

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. Irena HOŠTIČKOVÁ
Narozen(a): 1. 6. 1989 v Písku
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 25. 4. 2019, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Analýza genů indukovaných abiotickým stresem u řepky

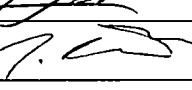
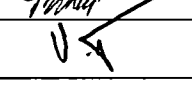
Výsledek obhajoby:

Prospěl (a) 

Neprospěl (a)

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 (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejř, ČZU v Praze, FAPPZ	
	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. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavlína Smutná; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých 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. Irena HOŠTIČKOVÁ
Narozen(a): 1. 6. 1989 v Písku

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

Výsledek hlasování:

Počet členů komise:

9

počet přítomných členů komise:

9

počet platných hlasů:

9

kladných:

9

záporných:

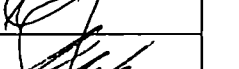
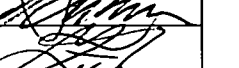
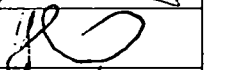
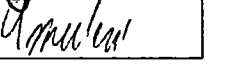
0

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 (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavel Vejř, ČZU v Praze, FAPPZ	
	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. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
	doc. Dr. Ing. Pavlína Smutná; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	

Ing. Irena Hoštičková – Odpovědi na otázky oponentů disertační práce

doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

- **Otázka:** Rozdíl v terminologii „polyploid“ vs. „amfidiploid“
- **Odpověď:** Polyploid je jedinec, který má v genomu více sad chromozomů (stejných nebo různých). Při křížení dvou druhů s odlišným počtem chromozomů vzniká sterilní hybrid, jeho polyploidizací pak vzniká fertilní amfidiploid (jedinec, který má dvě sady chromozomů od jednoho rodiče a dvě sady chromozomů od druhého rodiče a má obnovenou fertilitu).
- **Otázka:** Který patogen je původcem fómového černání stonku, je správná formulace na str. 14 „... je šlechtění na odolnost k fómovému černání stonku, neboť existuje mnoho ras tohoto patogena...“.
- **Odpověď:** Původcem onemocnění je houba *Leptosphaeria maculans* (teleom.) / *Phoma lingam* (anam.). Odolnost rostlin k tomuto patogenu může být rasově specifická (tzv. kvalitativní) nebo nespecifická (kvantitativní). V odborném textu se používá označení „rasa“ (angl. race), které může být zaměněno také za slovo „patotyp“. Fómové černání stonku je onemocnění, nikoliv patogen, ve větě by mělo být uvedeno, že existuje mnoho ras původce tohoto onemocnění.
- **Otázka:** Je možné uvést rozdělení genotypů před zahájením experimentu vzhledem ke sledovanému faktoru v rámci experimentu B?
- **Odpověď:** Genotypy použité v experimentu B byly vybrány na základě transkriptomické analýzy (O. Hejna). Podle jeho hypotézy měly tyto genotypy mít odlišnou míru exprese genu *ERD10* v reakci na stres chladem. Tato hypotéza nebyla po provedení analýzy RT-PCR potvrzena, ale u genotypů byla pozorována odlišná dynamika akumulace proteinu ERD10. Proto byly tyto genotypy využity právě v experimentu, při kterém byla analyzována exprese různých homologů genu *ERD10* a dalších genů, které jsou pravděpodobně zapojeny v signálních drahách reakce na chlad a které byly také vytipovány na základě analýzy transkriptomu.
- **Otázka:** Je složení média použitého v experimentu „C“ uvedeno v práci Verslues et al. (2006)? Pokud ne, je možné ho uvést?
- **Odpověď:** V práci Verslues et al. (2006) není uvedeno přesné složení média, je uveden způsob použití PEG pro simulaci osmotického stresu a vlastní médium je zde uvedeno pouze obecně - vzhledem k odlišným nárokům různých druhů rostlin není možné použít vždy stejné médium. Experiment zmíněný v mé disertační práci prováděl kolega Urban (VÚRV, v.v.i.), já prováděla analýzu exprese vybraných genů. Přesné složení média je uvedeno v připravovaném rukopisu.

- **Otázka:** Mohla by doktorandka charakterizovat a doporučit jiné metody, které by mohly být použité pro srovnání dosažených výsledků, resp. validaci metody?
- **Odpověď:** Metoda bude validována pomocí metody Western blot. Bude použit purifikovaný protein ověřený pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky experimentu zmíněného v disertační práci budou poté publikovány. K validaci by také mohla být použita metoda ELISA.
- **Otázka:** Jsou někde dostupné výsledky analýzy MALDI-TOF/TOF využité k výběru genů?
- **Odpověď:** Tyto výsledky nejsou v současné době nikde dostupné. Budou zveřejněny v připravovaném rukopisu.
- **Otázka:** Mohla by doktorandka uvést příklad metodiky studia nějaké vhodné kombinace stresových faktorů pro její modelovou rostlinu?
- **Odpověď:** Vhodná kombinace stresových faktorů řepky by bylo např. kombinace stresu suchem a zároveň vysokou teplotou či ozářeností, či kombinace chladu a sucha, případně chladu a vysokou ozářeností. Tyto kombinace stresových faktorů odpovídají reálným stresovým podmínkám, které působí na rostliny v průběhu suchého horkého léta, či suché zimy bez sněhové pokrývky.

doc. Ing. František Hnilička, Ph.D.

- **Otázka:** Jaký je rozdíl mezi termínem „stresor“ a „stres“
- **Odpověď:** Stresor je faktor, který na organismus působí, stres je stav, ve kterém se organismus nachází.
- **Otázka:** Tzv. osmoprotektanty - můžete uvést některé příklady těchto látek?
- **Odpověď:** Jedná se o osmoticky aktivní látky, např. rafinóza, stachyóza, trehalóza, sacharóza, fruktany, cukerné alkoholy (galaktinol), alkoholy (pinitol, ononitol, glycerol, manitol), aminokyseliny (prolin, asparagin).
- **Otázka:** Doplnění použitých statistických metod
- **Odpověď:** Získané hodnoty byly testovány pomocí analýzy variance, prováděné v prostředí Statistica, verze 12, společnosti StatSoft.
- **Otázka:** Str. 35 „U obou odrůd Cadeli došlo po 24 hodinách...“ Nejedná se o varianty?
- **Odpověď:** Věta je napsána chybně, správně měla být napsána: „U obou odrůd Cadeli i Navajo došlo po 24 hodinách v chladu k 17násobnému zvýšení exprese“

- **Otázka:** Dá se ze získaných výsledků u sledovaných genotypů řepky stanovit nějaký trend či závislost, která by byla využitelná v rámci dalšího šlechtění či výběru šlechtitelského materiálu?
- **Odpověď:** Ano, využitelné je hodnocení akumulace proteinu pomocí metody SPR a tento postup by mohl být použit při hodnocení a výběru šlechtitelských materiálů. V současné době se snažíme tuto metodu optimalizovat do podoby skríninkového testu pro šlechtitele. Akumulace proteinů se jeví jako vhodnější marker než hodnocení samotné exprese genů, nicméně je potřeba vzít v úvahu dynamiku akumulace konkrétního proteinu.
- **Otázka:** Uplatnění výsledků v praxi
- **Odpověď:**
 - V rámci disertační práce byla optimalizována metoda SPR, jako vhodná metoda pro studium akumulace některých stresových proteinů v pletivech rostlin. Akumulace proteinu ERD10 byla navržena jako marker pro výběr genotypů s odlišnou reakcí na stres chladem a metoda SPR jako vhodná metoda pro skrínink většího množství genotypů.
 - Exprese genu pro peroxiredoxin antioxidantu stanovená pomocí metody RT-qPCR byla navržena jako potenciální marker pro výběr genotypů, které mohou být odolnější stresu suchem.
- **Otázka:** Jaký je vztah mezi dehydrinami a odolností vůči nízkým teplotám?
- **Odpověď:** Akumulace dehydrinů je pravděpodobně hlavní fyziologickou odpovědí na stres chladem. Tyto proteiny fungují jako chaperony, které interagují s jinými proteiny, nukleovými kyselinami či membránami a zabraňují tak jejich denaturaci vlivem dehydratace.
- **Otázka:** Jakým způsobem dochází k vymrzání porostů v důsledku nedostatku sněhu?
- **Odpověď:** Sníh pokrývající rostliny či povrch půdy působí jako izolant. V případě, že po aklimaci dojde k opětovnému zvýšení teploty, rostliny mohou svoji odolnost ztratit a dochází tak k vymrzání porostů. Dalším efektem absence sněhové pokrývky je výraznější kolísání denní noční teploty a případný fotooxidativní stres při slunečném počasí.

doc. Dr. Ing. Pavlína Smutná

- **Otázka:** Je možné u takto koncipovaného experimentu (A) usuzovat něco o dynamice akumulace výše zmíněného proteinu, případně jeho efektu na průběh stresové reakce?
- **Odpověď:** Jak zmiňuji i ve své práci, porovnávání výsledků proteomických a expresních analýz je složité. Hlavním důvodem je právě rozdíl v rychlosti reakce na úrovni genu (exprese genů se mění řádově během hodin po začátku stresu) a na úrovni proteinu (rozdíl v akumulaci je pozorovatelný řádově během týdnů). Úroveň exprese genu se velmi rychle mění a v průběhu stresu kolísá, i proto není podle mého názoru vhodným markerem pro skrínink či selekci

genotypů. Naproti tomu akumulace proteinu je dlouhodobější. Navíc změřená vysoká exprese genu nemusí znamenat, že se podle transkriptů opravdu vyrobí protein a že tento protein nebude degradován.

- **Otázka:** Experiment B - nesoulad mezi dobou působení stresu pro stanovení akumulace proteinu (34 a 50 dní) a termíny odběru vzorků pro hodnocení aktivity genů (6 dní)
- **Odpověď:** Změna genové exprese je pozorovatelná v rámci několika hodin až dní po začátku působení stresu na rostlinu. Změna akumulace proteinu je pozorovatelná dny až týdny po začátku stresu podle použité metody. Z výsledků experimentu B vyplývá, že množství proteinu ERD10 v listech rostlin před začátkem stresu ovlivňuje jeho akumulaci v průběhu stresu chladem. Čím více je tento protein akumulován v podmínkách příznivých, tím méně ochotně ho rostlina akumuluje v průběhu stresu. Šestý den po začátku stresu není měřitelný rozdíl v akumulaci proteinu mezi kontrolními a stresovanými rostlinami a zároveň 50tý den stresu není rozdíl v expresi genu mezi stresovanými a kontrolními rostlinami.
- **Otázka:** Hodnoty relativní akumulace proteinu se u kontrolních rostlin v experimentech A a B výrazně liší (obr. 9 a 10). Prosím o vysvětlení tohoto rozdílu.
- **Odpověď:** Jedná se o relativní hodnoty. Rozptyl hodnot je tedy ovlivněn hodnotou vzorku, který se použije při výpočtu jako kalibrátor. Pro porovnávání jednotlivých experimentů mezi sebou by musel být změřen i standardizovaný vzorek, podle kterého by byly hodnoty přepočteny. Vzhledem k časovému odstupu mezi jednotlivými experimenty toto není možné.
- **Otázka:** Jednotlivé genotypy nejsou v práci popsány a ani není zřejmé, jak se od sebe fenotypově liší.
- **Odpověď:**
 - Genotypy pro experiment A byly vybrány na základě zkušeností a doporučení šlechtitelů.
 - Genotypy použité v experimentu B byly vybrány na základě transkriptomické analýzy (O. Hejna). Podle jeho hypotézy měly tyto genotypy mít odlišnou míru exprese genu *ERD10* v reakci na stres chladem. Tato hypotéza nebyla po provedení analýzy RT-PCR potvrzena, ale u genotypů byla pozorována odlišná dynamika akumulace proteinu ERD10. Proto byly tyto genotypy využity právě v experimentu, při kterém byla analyzována exprese různých homologů genu *ERD10* a dalších genů, které jsou pravděpodobně zapojeny v signálních drahách reakce na chlad a které byly také vytipovány na základě analýzy transkriptomu. Jejich fenotypový projev je předmětem současného zkoumání a bude součástí připravovaného manuskriptu.
 - Experiment C prováděl kolega Urban (VÚRV, v.v.i.), výběr genotypů byl v jeho režii.

- **Otázka:** Upřesnění metodiky z hlediska statistického hodnocení jednotlivých experimentů.
- **Odpověď:** Získané hodnoty byly testovány pomocí analýzy variance, prováděné v prostředí Statistica, verze 12, společnosti StatSoft.
- **Otázka:** Korelace výsledků transkriptomických a proteomických analýz, ověření použitelnosti metody SPR na rozsáhlejší souboru genotypů, porovnání s fenotypem.
- **Odpověď:** V rámci dizertační práce bylo testováno jen několik genotypů, bylo odebráno více vzorků od každého genotypu v průběhu stresu. Optimalizace vlastní selekční metody však vyžaduje ještě další testování většího souboru genotypů a samozřejmě je porovnávání s fenotypem. Předpokládám, že v rámci selekce by se netestovalo tolik vzorků od každého genotypu.

Zápis z průběhu obhajob doktorských disertačních prací – OR Zemědělské biotechnologie

Irena Hoštičková

25.4.2019

Zahájení – prof. Pokorný, představení komise a disertantky, CV, publikace, granty

I. Hoštičková – prezentace výsledků disertační práce

posudky oponentů:

1. doc. Hnilička
2. doc. Vyhnánek
3. doc. Smutná

odpovědi na posudky oponentů:

- doc. Hnilička – otázky a dotazy oponenta zodpovězeny
- doc. Vyhnánek – zodpovězeno, data z analýzy proteinů jsou připravena k publikaci, zatím nejsou dostupná
- doc. Smutná – další doplňující dotazy na statistické zpracování dat, diskuse ke statistickým metodám a přístupům

vědecká rozprava:

- doc. Vejl – data z RT-PCR byla vyřazována na základě hodnoty s, nebylo by lepší použít parametr VK?
- doc. Řepková – v prezentaci nebyly uvedeny cíle a hypotéza práce
- doc. Řepková – existuje korelace mezi transkriptomem a proteomem?
- doc. Řepková – sledování relativní exprese – jaký byl použit referenční gen a byl spolehlivý?
- doc. Vejl – statistické zpracování – jaký byl rozdíl mezi biologickými replikáty
- doc. Vejl – byla stejná eficeience u sledovaných genů a aktinu?
- doc. Vyhnánek – pro RT byly odebírány 4 listy, jaké byly navážky
- doc. Řepková – jak byla stanovena integrita RNA?
- doc. Smutná – jaká byla cena stanovení proteinu pomocí SPR
- prof. Pokorný – ve které fázi vývoje řepky se sledovaly rostliny? , proč se ztrácí schopnost tolerance vůči stresu, jaký je rozdíl mezi vymrzáním a vyzimováním

disertantka zodpověděla na všechny dotazy, členové komise i oponenti vyslovili souhlas s úrovní odpovědí, do disertace bude vložen opravný list – doplněna chybějící citace

prof. Pokorný – zhodnocení průběhu obhajoby, hlasování