

Oponentský posudek
na dizertační práci Ing. Jany Žaludové
„The structure and the function of the S-locus in oilseed rape (*Brassica napus* L.)“

Oponentka: Prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc.,

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství AF MZLU v Brně

Obecná charakteristika práce: Dizertační práce Ing. Jany Žaludové se zabývá aktuálním tématem, neboť studium a poznání genů a markerů autoinkompatibility řepky je důležitým stavebním prvkem při tvorbě hybridních odrůd, zabezpečující genetickou zábranu samosprašení. Práce je psána, dle mého názoru, dobrým stylem, srozumitelně a čtivou angličtinou. Zvolené téma je velmi náročné a ač již bylo v této oblasti mnoho poznatků učiněno, jak je zřejmé z literárního přehledu, je stále v této oblasti nezbytný další výzkum. Řepka je dnes významnou plodinou a výhodnou komoditou v EU i v ČR. V ČR zaznamenala v posledních letech prudký nárůst ploch a stala se výhodnou předplodinou pro obilniny zejména pro ječmen, po redukci ploch cukrovky. Jedná se současně o plodinu, která má stále více přinášet benefit v podobě ekologické energie. Je potěšitelné a významné, že autorka spolupracovala s významnými šlechtitelskými pracovišti – VÚO v Opavě, Šlechtitelskou stanicí ve Slapech a VÚRV v Praze, ve kterých pracují úspěšní autoři liniových odrůd řepky (v roce 2006 odrůda *Oponent* a nyní další dvě registrované odrůdy). Aplikovala své znalosti a náročné experimentální techniky na studium S-locusu na konkrétních liniových, šlechtitelských materiálech z těchto pracovišť a využila kromě také široký soubor již registrovaných odrůd (15).

Práce má obvyklou strukturu dizertačních prací a obsahuje 76 stran. **Literární přehled** je věnován aplikaci molekulárních markerů ve šlechtění *Brassica napus* L. a autoinkompatibilitě (AI) tohoto druhu. Většina uváděných poznatků je z oblasti studia lokusu-S u druhů *Brassica napus* či příbuzných druhů rodu *Brassicaceae*, dále se zabývá genetickou mapou genomu, kandidátními geny, genetickou diverzitou a možnostmi využití molekulárních technik např. při registraci kultivarů, kde je nutné potvrzení odrůdové pravosti, rovněž jsou zde uvedeny poznatky o možném využití molekulárních technik při zvyšování odolnosti vůči chorobám i změně kvality. V literárním přehledu je čerpáno z více jak 180 původních vědeckých prací, publikovaných většinou v renomovaných, vysoce impaktovaných časopisech, z nichž pouze 6 prací bylo publikováno před rokem 1989. Takže lze říci, že autorka využila aktuální literární zdroje na současné úrovni světového poznání. Z nich sestavený **seznam použité literatury** je velmi pečlivě vyhotoven.

Dále je práce členěna na **šest tématických studií**, z nichž čtyři, rozvedené v kapitolách 5 – 8 jsou původní, s originálními výsledky. Podkapitoly v nich odpovídajícími členění původních vědeckých prací.

Cíle práce byly jednoznačně formulovány: od nalezení specifického molekulárního markeru pro recesivní typ AI, vyskytující se u řepky, porovnání markeru *SLG* s markerovým genem *SCR* po porovnání fenotypu s genotypem dihaploidních rostlin s AI vlastnostmi.

Výsledky práce jsou uvedeny celkem na 23 stranách, rozčleněných v příslušných tématických studiích. Jsou vhodně dokumentovány grafy, tabulkami, přehledy sekvencí, dendrogramy aj. Z výsledků je patrné, že se jednalo o velmi náročné genetické studie, vyžadující odbornou připravenost doktorandky a její velké pracovní úsilí. Výsledky jsou řádným způsobem diskutovány s citovanými autory, **diskuze** je věcná a dobře vedena. I v této oblasti je vidět schopnost samostatné tvůrčí práce doktorandky.

Dosažené výsledky jsou **shrnuty** podle vyčleněných okruhů studií přehledně, jak v anglickém, tak i českém jazyce.

Některé drobné překlepy nesnižují nikterak odbornou úroveň práce, uvádím jejich příklady na zvláštním listu.

Při obhajobě bych požádala doktorandku o zodpovězení následujících otázek, které mají spíše diskuzní charakter:

Autorkou nalezený allelově specifický marker pro recesivní typ autoinkompatibility je přínosem této práce, autorka však uvádí jeho využití pouze u linií odvozených z linie Tandem 6/85. Jakou možnost vidí autorka dizertace pro frekventovanější a prakticky účelné využívání markeru tohoto typu (či jiného typu) ve šlechtitelské praxi?

Jak autorka dizertace může vysvětlit nalezení obou genů *SLG* a *SCR* ve stejném genotypu řepky, přestože je u ní předpokládán recesivní typ autoinkompatibility? Autorka uvádí, že oba použité molekulární markery nevyselektují stoprocentně AI rostliny, jakou další cestu ke 100 % selekci by autorka dizertace v tomto směru mohla nastínit?

Zajímavé je zjištění o zúžení genetického základu šlechtitelského materiálu dlouho vedenou selekcí. Považuje autorka tento jev ze svého, či šlechtitelského pohledu za pozitivní nebo negativní?

Závěrečné hodnocení:

Práce přináší několik významných výsledků, ať již v oblasti vývoje specifických molekulárních markerů AI, markerů asistované selekce (MASS), genetické deteminace AI a rozdílné distribuce S-allel u komerčních odrůd a linií. Jeví se mi velmi účelné spojení teoretických poznatků v této práci získaných, s vyústěním v praktické aplikace moderních molekulárních technik ve šlechtění odrůd řepky (*Brassica napus* L.). Autorka navázala během svého dizertačního výzkumu spolupráci se šlechtiteli řepky a významnými vědeckými pracovišti, což velice kladně hodnotím. Práce řeší možnosti jak její poznatky uplatnit při využívání metod MASS při šlechtění odrůd řepky. Je skutečností, že dosud jsou metody MASS pro šlechtitelská pracoviště ekonomickou zátěží (vybavení laboratorní technikou i odbornými silami). Důkladným poznáním genetického pozadí materiálů a nalezení vhodných molekulárních markerů by mohlo metody šlechtění zefektivnit díky spolupráci s vědeckými institucemi. Předložená práce je v tomto směru přínosem.

Doktorandka samostatně a vhodnými a náročnými metodami molekulárních technik řešila zadané cíle, čímž prokázala schopnost samostatně a erudovaně tvůrčím způsobem pracovat. Po prostudování dizertace mohu konstatovat, že její **cíle byly splněny**. Autorka dizertace publikovala svoje výsledky jako vědeckou práci, uvedla je v monografii připravené k tisku a v odborném časopise. S výsledky byla vědecká veřejnost seznámena na národních i mezinárodních konferencích, které byly rovněž publikovány v 10 sbornících.

Práci **doporučuji jednoznačně k obhajobě** a po úspěšné obhajobě udělit Ing. Janě Žaludové akademicko-vědecký titul Ph.D.

V Brně dne 21. května 2007


Prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergrová, CSc.

Technické poznámky:

Kap. 13 Shrnutí:

Ř. 7. ř. cíli, ne cíly

Ř. 17 ke, ne s ke

Ř. 18 autoinkompatibility, ne autoinkoímpability

Ř. 24 dvěma, ne dvoum

V obsahu práce chybí uvedení subkapitoly Results na str.48

Oponentský posudek na disertační práci doktorského studijního programu
na téma

The structure and function of the S-locus in oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Školitel: doc. Ing. Vladislav Čurn, PhD.

Oponent: doc. Ing. Miroslav Bechyně, DrSc.

Předložená doktorská práce řeší významný problém, jehož zejména druhá část, tj. funkce S lokusu v řepce olejné může podstatně přispět k dosud málo výrazným výsledkům ve šlechtění hybridní odrůdy řepky využitím a autoinkompatibility. Domnívám se, že právě nedostatečné genetické podklady jsou jednou z hlavních příčin proč tomu tak v ČR i celosvětovém měřítku je. Přesto, že se tento úkol řeší již po mnoho let a to i v úvodu zmíněné Asociaci Česká řepka, počet hybridních kultivarů řepky vyšlechtěných na bázi sterility je čtenější.

Právě proto považuji výběr tématu této práce za šťastný a prospěšný jak z hlediska základního výzkumu, tak pro praktické metody šlechtění. Dosažené výsledky mohou podnítit zaměření českého šlechtění řepky k ještě náročnějším úkolům v oblasti genetického inženýrství. A tak je záhodno přát si, spolu s doktorandkou, aby aplikace znalostí z molekulárních analýz v praktickém šlechtění pomohla v uskutečňování dalších prospěšných myšlenkách.

Jak uvádí autorka v úvodní části práce, je jistě závažné, že je další vývoj moderních šlechtitelských metod u nás ovlivněn nedostatkem finančních prostředků. Bylo by však vhodné zjistit jak dalece byly poskytnuté finance využity právě pro moderní šlechtitelské metody, zda by nepomohla ještě užší zahraniční spolupráce s nejvyspělejšími institucemi a univerzitami.

I když je dostatek finančních prostředků jedním ze zásadních předpokladů pro úspěšný výzkum, je přesto poněkud překvapivé tvrzení, že hlavním cílem šlechtění je redukovat výdaje, i když je patrně zaměřeno na aktivity zmíněné asociace.

Po formální stránce je práce členěna poněkud jinak než je např. doporučená struktura MŠMT v doktorských studijních programech. Proti tomuto členění nelze v zásadě nic namítat, je přijatelné. V tomto případě, kdy je vlastní pracovní část práce uvedena ve formě publikovaných prací by bylo vhodné uvést zda byly jednotlivé části vypracovány jenom autorkou samotnou nebo ve spolupráci s dalšími spoluautory. V druhém případě by bylo vhodné uvést vlastní podíl na získaných výsledcích. Zmínka, že je práce rozdělena do šesti studií, z nichž čtyři jsou původní vyžaduje podrobnější vysvětlení.

Velmi obsáhlý seznam prostudovaných literárních pramenů svědčí o nesmírné péči a dokonalé přípravě autorky na řešení stanovených cílů. Jistě jí velmi pomohly v experimentální práci i ve formulování promyšlených závěrů v jednotlivých studiích. Rád bych však věděl proč jsou až na jediný případ opomenuti čeští autoři, včetně předcházejících prací souvisejících s řešenými problémy. V obecném přehledu pak postrádám zásadní práce týkající se šlechtění řepky např. v Kanadě, Švédsku, Polsku i v ČR. Uvedené prameny dělají dojem, že byly příliš náhodně zvoleny.

Velmi nerad, i když se jedná o čistě formální záležitost, připomínám tak zbytečné množství i hrubých gramatických chyb v českém shrnutí, ve srovnání s anglickou částí. Je uvedeno pouze na jedné a čtvrtině stránky, což nemůže podle mého názoru plně vystihnout problematiku a dosažené výsledky práce. Ve srovnání s anglickými závěry je tato česká část chudší (i když se i v anglické verzi objevují čistě české výrazy - např. na straně 23). Dělá to dojem, že byla uskutečněna v dost velkém chvatu při ukončování práce. Je to škoda, protože se tak poněkud snižuje pohled na precizní zpracování celé práce.

V kapitole „Aplikace molekulárních markerů ve šlechtění řepky“ se některé části zabývají spíše výsledky tradičního šlechtění (délka šešulí, barva osemení aj.). Nabízí se tu otázka proč byly právě tyto znaky a vlastnosti vybrány. Je jich zde totiž charakterizováno méně než v účelné přehledné tabulce č.1. Pouze kolonka týkající se autoinkompatibility zde zůstává nevyplněná. Plně to však vyvažuje kapitola 4, v níž je o tomto problému dostatečný přehled. Používání názvu *Brassica campestris* a *Brassica rapa* by mělo být sjednoceno. Může to navodit dojem, že se jedná o různé druhy.

Ve vlastní práci došlo tím, že byla rozdělena do šesti studií, ke zbytečnému opakování úplně stejných nebo podobných vět v úvodních částech i v popisech metod práce. Také konstatování, že *Brassica rapa* je na rozdíl od *Brassica napus* autoinkompatibilní, nemusí být úplně přesné. Subspecie *Yellow Sarson* nebo *Toria* tomu plně neodpovídají.

Ve svých výsledcích přináší předložená práce velmi cenné a originální poznatky. Za velmi významné pokládám zjištění, že nebyly nalezeny dvě alaly genu SCR bez ohledu nato, že např. molekulární marker autoinkompatibility se úzce vztahuje jen k použitému materiálu nebo byl marker determinující autoinkompatibilitu pouze u kultivaru *Tandem*. Je také přirozené, že u některých kultivarů nelze vyloučit odlišné změny.

Dosti překvapivé však je zjištění že „genotyp“ neodpovídá teoretickému štěpnému poměru dihaploidů odvozených z F1 generace po křížení autoinkompatibilní linie s autoinkompatibilním donorem kvality (1:1 a 1:3). Lze, jak je v práci uvedeno předpokládat, že existuje nějaký další supresorový lokus, který ovlivňuje autoinkompatibilní reakci. Někdy a to i velmi složitých případech (a to se nemusí vztahovat k uvedenému předpokladu) může být jednodušší vysvětlení. V tomto případě se nabízí otázka realizace tzv. semenných testů (seed tests). Už samotné označení se mi nezdá dost příhodné. Jednalo se vlastně o odpočet semen v šešulích izolovaných rostlin. Podle uvedené metodiky spočívala příprava těchto testů v izolování patrně celých rostlin sáčky. Naneštěstí bez uvedení izolačního materiálu.

V našich pokusech, ovšem jiného zaměření, (např. vlivu opálení květů řepky včelami na nasazení semen v šešuli) jsme zjistili velmi podstatné rozdíly při izolaci různými

prostředky při izolaci celých rostlinného jednotlivých květů vlivem mikroklimatických podmínek v izolátorech ve srovnání s prostorovou izolací. Není i zde možné určité ovlivnění počtu semen a tím i odpovídajících zvolených poměrů 1,0:4,6 (6,4 ?) a dalších?

Ve všech uvedených experimentálních částech lze vidět precizní vědecké přístupy v nichž o to více vynikají nové, objevné rysy. V deváté kapitole porovnává autorka předpokládané cíle práce s dosaženými výsledky ve čtyřech proponovaných bodech. Toto porovnání záměrů a výsledků je bezpečným dokladem toho, že cíle byly odpovědně splněny. Svědčí o tom i fakta v desáté kapitole závěru.

Pro doplnění celkového dobrého dojmu z vykonané si dovoluji připojit několik dotazů.

Jaké jsou současné poznatky v této oblasti práce ve srovnání s předloženými výsledky, zvláště pak s ohledem na příspěvky na nedávné světové konferenci o řepce v Číně.

Jaký je váš názor na tvrzení, že ozimá a jarní řepka jsou ve stejném druhu dvě geneticky odlišné skupiny.

Jak dalece by k rozšíření úzké genetické báze v současném šlechtitelském materiálu prospělo prostudování starých a původních odrůd, třeba Slapské a Třebíčské, moderními metodami?

Dá se podrobněji vyjádřit požadavek ve třetím bodě cílů práce o účinnosti a prospěch selekce využitím molekulárních markerů a to z hlediska praktického šlechtění a jeho dalšího vývoje?

Závěr: Předložená práce splňuje požadavky kladené na tento druh vědecké práce. Je vhodným a účelným pokračováním výzkumných aktivit spojených s hybridním šlechtěním řepky pomocí autoinkompatibility. Vhodně navazuje na získané poznatky rozvíjí je. Je proto významná z hlediska základního výzkumu a prospěšná i pro praktické šlechtění řepky.

Doktorandka zde jasně prokázala schopnost samostatné experimentální práce, vědeckého myšlení a uvažování.

Proto tuto doktorskou disertační práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělit Ing. Janě Žaludové titul doktor (PhD.).

V Praze, 7.5.2007


M. Bechyně



Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Název práce: **The structure and the function of the S-locus in oilseed rape (*Brassica napus* L.)**

Autor: **Ing. Jana Žaludová**
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Agronomická fakulta

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

Posuzovaná disertační práce představuje již při zběžném pohledu velice kvalitní odbornou práci věnovanou aplikované molekulární genetice rostlin. Po formální stránce je práce vhodně logicky členěna do kapitol, které postihují jak obecnou problematiku aplikované molekulární genetiky, tak i specializovanou problematiku genetické determinace autoinkompatibility u čeledi *Brassicaceae*. Práce je zpracována v anglickém jazyce. Vlastní doktorská disertační práce je rozdělena do pěti základní části: úvodní obecná literární rešerše, cíle práce, čtyři kapitoly popisující odděleně jednotlivé experimenty, shrnutí výsledků a závěry. Toto nepřiliš standardní rozčlenění práce v sobě odráží logický postup, který doktorandka použila. Každá ze 4 kapitol věnovaných experimentální činnosti v sobě zahrnuje souhrny výsledků, další detailní literární přehledy, použité metodiky, získané výsledky a jejich diskuse. Všechny kapitoly předkládané disertační práce jsou velice pečlivě a kvalitně zpracovány. Domnívám se, že tato netradiční forma zpracování práce nikterak nesnižuje její celkovou výbornou úroveň. Mohu konstatovat, že jednotlivé kapitoly věnované prováděným experimentům jsou logicky seřazeny od optimalizace a nalezení DNA markerů genů zodpovědných za autoinkompatibilitu řepky, testování jejich specifčnosti až po hodnocení jejich segregace v populacích dihaploidních linií.

Disertační práce má rozsah 76 textových stran. Práce je doplněna 12 obrázky, na kterých jsou dokumentovány vzorové elektroforeogramy a kladogramy. Autorce disertační práce bych doporučil sjednotit číslování obrázků. Domnívám se, že i při zvoleném způsobu členění, musí disertační práce působit jako jednotný celek a není vhodné aby například označení „Fig. 1.“ bylo použito u 4 různých obrázků.

AKTUÁLNOST ZVOLENÉHO TÉMATU

Aktuálnost zvoleného tématu jasně vyplývá ze zvolených cílů vlastní doktorandské práce. Hlavní cíle práce jsou zcela jasné a konkrétní. Jedná se o zpracování molekulární studie struktury a funkce S-locusu u řepky. Hlavní výzkumné cíle doktorské disertační práce se zaměřují na vývoj molekulárních markerů recesivního typu autoinkompatibility řepky olejky, porovnání nových markerů s publikovanými markery *SLG* genu, aplikaci markerů při selekčních postupech vedoucích



k vyšlechtění nových odrůd a hodnocení polymorfismů alel *SLG* genu u různých šlechtitelských materiálů. Již z výčtu základních cílů práce jasně vyplývá, že doktorandka si zvolila velice aktuální téma, které v sobě nese prvky základního i aplikovaného výzkumu.

ZPRACOVÁNÍ LITERÁRNÍHO PŘEHLEDU

Úroveň zpracování literárního přehledu svědčí velice dobrém přehledu doktorandky nejen v oblastech molekulární genetiky, mechanismů opylování a šlechtění u čeledi *Brassicaceae*. V disertační práci je tomuto literárnímu úvodu věnováno 19 textových stran v obecné části. Do literárního přehledu je rovněž zapotřebí zahrnout části všech podrobných kapitol, ve kterých doktorandka podává velice podrobné informace těsně se vztahující k prováděným experimentům. Tato další část literárního přehledu má rozsah 7 stran.

Literární úvod mohu označit ze velice kvalitně zpracovaný, využívající výhradně aktuální vědecké publikace z oblasti molekulární genetiky a šlechtění rostlin. Toto kladné hodnocení se opírá o skutečnost, že doktorandka v disertační práci cituje celkem 199 literárních pramenů, které jsou z naprosté většiny velice aktuální. Jedné se téměř o výhradní citace původních zahraničních prací, které byly publikovány ve významných recenzovaných časopisech zaměřených na obecnou i aplikovanou molekulární genetiku. Doktorandka cituje pouze jednu práci uvedenou v českém vědeckém časopise. Při porovnání počtu stránek literárního přehledu a počtu citovaných autorů je patrné, že tato část práce je naplněna velkým množstvím zejména těch nejaktuálnějších informací věnovaných problematice molekulární charakteristiky genomu řepky, aplikace markerů a zejména mechanismu autoinkompatibility. Pozitivně oceňuji, že autorka disertační práce se zbytečně nezabývá obecnými a všeobecně známými informacemi. Na druhou stranu však musím upozornit na to, že takto podané vysoká koncentrace informací klade značné nároky na pozornost čtenáře a současné porovnávání informací v jednotlivých dílčích kapitolách se může stát částečně nepřehledným.

Přestože literární přehled považuji ze velice zdařilý a nasvědčující širokému odbornému přehledu autora, mám na doktorandku dva odborné dotazy vyplývající z posuzování této kapitoly:

1. Na straně 13 je popsáno hodnocení polymorfismu *fad2* genu pomocí metody jednonukleotidového polymorfismu (SNP). Jakým způsobem je SNP detekován a vyhodnocován? Jaký je Váš názor na využití metody SNP v praktickém šlechtění rostlin a jaká je jeho finanční náročnost?
2. Na straně 20 je citována informace o retroelementech, která byly detekovány v genomu *Brassica napus*. Jaké typy transponovatelných elementů jsou charakteristické pro rostlinný genom a jaký mají původ? Může přítomnost retroelementů ovlivnit využití genetických markerů založených na polymorfismu DNA?

STANOVENÉ CÍLE A JEJICH REALIZACE

V úvodu disertační práce si doktorandka vytýčila 4 základní cíle, které spojuje problematika studia genetických mechanismů autoinkompatibility u řepky olejky. Cíle práce považuji za dobře zvolené. Odrážejí v sobě všechny nezbytné kroky genetické analýzy, které musí být bezchybně splněny pro získání reprodukovatelných výsledků. Doktorandka si tudíž správně



zvolila cíle zaměřené nejprve na rozšíření spektra markerů *SCR* genů, porovnání výsledků analýzy při použití nových a dosud publikovaných markerů a studium polymorfismu *SLG* genu. Jeden z cílů doktorské disertační práce má praktické vyústění. Je zaměřený na aplikaci markerů genů řídicích autoinkompatibilitu řepky olejky v procesu "Marker Assisted Selection".

Mohu konstatovat, že doktorandka splnila všechny vytýčené cíle. Tomuto hodnocení plně nasvědčuje ta skutečnost, že doktorandka navrhla nový specifický marker recesivního typu autoinkompatibility včetně detekce jeho alely metodou PCR. Autorka práce rovněž úspěšně provedla porovnání tohoto nového markeru s již známým markerovaným genem *SLG* pro třídu I S-haplotypů. Studie variability sekvencí *SLG* genu třídy I a II byla rovněž úspěšně provedena včetně náležitého statistického vyhodnocení.

POUŽITÉ METODICKÉ POSTUPY

Metodice prováděných experimentů a charakteristice hodnoceného biologického materiálu je v práci věnováno 5 textových stran. Metodika experimentů je popsána jednotlivě u každé podrobné kapitoly. Přestože je metodika velice stručná, podává dostatečný přehled o způsobu provádění experimentů. Doktorandka vždy stručně charakterizuje hodnocený rostlinný materiál, metody izolace DNA a RNA, podmínky PCR amplifikace a tvorby cDNA a způsob klonování fragmentů. Ze stručné metodiky je patrné, že byly zcela vhodně zvoleny metody využívající komerčně vyráběné kity, která zaručují vysokou stabilitu reakčních podmínek a tím i vysokou reprodukovatelnost výsledků. Kity byly použity pro izolaci nukleových kyselin, pro tvorbu cDNA, klonování i sekvenování.

Veškeré metodické postupy jsou popsány jasně a srozumitelně s cílem maximální reprodukovatelnosti experimentů. Domnívám se, že uvedená metodika představuje výsledky celé řady optimalizačních experimentů. Z těchto důvodů hodnotím optimalizované metodické postupy jako významnou součást výsledků doktorské práce.

V rámci obhajoby disertační práce mám na doktorandku několik dotazů a drobných připomínek týkajících se této problematiky:

1. Na straně 28 jsou vedeny rodičovské kombinace, u kterých byla hodnocen F_2 generace. Celkový počet rostlin populace je 118. Jak tato populace vznikla? Jedinci tvořící tuto populaci jsou odvozeni z různých rodičovských kombinací?
2. Na straně 36 jsou shodné rodičovské kombinace uvedeny u populace dihaploidů, která měla rovněž četnost 118 jedinců. Jedná se o stejné nebo rozdílné populace?
3. U podmínek amplifikace, které jsou uvedeny na stranách 27, 36 a 42 doporučuji uvést typ termocykleru. Jaký je Váš názor na možnosti kontaminace laboratoře DNA nebo PCR produkty jako na zkreslující faktor prováděných analýz?
4. Pro první 3 experimenty byla použita rostlinná DNA izolovaná z mladých listů rostlin starých 2 týdny. U posledního experimentu byla DNA izolována z děloh. Jaký je Váš názor na vliv stáří a typu materiálu určeného pro izolaci DNA na výsledek PCR analýz?
5. Doporučuji u všech prováděných PCR amplifikací jednotně uvádět sekvence použitých primerů.



6. Rovněž u podmínek elektroforetické separace markerů uvedených u jednotlivých dílčích kapitol doporučuji rozšířit informace o složení a koncentraci gelů, popřípadě o barvení polyakrylamidových gelů. Rovněž u vzorových elektroforeogramů doporučuji doplnit typ použitého hmotnostního standardu včetně velikostí jeho fragmentů.
7. Z výsledků práce je zřejmé statistické hodnocení podobnosti sekvencí DNA. V metodice práce doporučuji rozšířit informaci o programu Bioedit, který byl použit. Na jakém principu pracoval? Jaké znáte další typy výpočtů shlukových analýz, které se používají pro konstrukci fylogenetických stromů?

VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE A JEJICH DISKUSE

Při hodnocení předcházející části disertační práce zaměřené na metodiku jsem se zmínil o tom, že vypracování spolehlivých metodických postupů pro aplikaci PCR, PCR-RFLP markerů, získání cDNA, její klonování a sekvenování považuji ze nedílnou součást výsledků disertační práce. Vlastním výsledkům a jejich diskusi je v práci věnováno přibližně 20 textových stran. Výsledky a diskuse jsou součástí každé dílčí kapitoly věnované jednotlivým experimentům.

Kapitoly zaměřené na prezentaci výsledků a na jejich diskusi považuji spolu s literárním přehledem za nejzdařilejší části práce. Jasně z nich vyplývá velká šíře experimentů a nezbytná odborná erudovanost doktorandky, které byly zcela nezbytné pro toto velice kvalitní zpracování. V první speciální kapitole autorka práce hodnotí nalezení nového PCR markeru pro recesivní typ autoinkompatibility. Segregační analýza provedená u tohoto markeru odpovídala přesně teoreticky očekávanému štěpnému poměru. Pozitivně hodnotím rovněž to, že doktorandka si při hodnocení a diskusi tohoto výsledku velice dobře uvědomila, že tento alelický specifický marker správně funguje pouze u materiálů, které byly odvozeny od jedné konkrétní linie Tandem 6/85. Z diskuse vyplývá, že doktorandka si je dobře vědoma určitých omezení při aplikaci tohoto markeru ve šlechtitelském procesu. Při řešení dalších úkolů disertační práce byly zjištěny výsledky, které se neshodovaly s očekávaným teoretickým štěpným poměrem. Autorka velice dobře dokázala vysvětlit příčiny těchto disproporcí. Vyslovila hypotézu o existenci dalšího supresorového lokusu, který ovlivňuje autoinkompatibilní reakci u řepky olejky. Přesto je z výsledků práce patrné, že byla navržena metodika, která umožňuje výrazně snížit procento autokompatibilních rostlin v populaci. Velice pozitivně hodnotím rovněž výsledky poslední experimentální části práce, ve které doktorandka podala velice přesvědčivý důkaz o tom, jak dokáže vlastní data – sekvence nukleotidů porovnat s informacemi mezinárodních nukleotidových databází. Doktorandky bych se rád zeptal na následující problematiku:

1. Na straně 26 je uvedeno, že v genomu *Brassica oleracea* je gen S^{15} -*SP11* duplikován. Duplikace této alely je popsána i v další části práce. Jak si vysvětlujete mechanismus vzniku těchto duplikací? Je známý vliv bodových mutací na funkci S alel u čeledi *Brassicaceae*?
2. Na obrázku uvedeném na straně 29 jsou popsány 2 fragmenty o velikosti 1000 bp a 450 bp. Z obrázku je však velice dobře patrný větší počet fragmentů, které jsou rovněž velice dobře patrné i v profilu *Brassica rapa* var. *rapifera*. Jak si vysvětlujete jejich přítomnost? Může se jednat o pseudogeny nebo sekvenční homology studovaných genů?



VÝZNAM VÝSLEDKŮ PREZENTOVANÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI PRO DALŠÍ ROZVOJ VĚDY

Zpracovaná disertační práce představuje vyřešení velice kompaktní, ucelené problematiky počínaje izolací DNA, výběru vhodných typů markerů, nalezení nových markerů, odvození cDNA, sekvenace PCR produktů a jejich restriční analýzy. Mohu jednoznačně konstatovat, že při řešení práce byly použity moderní trendové postupy, které umožnily získat množství vysoce originálních výsledků. Velký význam všech získaných výsledků jsem již pozitivně hodnotil v předcházejících částech mého posudku. Při celkovém hodnocení doktorské disertační práce mohu konstatovat, že všechny vytýčené cíle byly velice úspěšně splněny.

O splnění výsledků svědčí rovněž poslední kapitoly práce zaměřené na shrnutí výsledků. Z tohoto přehledu vyplývá, že byla získána řada cenných výsledků, které se nacházejí na rozhraní základního a aplikovaného genetického výzkumu. Vzhledem k originalitě doporučuji autorce disertační práce tyto výsledky publikovat ve vědeckém tisku. Domnívám se, že struktura předložené disertační práce, která je rozčleněna na 4 samostatná témata, může odpovídat 4 kvalitním vědeckým publikacím. Předpokládám také, že doktorandka, které profesně působí jako vysokoškolský učitel, úspěšně využije získané teoretické znalosti i praktické zkušenosti v procesu výuky například formou modelových úloh pro odborné předměty nebo v podobě moderní studijní literatury zaměřené na molekulární genetiku a šlechtění rostlin.

V závěrečné části práce bych doktorandce dále doporučil uvést vlastní doporučení, které se bude týkat aplikace získaných kvalitních výsledků ve šlechtitelském procesu a v dalším genetickém výzkumu řepky olejky. V rámci vědecké rozpravy, která je součástí obhajoby doktorské práce, bych se doktorandky velice rád zeptal na následující problematiku, která se dotýká právě tohoto posledního doporučení:

1. Již v literárním úvodu Vaší práce se zmiňujete o aplikaci DNA markerů při selekci (Marker Assisted Selection). Pokuste se na základě Vašich odborných znalostí navrhnout konkrétní uplatnění DNA markerů při šlechtění českých odrůd řepky olejky.
2. Existují významné vlastnosti řepky olejky, na které je selekce prováděná standardním způsobem velice obtížná a kde by aplikace markerů mohla výrazně zefektivnit proces tvorby nové odrůdy? Jaké je konkrétní praktické uplatnění genetických markerů ve šlechtění českých odrůd řepky olejky?

Z formálního a grafického hlediska je práce zpracována velice přehledně. Oceňuji rovněž výbornou znalost anglického jazyka doktorandky. Z formálního hlediska doporučuji odstranit některé drobné nedostatky jako je například *courent* na straně 5, *conluded* na straně 11, *bebore* na straně 18, *nor* na straně 19, *usinginterspecific* na straně 22, *napusis* na straně 22, *situacion* na straně 22, *a* na straně 27, *recantly* na straně 40, *te* na straně 43, *s ke* na straně 75 nebo *autoinkoimpatibility* na straně 75. Autorce práce rovněž doporučuji ujednotit psaní latinských názvů botanických druhů a rodů písmem typu kurzíva. Stejně tak výraz *et al.* je obvykle psán shodným typem písma.



ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

KATEDRA GENETIKY A ŠLECHTĚNÍ

Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, tel.: +420 224384571, fax: +420 234381801; e-mail: vej1@af.czu.cz

ZÁVĚREČNÉ HODNOCENÍ

Z předchozích částí mého oponentského posudku vyplývá, že doktorskou disertační práci paní Ing. Jany Žaludové hodnotím po všech stránkách velice kladně. Cíle práce, které si doktorandka vytkla, byly velice náročné, ale přesto beze zbytku splněné. Pozitivně hodnotím to, že Ing. Jana Žaludová dokázala v průběhu doktorského studia realizovat poměrně náročné analýzy, pro které bylo zcela nezbytné zvládnout řadu náročných technik molekulární genetiky.

Touto prací doktorandka podává jednoznačný důkaz o tom, že během svého doktorského studia získala nejen výborný teoretický přehled o problematice aplikované molekulární genetiky, ale zejména celou řadu praktických dovedností a zkušeností, které jsou zcela nezbytné pro úspěšnou realizaci všech náročných experimentů. Připomínky a dotazy, které jsou v tomto posudku uvedeny, nikterak nesnižují výbornou úroveň doktorské disertační práce a slouží pouze jako podklad pro rozvinutí vědecké rozpravy, která je součástí obhajoby doktorské disertační práce.

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

Praha, 15. května 2007

Doc. Dr. Ing. Pavel Vej1
FAPPZ ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE,
POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ
Katedra genetiky a šlechtění
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbát ☎