

**Zápis z vědecké rozpravy – obhajoba doktorské disertační práce Ing. Jany Žaludové,
30.5.2007, ZF JU České Budějovice:**

doc. Vejl: Jaká je náročnost SNP techniky a jaké jsou její praktické aplikace?

vychází ze sekvenování, resp. separace je prováděna na sekvenátoru, tím je dána i cena této techniky, je možno využít i modifikace a techniky PCR-RFLP, v případě že mutace zasahuje rozpoznávací sekvenci dané restriktázy, případně techniku SSCP, která rovněž zlevní cenu SNP markerování, aplikace pak jsou v markerování a mapování

doc. Vejl: Jaký je evoluční původ LTR retrotranspozonů?

původ – v retrovirech, retrotranspozony pak mohou ovlivnit i výsledky markerové analýzy

doc. Vlasák: Jaké byly používány primery pro SCR geny, lze předpokládat, že alely byly velmi odlišné.

byly vyzkoušeny univerzální publikované primery, a pak byly odvozeny alelicky specifické primery, které umožnily specifickou amplifikaci jen cílové alely z linie Tandem

doc. Vejl: Za jakým účelem byly využívána technika PCR-RFLP pro odlišení alel SCR genu?

Původní předpoklad byl odlišení SCR alel a nalezení druhé, zatím neznámé funkční alely. Přednostně byla ale z genomické DNA amplifikována jen jedna alela, proto byla technika PCR-RFLP využívána ke štěpení zaklonovaných fragmentů a jejich odlišení pře sekvenováním.

Ing. Kučera: Při křížení AI linií dochází ke ztrátě AI, jak to vysvětlujete?

V literatuře je tento jev popsán, ukazuje se různý projev AI alel v různém genetickém pozadí a při různé kombinaci alel. Je třeba objasnit vzájemný vztah alel, případně supresorů a zde se ukazuje výhoda alelicky specifických markerů.

Ing. Míka: Proč je v Kanadě využívána AI u hybridů jarní řepky?

V Kanadě se převážně šlechtí a pěstuje řepka tytu canola – jarní řepka, proto je i AI využívána při šlechtění hybridů jarní řepky.

Obhajoba disertační práce na téma:

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

autor: Ing. Jana Žaludová

Odpovědi na otázky oponenta

doc. dr. Ing. Pavel Vejl

Otázky k literárnímu přehled

- 1) Jakým způsobem je detekován a vyhodnocován SNP? Jaký je Váš názor na využití metody SNP v praktickém šlechtění rostlin a jaká je jeho finanční náročnost?**

SNP narozdíl od RFLP nemohou být detekovány konvenční gelovou elektroforézou a proto pro jejich detekci byly navrženy nové techniky. Většina protokolů detekce SNP vyžaduje PCR amplifikaci cílové sekvence v kombinaci s fluorescenčně značeným dideoxynukleotidem, který ukončuje reakci v různé vzdálenosti za primerem podle sekvence jednotlivých alel. Většinou se tyto fragmenty stanovují automatickým sekvenátorem. Pro potřeby analýzy většího množství vzorků může být aplikována metoda DNA čipů. Nová a velice výkonná metoda, která se dá aplikovat v detekci SNP je matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

- 2) Jaké typy transponovatelných elementů jsou charakteristické pro rostlinný genom a jaký mají původ? Může přítomnost retroelementů ovlivnit využití genetických markerů založených na polymorfismu DNA?**

V heterochromatinu centroméry je přítomno velmi malé množství genů, ale mnoho druhů repetitivní DNA a předpokládá se, že mnoho z ní bude mobilní. Většinu repetitivní DNA, která je mobilní tvoří LTR-retrotransposony. Je to původně sekvence RNA, která se změnila reverzní transkripcí na DNA a integrovala se do chromozómu. Některé jsou schopny pravidelně tento proces opakovat, protože si kódují vlastní reverzní transkriptázu a vznikly náhodným uzavřením genu pro RT mezi dvě inserční sekvence LTR - (long terminal repeat). Musí také kódovat transponázu.

Pokud by došlo k transpozici kde je určitým molekulárním markerem detekovaný polymorfismus, pak by se mohl změnit výsledný patern a celkové hodnocení by mohlo být ovlivněné.

Otázky k metodice

- 1) Jak vznikla F₂ populace uvedená v rostlinném materiálu v kap. 5? Jsou jedinci tvořící tuto populaci odvozeni z různých rodičovských kombinací?**

Populace vznikla mikrosporovou embryogenezí, následní dihaploidní regeneranti pocházeli ze čtyř křížení a dohromady čítali 118 rostlin. Tato výsledná populace nebyla tedy stejnorodá ve vztahu ke genetickému pozadí, ale rozhodující bylo, že štěpí ve znaku autoinkompatibility. AI linie, které byly použity ke křížení (linie AIK3 a AIK6), byly odvozené ze stejné linie a bylo velmi pravděpodobné, že nesou stejnou alelu.

- 2) Jedná se o stejné nebo rozdílné populace v kap. 5 a 6?**

Jedná se o stejné populace.

3) Jaký je váš názor na možnosti kontaminace laboratoře DNA nebo PCR produkty jako zkreslující faktor prováděných analýz?

Kontaminace je samozřejmě možná. Zvláště je pak třeba dávat pozor na případnou kontaminaci templátovou DNA při pipetování PCR mastermixu. Je vhodné proto používat vodu jako negativní kontrolu.

4) Jaký je Váš názor na vliv stáří a typu materiálu určeného pro izolaci DNA na výsledek PCR analýz?

Pro úspěšný výsledek PCR analýzy je důležité dostatečné množství templátové DNA. Pokud používáme k izolaci DNA komerčně vyráběné kity, obvykle je dosažena optimální koncentrace až 50 µg. Zásadní vliv na výtěžek má počáteční rozdrčení materiálu. Mladé šťavnaté listy, jako například děložní, lze lehce rozdrtit bez potřeby tekutého dusíku. Nevýhodou starších listů u řepky je, že rychle ovadnou a pak drcení bez dusíku málo úspěšné. Další nevýhodou starších listů je, že žloutnou a jsou napadány houbovými chorobami.

5) Na jakém principu pracuje program Bioedit? Jaké znáte další typy výpočtů shlukových analýz, které se používají pro konstrukci fylogenetických stromů?

Program Bioedit je editor pro snadnou úpravu sekvencí a jejich další hodnocení. Kromě editace sekvencí, kdy můžeme také sekvence souběžně sledovat v chromatogramu nám pronabízí srovnání většího počtu sekvencí (multiple sequence alignment) programem ClustalW, on-line připojením srovnat sekvence s databází NCBI, mapování restrikčního štěpení za definovaných podmínek nebo translaci v šesti možných čtecích rámcích. Dále pak obsahuje další doplňující aplikace, které pocházejí z programu Phylip. Pro sestavení fylogenetického stromu byla použita aplikace DNAdist, což je program, který počítá vzdálenostní matici z nukleotidových sekvencí. Sekvence jsou před tím srovnány programem ClustalW. Program počítá vzdálenostní matici podle třech různých modelů nukleotidové substituce (FITCH - Fitch-Margoliash and Least-Squares Distance Methods, KITSCH - Fitch-Margoliash and Least Squares Methods with Evolutionary Clock, NEIGHBOR - Neighbor-Joining and UPGMA methods). V práci byla použit program NEIGHBOR, který metody Neighbor-Joining (Nei a Saitou, 1987) a shluková analýzy UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Pro konstrukci následných stromů se běžně vzdálenostní matice počítá podle Euklidovské vzdálenosti, což jsou vzdálenosti absolutní a pak neilmetrikou, která sestavuje matici z podobnostních koeficientů.

Otázky k výsledkům a diskusi

1) Jak si vysvětlujete mechanismus vzniku těchto duplikací? Je známý vliv bodových mutací na funkci S alel u čeledi Brassicaceae?

Duplikace, které byly v práci nalezeny u genu *SCR* třídy II, byly také zjištěny u genu *SLG* třídy II (Cabrillac et al. 1999) a rovněž u genu *SCR* třídy II z *Brassica oleracea*. Oba dva geny pocházely z *S*₁₅ lokusu. U žádného jiného *S* lokusu tyto duplikace zjištěny nebyly. Převažuje názor, že vznikly genovou konverzí, a to v případě *SLG* genu z genu *SRK* protože tyto dva geny mají velkou sekvenční podobnost. Předpokládá se, že genová konverze nastává mnohem častěji mezi geny stejného *S* haplotypu než mezi alelami stejného genu.

Jednobazová delece zjištěná u genu *SRK* byla nalezená u autokompatibilní *Brassica napus*. Tato mutace způsobila posun čtecího rámce, jehož výsledkem je zkrácený receptor (Goring et al. 1993). Pokud je dodán funkční gen do genomu pomocí transgenózy, je autoinkompatibilita specificky obnovena.

- 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?

Domnívám se, při teplotě annealingu 55°C se jedná o nespecifické fragmenty. S geny jako jsou *SLG*, *SCR* a *SRK* jsou sekvenčně velmi podobné, což je pochopitelné uvážíme-li, že *SRK* a *SCR* působí jako receptor a ligand.

Otázky

- 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.

V současné době se šlechtění řepky zaměřuje na šlechtění hybridních odrůd. Pro co nejvyšší heterózní efekt je proto důležité mít co nejvíce geneticky vzdálené rodičovské komponenty. Proto bych navrhovala uplatnění AFLP a mikrosatelitových markerů, které jsou známé.

- 2) Existují významné vlastnosti řepky olejky, na které je selekce prováděná standardním způsobem velice obtížná a kde by aplikace molekulárních markerů mohla výrazně zefektivnit proces tvorby nové odrůdy? Jaké je konkrétní praktické uplatnění genetických markerů ve šlechtění českých odrůd řepky olejky?

Jsou to všechny vlastnosti, které se stanovují až v pozdním ontogenetickém vývoji (AI) a pozdní selekce vyžaduje prostorově a časově náročné dopěstování i nevhodných genotypů rostlin. Dále pak kvalitativní vlastnosti, které se zjišťují nákladným měřením (obsah glukosinulátů, k. erukové a obsahů MK).

Konkrétně se v praxi uplatňuje markerování autoinkompatibility na Rf restorera cytoplazmatické sterility pomocí isoenzymového (PGI – fosfogluoizomeráza) a RAPD markeru. Dále pak bychom sem mohli zařadit monitoring GMO řepky.

prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová

- 1) Jakou možnost vidí autorka disertace pro frekventovanější a prakticky účelné využívání alelově specifického markeru pro recesivní typ autoinkompatibility (či jiného typu) ve šlechtitelské praxi?

Tento marker je sice specifický pro určitou alelu, což omezuje jeho použití na různé kombinace křížení s AI liniemi, které nesou jinou S alelu. Na druhou stranu může sloužit k odhalení kontaminace jinou S alelou nežádoucím cizosprášením a pomůže tak udržet čistotu linie. Alelově specifické markery tak mohou být nástrojem pro rozlišování jednotlivých linií.

- 2) Jak autorka disertace 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 disertace mohla v tomto směru nastínit?

Gen *SLG* má rovněž třídu II a vyskytuje se běžně s genem *SCR* třídy II na stejném lokuse. Pokud má oponentka myslí gen *SLG* třídy I a gen *SCR* třídy II u některých AK odrůd, tak gen *SLG* třídy I či celý lokus je pravděpodobně nějakým způsobem nefunkční, nicméně však dominantní recesivním lokusem třídy II, který obsahuje gen *SCR*.

Domnívám se, že molekulární marker, který dokáže zredukovat populaci na polovinu s 90% pravděpodobností, že všechny odstraněné rostliny byly skutečně s nevhodným genotypem, je docela úspěšný. Pro přesnější selekci je nezbytné založení AI, které můžeme porovnat s přesně stanoveným fenotypem, na který nepůsobí žádné vnější vlivy. Vzhledem ke složitějšímu uspořádání genomu řepky a různým interakcím mezi alelami v rámci S lokusu to není jednoduché. V další práci bude sledována exprese důležitých genů S lokusu v porovnání s AI fenotypem.

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

Zúžení genetického základu šlechtitelského materiálu je bezesporu negativním jevem, zejména pokud se týká rezistentního šlechtění.

doc. Ing. Miroslav Bechyně, DrSc.

1) 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.

Ma et al. (2007) v posteru 'Self-incompatibility and its application in *Brassica napus*' používá jako molekulární marker úsek amplifikovaný primery SLGb a SP11a. Ve svém segregančním diagramu zohledňuje také supresorový lokus AI. Okamoto a Nishio (2007) představili poster Self-incompatibility of Brassica allopolyploid species due to independent mutation in S- locus and dominant /recessive relationships. Zjistili, že u heterozygotů S-haplotypů třídy I a II je alela *SCR* genu třídy II potlačena alelou *SCR* třídy I. Toto bylo ověřováno u odrůdy Westar a třída I byla považována za nefunkční. Závěrem bylo, že jednotlivé mutace v dominantní třídě I mohou způsobit AK fenotyp.

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

Molekulárními markery se nepodařilo odlišit tyto dvě skupiny. Z hlediska AI a velice polymorfního S lokusu nebyly shledány žádné významné rozdíly.

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

U starých a původních odrůd se dá očekávat velká variabilita a to nejen ve srovnání s dalšími odrůdami, ale i v rámci jedné odrůdy typu populace.

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

Pokud budeme brát v úvahu reálnou šlechtitelskou praxi v ČR, pak jsou to nároky na prostor a izolaci a také zpřesnění výsledků na základě fenotypových analýz. K úspěšné realizaci MAS v ČR je zapotřebí, aby jednotlivé šlechtitelské stanice spolupracovaly s univerzitními institucemi (Biotechnologické centrum ZF JU), jelikož náklady na laboratorní zařízení jsou

neúměrně vysoké. Samozřejmě vytvoření či hledání nového molekulární markeru je také velmi nákladné. Markerování také velmi zjednodušuje odvození dihaploidních rostlin, které také zkracuje šlechtitelský proces o následnou homozygotizaci.

Jana Sulová



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: **Ing. Jana Žaludová**
Narozen(a): 29.12.1978 v Českých Budějovicích

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

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

Výsledek obhajoby:

Vyhověl (a)

~~Nevyhověl(a)~~

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	Ing. Václav Míka, DrSc., ŠS Tagro Červený Dvůr s.r.o	
Členové:	doc. Ing. Petr Baranyk, CSc., ČZU v Praze	
	prof. Ing. Miroslav Bechyně, DrSc., ČZU v Praze (oponent)	
	prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc., MZLU Brno (oponent)	
	Ing. Vratislav Kučera, CSc., VÚRV Praha Ruzyně	
	doc. Ing. Pavel Vejl, Dr., ČZU Praha (oponent)	
	RNDr. Josef Vlasák, CSc., ÚMBR AV ČR	
Školitel:	doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 30.5.2007



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: **Ing. Jana Žaludová**
Narozen(a): 29.12.1978 v Českých Budějovicích

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

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 4

počet přítomných členů komise: 5

počet platných hlasů: 5

kladných: 5

záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

Komise:

	JMÉNO	PODPIS
Předseda:	Ing. Václav Míka, DrSc., ŠS Tagro Červený Dvůr s.r.o	
Členové:	doc. Ing. Petr Baranyk, CSc., ČZU v Praze	
	prof. Ing. Miroslav Bechyně, DrSc., ČZU v Praze (oponent)	
	prof. Ing. Jaroslava Ehrenbergerová, CSc., MZLU Brno (oponent)	
	Ing. Vratislav Kučera, CSc., VÚRV Praha Ruzyně	
	doc. Ing. Pavel Vejl, Dr., ČZU Praha (oponent)	
	RNDr. Josef Vlasák, CSc., ÚMBR AV ČR	
Školitel:	doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v Českých Budějovicích	

V Českých Budějovicích dne 30.5.2007