



PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Libor VEČEREK
Narozen(a): 25. 3. 1968
Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Obecná zootechnika
Forma studia: Kombinovaná
Školící pracoviště: KZVK ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 17. 9. 2015, ZF JU v Praze
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Analýza vybraných dědičných poruch zdraví skotu

Výsledek obhajoby:

Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. Ing. Milan Podsedníček, CSc.; MZe ČR v Praze	
Členové:	doc. Ing. Mgr. Ivan Majzlík, CSc.; ČZU v Praze (oponent)	
	prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.; ZF JU v Č. Budějovicích	OMLUVEN
	prof. dr hab. Andrzej Filistowicz, prof. zw.; Uni. Przyrodniczy, Wroclaw	OMLUVEN
	prof. Ing. Václav Řehout, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Karel Mach, CSc.; ČZU v Praze (oponent)	
	doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
	doc. Ing. Karel Košvanec, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	OMLUVEN
Školitel:	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc., dr. h. c.; ZF JU v Č. 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. Libor VEČEREK
Narozen(a): 25. 3. 1968 v Praze

Studijní program: Zootechnika
Studijní obor: Obecná zootechnika
Forma studia: Kombinovaná

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 10

počet přítomných členů komise: 7

počet platných hlasů: 7

kladných: 7

záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Zkušební komise:	Podpis:
Předseda: doc. Ing. Milan Podsedníček, CSc.; MZe ČR v Praze	
Členové: doc. Ing. Mgr. Ivan Majzlík, CSc.; ČZU v Praze (oponent)	
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.; ZF JU v Č. Budějovicích	OMLUVEN
prof. dr. hab. Andrzej Filistowicz, prof. zw.; Uni. Przyrodniczy, Wroclaw	OMLUVEN
prof. Ing. Václav Řehout, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
doc. Ing. Karel Mach, CSc.; ČZU v Praze (oponent)	
doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
doc. Ing. Karel Košvanec, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	OMLUVEN

Obhajoba Disertační práce – Ing. Libor Večerek – 17.9.2015

Odpovědi na dotazy oponentů

Oponent: **doc. Ing. Karel Mach, CSc.**

Dotaz oponenta:

Zvířata pro genotypizaci na 7 onemocnění (*BLAD*, *CVM*, *CITRULINEMIE*, *DUMPS*, *DEFICIT KREVŇÍHO FAKTORU XI*, *GSD II a GSD V*) byla u jednotlivých plemen vybrána s ohledem na jejich rozšíření v ČR i zahraničí a na případný očekávaný výskyt sledovaných onemocnění. V rozporu s prvním cílem práce se nejednalo vždy o plemena chovaná v ČR (analýza u 17 býků slovenského strakatého skotu).

Odpověď:

Ano, to je pravda. Zvířata ze Slovenska, Polska, popř. Německa byla zařazena v malém počtu jako doplnění. Původní cíl, tj. analýza výskytu chorob v populaci skotu v ČR tím nebyl narušen.

Názor oponenta:

Pro genotypizaci DNA z krve, případně inseminačních dávek bylo využito standardních postupů. Počet analyzovaných jedinců na pět vybraných chorob (vyjma *GSD II* a *GSD V*) u holštýnského skotu lze považovat za dostatečný, pro objektivní analýzu frekvence nežádoucí recesivní alely a případnému výskytu heterozygotů. Totéž ve značné míře platí i pro český strakatý skot, za drobný nedostatek v tomto směru však považuji absenci analýzy na *CVM*.

Odpověď:

Analýza by měla smysl u potomstva holštýnských býků používaných ke křížení v populaci českého strakatého skotu. Pokud by býk byl heterozygotní (*CV*), v jeho potomstvu by byl výskyt heterozygotů 50 %. Je možné, že se takové případy použití *CV* býků vyskytly, zejména v době před identifikací *CVM*, o počtu lze jen spekulovat. Pokud jsou nyní k zušlechťovacímu křížení používáni býci *TV*, nehrozí nebezpečí.

Dotaz oponenta:

Zjištěný 0 výskyt onemocnění *BLAD* lze považovat za pozitivní, otázkou však je zda v současné době minimální počet prováděných vyšetření (s. 75), nepovede k opětovnému výskytu tohoto onemocnění.

Odpověď:

Neměl by vést, protože počet testací klesá proto, že příchozí plemenný materiál z chovatelsky vyspělých zemí bývá prověřen. V našich podmínkách mají obvykle již rodiče mladých býků potvrzený status TL.

Dotaz oponenta:

Kromě jasně definovaných a uvedených cílů by práce měla rovněž obsahovat vědeckou hypotézu, od které se odvíjí další části práce, počínaje výše citovaným cílem práce.

Odpověď:

Vědecké hypotézy byly implicitně obsaženy v cílech práce.

Dědičně podmíněné choroby skotu jsou s postupující úrovní vědeckého poznání stále lépe rozpoznatelné, včetně příčin a důsledků. Dovedeme tak naše chovy stále lépe chránit.

Lze popsat aktuální stav populace skotu v ČR z hlediska výskytu dědičných poruch zdraví a na základě toho formulovat chovatelská opatření.

V lokusu pro *BLAD* existují další polymorfismy, je možné posoudit jejich vztah

k fenotypovému projevu choroby.

Názor oponenta:

Izolace DNA a následná genotypizace, pokud se jedná o všeobecně platné standardní postupy, je v práci uvedená příliš detailně – stačilo by uvést případný zdroj. Vypíchnout však je třeba optimalizační odchylky, vyvinuté pracovištěm, na kterém byla práce řešena.

Odpověď:

Ano, to je pravda. Nicméně v řadě disertací jsou všechny laboratorní metodiky uváděny detailně, proto byl zvolen tento postup.

Dotaz oponenta:

„Opatření Svazu chovatelů holštýnského skotu ČR k evidenci a eliminaci výskytu dědičných vad v populaci holštýnského skotu v ČR“ (příloha 2 na s. 149 a 150) nabyla účinnosti 1.1.2004. Neměla by být tato opatření aktualizována na základě návrhů, uvedených v kap. 6.3: Doporučení pro praxi. Pokud ano, o které návrhy by se mělo jednat?

Odpovědi:

I. Výsledky byly průběžně publikovány nejen ve vědeckých časopisech, ale i v odborných, byly uváděny v uplatněné metodice, na konferencích, chovatelská veřejnost byla s nimi seznámena.

Uplatněná metodika:

ČÍTEK J., ŘEHOUT V., HRADECKÁ E., HANUSOVÁ L., VEČEREK L. (2008): Organizační postupy pro odhalování skrytých přenašečů geneticky podmíněných poruch zdraví. Uplatněná metodika, Vydání 1., České Budějovice. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 1–33. Vypracované v rámci výzkumného záměru č. MSM 6007665806. ISBN 978-80-7394-152-9.

II. Pokud má být prevence u zmíněných onemocnění maximálně účinná, lze doporučit vypuštění výjimky pro použití heterozygotních býků, používat nadále výhradně býky se statutem TV pro CVM, resp. TL pro BLAD. Pro přirozenou plemenitbu využívat pouze býky s ověřeným statutem.

V současné době je již jistě dostatek býků s vysokou PH a ověřeným statutem homozygot dominantní.

Z Opatření.....:

b) Konzervované sperma plemenných býků, kteří jsou nositeli BLAD (status BL), resp. CVM (status CV) může být používáno za předpokladu, že se jedná o býky prověřené kontrolou dědičnosti a zapsané v plemenné knize v ČR. Majitel býka, dovozce semene a inseminační

technik jsou povinni informovat chovatele, že se jedná o býka nositele uvedené genetické vady.

c) Chovatelé i pracovníci servisních organizací dbají, aby spermatem těchto býků nebyly inseminovány plemenice se shodným statutem (BL, CV) nebo podezřelé z nositelství BLAD, resp. CVM.

d) Pro přirozenou plemenitbu mohou být používáni býci bez známého statusu BLAD a CVM. V případě prodeje jinému majiteli je prodávající povinen zajistit stanovení statusu (testování) pokud o něj kupující požádá.

Dotaz oponenta:

Které ze získaných poznatků by měly být rozvíjeny další výzkumnou činností?

Odpověď:

Zjištěné informace o výskytu jmenovaných onemocnění v určitém období spoluvytváří informační podklad pro porovnání a další sledování vývoje zdravotní situace v chovech v dalších letech.

Pro další výzkum lze doporučit analýzu lokusů pro další dědičné poruchy zdraví na molekulární úrovni. Dále, analyzovat další choroby, u nichž není dosud spolehlivě objasněná etiologie. K tomu lze s výhodou použít také data z odhadu genomické PH.

Pro praktické šlechtění lze doporučit zařazení polymorfismů, zodpovědných za další dědičné poruchy zdraví na customer čipy nebo na běžné čipy používané k odhadu genomové PH. To umožní aktivní řízení plemenitby s cílem nedopustit zvýšení frekvence recesivních alel. Testování provádět s ohledem na specifický výskyt dědičných chorob u jednotlivých plemen, ale i linií. Toto opatření je možné již prakticky zavádět, customer čipy jsou dostupné, další s SNP pro specifické choroby je možné připravit.

Oponent: **doc. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.**

Dotaz oponenta:

Jaký byl podíl autora na laboratorních analýzách?

Odpověď :

Pracoval jsem jako technik přijatý na řešení projektu NAZV, jehož cílem bylo zejména provést screening dědičných poruch zdraví v populaci skotu v ČR. Řešitelem projektu byl prof. Čížek, který je rovněž školitelem.

Objem laboratorních prací, které bylo nutné provést, byl značný. Proto se na laboratorních analýzách podílelo několik dalších kolegů. Cílem disertace bylo vyhodnotit výskyt přenašečů v populaci, tento úkol byl splněn.

Analýzy CVM byly provedeny zakázkou v ČMSCH z toho důvodu, že tato laboratoř vystavovala certifikát, který mohli chovatelé použít k plemenářské dokumentaci.

Laboratorní analýzy genu *CD18* a tiché mutace jsem provedl z převažující části, samostatně jsem provedl zpracování a vyhodnocování výsledků.

Dotaz oponenta:

Jakou jinou metodou by bylo možné detekovat polymorfizmy ve vybraném genu *CD18*, popřípadě v dalších genech? Proč byla vybrána metoda restrikční analýzy?

Odpověď:

Metoda PCR-RFLP je relativně dobře proveditelná, poměrně levná, získané výsledky jsou relevantní k použité metodě.

Určitou nevýhodou je vyšší pracnost, rostoucí s délkou analyzovaného úseku a počtu použitých RE.

Dále je možné použít další techniky pro odhalení bodových polymorfismů, jako je SSCP, TGGE. Pochopitelně, nejúplnější popis poskytuje sekvencování příslušného genu.

Dotaz oponenta:

Na str. 6 definování genomu jako soubor genů není zcela správný. Mohl by autor zpřesnit tuto definici?

Odpověď :

Zmíněná definice v disertační práci je citována dle publikace SRŠEŇ, SRŠŇOVÁ (2005).

Genom – veškerý soubor genetického materiálu, viru, buňky, jedince, druhu nebo vyšších taxonomických kategorií (HRUBAN V., MAJZLÍK I., 2002).

Genom – soubor molekul DNA, který je charakteristický pro daný organismus (SNUSTAD D.P., SIMMONS M. J., 2009).

Genetická informace, neboli genom (PRITCHARD D. J., KORF B. R., 2003).

Genom – kompletní sekvence DNA obsahující veškerou genetickou informaci gamety, jedince, populace nebo druhu (THOMPSON AND THOMPSON, 2004)

Názor oponenta:

Samostatná kapitola 2.2.1.1 zcela nezapadá do kontextu kapitoly 2.2.1. Měla být samostatnou kapitolou.

Odpověď:

Ano, kapitola Vyhodnocení frekvencí by měla být samostatná. S názorem na umístění kapitoly souhlasím.

Dotaz oponenta:

Na základě čeho byly vybrány studované geny?

Odpověď :

Výběr souvisel s aktuální snahou pomoci s řešením nastalé zdravotní situace v chovech skotu v ČR. Výběr genů byl proveden rovněž s ohledem na výskyt dědičných poruch zdraví

v zahraničí, na základě provedené rešerše. U některých onemocnění (např. DUMPS, citrulinémie) byla snaha zjistit zda se tato onemocnění v naší populaci vyskytují.

Dotaz oponenta:

V Literárním přehledu bylo uvedeno více lokusů pro dědičné onemocnění, než bylo nakonec testováno. Proč byly uváděny?

Odpověď:

Literární přehled měl poněkud širší záběr, než je vlastní analytická část práce. Uvedené příklady dalších onemocnění skotu měly za cíl ukázat, že náš skot může být ohrožen i jinými dědičnými onemocněními, která v některých oblastech světa představují v chovech nezanedbatelný problém. Rovněž není vyloučeno, že časem budou některá z nich zavlečena i do našich chovů, pokud už se tak nestalo.

Dotaz oponenta:

Jaké byste navrhl uplatnění výsledků a jaká je budoucnost testování mutací genů asociovaných s onemocněními – z pohledu metodiky a ceny?

Odpovědi:

Uplatnění výsledků - Zjištěné informace o výskytu jmenovaných onemocnění v určitém období spoluvytváří informační podklad pro porovnání a další sledování vývoje zdravotní situace v chovech v dalších letech. Informace o zjištěných polymorfismech a jejich vztahu k BLAD mají spíše informační charakter základního výzkumu.

Budoucnost testování mutací genů asociovaných s onemocněními, spočívá v zavádění tzv. customer čipů – specifických pro plemena. Viz např. BeadChip od firmy Illumina Infinium®, s obsahem 26 000 SNPs. Zvíře lze současně otestovat na více postižení, včetně ověření původu, případně odhadu genomické hodnoty.

Testace stávajících onemocnění, kdy je známa genetická podstata se tak stává rutinní záležitostí. S dalším rozvojem technologií molekulární genetiky lze očekávat i významné zlevnění.

Dotaz oponenta:

Budou komplexní výsledky publikovány ve významnějším vědeckém časopise ?

Odpověď :

Většina výsledků ohledně onemocnění skotu byla průběžně uveřejňována i ve významnějších vědeckých časopisech.

Například: informace o GSD II a GSD V, byla uveřejněna:

Journal of Veterinary Medicine (2007)

Informace o deficienci faktoru XI, byla uveřejněna:

Journal of the Science of Food and Agriculture (2008)

Výsledky byly rovněž publikovány na konferencích, v poslední době např. Animal Biotechnology (ČÍTEK, VEČEREK, 2014), kde byla prezentována rozsáhlá vyzvaná přednáška.

Oponent: **doc. Ing. Ivan Majzlík, CSc.**

Dotaz oponenta:

V jakém rozsahu a na které části studií se autor podílel?

Odpověď:

Pracoval jsem jako technik přijatý na řešení projektu NAZV, jehož cílem bylo zejména provést screening dědičných poruch zdraví v populaci skotu v ČR. Řešitelem projektu byl prof. Čítek, který je rovněž školitelem.

Objem laboratorních prací, které bylo nutné provést, byl značný. Proto se na laboratorních analýzách podílelo několik dalších kolegů. Cílem disertace bylo vyhodnotit výskyt přenašečů v populaci, tento úkol byl splněn.

Analýzy na CVM byly provedeny zakázkou v ČMSCH z toho důvodu, že tato laboratoř vystavovala certifikát, který mohli chovatelé použít k plemenářské dokumentaci.

U laboratorní analýzy genu *CD18* a tiché mutace je můj technický podíl většinový, včetně samostatného zpracování a vyhodnocování výsledků.

Dotaz oponenta:

Jaký systém monitoringu by autor doporučoval pro populaci českého strakatého skotu ?

Odpověď :

KDZ by měla být obnovena v účelném rozsahu.

Pokud budou používáni k zušlechťovacímu křížení holštýnští plemeničí, je nutné znát status pro CVM a BLAD a používat pouze homozygoty dominantní. Aktuálním problémem je testování mladých býků před zařazením do plemenitby na chromozomální Robertsonskou translokaci. V nedávné minulosti se zejména translokace 1/29 vyskytovala ve zvýšené míře zvl. u býků českého strakatého skotu linie Laban.

Tyto translokace snižují plodnost – zvýšená pravděpodobnost abortů.

- Systém monitoringu pro vzniklá autozomálně recesivní onemocnění skotu, by měl mít podobné metodické znaky, jaké jsou obsaženy v metodice Svazu chovatelů holštýnského skotu z r. 2004 – samozřejmě pro specifická onemocnění.
- 1) Monitorovat zejména plemeníky a elitní plemenice před vstupem do plemenitby. Včetně plemeníků vstupujících do přirozené plemenitby.
 - 2) Monitoring zahraničního plemenného materiálu používaného k plemenitbě (holštýn, ayrshire....)
 - 3) Z plemenitby zcela vyloučit heterozygotní nositele onemocnění mladé i již zapojené v plemenitbě bez ohledu na jejich PH.
 - 4) Zpětně dle možnosti dohledávat heterozygotní nositele mezi předky, případně pokusit se nalézt původce onemocnění.
 - 5) Označovat heterozygoty v plemenných knihách.

Zápis z obhajoby DSP Ing. Libora Večerka ze dne 17. 9. 2015

Předseda komise představil členy komise.

Omluveni: prof. Šoch, prof. Filistowicz, prof. Matoušek

Předseda přečetl životopis a publikační činnost.

Předseda vyzval prof. Čítka, aby přečetl stanovisko školitele a doc. Maršálka k přečtení stanoviska pracoviště.

Ing. Večerek přednesl svůj příspěvek práce (teze).

Oponenti přečetli své posudky v tomto pořadí:

1. doc. Urban
2. doc. Mach
3. doc. Majzlík

Předseda vyzval Ing. Večerka, aby odpověděl na otázky oponentů (viz přílohy – odpovědi na posudky).

Záznam vědecké rozpravy:

1. prof. Řehout

1a) Obecný problém vědeckých definic – viz již citované definice, lišící se v pohledu na genom.

Ing. Večerek: Definice se často výrazně mění s úrovní poznání, mohou se lišit definice platné např. před 50 –100 lety od dnešních formulací.

prof. Řehout: Čím tedy o problému tzv. více víme, tím stále zjišťujeme, že je stále co objevovat – tedy i definovat lépe a přesněji.

1b) Primární mutace mohou být i daleko starší než desítky let. Některé mohly vzniknout nedávno a některé naopak před mnoha stovkami let. Mutace souvisí s evolučním vývojem – např. barva očí.

Ing. Večerek: V prezentaci uváděné desítky let skrytého šíření byly upozorněním na tzv. „původní“ šířitele BLAD a CVM, holštýnské býky Osborndale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star.

2. doc. Urban

Pokud bychom neměli přísun plemenného materiálu ze zahraničí, kdy bychom mohli skončit s analýzami pro konkrétní dědičné onemocnění.

Ing. Večerek: Pokud by nebylo prověřeno každé zvíře, které by teoreticky mohlo nést alelu postižení – jistota nebude.

doc. Urban: Možná, že je to nekončící proces neboť se teoreticky může objevit mutace na jiném místě lokusu – což může ovlivnit onemocnění.

3. doc. Majzlík

Nezjistil jste při studiu literární pramenů, kde se v populaci českého strakatého skotu vzaly Robertsonské translokace – celosvětový problém.

Ing. Večerek: Translokaci může způsobit poškození telomer chromozomů a následná fúze.

doc. Majzlík: V chovech skotu došlo k rozšíření Robertsonských translokací pod vlivem importu dánských červinek, a to nejen v českém chovu, ale i v dalších zemích.

4. doc. Maršálek

4a) Bylo citováno cca 290 literárních pramenů – pro výběr nemocí, proč se dělaly analýzy na nemoci, které nejsou běžné, zda předem byla známa informace předpokládající jejich výskyt.

Ing. Večerek: Chtěli jsme vyzkoušet, zdali neprokážeme nositele v populaci skotu u plemen, kde se obvykle vyskytují, nebo nově neobjevíme onemocnění u ostatních plemen. To bylo prováděno jednak z experimentálních důvodů, jednak i pro praktickou ochranu našich chovů.

4b) Jaká je obecně frekvence výskytu, zda jsou nemoci pro běžného chovatele ekonomicky nebezpečné.

Ing. Večerek: U těchto sedmi onemocnění je v současnosti situace stabilizovaná, výskyt natolik nízký a pravděpodobnost, že by byl běžný chovatel nějak výrazněji ekonomicky poškozen, je malá.

4c) Kontrola dědičnosti zdraví u skotu, zda se dělá a co od toho mohu očekávat.

Ing. Večerek: Kontrola dědičnosti zdraví skotu byla prováděna SVÚ Brno, později VÚVeL Brno, byla bohužel fakticky zrušena. Donedávna byl využíván Test 2B VET.

4d) Genomická selekce pro šlechtění skotu - pohled člověka zabývajícího se genetikou.

Ing. Večerek: Metoda genomické selekce je perspektivním směrem pro odhad PH, použité metody se budou jistě rychle rozvíjet v souladu s rozvojem znalostí a s novými technologiemi v molekulární genetice. Uvedené postupy se budou výrazně zlevňovat.

5. doc. Mach

Doplňující otázka – která z metod by byla vhodná pro vyhodnocování odhadu PH pro vlastnosti nízko dědivé.

Ing. Večerek: Obě metody mají v současnosti svoje opodstatnění – záleží na řešeném problému, nebylo by tak rozumné jednu metodu výrazně upřednostňovat na úkor druhé. Je nutný uvážlivý postup.

Zapsala: P. Pinerová

