

Posudek doktorské disertační práce

Ing. Evy Jozové

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

V předložené doktorandské práci je řešeno zajímavé téma hodnocení genetických zdrojů řepky pomocí vybraných molekulárních markerů SSR, ISSR a AFLP a možnosti selekce autoinkompatibilních rostlin.

Disertační práce je zpracována moderním způsobem a to tak, že je rozčleněna do dvou částí. První část zahrnuje poměrně detailní informace o biologii a pěstování řepky v zahraničí a v ČR, dále uvádí do problematiky šlechtění řepky a popisu pěstovaných odrůd a použití molekulárních markerů ve šlechtění řepky. Dále je zde popsán systém auto-inkompatibility obecně u rostlin a dále je tato problematika rozvíjena u řepky. Za ne zcela zásadní považuji popis obecně známé a rutinně používané gelové elektroforézy a fragmentační analýzy, jejich potřebné detaily jsou uvedeny v publikovaných člancích. Dále jsem nenašla souvislost mezi čipovou elektroforézou a metodami použitých v člancích, z tohoto pohledu mi také přijde nelogické tuto subkapitolu v literárním přehledu uvádět.

Literární rešerše je poměrně kvalitně zpracovaná, jak již bylo zmíněno výše v některých částech i dostatečně detailně, co ale považuji za trochu nedostačující je stáří velké části citované literatury především u kapitol jako šlechtění řepky, genetická diverzita u řepky (str. 25 resyntéza řepky, vzdálená hybridizace atd.) a použití molekulárních markerů většina citovaných zdrojů je starších než rok 2014. Přeci jenom lze říci, že výzkum a šlechtění významných hospodářských plodin jako řepka jsou dnes dynamický a rychle se vyvíjející sektor, proto si myslím, že by bylo vhodnější především do těchto kapitol zařadit aktuálnější poznatky z oboru a to např. formou přehledné tabulky, kde spolu s autorem a použitou technikou by byl uveden i účel k jakému byla použita.

Součástí této první části práce je i stanovení cílů práce a hypotéz, hypotézy mi přijdou v některých případech velmi nekonkrétní, kusé např. pomocí molekulárních markerů lze hodnotit úroveň gen. diverzity gen. zdrojů řepky (pomocí jakých markerů? Na jaké úrovni atd.), nebo že analýzy mol. markerů poskytují stabilní, opakovatelné a reprodukovatelné markery. Určitě by si formulace především hypotéz zasloužila větší pečlivost a přesnost, tak aby to korespondovalo více se samotným obsahem práce - s použitými metodami, s testovanými parametry a získanými výsledky.

Druhá část předložené práce zahrnuje tři opublikované články v časopisech s impakt faktorem, jejichž spoluautorkou je autorka disertační práce, to považuji za velmi důležité a jasně to dokumentuje významný podíl doktorandky na řešení projektů a výzkumu řepky, jež je dlouhodobě realizovaný na katedře Speciální produkce rostlinné a v Biotechnologickém centru. Důkazem toho jsou i výsledky uplatnitelné v praxi jako certifikovaná metodika a další dvě metodiky, které mají širší uplatnění v praxi, než publikace ve vědeckých časopisech.

Dalším důležitým výsledkem pro šlechtění je vyvinutí markerů pro spolehlivou selekci AI rostlin u řepky.

Dále v doktorské práci kladně hodnotím využití genetických zdrojů řepky uložených v Genové bance VÚRV Ruzyni jako zdroj nových informací pro výzkum a šlechtitelskou praxi.

Otázky k obhajobě:

- 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?
- 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?
- Jsou u řepky k dispozici jiné mikrosatelitové sekvence, které nebyly v práci použity a kterými by se dala hodnotit genetická variabilita u odrůd řepky?
- Řepkový olej je používán v potravinářství k tepelné úpravě potravin, je v porovnání se slunečnicovým a olivovým olejem zdravější? Jaké jsou výhody jeho použití.
- Máte informace, zda a kým jsou používány Vámi vyvinuté markery pro detekci AI rostlin v rané fázi ontogeneze u řepky?

Připomínky a komentáře:

- V části 'Summary' by bylo více platné přehledněji zmínit získané nejdůležitější výsledky a ne opakovat části z přehledu literatury (pasáž o auto-inkompatibilitě), pak se vlastní výsledky jaksi ztrácí v textu.
- S ohledem na velké množství zkratk a specifických termínů, které se v doktorské práci používají, by bylo vhodné zařadit na začátek práce seznam zkratk použitých v textu pro větší přehlednost.
- Dále v práci chybí seznam obrázků a tabulek uváděných v textu.
- V disertační práci psané v českém jazyce by také obrázky měly být popsány česky nikoli anglicky, jak se to v této práci často vyskytuje. Téměř u všech obrázků v textu je nesprávně uvedena citace, citace by měla být na konci titulku obrázku.
- Citace webových stránek jsou v práci uváděna nesprávně (např. str. 17 www.czso.cz), mělo by to být citováno dle platné citační normy a dále tyto citace nejsou v seznamu literatury!
- V textu jsou názvy odrůd uváděny nejednotně v uvozovkách nebo naopak bez uvozovek.

Autorka předložené disertační práce prokázala schopnost samostatně vědecky pracovat, zanalyzovala velké množství vzorků a dat a získala zajímavé výsledky, které pak byla schopná zpracovat do vědeckých publikací a metodik, což dokumentuje a potvrzuje kvalitu získaných výsledků. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělit Ing. Evě Jozové akademický titul „Doktor“.



Ing. Petra Hlásná Čepková, Ph.D.

Genová banka

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce

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

Autor: Ing. Eva J o z o v á

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 předložené práce je využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky při hodnocení genetické diverzity genetických zdrojů v českém šlechtění a při selekci rostlin s funkčními alelami lokusu inkompatibility. Práce je přínosná z hlediska získání poznatků o konkrétních genotypech řepky využívaných ve šlechtění i z hlediska aplikace DNA markerů při genotypování rostlin.

Členění disertační práce vychází ze tří publikovaných prací s impakt faktorem k danému tématu, kde je doktorandka spoluautorkou, a jsou zde formulovány cíle práce, literární přehled a komentář k těmto publikacím.

Cíle jsou formulovány jasně s uvedením hypotéz. U hypotéz by bylo vhodné také zvážit kromě dostatečné rozlišovací schopnosti DNA markerů i to, zda je počet použitých markerů dostatečný pro rozlišení genotypů v souboru. Tedy zda markery dostatečně pokrývají studovaný genom nebo významné části.

V **úvodu** je stručně zmíněna řešená problematika a v **literárním přehledu** následuje na 32 stranách podrobnější rešerše. Jedna kapitola pojednává o biologii řepky včetně taxonomické klasifikace, genetického původu, pěstování, šlechtění ve světě a v ČR a popisu hlavních typů odrůd. Druhá kapitola se týká genetické diverzity rostlin a konkrétně řepky a použití molekulárních markerů ve šlechtění řepky. Třetí kapitola pak popisuje systém autoinkompatibility obecně a u řepky. Témata mají vztah k tématu disertační práce, nicméně jejich některé části mají spíše učebnicový charakter. Učebnice jsou také citovány, ačkoliv autor učebnice není autorem daného poznatku. Neaktuálně je současný stav poznání popsán v kap. 2.2 Použití molekulárních markerů ve šlechtění řepky a 2.3 Hodnocení molekulárních markerů. Relativně nejlépe je současný stav poznání popsán u kapitoly týkající se autoinkompatibility, ale kromě kap. 3.6 Molekulární markery využívané pro hodnocení AI/AK – což je téma přímo související s disertační prací. Celé kapitole literárního přehledu by prospěla větší stručnost v obecně známých poznatcích a v částech, které nemají přímou souvislost s tématem disertační práce, a doplnění o aktuální stav problematiky v tématech souvisejících s disertační prací i z hlediska metod přínosných s určitou perspektivou. Např. vedle všeobecně známého genetického původu řepky bych doporučila uvést poznatky o genomech. Genom řepky olejné byl osekvenován a srovnán s genomy druhů, ze kterých vznikla. Jsou vyvíjeny celogenomové SNP i SSR markery a identifikovány kandidátní geny významných znaků, zajímavé výsledky přináší v těchto tématech sekvenování nové generace.

Na str. 33 a 36 je uvedeno, že lokus S má 50 alel (citace práce z r. 1993). Od té doby neexistuje novější práce nebo údaj?

Část **Komentář k publikacím** je napsána na pěti stranách. Tento rozsah je poměrně malý právě ve srovnání s literárním přehledem. Má pouze popisný charakter a chybí aktuální diskuse, i proto, že poslední práce byla napsána před třemi lety.

Z metodické části práce je zřejmé, že ke splnění cílů práce byla využita řada metod molekulární biologie založených na analýze DNA a RNA; klonování sekvencí, analýza sekvencí z hlediska charakterizace polymorfismů, statistická analýza dat pro studium příbuzenských vztahů. Není však zřejmý přínos autorky, protože publikované práce jsou ve větších autorských kolektivech. Proto prosím autorku o doplnění, jaký je její podíl na uvedených publikacích (z hlediska zpracovaných metod, podílu na publikování) a jaký je její tvůrčí podíl? Autorka disertace není prvním autorem u žádné publikované práce s impaktfaktorem. Alespoň u jedné bych to očekávala.

Z výsledků je patrné, že zvolené metody umožnily vypracovat diagnostiku rostlin řepky olejné v různých fázích vývoje v lokusu inkompatibility pro aplikaci ve šlechtění a vypracovat metodiku pro využití DNA markerů při hodnocení diverzity genotypů řepky olejné také s potenciálem ve šlechtění.

Jaké jsou aktuální výsledky aplikace DNA marků při identifikaci lokusů inkompatibility u dalších druhů? Jaký je metodický trend takových prací?

Literatura – názvy časopisů nejsou psány jednotným stylem, jsou zde zkratky i celé názvy, zkratky jsou s tečkami i bez teček.

Připomínky

V česky psané práci je nutné použít obrázky s popisy v češtině místo v angličtině. Anglický popis je u obrázků 3, 4, 6, 7.

Ve velké rozsahu jsou používána spojení A genom, S alela, S lokus, S haplotyp, SLG geny, apod. odpovídající anglickému textu.

Expresovat (str. 38) – správně je exprimovat.

Dotazy

- 1) 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/loku?
- 2) Jak se vyvinul samosprašný druh z autoinkompatibilního předka (př. rody *Arabidopsis*, *Brassica* aj.)?
- 3) Jak je na molekulární úrovni zajištěna dominantní nebo recesivní determinace alel lokusu inkompatibility?
- 4) Vysvětlíte společný evoluční základ některých genů lokusu S a genů pro ochranu vůči patogenům?
- 5) Jaký je význam poznatků o příbuzenských vztazích genotypů řepky ve šlechtění?

Závěrečné hodnocení

Disertační práce splnila stanovené cíle. Publikované výsledky prošly recenzním řízením, jsou prezentovány a diskutovány v časopisech *Romanian Agricultural Research* 2013 (IF 0,186), *Genetics and Molecular Biology* 2014, krátké sdělení (IF 1,660), *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 2014 (IF 0,476) a 9 příspěvků je v recenzovaném časopise *Úroda*. Publikace svědčí o přínosu výsledků disertační práce v oblasti využití inkompatibility u *Brassica napus* ve šlechtění. Rezervy vidím v teoretické části práce.

Studentka prokázala schopnosti řešit zadaný problém a práce splnila požadavky kladené na disertační práce ve studijním programu Biotechnologie.

Práci doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 26. dubna 2017

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'K. J.' followed by a long horizontal stroke.



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Katedra genetiky a šlechtění

Česká zemědělská univerzita v Praze,
Kamýčká 129, 165 21 Praha 6 - Suchbát

Tel.: +420 224 382 554

e-mail: vej1@af.czu.cz, www.af.czu.cz

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

**Název práce: Molekulární markery jako nástroj pro hodnocení
genetických zdrojů řepky a selekci autoinkompatibilních
rostlin**

Autor: Ing. Eva Jozová
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Oponent: doc. Dr. Ing. Pavel Vej1
Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra genetiky a šlechtění

Disertační práce Ing. Evy Jozové představuje již při zběžném pohledu velice kvalitní vědeckou práci zaměřenou na aplikaci molekulární genetiky při studiu biodiverzity a autoinkompatibility řepky olejky. Kladně hodnotím aplikační oblast disertační práce v oblasti šlechtění nových perspektivních odrůd řepky.

Posuzovaná disertační práce je zpracována formou tří původních vědeckých prací publikovaných v časopisech s impakt faktorem. U všech předkládaných prací je Ing. Eva Jozová druhým nebo třetím autorem. Vlastní disertační práce je vhodně doplněna úvodní částí zaměřenou na vytyčení cílů práce a vědeckých hypotéz, literární přehled dané problematiky, komentáře k publikovaným výsledkům a závěrečné shrnutí získaných výsledků. Rozčlenění práce do výše uvedených kapitol je zcela logické a jasné. Autorka práce postupuje



od obecných informací k detailním poznatkům týkajících se studia biodiverzity rostlin, šlechtění odrůd řepky a opylovacích poměrů včetně autoinkompatibility.

Disertační práce má rozsah 94 textových stran. Ve vlastní textové části je citováno celkem 159 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.

V závěru disertační práce autorka podává přehled o vlastních publikačních aktivitách nejen v časopisech s impakt faktorem, ale i v dalších recenzovaných časopisech a sbornících. Tato část práce svědčí o odborné erudici Ing. Evy Jozové a o její schopnosti prezentovat výsledky vědecké práce nejen formou publikací, ale rovněž i v podobě aktivních příspěvků na konferencích určených praktickým šlechtitelům nebo formou certifikovaných metodik.

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

Doktorská disertační práce Ing. Evy Jozové je zpracována formou komentovaných publikovaných výsledků v kvalitních vědeckých časopisech. Je mi jasné, že všechny tři klíčové publikace prošly přísným oponentním řízením, které je zárukou, že jedná o kvalitní a originální výsledky. Z tohoto pohledu je pro mne zpracování oponentského posudku do určité míry značně ulehčené. Již v úvodní části mého hodnocení jsem uvedl, že tři stěžejní publikace považuji za výbornou prezentaci výsledků doktorandského studia. K práci tudíž nemám žádné kritické připomínky ani po stránce metodické, obsahové a interpretační. Rád bych se stručně vyjádřil k některým oblastem doktorské disertační práce.

Modelovou rostlinou práce je řepka olejka. Jedná se jednoznačně významnou zemědělskou komoditu. Jedná o plodinu intenzivně šlechtěnou, prezentovanou liniovými i hybridními odrůdami. Intenzivní šlechtění je příčinou výrazného snížení variability genomu současných odrůd. Z tohoto pohledu se jedná botanický druh, u kterého je nutné se zamyslet nad možnostmi, jak hodnotit, uchovávat a obohacovat genetické zdroje. Řepka olejka je zajímavý model rovněž evolučního hlediska. Jedná se o allotetraploida. Z genetického a



fyziologického hlediska lze řepku olejku považovat za vyhledávaný model pro studium autoinkompatibility.

Všechny výše uvedené body se základem pro vhodně vybrané vědecké hypotézy a vlastní cíle práce. Doktorská disertační práce tak představuje ucelený průnik základního a aplikovaného výzkumu. Po důkladném prostudování přiložených vědeckých publikací mohu jednoznačně konstatovat, že disertantka všechny vytýčené cíle splnila.

Ing. Eva Jozová při řešení doktorské práce jednoznačně prokázala výbornou schopnost spojit různé pohledy na modelovou rostlinu řepku olejku do ucelené a smysluplné práce. Metodické postupy, které jsou prezentovány v klíčových publikacích lze považovat za aktuální nástroje aplikované molekulární genetiky rostlin. Autorka zvládla aplikovat celou škálu molekulárních markerů. Dokázala kriticky posoudit jejich přednosti i omezení. Komplex různých přístupů ke studiu genetických polymorfismů poté úspěšně aplikovala jako ucelený bioinformatický nástroj při studiu biodiverzity řepky olejky. Ze šlechtitelského hlediska vidím velký přínos doktorské práce v implementaci genetických markerů při selekci juvenilních rostlin na základě polymorfismů genů *SLG*, *SCR* a *SRK*, které souvisí s autoinkompatibilitou. Vývoj markerů pro jednoznačné odlišení rostlin AI a AK je důkazem toho, že Ing. Eva Jozová dokázala propojit teoretické molekulárně genetické experimenty s praktickým šlechtěním hybridních odrůd.

Po formální stránce je práce psaná jasným, srozumitelným a korektním jazykem. Autorka správně používá odbornou terminologii. V práci je opakovaně používán výraz „rostliny expresují“ studované geny nebo proteiny. Je tento termín identický s výrazem „rostlinné geny jsou exprimovány“? Který z těchto termínů je jazykově správný? Disertantka prokázala velice dobrou schopnost jasně vysvětlit genetickou podstatu své práce. Jedná se zejména o příčiny poklesu biodiverzity nebo složité mechanismy genetické kontroly autoinkompatibility.

V rámci vědecké rozpravy, která je součástí obhajoby doktorské práce, bych disertantce velice rád položil některé dotazy:

1. *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 porovnávání mikrosatelitních profilů.

- 2. V práci jsou pozitivně hodnoceny ISSR markery. Byla provedena sekvenční analýza ISSR amplikonů? Lze předpokládat výskyt sekvenčních polymorfismů v rámci délkově identických ISSR amplikonů?*
- 3. V disertační práci zmiňujete expresi genu SLR3 ve vegetativních orgánech. Je známá role proteinu kódovaného tímto genem právě ve vegetativních orgánech?*
- 4. 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?*

Závěrečné hodnocení

Z předchozích částí mého oponentského posudku vyplývá, že doktorskou disertační práci paní Ing. Evy Jozové hodnotím po všech stránkách kladně. Cíle práce, které si doktorandka vytkla, byly velice náročné, ale přesto beze zbytku splněné. Touto prací disertantka podává jasný 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. Opakovaně kladně hodnotím prezentování získaných výsledků formou vědeckých prací. Mé pozitivní hodnocení se týká i velkého aplikačního potenciálu předkládaných výsledků ve šlechtění rostlin.

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

doc. Dr. Ing. Pavel Vejls

FAPPZ ČZU v Praze

Praha, 21. dubna 2017