila také na tuto otázku.

Jak již bylo uvedeno výše, autorka cituje 227 literárních pramenů. Poněkud mne zarazil způsob citování, který však není v celém textu jednotný. Musím se přiznat, že jsem se v něm zpočátku poněkud ztrácel. Možná by bylo výhodné využít nějaké citační programy nebo použít citační normy. Bohužel několik literárních pramenů jsem v přehledu literatury nenašel,



nebo byl rozpor mezi citováním v textu a v přehledu použité literatury. Jedná se např. o citování zdroje Hwang et al. (2012a; 2012b, kdy v textu je uvedena citace Hwang et al. (2012; 2012a). Dále jsem nenašel citaci Etchells et al. (2012)Liu et al. (2009), Xie et al. (2005). Rozpor byl u citace Capel a Charles et al. (2016) x Copeland et al. (2016). V přehledu chybí také odkaz na citované webové stránky.

Naopak několik pramenů jsem nenašel nebo přehlédl v textu (např. Auer et al. (2015); Copeland et al. (2016); Dixen (2006); Hirai et al. (2004); Li et al. (2009); Piao et al. (2004), Porteous et al. (1994) a Sakamoto et al. (2008)).

K disertantovi mám následující otázky:

1. Jaké jsou perspektivy šlechtění řepky na nádorovitost?
2. Vysvětlíte pojem hypersenzitivní reakce?
3. Bylo by možné využít regulátory růstu jako možný ochranný prostředek vůči nádorovitosti?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená práce Mgr. Ing. Hejny splňuje i přes uvedené poznámky či připomínky kritéria pro disertační práce. Na základě svého posudku doporučuji uvedenou disertační práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení navrhuji Mgr. Ing. Ondřeji Hejnovi udělit akademický titul doktor, ve zkratce „Ph.D.“

V Praze: 6. 11. 2019

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.



Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Název práce: **Identifikace genů/zdrojů rezistence k nádorovitosti pomocí asociativní transkriptomiky**

Autor: **Mgr. Ing. Ondřej Hejna**
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Oponent: doc. Dr. Ing. Pavel Vejl
Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra genetiky a šlechtění

Disertační práce Mgr. Ing. Ondřeje Hejny představuje již při zběžném pohledu velice kvalitní vědeckou práci zaměřenou na aplikaci molekulární genetiky a bioinformatiky při hledání kandidátních genů rezistence *Brassica napus* vůči původci nádorovitosti *Plasmodiophora brassicae*. Studium donorů genů rezistence a mechanismů, jak fungují rezistentní geny, považují jednoznačně za téma vysoce aktuální. Zvolení vhodných molekulárních analýz, které umožní hodnotit polymorfismy funkční části genomu – transkriptomu ještě výrazně zvyšují význam oponované disertační práce.

Posuzovaná disertační práce je zpracována standardní formou odpovídající svou strukturou vědecké práci. Je tvořena jasným úvodem, kompaktním literárním přehledem, jasnými a konkrétními vědeckými hypotézami, ze kterých vyplývají cíle práce. Samostatné kapitoly jsou věnovány výsledkům, jejich diskusi a shrnutí nové získaných poznatků. Celkový rozsah práce představuje 117 stran velice uceleného a kompaktního textu včetně řady tabulek, názorných schémat a grafů. Jednotlivé kapitoly jsou logicky propojené. Ze všech



kapitol práce jasně vyplývá výborná schopnost doktoranda systematicky podat velké množství informací na malém počtu textových stran. Jednoznačně mohu konstatovat, že autor svou práci nezatížil obecně známými informacemi, ale naopak se zaměřil na maximální koncentraci nově získaných poznatků.

V kapitole Literární přehled doktorand cituje celkem 227 vědeckých a odborných prací. Mohu jednoznačně konstatovat, že všechny citované literární prameny se týkají tématu doktorské práce, jsou aktuální a v naprosté většině představují původní vědecké práce publikované v prestižních časopisech. Literární přehled je v úvodní části zaměřen na fytopatologickou charakteristiku původce nádorovitosti košťálovin, ochranná opatření a diagnostické metody. Následně autor podává podrobný přehled mechanismů, jak reaguje rostlina na napadení patogenními organismy. Závěrečná část literárního přehledu je zaměřena praktické rezistentní šlechtění včetně charakterizace doposud známých rezistentních lokusů.

Aktuálnost zvoleného tématu, stanovené cíle, použité metodické postupy a získané výsledky

Již v úvodu posudku jsem se zmínil, že studium mechanismů rezistence, identifikace donorů rezistence a jejich využití při tvorbě nových odrůd za podpory markery asistované selekce považuji za velice důležité a aktuální téma. Samotný modelový patogen *Plasmodiophora brassicae* způsobuje závažné onemocnění rostlin z čeledi *Brassicaceae*, a tudíž význam studovaného tématu ještě umocňuje.

Oponovaná disertační práce je dle mého názoru výborným příkladem propojení základního genetického výzkumu – transkriptomiky s aplikovaným šlechtitelským výzkumem. Velice kladně cestu, kterou se doktorand ve svém výzkumu vydal. Hodnocení genetických polymorfismů na základě komplexní analýzy SNP v transkribovaných genech představuje v současnosti velice efektivní cestu, jak odhalit doposud neznámé mechanismy rezistence rostlin včetně alel genů, které za tyto reakce jsou zodpovědné. Z tohoto pohledu považuji



cíle doktorské disertační práce v naprostém souladu se světovými trendy aplikovaného genetického výzkumu rostlin.

V kapitole Materiál a metody podal doktorand jasný důkaz o tom, že si je dobře vědom toho, že smysl náročných molekulárních technik je pouze tehdy, pokud jsou aplikovány u biologického materiálu s jasně definovaným fenotypem. Proto je úvodní metodická část zaměřena nejen na původ, botanickou a agronomickou charakteristiku testovaných linií, ale zejména na jejich reakci na umělé infekce původcem nádorovitosti. Autor kompletně popsal metody přípravy biologického materiálu včetně infekčních testů a kvantifikace úrovně napadení pomocí indexu DI.

Molekulární analýzy vycházejí ze současných sekvenačních technik nové generace. Sekvence transkriptomů genotypů s různým stupněm odolnosti vůči nádorovitosti představuje správně zvolenou efektivní metodu, jak získat velké množství SNP lokalizovaných v transkribované části genomu. Získání vstupních sekvenačních dat je pouze první část detailní náročné molekulární analýzy. Další etapou je odfiltrování náhodných dat, identifikace vysoce průkazných SNP, jejich lokalizace v genomu a vyhledání asociací s fenotypem. Všechny tyto etapy doktorské práce, souhrnně označované jako bioinformatické analýzy, doktorand výborně zvládl realizovat s využitím adekvátních bioinformatických programů.

Z praktického šlechtitelského hlediska autor práce identifikoval 46 rezistentních genotypů – potenciálních donorů z celkového počtu 245 hodnocených genotypů. Sekvenací transkriptomu identifikoval 256 397 SNP, které následně hodnotil asociační analýzou. 86 SNP lokalizoval na 6 chromozómech. Na počátku asociační analýzy identifikoval více než 50 tisíc genů, jejich exprese byla závislá na genotypu. Na základě anotační analýzy vybral 82 kandidátních genů, které mohou zajišťovat odolnost proti nádorovitosti košťálovin. Výše uvedený rozsah hodnocené variability včetně navržení kandidátních rezistentních genů svědčí o tom, že doktorand výborně zvládl i tuto nejnáročnější část práce.

Z formálního hlediska je práce jasným a srozumitelným jazykem. V práci je podáno velké množství informací. Přesto je práce dobře čtivá a jako oponent jsem se v ní velice dobře orientoval. K dobré orientaci v práci dle mého názoru přispívá již zmíněná schopnost



doktoranda systematicky členit získané výsledky do přehledných tabulek (statistická hodnocení) či názorných grafů. Výborné odborné i jazykové schopnosti formulovat možné mechanismy rezistence doktorand prokázal zejména v kapitole Diskuse, kde jasně popsal, jakým způsobem by se mohly kandidátní geny zapojit do mechanismů odolnosti. Z formálního hlediska mám několik drobných připomínek, které zcela jistě nesnižují výbornou úroveň práce. První připomínka se týká názvu doktorské disertační práce. Osobně bych název doplnil o botanický druh (*B. napus*), u kterého byly analýzy prováděny. V práci je používáno velké množství zkratk, které jsou náležitě vysvětleny obvykle formou anglických slov, které zkratce daly vzniknout. Doporučil bych doplnit práci o seznam zkratk včetně jejich českého vysvětlení. V textové i tabulkové části práce je velké množství anglických názvů genů a jejich proteinových produktů. Tento způsob jazykového zpracování plně chápu, nenarušuje dle mého názoru práci. Práce je však psaná v českém jazyce a tudíž i tyto textové části by měly být správně psány česky na základě aktuálního chemického názvosloví.

V rámci vědecké rozpravy mám na pana Mgr. Ing. Ondřeje Hejnu následující dotazy:

1. Z charakteristiky biologického materiálu vyplývá, že všechny hodnocené materiály byly dihaploidní linie. Byla provedena molekulárně genetická kontrola jejich homozygotnosti a genetické uniformity. Jaké metody by se daly pro tuto analýzu použít?
2. V metodické části práce uvádíte, že od každého genotypu byly získány 4 semenáčky, které byly určeny pro izolaci RNA. Jednotlivé semenáčky byly analyzovány včetně sekvenace transkriptomu individuálně? Nebo byl připraven směsný vzorek?
3. Transkriptomická analýza byla provedena z RNA pocházející z rostlin, které nebyly vystaveny infekčnímu tlaku. Je možné, že infekční test mohl ovlivnit strukturu transkriptomu? Je možné, že kontakt kořenového systému rostliny s patogenem mohl indukovat expresi dalších genů?



4. V práci jste získal velice důležité originální informace o možných kandidátních genech zodpovědných za rezistenci rostlin vůči nádorovitosti. Můžete se prosím pokusit nastínit další analýzy, které povedou k identifikaci konkrétních rezistentních alel těchto genů a k vývoji markerů aplikovatelných při MAS.

Závěrečné hodnocení

Z předchozích částí mého oponentského posudku vyplývá, že doktorskou disertační práci pana Mgr. Ing. Ondřeje Hejny hodnotím po všech stránkách výborně. Cíle práce, které si doktorand vytýčil, byly velice náročné, ale přesto beze zbytku splněné. Touto prací doktorand podává jasný důkaz o tom, že během svého doktorského studia získal nejen výborný teoretický přehled o problematice aplikované molekulární genetiky, ale zejména celou řadu praktických dovedností a zkušeností. Autor práce jednoznačně prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce. Předpokládám, že výborně zpracované originální výsledky s praktickým aplikačním potenciálem dokázal doktorand úspěšně publikovat

Bez výhrad proto **doporučuji**, aby práce byla přijata k obhajobě, a na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělit panu Mgr. Ing. Ondřeji Hejnovi akademicko-vědecký titul doktor (Ph.D.).

Praha, 11. listopadu 2019

doc. Dr. Ing. Pavel Vejli

FAPPZ ČZU v Praze