

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. Lucie LÍSKOVCOVÁ
Narozen(a): 6. 2. 1988 v Českých Budějovicích
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Kombinovaná
Školící pracoviště: KZVE ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 18. 5. 2017, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Asociační analýza genů ovlivňujících kvalitu masa skotu

Výsledek obhajoby:

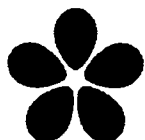
Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. Ing. Mgr. Ivan Majzlík, CSc.; ČZU v Praze	
Členové:	prof. Ing. Václav Řehout, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Karel Košvanec, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Karel Mach, CSc.; ČZU v Praze (oponent)	
	doc. Ing. Jarmila Voříšková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.; ČZU v Praze (oponent)	
	doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
Školitel:	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; 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. Lucie LÍSKOVCOVÁ
Narozen(a): 6. 2. 1988 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

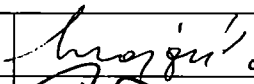
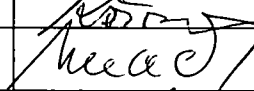
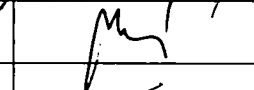
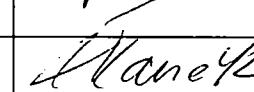
kladných: 6

záporných: 0

počet neplatných hlasů: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. Ing. Mgr. Ivan Majzlík, CSc.; ČZU v Praze	
Členové:	prof. Ing. Václav Řehout, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Karel Košvanec, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Karel Mach, CSc.; ČZU v Praze (oponent)	
	doc. Ing. Jarmila Voříšková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.; ČZU v Praze (oponent)	
	doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	

Errata

Oprava chyb disertační práce

Asociační analýza genů ovlivňujících kvalitu masa skotu

1.) Str. 17 – typografické pochybení týkající se %:

Jalovice dosahují o 10 – 30 % nižší intenzity růstu než býci.; Za nízké dědivé znaky se označuje většina fitness znaků pohybující se v rozmezí 2 – 15 %.; Za znak s dobrou dědivostí je považována mléčná užitkovost pohybující se na úrovni 30 % a více, masná užitkovost 20 – 40 %.

2.) Str. 52 – typografické pochybení týkající se %:

Byla provedena na 2,5% agarózovém gelu.; K rozdělení došlo na 3,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem při době trvání elektroforézy cca 2 hod.

3.) Str. 59, 61, 62, 63, 64, 67, 70, 72 - Ve všech tabulkách je uvedena hodnota průměrného nejmenšího čtverce a střední chyba průměru. SAS popisuje lineární modely pomocí LSM a středních chyb průměru (standard error – SE).

4.) Str. 50 – Lineární rovnice: Rovnice pro model, v němž byly zohledněny genotypy *CAPN* a *CAST* s opakováním a bez opakování byla následující:

$$Y_{ijklmnop} = \mu + CAPN_i * CAST_j + MSTN_k + MYF5_l + jatky_m + PP_n + chov_o + e_{ijklmnop}$$

5.) Chybějící citace v seznamu literatury:

Weller J.I., Glick G., Ezra E., Zeron Y., Seroussi E., Ron M. (2010). Paternity validation and estimation of genotyping error rate for the BovineSNP50 BeadChip. *Animal Genetics*.

Kučera J. (2006). Vývoj a současná situace chovu skotu v České republice, Council Meeting WSFF 2007 Czech Republic, Sborník referátů, Svaz chovatelů českého strakatého skotu, 2006, s. 63-66.

Schenkel et al. (2006). – jedná se pouze o překlep

Ing. Lucie Lískovcová

České Budějovice 13 . 5. 2017

Dotazy doc. Ing. Karel Mach, CSc.

1) Korelační koeficienty mezi jednotlivými ukazateli kvality masa v 1., 14. a 28. dni *post mortem*. Dotaz: jedná se o korelace fenotypové (r_P), genetické (r_G), případně prostřed'ové (r_E)?

Odpověď:

Fenotypové korelace – byly vypočteny na základě výsledků užítkovosti (korelace užítkovosti).

2) Korelační koeficienty mezi jednotlivými ukazateli kvality masa v 1., 14. a 28. dni *post mortem*. Stejný dotaz (připomínka), jako u předchozího bodu. Je třeba zdůraznit, zejména pokud by se jednalo koeficienty genetické korelace, jejich přínos při selekci na jednotlivé ukazatele masné užítkovosti.

Odpověď:

Jedná se o fenotypové korelace.

3) Studium interakce mezi všemi čtyřmi analyzovanými geny (polymorfními typy), jatkami, plemenem a chovem na jedné straně a délkou zrání na straně druhé. Jedná se o přínosné výsledky ve směru propojení poznatků molekulární genetiky a klasického posuzování vybraných vlivů na masnou užítkovost – konkrétně na jeden z ukazatelů kvality masa.

4) Vliv interakce mezi genotypy v genu *CAPN* x *CAST* na jednotlivé ukazatele kvality masa.

5) Vliv interakce mezi genotypy *CAST*, *CAPN* a délkou zrání na jednotlivé ukazatele kvality masa. Dotaz: vliv interakce (tento a dva předchozí body) je posuzován na základě výpočtu koeficientu korelace?

Odpověď:

Vliv interakce je posuzován na základě výsledků v GLM, kdy interakce *CAPN* a *CAST* byla zařazena jako jeden z efektů do modelové rovnice. Na základě toho vyšla průkaznost nebo neprůkaznost efektu v modelové rovnici a tedy vliv interakce je buď průkazný nebo neprůkazný.

6) V části „Souhrn“ (3. řádek) autorka uvádí; cituji: „Byl analyzován vliv některých kandidátních genů na kvalitu masa.....“. Nelze tyto analyzované geny, v souladu s dosaženými poznatky, s přihlédnutím k dalším poznatkům uvedených v literárním přehledu, označit za QTL?

Odpověď:

Domnívám se, že lze.

Kandidátní gen, kandidátní fyziologický gen

Je součástí metabolických drah, vedoucích k manifestaci studovaného znaku.

Poziční kandidátní gen

Nachází se v dříve identifikované QTL oblasti.

Kritéria pro jejich výběr:

- 1) znalost funkce genu
- 2) úloha genu ve vývoji dané vlastnosti
- 3) znalosti o vlivu genu na fenotyp u jiných druhů (myš, člověk)
- 4) exprese genu v dané tkáni a to i během vývoje (sval, tuk apod.)
- 5) gen se nachází v blízkosti QTL pro danou vlastnost (poziční kandidátní gen)

Standardy asociační analýzy

- používat práh signifikance pro mnohonásobné testování (viz dále)
- úplně popsat diverzitu haplotypů a strukturu existující ve studované populaci
- opakovat analýzu pozitivní asociace v nezávislé populaci
- zahrnout údaje o resekvenování odlišných haplotypů za účelem identifikace domnělých příčinných mutací

Jinak se často pro vztah mezi genem a užítkovostí dělají předčasné nebo statisticky nepodložené závěry!

7) Závěr práce (s. 86) je značně obecný. Domnívám se, že vliv některých genotypů v analyzovaných lokusech, byl již prokázán. Je možno tuto asociaci, (tento průkazně prokazatelný vztah?) využít ve šlechtění zaměřeného na kvalitativní ukazatele masné užítkovosti skotu? Který z výsledků disertační práce by měl být rozvíjen další výzkumnou činností?

Odpověď:

Studium *MSTN* a *MYF5*.

8) Který z poznatků molekulární genetiky – selekce pomocí markerů (MAS), kandidátních genů, QTL, případně SNP má, podle názoru autorky, perspektivu ve šlechtění hospodářských zvířat, konkrétně skotu a jeho masné užítkovosti? Dojde v budoucnosti k výraznému poklesu využívání dosavadních šlechtitelských postupů, vycházejících z aplikace poznatků populační genetiky?

Odpověď:

Rozvíjet a aplikovat GS. U mléčné už. již běžně používána, zvl. u holštýna. To zvl. souvisí se strukturou populace, která je početně velká, ale geneticky malá, má nízkou N_e (Efektivní velikost populace). U kombinovaných plemen je aplikace GS obtížnější. Zejména komplikovaná je u masných plemen, kterých je mnoho a každé z nich má větší N_e než holštýn.

Dotazy prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

1) Proč byly vybrány právě tyto polymorfizmy? Byly popsány před více než 10 lety a byly určité již dostatečně analyzovány. Nejsou v těchto genech popsány novější polymorfizmy?

Odpověď:

Mnoho autoru hodnotilo pouze geny zvlášť. Vliv všech těchto 4 kandidátních genů s vlivem na kvalitu masa nebyl v žádné práci doposud hodnocen. Práce je součástí rozsáhlejšího výzkumu, který zahrnoval více lokusů, s ohledem na rozsah DDP byly vybrány tyto.

2) Jaký byl důvod používat programy jako MS Excel, Statistica a SAS pro statistické hodnocení, když by stačil pouze jeden (např. SAS)? Navíc MS Excel není statistický program a nepoužívá se ve vědeckých pracích pro jakékoliv hodnocení.

Odpověď:

MS Excel byl použit již na začátku, pro zpracování základních statistik min., max. hodnot, výpočtu směrodatné odchylky. Program statistika pro výpočet HW-rovnováhy a. Program SAS byl k hodnocení pomocí GLM.

3) V metodice u některých modelových rovnic je zahrnut efekt otce, v popisu je uvedeno 135+. Znamená to, že bylo použito 135 otců? Pokud ano, měl se efekt otce použít jako náhodný efekt (což v GLM proceduře SASu lze nastavit). Popř. měla být použita přímo procedura MLM pro smíšené modely.

Odpověď:

Připomínka je správná.

4) Rovněž v některých modelech je uveden efekt *hmotnosti JOT*. Z popisu rovnice opět není jasné, zda se jedná o proměnnou nebo pevný faktor. Pokud se jedná o proměnnou, je zahrnuta do modelové rovnice jako regrese? Pokud jako pevný faktor, kolik úrovní (vyjádřené pravděpodobně v intervalech) má?

Odpověď:

Je tam jako regrese (tedy není v kategoriích, ale jako spojitá proměnná).

5) V kapitole Výsledky nejsou výsledky χ^2 testu podrobněji okomentované a u polymorfizmů v genech *MSTN* a *MYF5* zcela chybí. Co tedy výsledky o HW rovnováze vypovídají o populaci býků?

Odpověď:

Pokud je populace v nerovnováze může to ukazovat na nepřímou selekci. Dále se zde mohou uplatnit náhodné vlivy a nebo, že rovnováha nebyla dosud pro krátkou dobu nastolena.

6) Jakou metodou byly počítány korelace? Není uvedeno v metodice. Rovněž v metodice nejsou uvedeny modelové rovnice pro výpočty interakcí mezi geny *CAPN* a *CAST*.

Odpověď:

PROC CORR – v SASu (procedura v rámci balíčku SAS).

Modelová rovnice je uvedena na str. 50 DDP

Rovnice pro model, v němž byly zohledněny genotypy *CAPN* a *CAST* s opakováním a bez opakování byla následující:

$$\blacktriangleright Y_{ijklmnop} = \mu + CAPN_i * CAST_j + MSTN_k + MYF5_l + jatky_m + PP_n + chov_o + e_{ijklmnop}$$

7) Jaký způsob využití studovaných genetických markerů byste pro šlechtění doporučila? Naznačujete přímé využití znalosti genotypů k selekci. Má tento způsob MAS v dnešní době genomických selekcí opodstatnění? Byl by zájem šlechtitelských firem a svazů chovatelů?

Odpověď:

Odkázala bych se na otázku od doc. Macha č. 8.

Je žádoucí sledovat geny s velkým účinkem.

8) Proč tyto původní výsledky nebyly publikovány v časopisu (s impakt faktorem)? Publikaci popisující výsledky uváděné v této disertační práci jsem nenašel v seznamu publikovaných prací (což je podmínkou VŠ zákona a opatření děkana ZF JU č. 17/2010)?

Odpověď:

Daí jsou připravována na publikaci. Dosud jsem publikovala 3 práce s IF.

Dotazy doc. Ing. Jarmila Voříšková, Ph.D.

1) Kapitola Materiál a metodika... Pro přehlednost by autorka při obhajobě mohla uvést, jak ona sama se podílela na této činnosti.

Odpověď:

- Příjem vzorků.

- Izolace DNA.
- Genotypizace.
- Vyhodnocení.

2) V textu citování autoři nejsou uvedeni v Seznamu literatury to Weller et al. (2010), Kučera (2006), Schenkel et al. (2007)

Doplnění:

Weller J.I., Glick G., Ezra E., Zeron Y., Seroussi E., Ron M. (2010) Paternity validation and estimation of genotyping error rate for the Bovine SNP50 BeadChip. Animal Genetics.

Kučera J. (2006). Vývoj a současná situace chovu skotu v České republice, Council Meeting WSFF 2007 Czech Republic, Sborník referátů, Svaz chovatelů českého strakatého skotu, 2006, s. 63-66.

Schenkel et al. (2006). – jedná se pouze o překlep

3) V kapitole Materiál a metodika je uveden rozsah získání podkladových dat za roky 2009 až 2013 (s. 41) a následně pak 2007 až 2013 (s. 43)

Odpověď:

Jedná se o data z let 2009 - 2013.

4) Autorka by mohla uvést svůj názor na to, proč se ve světě autoři nevěnují problematice lokusů calpastatinu, myostatinu a MYF5u populací skotu ve vztahu k chemickému složení masa (s. 61)

Odpověď:

Pro spotř. je hlavní křehkost, vaznost, zřejmě proto se jim věnuje větší pozornost.

- chemické složení masa je ovlivněno zejména kvalitou krmné dávky

5) Jaký význam a vztah k ostatním ukazatelům hrála teplota, která nebyla v práci u žádných vztahů komentována (s. 64, 67, 70 a 72)

Odpověď:

- pH metr má teplotní sondu a současně měří teplotu a pH najednou, měřicí přístroj to umí částečně kompenzovat, aby se měřilo správně.
- teplotní ukazatel je významný při zjišťování pH masa, kdy je nezbytnou součástí dosažených výsledků měření, koriguje správnost výsledků měření
- při procesu zrání je také doplňujícím ukazatelem dodržování podmínek pro zrání masa
- jeho uvedení ve výsledných tabulkách je dokladem správnosti postupu řešení

6) U řady hodnocení uvádíte, že nejsou dostupní autoři, kteří se zabývali obdobným tématem. Proč si myslíte, jaký je váš názor, že je malá pozornost ve výzkumu zaměřena na tuto problematiku (otázka finančního zatížení, dostupnost, nebo?)

Odpověď:

Pracná, zdlouhavá a finančně náročná analýza. Nutnost opakované analýzy kand. lokusů.

- u sledovaných kandidátních lokusů nebyl prokázán významný vztah ke sledovaným ukazatelům
- malá možnost genetického ovlivnění sledovaných ukazatelů

Nyní jsou možnosti GS, NGS, ...

7) Které další markry je podle Vás možné využít při šlechtění skotu na masnou užitkovost?

Odpověď:

LEP, GH, GHR, PIT1, FASN, DGAT1,

Customer čipy umožňují zařadit SNP v kandidátních lokusech, to by umožnilo tyto majorgeny analyzovat v rámci programů genomové selekce.

8) Na základě získaných obsáhlých poznatků za dobu studia by autorka mohla naznačit jakým procentem (v jednotkách, desítkách) by se genotypizace mohla promítnout na zlepšení výsledků masné užitkovosti (kvality masa) u populace českého strakatého skotu.

Odpověď:

První otázkou je heritabilita dané vlastnosti, ty se liší. Z ní lze pomocí asociační analýzy vysvětlit část. GS slibuje komplexnější přístup. Problém vyžaduje soustředěnou pozornost.

Z genetické proměnlivosti by se mohlo jednat řádově o desítky procent.

Diskuze:

- 1.) prof. Ing. Václav Řehout, CSc. - genetická rovnováha na co to ukazuje?

Odpověď: Pokud je populace v genetické nerovnováze může to ukazovat na nepřímou selekci. Dále se zde mohou uplatit náhodné vlivy nebo, že rovnováha doposud nebyla nastavena.

- 2.) doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc. - kdy se zjišťovala teplota a pH masa? Jakým způsobem se maso skladovalo?

Odpověď: - pH metr má teplotní sondu a současně měří teplotu a pH najednou, měřicí přístroj to umí částečně kompenzovat, aby se měřilo správně.

- teplotní ukazatel je významný při zjišťování pH masa, kdy je nezbytnou součástí dosažených výsledků měření, koriguje správnost výsledků měření

- při procesu zrání je také doplňujícím ukazatelem dodržování podmínek pro zrání masa

- jeho uvedení ve výsledných tabulkách je dokladem správnosti postupu řešení

- maso bylo skladováno při 2 - 4 °C při 80 % vlhkosti vakuově zabalené v chladničce

- 3.) doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc. - lze zjistit genotyp ze živých zvířat?

Odpověď: - Ano, lze. Z krve, když přijde veterinář.

- 4.) doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc. – Jak je finančně náročné udělat analýzu u genů?

Odpověď: cena jednoho vyizolovaného vzorku - DNA se pohybuje kolem 100,-, dále je zapotřebí chemikálií na PCR, RFLP, přístroje, ...

- 5.) doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc. – Uvádíte jatka jako jeden z faktorů, jakým způsobem mohli 3 jatka ovlivnit výsledky?

Odpověď: zacházení se zvířaty na jatkách je důležitý faktor, z pohledu, že zvíře je vystavováno stresu. Zacházení se zvířaty je důležité, protože stres před porážkou se podepisuje na kvalitě masa. Způsob naskladnění považuji za důležitý, jako objektivní ukazatel.

- 6.) doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc. - Jakým způsobem to uplatit v chovu? V čem to bude mít negativní dopad? Jaký holštýn na rozdíl od českéhostrakatého skotu?

Odpověď: U mléčné užitkovosti je již běžně používána GS, zvl. u holštýna. To zvláště souvisí se strukturou populace, která je početně velká, ale geneticky malá, má nízkou N_e (Efektivní velikost populace). U kombinovaných plemen je aplikace GS obtížnější. Zejména komplikovaná je u masných plemen, kterých je mnoho a každé z nich má větší N_e než holštýn.

7.) doc. Ing. Karel Mach, CSc. – Jak je šlechtěn holštýn?

Odpověď: U holštýna už došlo ke křížení jedinců mezi sebou a byl dosažen požadovaný chovný cíl.

8.) doc. Ing. Majzlík, CSc. – 28. den zrání je skutečně nejlepší?

Odpověď: Ano. S přibývajícím délkou zrání hovězí maso křehne.

9.) doc. Ing. Majzlík, CSc. – 3 způsoby izolace DNA – jak kvalitní DNA je z které metody?

Odpověď: nejkvalitnější a nejčistější byla z automatického izolátoru nukleových kyselin od KRD. Nejméně čistá byla z klasické chloroformové izolace.

10.) doc. Ing. Jarmila Voříšková, Ph.D. - myostatin, jaký má tento gen negativní dopad?

Jsou nějaké problémy se dvojím osvalením?

Odpověď: Problém jsou spojené s porody. Zvířata ještě nenarozená mají dvojí osvalení a jsou proto velká, není možné je rodit normálně, ale jsou rozeny císařskými řezy. Císařský řez je finančně náročný a kráva ho nemůže podstupovat stále.

