

Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Eva JOZOVÁ  
Narozen(a): 6. 6. 1985 v Českých Budějovicích  
Studijní program: Biotechnologie  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie  
Forma studia: Kombinovaná  
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Českých Budějovicích  
Datum a místo konání zkoušky: 4. 5. 2017, ZF JU v Č. Budějovicích  
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Molekulární markery jako nástroj pro hodnocení genetických zdrojů řepky a selekci  
autoinkompatibilních rostlin

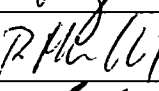
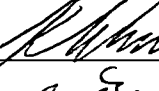
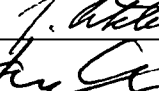
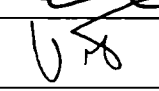
VÝSLEDEK ZKOUŠKY:

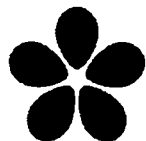
Prospěl(a)

Neprospěl(a)

ZKUŠEBNÍ KOMISE :

Podpis:

|           |                                                                  |                                                                                       |
|-----------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Předseda: | doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Masarykova univerzita v Brně, PřF |  |
| Členové:  | prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.; Mendelova univer. v Brně, AF  | OM LUVEN                                                                              |
|           | doc. Dr. Ing. Pavel Vejtl; ČZU v Praze, FAPPZ                    |  |
|           | Ing. Petra Hlásná - Čepková, Ph.D.; VÚRV Praha                   |  |
|           | Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha                           |  |
|           | prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích         |  |
|           | doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích         |  |
| Školitel: | prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích   |  |



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Eva JOZOVÁ  
Narozen(a): 6. 6. 1985 v Českých Budějovicích

Studijní program: Biotechnologie  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie  
Forma studia: Kombinovaná

### Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 7

počet přítomných členů komise: 6

počet platných hlasů: 6

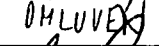
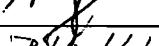
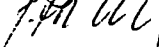
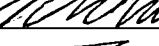
kladných: 6

záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

|           |                                                                  |                                                                                       |
|-----------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Předseda: | doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Masarykova univerzita v Brně, PřF |  |
| Členové:  | prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.; Mendelova univer. v Brně, AF  |  |
|           | doc. Dr. Ing. Pavel Vejtl; ČZU v Praze, FAPPZ                    |  |
|           | Ing. Petra Hlásná – Čepková, Ph.D.; VÚRV Praha                   |  |
|           | Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha                           |  |
|           | prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích         |  |
|           | doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích         |  |

## Otázky k obhajobě Ing. Petra Hlásná Čepková, Ph.D.

*Myslíte, že zjištění, že se genetická diverzita u českého novošlechtění řepky se rozšiřuje za použití tří ISSR primerů, je dostačující, doporučila byste další možnosti, jak výsledek potvrdit? V komentářích se píše, že genetická diverzita odrůd řepky je hodnocena pěti ISSR primery, takže pro rutinní použití v laboratoři byl počet těchto primerů navýšen oproti počtu použitým v článku? Jaký byl důvod.*

V uváděném článku byly porovnávány tři metody a na základě těchto výsledků byl vybrána právě metoda analýzy ISSR. Metodický postup hodnocení diverzity jsme ve spolupráci se šlechtiteli dále rozpracovávali a pro rutinní hodnocení odrůdového polymorfismu byl počet primerů navýšen na 5, aby došlo k dostatečnému navýšení stupně polymorfismu a optimálnímu rozlišení celého souboru genetických zdrojů. Vyšší počet primerů by ale nevedl k lepšímu rozlišení.

*Při použití AFLP markerů a zjišťování genetické diverzity mezi testovanými materiály bývá počítán koeficient  $F_{st}$  nebo  $F_{is}$ . Poskytnul by tento parametr vypovídající informaci o struktuře skupin případně o systému šlechtění řepky?*

$F_{is}$  koeficient je koeficient inbreedingu, který měří redukci heterozygotnosti jedince podmíněnou nenáhodným oplozením uvnitř subpopulace.  $F_{st}$  je fixační index – redukce heterozygotnosti subpopulace podmíněná náhodným genetickým posunem. Tyto koeficienty je vhodnější použít v čistě populačních studiích. U použitých šlechtitelských materiálů typu linie (liniové odrůdy nebo DH linie) nelze hodnotit vnitropopulační variabilitu, pro analýzy jsme používali bulk děložních listů a vnitropopulační variabilitu by pak nebylo možné hodnotit ani z tohoto důvodu.

*Jsou u řepky k dispozici jiné mikrosatelitové sekvence, které nebyly v práci použity a kterými by se dala hodnotit genetická variabilita u odrůd řepky?*

Službou bylo otestováno 19 mikrosatelitových primerů se specifitou pro každý chromozom. Tyto primery jsou ale patentovány. V plánu bylo použít jiné mikrosatelitové primery vybrané na základě sekvencí dostupných v GeneBank. Vybrané SSR primery byly testovány, amplifikovali fragmenty (mikrosatelity) ale ty ovšem vykazovaly velmi malou rozlišovací schopnost. Důvodem mohla být to, že vybrané primery byly velmi konzervativní a nebo to, že použitý materiál si byl velmi podobný.

*Řepkový olej je používán v potravinářství k tepelné úpravě potravin, je v porovnání se slunečnicovým a olivovým olejem zdravější? Jaké jsou výhody jeho použití?*

Řepkový olej je svým složením považován za zdravější než olej slunečnicový a srovnatelný s olejem olivovým. Oproti ostatním olejům obsahuje nízké množství nasycených mastných kyselin, které bývají příčinou růstu „špatného“ cholesterolu. Má vysoký obsah kyseliny olejové a linolenové, které jsou považovány za zdraví prospěšné, a příznivý poměr omega 3 a 6 mastných kyselin. Dále obsahuje oproti oleji slunečnicovému velké množství tokoferolů (vit E) a  $\gamma$ -tokoferolů, které zajišťují vysokou antioxidační účinnost. Řepka je tedy stabilnější k oxidačnímu žluknutí. Další výhodou je vysoký obsah vit K. Úpravou množství taninů a sinapinů se docílilo i neutrální chuti, kdežto u oleje slunečnicového se může někdy vyskytovat nepříjemný „rybí“ zápach a chuť. Řepkový olej je oproti leji olivovému i termostabilní.

*Máte informace, zda a kým jsou používány Vámi vyvinuté markery na detekci AI rostlin v rané fázi ontogeneze u řepky?*

V současné době metodiku jako takovou používá pouze naše laboratoř na Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné. Zájemci – nyní konkrétně VÚRV Ruzyně, nám zašlou materiál, který chtějí otestovat. Materiál je buď ve fázi děložním lístků a nebo části embryí tak, aby tato metoda nebyla destruktivní. Úzce spolupracujeme s VÓL Opava, kde podle našich metodik hodnotí genetickou diverzitu šlechtitelských materiálů řepky, připravují hodnocení katalogu olejnin a detekci nositelů *Rf* genu. V případě dalšího rozvoje šlechtění AI hybridů mohou používat i tento postup.

#### **Otázky k obhajobě Doc. RNDr. Jana Řepkové, CSc.**

*Jaké současné metody molekulární biologie lze využít pro vývoj velkého počtu DNA markerů pro celý genom daného druhu? Jaké metody umožní sledovat diverzitu často u stovek rostlin daného druhu (tedy u velkého souboru genových zdrojů, šlechtitelského materiálu), rozpoznat polymorfismy v konkrétním genu/lokusu?*

Jako nejvhodnější metody pro vývoj velkého počtu DNA markerů by bylo použití sekvenačních metod – NGS, sekvenování genomu a transkriptomu. Na základě dat z NGS je možné identifikovat tisíce (desítky tisíc) potenciálních SNPs a SSRs, validovat je a využít jako markerů. Analýza transkriptomu umožní navrhnout SNPs přímo lokalizované v aktivních genech (transkribovaných sekvencích) anebo GEMs (genově exprimované markery). Pro rozpoznání polymorfismů je možné využít techniku DNA microarrays (např. detekce specifických alel genů odolnosti suchu u pšenice), nebo kombinaci PCR, amplifikaci specifických sekvencí odpovídající cílovému genu a sekvenování amplifikovaných fragmentů a nalezení nové alely (analýza TILLING populací řepky – oba postupy jsme na pracovišti prováděli ve spolupráci se zahraničními laboratoři). Genetické mapování včetně QTL. Identifikace kandidátních genů významných znaků

*Jak se vyvinul samosprašný druh z autoinkompatibilního předka (př. rody *Arabidopsis*, *Brassica* aj.)?*

Samosprašnost je fylogeneticky odvozená a vznikla mnohonásobně. Tyto uváděné druhy vznikly prokřížením planých předků, tudíž v sobě nesou i vysoký stupeň polymorfismu. Samosprašnost lze brát jako reakci na životní podmínky např. při osídlování nového prostoru, kdy je potřeba rychlého rozmnožení homogenní populace. U kulturních druhů se na počátku jejich domestikace prováděl výběr na stabilitu a dobré produkční vlastnosti. Evoluce u samosprašení pravděpodobně probíhala postupným přizpůsobováním systémů křížení, např. ke ztrátě autoinkompatibility, nebo jiným uzpůsobením květu. U řepky lze zaznamenat rychlý přechod od odrůd typu populace (s výskytem rostlin nesoucích funkční S alely) k liniovým samosprašným odrůdám, kde se vyskytují pouze nefunkční S alely. Tato ztráta znaku AI byla způsobena selekcí rostlin v izolátorech či malých parcelkách upřednostňující AK rostliny.

*Jak je na molekulární úrovni zajištěna dominantní nebo recesivní determinace alel lokusu inkompatibility?*

Na fenotypové úrovni lze úroveň sledované dominance podle počtu vyvinutých pylových láček na blizně. Na molekulární úrovni lze toto využít u SLG genu, které jsou rozděleny do dvou tříd,

kdy SGL třídy I jsou dominantní a SLG třídy II jsou recesivní. Tato rozdělení jsou pravděpodobně i z toho důvodu, že SLG třídy I neobsahují intron, zatímco pro SLG třídy II je intron typický na C-konci. Obecně se uvádí, že dominantní alely třídy I jsou shodné s S<sup>47</sup> pocházející z *B. rapa* alely třídy II jsou shodné s alelou S<sup>15</sup> pocházející z *B. oleracea*.

*Vysvětlete společný evoluční základ některých genů lokusu S a genů pro ochranu vůči patogenům?*

Konkrétně u řepky se toto prokázalo u genu SRK, u kterého byla prokázána kinázová aktivita expresi cytoplazmatické domény v *E.coli*. SRK je příbuzná s rostlinnými kinázami, které se podílejí např. na obranných mechanismech proti patogenům či regulaci vývoje meristému.

*Jaký je význam poznatků o příbuzenských vztazích genotypů řepky ve šlechtění?*

Blízký příbuzenský vztah mezi jednotlivými genotypy řepky navozuje snižování genetické diverzity. Z hlediska šlechtění a získání F2 generace z rozsáhlou genetickou variabilitou je nejideálnější využívat ke křížení geneticky nejvzdálenější jedince, aby docházelo k rozšiřování genetické variability. To ale není zcela reálné v praktickém šlechtění, kdy výběr komponent do křížení byl prováděn jenom na základě fenotypových selekčních znaků. Je třeba zohledňovat za jakým účelem je řepka šlechtěna, jaký mají fenotypový projev, a proto se využití molekulárních markerů nabízí jako doplňující kritérium a jeden z nástrojů k výběru rodičovských komponent.

Doplňující otázky:

*Jaký je podíl na uvedených publikacích a jaký je tvůrčí podíl?*

Podílela jsem se na práci v laboratoři – příprava rostlinného materiálu pro izolaci, izolace rostlinného materiálu, PCR reakce, vyhodnocování dat včetně některých bioinformatických dat. Sepsání metodické části u článků s IF.

Podíl na publikacích s IF – 30%, podíl na recenzovaných publikacích – 80%.

### **Otázky k obhajobě doc. Dr. Ing. Pavel Vejř**

*Řepka olejka je z evolučního pohledu allotetraploid. Jak tato situace ovlivnila polymorfismus alel v jednotlivých SSR lokusech. Teoreticky může nastat situace, že u jednoho jedince je jeden lokus prezentován čtyřmi různými alelami. Jak jste tyto situace matematicky ošetřili při bioinformatickém porovnání mikrosatelitních profilů.*

Mikrosatelity, které byly využity (publikace v CJGPB) byly specifické pro určitý chromozom, 19 patentovaných mikrosatelitů, každý na „svém“ chromozomu, pak se mikrosatelit chová jako binární znak. Mikrosatelity, které jsem navrhovala byly rovněž specifické pro A nebo C genom, takže by nemělo dojít k situaci, že bude amplifikován lokus na A a C genomu současně.

*V práci jsou pozitivně hodnoceny ISSR markery. Byla provedena sekvenanční analýza ISSR amplikonů? Lze předpokládat výskyt sekvenčních polymorfismů v rámci délkově identických ISSR amplikonů?*

Amplikony nebyly sekvenovány, jelikož možných ISSR produktů byly stovky a nebylo možné je osekvenovat, vycházelo se ze způsobu hodnocení publikovaných i pro jiné plodiny.

*V disertační práci zmiňujete expresi genu SLR3 ve vegetativních orgánech. Je známá role proteinu kódovaného tímto genem právě ve vegetativních orgánech?*

Zmínka o SLR3 je citována na základě článku: „SLR3: A modified receptor kinase gene that has been adapted to encode a putative secreted glycoprotein similar to the S locus glycoprotein“, exprese v listech je pouze konstatování. Další informace o funkci tohoto genu, resp. proteinu jsem nedohledala.

*Genetická analýza u široké škály organismů jsou v současnosti založeny na aplikaci různých technik „Next-Generation Sequencing“. Jak se díváte na možnosti uplatnění NGS při studiu genomu řepky a při jejím šlechtění?*

Genom řepky, stejně tak jako genomy *B. rapa* a *B. oleracea* jsou nyní osekvenovány. A tento fakt skýtá značné možnosti pro vývoj nových markerů nebo pro studium evoluce řepky a dalších polyploidních druhů. Tento postup využíváme i v našem projektu – spolupracujeme s pracovištěm CNAP UoY, kde provedli jak RNAseq kolekce 600 genotypů řepky, tak sekvenování DNA – této kolekce, souboru genotypů OguINRA, Shaan 2A a TILLING populací. Získaná data pak využíváme pro vývoj markerů pro selekci rostlin rezistentních k *Plasmodiophora brassicae*, vývoj alelicky specifických markerů pro detekci rostlin sterilních a nesoucích geny obnovy fertility u CMS systému Shaan 2A a pro odlišení homozygotů a heterozygotů – obnovitelů fertility pro CMS systém OguINRA...

Doplňující otázky:

Geny jsou exprimovány

