

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Téma:	Charakteristika genetické struktury populací parazitoida mšic <i>Lysiphlebus fabarum</i> použitím molekulárních markerů.
Autorka:	Ing. Kamila Štrymplová Šťastná
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, PhD.
Studijní obor:	Ochrana rostlin

Doktorská disertační práce Ing. Štrymplové Šťastné je ve finální oponované verzi zpracována v rozsahu 68 stran textu. Doktorská práce je členěna do 9 kapitol, přičemž rozsahem největší podíl zaujímají kapitoly 3 (literární přehled - 16 stran) a 5 (výsledky - 21 stran).

V souladu se základní hypotézou vymezenou názvem DP je formulováno 6 základních cílů (viz kapitola 2/str. 7), které obsahově oscilují od základních otázek metodického charakteru, až po cíle orientované na problematiku mezidruhové a vnitrodruhové genetické charakterizace parazitoidů rodu *Lysiphlebus*, s důrazem na druh *L. fabarum*. V tomto kontextu je nutné upozornit na skutečnost, že stanovené cíle DP jsou definovány v rozsahu širším, než je dáno názvem DP, ve kterém je explicitně uveden výhradně druh *Lysiphlebus fabarum*, což navozuje představu, že se doktorský projekt bude věnovat výhradně otázkám intraspecifických charakteristik tohoto druhu. Nicméně, zařazení a realizace, byť jen dílčí studie zahrnující též druhy *L. cardui* a *L. confusus* je logické, protože zvyšuje možnosti v oblasti interpretace a případného zobecnování výsledků, a zároveň deklaruje obecnější použitelnost klíčových metodických postupů.

Úvod (kapitola 1) a literární přehled (kapitola 3):

Z ne zcela jasných důvodů bývá úvod do doktorských prací často podceňován a výjimkou není ani DP Ing. Štrymplové Šťastné. Na relativně malém prostoru (necelá strana textu) je jinak nesporně zajímavý projekt uveden několika obecnými, často diskutabilními formulacemi, a to včetně značných terminologických nedostatků (viz poznámky v oponovaném výtisku DP).

Literární přehled prokazuje schopnost autorky pracovat s odbornou literaturou a rozmanitými informačními zdroji. Kapitola je členěna na dva základní okruhy informací: a) Charakteristiky parazitoidů mšic a b) Detekce biologické diverzity genetickými markery. Při porovnání obou tematických okruhů je zřejmá terminologická a formulační nevyrovnanost naznačující, že autorka je lépe vybavena pro „molekulárně genetickou“ část svého doktorského projektu. V první části jsou referovány obecné i zcela specifické informace týkající se parazitoidů mšic a jejich interakcí s hostiteli, včetně aspektů souvisejících s geografickým rozšířením a šířením parazitoidů, mechanismů souvisejících s cílovým interakčním systémem „hostitel – parazitoid“ a vybraných aspektů populační dynamiky parazitoidů mšic. Druhá tematická oblast rešeršně je převážně zaměřena na principy a praktické aspekty metod využívaných pro genetické markerování, zejména pak technik z okruhu PCR RAPD a mikrosatelitních markerů DNA – SSR, s mírným důrazem na zvolený experimentální objekt – parazitoidy mšic. K této kapitole mám několik formálních poznámek a dotazů:

1. V rešerši postrádám pasáž týkající se základních morfologických charakteristik rodu *Lysiphlebus*, která by logicky navodila význam celé studie a obecnou potřebu molekulárně genetických markerů. Identifikace *L. fabarum* pomocí klasických diagnostických postupů vyžaduje velké zkušenosti a i tak panuje názor, že *L. fabarum* je pravděpodobně zastoupen skupinou více druhů lišících se spíše vztahem k hostitelům než relevantními morfologickými znaky. Logicky se tedy navozuje otázka „... jak byla prováděna identifikace druhů při odběrech na lokalitách?“.
2. Podkapitola 3. 1. je zatížena řadou formálních i obsahových nedostatků, slangových výrazů, sporných formulací a gramatických chyb, včetně toho, že obsah jednotlivých paragrafů neodpovídá jejich názvu. Z celkové úrovně je zřejmé, že autorka nemá zcela zažitou terminologii z oblasti obecné a aplikované entomologie, což úroveň jinak poměrně dobře strukturované a koncipované rešerše zbytečně degraduje.
3. Podkapitola 3. 2. je koncipována převážně v obecné rovině a je orientována na obecné principy metod orientovaných na DNA markery. V celé podkapitole prakticky není konkrétní informace týkající se parazitoida *L. fabarum*, resp. parazitoidů rodu *Lysiphlebus*, a to i přesto, že v obecném kontextu je citována např. publikace Sandrock et al. 2007, která se přímo týká nejen problematiky mikrosatelitů DNA, ale studie je realizována právě na *L. fabarum*.

Materiál a metodika (kapitola 4)

Studie byla realizována na šesti populacích *L. fabarum* (4 populace, 4 lokality, 3 druhy rostlin, 2 druhy hostitelů), *L. cardui* (1) a *L. confusus* (1) odebraných na šesti lokalitách. Dílčí studie zaměřená na vliv hostitele na případný polymorfismus v testované populaci *L. fabarum* byla realizována na dospělých pasážovaných přes *Aphis fabae* (=typický hostitel, resp. po alternaci přes atypického hostitele (1 generace pasážována přes mšici *Diuraphis noxia*). Po odběrech byly populace všech výše uvedených druhů udržovány a namnožovány pomocí udržovacích laboratorních chovů. Genetické studie byly realizovány na dospělých a v obou metodických variantách (PCR RAPD, resp. SSR) byly použity více méně známé postupy. Experimentální schéma odpovídá zadání a cílům DP a v logické posloupnosti jsou řešeny otázky genetických markerů populací všech druhů parazitoidů zastoupených ve studii až po polymorfismus indukovaný odlišným hostitelem. Ani tato kapitola není – zejména v úvodní „entomologické části“ - prostá terminologických nepřesností a gramatických chyb, nicméně je zpracována přehledně a dokladuje metodickou náročnost celé studie. S ohledem na některá konstatování v dalších částech DP mám k této části následující dotaz:

1. Pro analýzy byli použiti dospělci namnožení pomocí laboratorního chovu, převážně na standardním hostiteli, mšici *Aphis fabae*. Lze upřesnit manipulaci s jednotlivými populacemi v době od odběru na vybraných lokalitách, do doby jejich využití v analýzách DNA?

Experimentální část a výsledky (kapitola 5)

Výsledky dílčích studií jsou převážně prezentovány v grafické formě s využitím ordinačních diagramů a klastrových analýz, tabulky a verbální komentář doplňují tuto dobře koncipovanou kapitolu. Z formálního hlediska lze této kapitole vytknout zejména prezentaci výsledků klastrových analýz (obr. 4, 7 a 18) a některých ordinačních diagramů (např. obr. 10), protože zvolená velikost prakticky znemožňuje posouzení bez použití lupy a u grafů ani v doprovodném textu není legenda, která by usnadnila orientaci pomocí barevných markerů použitých při tvorbě grafů. Rozsah DP není natolik enormní, aby nebylo možné v práci použít větší, nejlépe celostránkové prezentace těchto klíčových výstupů experimentální činnosti. V kapitole lze zaznamenat též nelogické přerušení číslování tabulek (viz tabulka 4/str. 33 následovaná tabulkou 2/str. 35).

V první části této kapitoly jsou uvedeny informace týkající se (pravděpodobně) optimalizace metodických postupů (např. izolace DNA, postup použitý při analýzách DNA pomocí PCR RAPD a SSR). V logické posloupnosti jsou pak dále prezentovány výsledky z oblasti mezidruhové variability (3 druhy, 3 populace); vnitropopulační variability (čtyři populace *L. fabarum* lišící se původem a z části i hostitelem a hostitelskou rostlinou) a vnitropopulační variabilitou indukovanou pasáží populace *L. fabarum* (populace 078, lokalita Dobrotice, hostitel *A. fabae*) přes odlišné hostitele (verze *Aphis fabae* – *Aphis fabae* a *Diuraphis noxia* – *Aphis fabae*). Ve všech uvedených studiích byl zaznamenán polymorfismus dokladovaný buď klastrováním souvztažných experimentálních entit (druh – populace – pasáž) v jednotlivých kvadrantech PCoA ordinačních diagramů nebo zjevným sdružováním v dendrogramech sestavených pomocí klastrové analýzy v programu DARwin, resp. prezentace barevných prezentací výsledků analýz zpracovaných pomocí programu STRUCTURE.

Ve všech studiích působí přesvědčivěji výsledky prezentující výstupy analýz při použití PCR RAPD. Autorka nejprve provedla výběr vhodných primerů (5 z 80), které následně použila pro rutinní parametrizaci všech experimentálních skupin a variant. Prezentace výsledků ve formě ordinačních diagramů resp. dendrogramů vytvořených klastrovou analýzou v programu DARwin jednoznačně prokazuje význam této metody. Ve všech dílčích studiích se pomocí RAPD analýzy podařilo zřetelně oddělit (=identifikovat) souvztažné skupiny (=druhy, různé populace *L. fabarum*, resp. populace *L. fabarum* lišící se pasáží přes alternující hostitele). Tyto výsledky lze s ohledem na zadání a stanovené cíle DP označit za klíčové. Výsledky srovnávacích analýz využívajících analýzu mikrosatelitů (metoda SSR) mají poněkud menší vypovídací hodnotu. Důvodem je pravděpodobně omezený počet použitých primerů (6 primerových párů z 20 testovaných) a autorka sama těmito studiím opakovaně přiznává pouze orientační informační hodnotu. K této části DP mám následující připomínky a dotazy:

1. S ohledem na další studie se zdá, že interpretaci výsledků úvodní studie zaměřené na možnost využít DNA markery pro identifikaci různých druhů parazitoidů rodu *Lysiphlebus* by prospělo zařazení alespoň dvou různých populací *L. fabarum* (viz též následující dotaz). Lze předpokládat, že v případě, že by do studie byly zařazené dvě populace *L. fabarum*, vykáže klastrová analýza (DARwin) bližší souvztažnost různých populací *L. fabarum*?
2. Analýzy subpopulací *L. fabarum* lišících se různou „historií“ (*A. fabae* versus *D. noxia*) prokázaly významný vliv hostitele na prakticky okamžitou indukci polymorfismu. Jaké je pro tento fenomén vysvětlení, jedná li se o druh rozmnožující se nepohlavně (thelytokie)?

3. Výsledky a analýzy realizované pomocí SSR naznačují možnost přípravy druhově specifických SCAR markerů pro identifikaci druhu *L. cardui*. Lze tento závěr formulovat na základě analýzy jedné populace tohoto druhu a lze obdobně významný metodický prvek očekávat i v případě *L. fabarum*?

Diskuze (6), závěry (7) a seznam použité literatury (9)

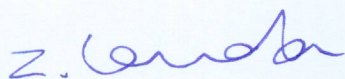
Autorka kvalifikovaně diskutuje nebo komentuje dosažené výsledky a formuluje závěry, které korelují se stanovenými cíli. V diskuzi lze postrádat větší interakci s výsledky publikovanými jinými autory. Například, podkapitoly 6.6. - 6.8 představují pouze osobní komentář bez citačních vazeb. Seznam použité literatury představuje velmi ucelený a rozsáhlý soubor bibliografických záznamů a dokladuje schopnost autorky nejen využívat rozmanité informační zdroje, ale i použít a prakticky aplikovat vhodnou zvyklostní normu pro bibliografické záznamy.

Závěrečné hodnocení:

DP ing. Ing. Štryplové – Šťastné je příkladem interdisciplinární studie, ve které je propojena metodická výbava z oblasti analýzy DNA s dynamickým biologickým modelem. Takto koncipované hypotézy a realizované studie jsou velmi významné, protože jsou zpravidla přínosem pro obě disciplíny. DP ing. Šťastné však tento předpoklad naplnila jen z části. Práci nelze nepřiznat určitý přínos jak v oblasti metodické, tak i v oblasti poznání některých mechanismů z oblasti populační genetiky a nastínění potenciálních možností praktického využívání genetických markerů v diagnostice, a to jak na druhové, tak zejména na úrovni poddruhové (=populace). Nicméně, celá studie působí dojmem nedokončenosti a to zejména ve vztahu k obecné a aplikované entomologii a praktickému rostlinolékařství. Vzhledem k mému odbornému profilu a zaměření si nedovolím hlouběji komentovat přínos v oblasti metodologie a praktické aplikace, nicméně nemohu konstatovat, že výsledky studie na mne působí dojmem spíše promarněné šance. Řečeno jinak, v DP jsou dva známé metodické principy aplikovány na velmi dynamický biologický systém. Pomocí obou metodických principů jsou sice generovány interpretačně zajímavé výstupy či odlišnosti, nicméně jejich vysvětlení a zobecnění je spíše náznakové. Tím není řečeno nebo míněno, že DP nesplňuje obecné požadavky kladené na doktorské práce v oboru Ochrana rostlin. Poznámka je spíše míněna jako upozornění na skutečnost, že interpretace výsledků mezioborových studií je funkční pouze tehdy, je-li inovační a přínosná pro obě zainteresované disciplíny, což v tomto případě – jako reprezentant aplikované entomologie – konstatovat nemohu.

S ohledem na výše uvedené výhrady a připomínky lze doktorskou práci Ing. Štryplové – Šťastné celkově hodnotit jako průměrné dílo, které však i přes veškeré výše uvedené výhrady splňuje základní požadavky na DP v oboru Ochrana rostlin. **Doporučuji** tuto doktorskou práci k obhajobě před příslušnou odbornou komisí.

V Českých Budějovicích dne 6. 2. 2010.



.....
Prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Zlanda@zf.jcu.cz

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Název práce:

Charakteristika genetické struktury populací parazitoida mšic *Lysiphlebus fabarum* použitím molekulárních markerů

Autorka:

Ing. Kamila Štryplová Šťastná (České Budějovice 2009)

Obecné poznámky:

Práce obsahuje výsledky analýz genetické variability jednoho druhu parazitoida mšic dvěma molekulárními metodami. Cílem práce totiž bylo posoudit vhodnost těchto metod pro studium vnitropopulační variability v závislosti na parazitaci nepřírodního hostitelského druhu.

K formální stránce práce lze mít jen velmi málo připomínek. Určitě mi však chybělo, coby čtenáři s již slabším zrakem, v ordinačních diagramech a klastrových analýzách z programu DARwin vysvětlení barevného kódu použitého v obrázcích, protože luštění drobných písmen v grafech nebylo zrovna příjemné. Od tabulky na str. 35 je posunuté číslování tabulek, správně má být vždy o 3 větší (takto se v práci vyskytují tabulky 2, 3 a 4 dvakrát). Stylisticky je práce napsaná dobře, jen poslední dva odstavce na str. 24 by si zasloužily zcela přeformulovat, neboť v předložené podobě je jejich obsah obtížně srozumitelný. Gramatických chyb je skromně, ale když se vyskytnou, stojí zato (cíly, hostitely, studium). Ani anglicismy se téměř nevyskytují (kit místo souprava).

Žádná z molekulárně biologických a statistických metod použitých v této práci nebyla autorkou nově vyvinuta nebo významným způsobem modifikována.

Pro mě překvapivé a na PřF JU neprůchodné je, že žádný výsledek z předkládané práce nebyl publikován v impaktovaném časopise a dokonce ještě ani na žádné konferenci formou plakátového sdělení. V autoreferátu disertační práce autorka sice uvádí dvě práce v impaktovaných časopisech, ale obě publikace se ani v nejmenším nedotýkají tématu předkládané práce a kandidátka v nich navíc nefiguruje ani jednou jako první autorka. A jenom na okraj, kandidátka u dvou posledních grantů uvedených v autoreferátu zcela jistě nefigurovala jako spoluředitelka (tj. spolupříjemce dotace), ale jen jako členka jednoho z řešitelských kolektivů.

Specifické připomínky:

Abstrakt

Abstrakt má dvojjazyčný název, ale je napsán jen anglicky, nechybí jeho česká verze?

Cíle práce

Cílů si práce stanovuje dokonce šest, ale první dva nemají v disertaci co dělat. Rozumí se samo sebou, že použité metody budou optimalizovat pro svůj experimentální materiál a není třeba to uvádět jako zvláštní cíl disertační práce. Poslední cíl je pak špatně formulován, je přeci samozřejmé, že výsledky vzešlé z použití dvou metod porovnáme, ale z tohoto porovnání mi musí vzniknout závěr o vhodnosti použitých metod pro daný účel, v tomto případě pro populační studie druhu *L. fabarum*.

Literární přehled

Literární přehled o studované problematice na celkem 16 stránkách podává zevrubnou charakteristiku parazitoidů mšic a nástin metod detekce genetické diverzity. Vzhledem k zaměření práce měl být poměr obrácený, nástin o parazitoidech mšic a zevrubný přehled různých metod detekce genetické variability s důrazem na dva v práci použité postupy. Na

disertaci nadbytečné, ale když už přítomné, tak nedostatečně zpracované, se jeví podkapitoly o izolaci DNA a metodě PCR.

Materiál a metody

Jak uvedeno již výše, větší část kapitoly 4.1 věnované charakteristice analyzovaných populací je stylisticky chabá a poměrně nesrozumitelná. Věta „Analyzované populace a analyzované druhy byly charakterizované vždy 23 jedinci“ mám rozumět tak, že v každé skupině bylo molekulárně analyzováno 23 jedinců? Pokud ano, jak autorka došla k tomuto číslu? Jen na okraj, umístění bodů pro odběrové lokality Peruc a České Budějovice v mapě na obr. 1 nelze pro jejich nepřesnost označit ani jako přibližné.

V kapitole 4.2 a ani nikde v práci jsem nenalezl zdůvodnění výběru autorkou použitých metod detekce genetické variability, i když jich existuje celá škála. V části o analýze RAPD opět chybí vysvětlení důvodu použitých primerů. Pro práci typu disertace je zbytečné uvádět schéma pipetování (platí pro metodu RAPD i SSR), když složení reakční směsi je uvedeno v předcházejícím odstavci. V popisu obou metod se vyskytuje prakticky stejný text týkající se zpracování gelu po elektroforéze, jistě by to šlo napsat elegantněji (navíc autorka v obou případech gely „vyfotila“, přičemž nejspíše obrázek získala v digitální podobě pomocí v práci použitého zobrazovacího systému). V části o elektroforéze produktů PCR při analýze SSR je zavádějící údaj o 2 % synergelu, když vzápětí je uvedena navážka obou složek elektroforetického gelu, tj. 0,7 g agarózy plus 0,65 g synergelu na 100 ml. Nezkušený čtenář je nutně zmaten pokud, neví, že koncentrace synergelu odpovídá zhruba dvojnásobné koncentraci agarózy.

Hlavní otázka k této části zní, proč nebyly při optimalizaci obou metod měněny teplotní průběhy reakcí PCR, když na nich tolik výsledky analýz závisí, jak uvádí autorka např. na str. 20 nahoře? Nebo byly teplotní profily optimalizovány a není o tom v práci konkrétní výsledkový záznam? Nejspíše platí druhá možnost, jak o tom svědčí text na str. 32 „... , byla tato teplota pro každý primerový pár ověřena popřípadě optimalizována“.

Výsledky

Poslední větou jsem se dostal již do kapitoly popisující získané výsledky. Když už byl do cílů disertace zařazen také výběr vhodné metody izolace DNA z experimentálního materiálu, mělo by prezentaci výsledků z této části věnováno více prostoru. Těch necelých 10 řádků bez jediné obrazové dokumentace je naprosto nedostatečných. Ostatně absence jakékoliv fotografické dokumentace exemplárních výsledků jakékoliv analýzy je do očí bijící a zanechává v čtenáři pocit neurčitosti.

Na str. 32 se do 6. řádku odspoda vloudila podstatná chyba, když se konstatuje, že data analýzy SSR vykazala kodominantní charakter. V obr. 5 chybí číselné označení klastrů, tak jak je běžně uváděné v ostatních obrázcích klastrové analýzy. Na str. 40 nahoře je chybně uvedeno, že při zadání dvou a tří skupin se vytvoří vždy tři skupiny. Já však na obr. 8 vidím při dvou zadaných analyzovaných skupinách jen 2 skupiny, nikoliv 3.

Ve všech třech případech, kdy byly ke stanovení genetické variability analyzovaných populací použity obě metody (kapitoly 5.5, 5.6 a 5.7), došlo poměrně k dobrému vymezení rozdílných skupin jedinců pomocí metody RAPD, zatímco užití SSR přinášelo výsledky daleko větším rozptylem jedinců. Jak si to vysvětlujete?

Diskuse

Diskuse je spíše opakováním výsledků a nikoliv jejich interpretací a konfrontací s literaturou. Diskuse k metodám izolace DNA je jen naznačena, což je mj. způsobenou již kritizovanou absencí obrázků elektroforetogramů. V kapitole 6.3.1 se opět vrací problém s nezbytně nutnou optimalizací teplotního profilu při amplifikaci RAPD markerů, ale v předložené práci

o této činnosti nenajdeme jediný důkaz. V části 6.5 se ukazuje problém "diskuse" v celé své nahotě, když jsou v odstavci zopakovány získané výsledky a na závěr konstatováno, že do „...schématu nezapadá populace 078, která parazitovala stejný hostitelský druh mšice jako populace 050 a 051 a stejnou lokalitu výskytu jako populace 081“ bez jakéhokoliv náznaku snahy o vysvětlení, formulace hypotézy a skutečné konfrontace s výsledky v literatuře. A totéž se dá tvrdit i pro části diskuze 6.6 až 6.8.

Závěr

Mezi závěry disertace nepatří závěr o optimální metodě izolace DNA, zvláště, když byla použita standardní nemodifikovaná metoda používaná pro hmyz. S ostatními závěry lze souhlasit, i když jejich význam je značně omezen tím, že se často jedná o trendy.

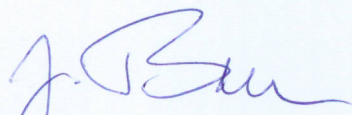
Použitá literatura

I přes jen částečnou kontrolu jsem objevil několik v textu citovaných prací, které v seznamu použité literatury chybí (např. Laštůvka et al. 1999, Mazura et al. 2001, Behura 2006). V citacích jsou uvedeny někdy zkrácené názvy časopisů, někdy jsou naopak jména časopisů citovány v nezkrácené formě.

Oponentův závěr

Pro četné obsahové nedostatky disertační práce si ponechávám konečné rozhodnutí o doporučení či nedoporučení práce k obhajobě až po ústní prezentaci autorky a její reakci na připomínky a položené dotazy.

České Budějovice, 2. 2. 2010



Doc. RNDr. Jindřich Bríza, CSc.

BC AV ČR, v.v.i.

Ústav molekulární biologie rostlin

Branišovská 31

370 05 České Budějovice

Posudek doktorské disertační práce

**„Charakteristika genetické struktury populací parazitoida mšic *Lysiphlebus fabarum* použitím molekulárních markerů“
autorky Ing. Kamily Štryplové Šťastné**

Oponent: Ing. Ladislav Kučera, CSc.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně

a) aktuálnost zvoleného tématu

Zvolené téma je aktuální nejen svým zaměřením na charakterizaci populací s využitím moderních postupů molekulární diagnostiky polymorfizmu DNA, ale je aktuální i svým významem pro účelné využívání agroekosystémů.

b) zvolené metody, zpracování

Předložená disertační práce je zpracována ve standardním členění na 68 stranách s uvedením 196 literárních pramenů.

Zvolené metody plně odpovídají zvolenému tématu a cílům disertační práce.

V práci jsou autorkou využívány potřebné postupy zpracování a hodnocení získaných dat.

Výsledky jsou prezentovány vhodnou formou s bohatou prezentací grafických a obrazových výstupů.

Dotazy a připomínky:

- Samotný název „CTAB“ není vhodné používat pro označení metody izolace DNA (str. 17). Variant postupů využívajících cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) je řada.
- Které další postupy (metody), kromě RFLP, RAPD a SSR, lze použít pro charakterizaci polymorfizmu na úrovni DNA?
- V rámci programu DARwin je bootstrap používán pro odhad robustnosti výsledků shlukové analýzy

c) výsledky disertace a získané nové poznatky

Výsledky práce dokumentují nejen experimentální pečlivost doktorandky, ale i schopnost prakticky používat metodicky náročné postupy analýz polymorfizmu DNA.

Ocenit lze zvláště zavedení postupu izolace DNA, který je vzhledem k malé hmotnosti vzorků (jedinců) parazitoidů klíčový pro následné molekulárně - genetická analýzy.

Výsledky v oblasti využití RAPD dokumentují pracovní náročnost spojenou s výběrem vhodných oligonukleotidů, pouze 5 z 80 testovaných poskytl stabilní a dobře hodnotitelné spektrum amplifikovaných produktů. Toto zjištění však plně odpovídá i výsledkům získaným na zahraničních pracovištích. Je zřejmé, že přes svou poměrnou jednoduchost, je aplikace RAPD fingerprintingu spojena s řadou technicky problematických míst.

Zavedení SSR markerů je vzhledem k jejich kodominantnímu charakteru zvláště vhodné pro populační studie a je zde třeba ocenit jejich použití i v této studii. Bezpochyby tato práce bude i východiskem pro případné následné analýzy a výzkum populací parazitoidů r. *Lysiphlebus* a jejich biologie.

Dotazy a připomínky:

- lze odhadnout přibližnou hmotnost jedinců použitých pro izolaci DNA?
- připomínku mám k hodnocení vnitro- a mezidruhové variability a prezentaci výsledků PCoA, kdy jsou komentovány výsledky jen dvourozměrné projekce ordinačního prostoru. Pro posouzení míry vzdáleností objektů ve vícerozměrném prostoru to může vézt k nepřesným interpretacím.
- na str. 40 je při popisu výsledků shlukové analýzy pomocí programu STRUCTURE chybně uvedeno, že při zadání počtu shluků = 2, jsou výsledkem tři skupiny, ale z obrázku 8. je patrné, že jsou rozeznatelné pouze skupiny dvě (první zahrnující populace 050, 051 a 078 a druhá zahrnující populaci 081)
- označení populací v tabulce č.5 není v souladu s údaji v tabulce č.6 („kolomapa“)
- aplikace SSR markerů je vhodnou volbou, bohužel omezený počet ověřených lokusů poskytujících kvalitní a opakovatelné výsledky neumožnil jejich rozsáhlejší aplikaci. Pro identifikaci heterozygotních jedinců jsou vysoce žádoucí. Určitým řešením by byla jistě finančně a přístrojově náročnější analýza mikrosatelitních lokusů s využitím fluorescenčně značených primerů a separace produktů ve kapilární elektroforéze, tak, jak autorka navrhuje.
- vzhledem k rozsahu souborů hodnocených jedinců nejsou sice výsledky jednoznačným důkazem diferenciací populací podle lokality, případně hostitele, ale jsou určitým signálem, že v rámci ČR lze předpokládat difference v genetické struktuře populací parazitoida a bylo by jistě přínosné tyto studie dále rozšířit

d) význam pro další rozvoj vědy

Výsledky mohou být využity pro další studium rodu *Lysiphlebus* a charakterizaci jeho populací, vyhodnocení genetických změn, pro identifikaci možné citlivosti populací parazitoidů na pesticidní zásahy, případně pro návrh vhodných opatření na zachování diverzity přirozených parazitoidů.

e) splnění sledovaného cíle disertace

V kapitole 2. jsou prezentovány pracovní hypotézy a cíle, které jsou jasně formulovány a umožňují odpovídající posouzení volby metod a shodu s výsledky práce.

Autorka v předložené práci doložila splnění všech šesti hlavních cílů.

Byla zavedena metoda izolace DNA ze vzorků jedinců rodu *Lysiphlebus*, byly zavedeny a optimalizovány metody RAPD a SSR pro analýzy DNA polymorfizmu u vybraných druhů rodu *Lysiphlebus*. Stanovena byla mezidruhová variabilita tří studovaných druhů rodu *Lysiphlebus* a partenogenetických populací druhu *Lysiphlebus fabarum* před a po parazitaci nepřirozeného hostitele. Byly porovnány výsledky použitých metod pro populační studie. Výsledky naznačují význam parazitace nehostitelského druhu na významné změny populační struktury.

Závěr hodnocení:

Předložená disertační práce „Charakteristika genetické struktury populací parazitoida mšic *Lysiphlebus fabarum* použitím molekulárních markerů“, autorky Ing. Kamily Štryplové Šťastné, svým zaměřením, dosaženými výsledky a způsobem zpracování splňuje kritéria kladená na disertační práce.

Výsledky jsou bezpochyby přínosem nejen pro výzkum populací významného přirozeného parazitoida mšic, ale i pro možné budoucí uplatnění v rámci metod biologické ochrany rostlin. V průběhu řešení byly získány původní poznatky, které obstojí i v mezinárodním měřítku.

Souhlasím, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělen doktorandce Ing. Kamile Štryplové šťastné akademický titul „Doktorka“.

V Praze dne 7.2.2010


Ing. Ladislav Kučera, CSc.