



OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Dagmar STEHLÍKOVÉ
Narozen(a): 25. 8. 1989 v Českém Krumlově

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

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 10

počet přítomných členů komise: 9

počet platných hlasů: 9

kladných: 9

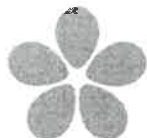
záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, AF	
Členové:	doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Masarykova univerzita v Brně, PŘF	
	doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejl; ČZU v Praze, FAPPZ	
	doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, AF	
	doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, ZF Lednice (oponent)	
	Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	



PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Dagmar STEHLÍKOVÁ
Narozen(a): 25. 8. 1989 v Českém Krumlově
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 13. 11. 2019, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Metoda loop-mediated isothermal amplification pro detekci fytopatogenních mikroorganismů

Výsledek obhajoby:

Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Zkušební komise:		Podpis:
Předseda:	prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, AF	
Členové:	doc. RNDr. Jana Řepková, CSc.; Masarykova univerzita v Brně, PŘF	
	doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.; ČZU v Praze, FAPPZ	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejl; ČZU v Praze, FAPPZ	
	doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, AF	
	doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.; Mendelova univerz. v Brně, ZF Lednice (oponent)	
	Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
Oponent:	Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, LDF	Není členem komise
	prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.; Univerzita T. Bati ve Zlíně, FT	Není členem komise
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	

Otázky a odpovědi k doktorské disertační práci Ing. Dagmar Stehlíkové

Oponent: Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.

1. Na příkladu vhodně zvoleného obrázku se symptomy infekce xantomonádami ukažte správný způsob citace internetového obrazového zdroje.

Obrázek 1: Symptomy bakteriální skvrnitosti na listech papriky infikované bakterií *Xanthomonas vesicatoria*



EPPO 2019 (převzato z databáze)

V seznamu literatury:

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). [cit. 2019-11-08] Dostupné z: <https://gd.eppo.int/media/data/taxon/X/XANTVE/pics/1024x0/1768.jpg>

2. Vysvětlete, proč je *F. circinatum* v podmínkách českých lesních školek hrozba pro modřín a smrk, ačkoliv je pryskyřičná rakovina onemocnění borovic (douglasky).

Minulý rok byla zveřejněna publikace, kde byl zkoumán vztah mezi semenáčky (borovice, smrk, modřín) a houbou *Fusarium circinatum* v lesních školkách na území ČR. Bylo prokázáno, že houba *F. circinatum* je schopna infikovat semenáčky všech tří druhů dřevin. U smrku a modřínu může být latentní

Existuje riziko, že při reakci zkrácené na 30 minut dojde k nespecifické amplifikaci např. *X. perforans*, pokud bude v reakci 10x více DNA než v uvedeném testovaném případě?

X. perforans je nyní řazena do druhu *X. euvesicatoria* a při analýzách nebyla zaznamenána amplifikace s navrženými primery. Při hodinové amplifikaci může nastat riziko amplifikace nespecifických produktů, což může být riziko u velmi příbuzných druhů. (*X. gardneri* a *X. euvesicatoria*).

- 7. Z obr. 25 vyplývá, že se na platformě Genie II amplifikuje vzorek o nejvyšší koncentraci DNA nejpomaleji. Jaké proto máte vysvětlení?**

Velká koncentrace DNA může inhibičně ovlivnit dobu přesahu fluorescence prahové hodnoty. Udává se, že vysoká koncentrace templátové DNA se projevuje inhibičním efektem, což je zřejmě tento případ, kdy pravděpodobně byla překročena prahová hodnota.

- 8. Detekční techniky pro xantomonády jste optimalizovala na real-time PCR termocykleru a nakonec převedla na platformu Smart-Dart. Projevil se převod na „primitivnější“ hardware zvýšením detekčního limitu metody?**

Detekční limit byl u real-time platformem stejný. Jediná odlišnost byla zaznamenána v intenzitě fluorescence u LAMP s použitím asimilační sondy. Avšak tato odlišnost je spíše způsobena postupnou degradací fluorescenční asimilační sondy a ne v použití různých real-time platformem.

- 9. Bylo by možné doladit techniku LAMP detekce na platformě použitelné v terénu v triplexu (tj. pro *X. vesicatoria*, *X. gardneri* a *X. euvesicatoria*)?**

Ano, v případě optimalizace tří fluorescenčních sond s různou vlnovou délkou a při použití přenosného přístroje, který je schopný detekovat tři vlnové délky. Tetraplex LAMP byl již optimalizován na přenosném přístroji ESEQuant, který je schopen detekovat 6 vlnových délek (Nathan a Tanner, 2012).

Oponent: doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

- 1. na obrázku č. 23 jsou zachyceny výsledky detekce navrženou LAMP metodou v uměle infikovaných rostlinách. Těch bylo celkem 40, proč výsledky analýzy zobrazují pouze 3 vzorky?**
Analýza byla provedena pro všech 40 vzorků. Na obrázku jsou tři a to z důvodu lepší přehlednosti. Do grafu byly vybrány 3 vzorky s nejrychlejším, nejpomalejším a průměrným přesáhnutím prahové hodnoty (20-30 min).
- 2. v rámci prezentace pro obhajobu dizertační práce prosím popište jak a které *in silico* analýzy v jednotlivých krocích pobíhaly.**
Tato otázka byla zodpovězena během prezentace.
- 3. -LAMP je prezentována jakožto velmi citlivá metoda. Jaké máte zkušenosti s falešně pozitivními vzorky? Nenastane problém, pokud bude v jedné laboratoři opakovaně prováděn test stejného patogenu?**

lepší citlivost real-time LAMP, což naznačuje, že látky obsažené v půdě mohou inhibovat aktivitu DNA polymerázy v real-time PCR.

5. Vzhledem k poměrně malému rozsahu výsledkové části se nabízí testovat vyvinuté metody na vzorcích v terénu, tak jak je navrhováno. Nebylo možné se o to pokusit?

Hlavním cílem byla optimalizace metod. Testování na vzorcích probíhalo jak u rodu *Xanthomonas* tak u houby *F. circinatum*. Rozsáhlejší testování dalších rajčat, paprik a borovic je předmětem plánovaných projektů. Screening a typizace lokalit vzorků je náročná jak časově tak finančně.



Zápis obhajoba DSP

Ing. Dagmar Stehlíková

13.11.2019

Zahájení – prof. Pokorný, představení komise a studentky, představil CV, publikační aktivitu, řešené projekty

D. Stehlíková - představení tématu DSP a průběhu řešení DSP, dosažené výsledky

Oponenti – doc. Baránek, Ing. Dvořák, prof. Koutný – přednesli posudky, vyzdvihli aktuálnost tématu, nové metody použité v práci, význam pro praxi, vědecký význam práce, přednesli připomínky a dotazy a doporučili práci k obhajobě

D. Stehlíková – odpověděla na dotazy a připomínky oponentů, odpovědi byly vyčerpávající

Rozprava k DDP:

prof. Pokorný – jak funguje metoda LAMP v terénu, požadavky na izolaci DNA, kvalitu a čistotu DNA, jaké techniky izolace DNA se používají

doc. Vejl – kolik vzorků lze zároveň analyzovat na mobilní, terénní, platformě, citlivost metody, jaký je požadavek na templátovou DNA, kolik sad primerů se musí navrhnout a jaká je úspěšnost výběru vhodné primerové sady, možnosti detekce živočišných parazitů

doc. Vyhnánek – jak probíhala detekce patogenů v terénu

Ing Žabka – výskyt *F. circinatum* v ČR

doktorandka zodpověděla na všechny položené dotazy, komise konstatovala, že byla schopna reagovat na dotazy a odpovědi byly v pořádku

13.11. 2019
V.S.