

Zápis z vědecké rozpravy:

obhajoba disertační práce Ing. Lenky Havlíčkové ZF JU v Českých Budějovicích, 10.11.2011

Ing. L. Kučera:

Pro normalizaci – hodnocení výsledků RT-PCR jste použila jeden gen? Jaké programy jste používala pro normalizaci? Vysvětlení výběru HskG.

Pro normalizaci byly vytipovány 4 geny, vzhledem ke stabilitě exprese byl v experimentech používán 1 gen, pro hodnocení byly využívány programy dostupné na pracovišti CRA Fiorenzuola, kde jsem tyto experimenty prováděla. Jako HskGen byly vytipovány geny se stabilní expresí v používaných experimentech.

prof. M. Jůzl:

Dotaz na publikaci výsledků.

Ano výsledky jsou připraveny k publikování, byly prezentovány na konferenci a formou sdělení v neimpaktovaném časopise, připravuje se rozsáhlejší publikace do časopisu s IF.

doc. M. Šíp:

Lze expresní čipy využít k identifikaci genů?

U expresní analýzy je obtížné získat výsledky bez validace, záleží na kvalitě vzorků, čipy obsahují anotované geny a ne vždy jsou geny, které hledáme již přítomné na čipu.

Dr. I. Prášil:

Problematika detekce autoinkompatibilních rostlin – jak drahé jsou analýzy?

Detekce spočívá v provedení PCR analýzy – pro potvrzení analýza 2-3 genů. Cena pak odpovídá ceně za izolaci DNA a provedení PCR analýzy.

Kontrolní rostliny byly zality na 95% vodní kapacity, to je ale dost, nemohlo již toto způsobovat stres?

Postupovalo se podle metodiky, která byla na pracovišti CRA vypracovaná a dlouhodobě používaná.

Ing. L. Kučera:

Proč je v genu HEL intron, může se projevit v expresní analýze?

Sestřih je regulován jako odpověď na stres, intron se pak někdy nevystřihne.

Obhajoba dizertační práce Ing. Lenky Havlíčkové

Odpovědi na otázky oponentů

RNDr. Ilya Prášil, CSc.

„Jaký podíl na uvedených experimentech mají (mají-li vůbec) pracovníci z jiných organizací, např. u kultivačních a fyziologických měření?“

- Rostlinný materiál tvořený RIL6 až 8 generace byl vytvořen ve výzkumném centru „CRA-Cereal Research Centre, Foggia – Itálie.
- Veškeré experimenty provedené na tomto pokusném materiálu (RIL) včetně rodičovských odrůd „Ofanto“ a „Cappelli“ byly následně provedeny ve výzkumném centru „CRA“ – Genomic Researc Centre, Fiorenzuola d'Arda, Itálie autorkou dizertační práce ve spolupráci s členy tohoto centra (~90%).
- Výsledné statistické zpracování naměřených dat a eQTL analýza byla provedena v centru „CRA“ Foggia.

„Uplatnění těchto výsledků v dalších programech (včetně šlechtitelských) na uvedených pracovištích“

Nové možnosti ve šlechtění na výnos a výnosovou stabilitu (mapování genu HEL a detekce robustního QTL spojeného s tolerancí vůči stresu suchem).

Použití genu HEL jako molekulárního markeru ve šlechtitelských selekčních programech.

Studium genové funkce tohoto genu a porozumění mechanismu molekulární odpovědi na stres suchem (GMO přístup ve šlechtění na odolnost k stresu suchem)

„Uvítal bych vyjádření o rozpracovanosti zveřejnění výsledků v impaktivních časopisech“

Výzkumný projekt uvedený v Ph.D práci byl součástí rozsáhlého výzkumného experimentu s cílem pochopit molekulární odpověď u pšenice tvrdé na působení stresu suchem. Cílem celého projektu je identifikace suchem indukovaných genů v použitých odrůdách s kontrastní úrovní tolerance k tomuto stresu a objevení možného využití těchto dat k nalezení eQTL v segregující populaci a jejich propojení k lokusům zodpovědným za odolnost rostlin k působení suchu. V současné době je v přípravě manuskript týkající se výsledků analýzy transkriptomu, který by měl být publikován v Plant Molecular Biology Journal. Tato publikace je připravována ve spolupráci mezi výzkumnými centry CRA - Fiorenzuola d'Arda a CRA – Foggia společně s autorkou dizertační práce.

Ing. Ladislav Kučera, CSc.

„Budou, nebo jsou výsledky již zpracovány a publikovány?“

Výzkumný projekt uvedený v Ph.D práci byl součástí rozsáhlého výzkumného experimentu s cílem pochopit molekulární odpověď u pšenice tvrdé na působení stresu suchem. Cílem celého projektu je identifikace suchem indukovaných genů v použitých odrůdách s kontrastní úrovní tolerance k tomuto stresu a objevení možného využití těchto dat k nalezení eQTL v segregující populaci a jejich propojení k lokusům zodpovědným za odolnost rostlin k působenému suchu. V současné době je v přípravě manuskript týkající se výsledků analýzy transkriptomu, který by měl být publikován v Plant Molecular Biology Journal. Tato publikace je připravována ve spolupráci mezi výzkumnými centry CRA - Fiorenzuola d'Arda a CRA – Foggia společně s autorkou dizertační práce.

„Proč nebyly pro výběr referenčních genů použity i specializované nástroje hodnocení, například geNorm či Normfinder?“

Referenční geny byly vybírány na základě předešlých zkušeností z experimentů provedených ve zmiňovaných výzkumných centrech, kde tyto HKG geny prokázaly požadovanou expresní stabilitu v rámci studovaného rostlinného materiálu (analýzy provedeny na stejné odrůdě, stejné růstová vývojová fáze či pod vlivem působení stejného stresového faktoru). Postupně byla tato sada rozšířena o geny z literárních zdrojů, zabývající se podobnou problematikou. Dalším hodnotným zdrojem byly samotné výsledky microarray provedené na stejném materiálu, které vedli k detekci nových genů vykazujícím stabilní expresi v rámci tohoto materiálu. Vzhledem k použitým strategiím výběru těchto genů, nebylo přistoupeno k použití těchto programů za účelem detekce HKGs genů s největší stabilitou pomocí těchto programů.

„Proč byly pro expresní analýzy vybrány jako referenční geny *cyclophilin* a *TIM17* (viz str. 66). Pro *cyclophilin* nesvědčí data prezentovaná v tabulce 13. ve vztahu ke kritériím výběru na straně 73. Je tu také rozpor v uvedeném počtu vzorků, u tabulky č.13 jsou použity 4 vzorky a na straně 65 uvádí, že pro qRT-PCR analýzy stability referenčních genů bylo použito celkem 16 vzorků.“

Kritéria výběru referenčních genů byla následující:

- ΔC_t indikuje rozdíl $C_{t \max} - C_{t \min}$ získaný ze třech opakování pro daný gen
- stanoveným kritériem bylo nalézt gen s minimálním rozdílem ΔC_t prezentující jeho stabilitu v rostlinném materiálu po expozici stresovým faktorům
- hranice akceptovatelného referenčního genu byla $\Delta C_t \leq 1$

z výřezu tabulky č. 13 je patrné, že TIM17 byl vhodným referenčním genem pro série RSWC 78/79; 49 a 27/28. U vzorků RSWC=34/35 byl použit referenční gen *cyclophilin*, vzhledem k jeho lepší stabilitě jeho expresního profilu.

	Series (RSWC%)	ΔC_t
<i>cyclophilin</i>	78/79	1.090
	49	1.170
	34/35	0.680
	27/28	1.910
	total	2.840
<i>TIM 17</i>	78/79	0.820
	49	0.910
	34/35	1.470
	27/28	0.520
	total	1.470

- každá série (RSWC) se skládala ze 4 vzorků rostlin ve 3 opakováních jejich expresního profilu. Pro každý testovaný gen bylo tedy použito celkem 16 vzorků ve třech opakováních.

„Jak byly propočítávány delta Ct (normalizace k referenčnímu genu)?“

„ V kapitole 4.3.3. na straně 86 nejsou použité postupy stanovení relativní exprese dostatečně popsány.“

Normalizace vnitřní kontroly byla počítána porovnáním cílového genu k jeho endogenní kontrole: $\Delta C_t = C_t \text{ cílový gen} - C_t \text{ referenční gen}$

Normalizace ke referenčnímu vzorku (kalibrátoru): $\Delta C_t \text{ vzorku} - C_t \text{ kalibrátoru} = \Delta \Delta C_t$

Referenčním vzorkem byla pro všechny vzorky kontrolní rostlina Ofanto (95% RSWC)

Použitím vzorce $2^{-\Delta \Delta C_t}$ byla následně získána hodnota „fold changes“ (FC) – násobná změna

Postupy vysvětlující hodnocení exprese byly popsány v předešlé kapitole 3.3.6 popisující podmínky RT-PCR analýzy. Za neuvedení konkrétních postupů v následující kapitole došlo neúmyslným nedopatřením a autorka se za tuto chybu omlouvá.

„Proč se autorka domnívá, že negativní delta Ct u *TaFBPase-1* je spojeno s narušením distribuce u populace RIL? „

Expresní analýza tohoto genu vykazovala hodnoty ΔC_t u kontrolní odrůdy Cappelli pěstované společně s RIL populacemi $\sim -2,92$ (Ofanto jako kalibrátor = 0).

Výsledná analýza provedená na RIL populaci vykazovala u všech vzorků negativní hodnoty korespondující hodnotám pouze jednoho rodiče.

Tento fakt vedl k předpokladu, že genetické založení tohoto znaku je komplexní a ve zmiňovaném kontextu bylo toto „narušení distribuce“ míněno jako neshoda s předpokládanou segregací u tohoto znaku.



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
 Studentská 13, 370 05 České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

JMÉNO STUDENTA DSP: Ing. Lenka HAVLÍČKOVÁ

NAROZEN(A): 15. 07. 1982 v Českých Budějovicích

STUDIJNÍ PROGRAM: Fytotechnika

STUDIJNÍ OBOR: Speciální produkce rostlinná

FORMA STUDIA: Prezenční

ŠKOLICÍ PRACOVNÍŠTĚ: Biotechnologické centrum, ZF JU v Č. Budějovicích

DATUM A MÍSTO KONÁNÍ ZKOUŠKY: 10. 11. 2011, ZF JU v Č. Budějovicích

ZKUŠEBNÍ TERMÍN Č.: první

NÁZEV DISERTAČNÍ PRÁCE:

Aplikace molekulárních technik ve šlechtění rostlin

VÝSLEDEK OBHAJOBY:

Prospěl(a)

~~**Neprospěl(a)**~~

ZKUŠEBNÍ KOMISE:

Podpis:

Předseda: prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; AF Mendelu Brno	
Členové: RNDr. Ilja Prášil, CSc.; VÚRV Ruzyně, Praha (oponent)	
Ing. Ladislav Kučera, CSc.; VÚRV Ruzyně, Praha (oponent)	
prof. Ing. Jan Moudrý, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
doc. RNDr. Miloslav Šíp, DrSc.; ZSF JU v Č. Budějovicích	
doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.; BC AV ČR Č. Budějovice	
doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Studentská 13, 370 05 České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP
PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

JMÉNO STUDENTA: Ing. Lenka HAVLÍČKOVÁ
NAROZEN(A): 15. 07. 1982 v Českých Budějovicích

STUDIJNÍ PROGRAM: Fytotechnika
STUDIJNÍ OBOR: Speciální produkce rostlinná
FORMA STUDIA: Prezenční

Výsledek hlasování:

počet členů komise: 5
počet platných hlasů: 5
počet nepřítomných členů komise: 5
kladných: 5
záporných: 0
počet neplatných hlasů: 0

ZKUŠEBNÍ KOMISE:

Podpis:

Předseda: prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; AF Mendelu Brno	
Členové: RNDr. Ilja Prášil, CSc.; VÚRV Ruzyně, Praha (oponent)	
Ing. Ladislav Kučera, CSc.; VÚRV Ruzyně, Praha (oponent)	
prof. Ing. Jan Moudrý, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
doc. RNDr. Miloslav Šíp, DrSc.; ZSF JU v Č. Budějovicích	
doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.; BC AV ČR Č. Budějovice	
doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU V Č. Budějovicích	