

Posudek na disertační práci Ing. Pavla Berana: „Detekce a identifikace bakterií patogenních pro rajče s použitím několika molekulárně biologických technik“

Disertační práce Ing. Pavla Berana je předložena ve formě souboru publikací s komentářem. Ten je sepsán na 25 stranách textu s použitím celkem 55 citací. Přílohy jsou tvořeny osmi články, které již byly publikovány nebo alespoň zaslány do redakcí vědeckých časopisů. Z prací, které už vyšly, je jedna v časopise *Journal of Microbiological Methods*, tři ve vědecké příloze časopisu *Úroda* a jedna v *Acta Horticulturae*. Dva články byly předloženy do časopisu *Crop Protection* a jeden do *African Journal of Biotechnology*. Pět příspěvků se týká detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, dva jsou o *Xanthomonas vesicatoria* a jeden o *Pseudomonas syringae*.

Práce se zabývá tématem identifikace fytopatogenních bakterií, což je z hlediska potřeb praxe téma nanejvýše aktuální. Doktorand využil k získání svých výsledků nejmodernějších dostupných metod. Výsledky samotné byly již publikovány nebo alespoň k publikaci předloženy, prošly už tedy recenzním řízením a tím byla prokázána jejich kvalita. K práci mám následující připomínky.

Připomínky formálního rázu:

- v textu se objevují drobné gramatické chyby a překlepy (např. str. 29 syrigae, moleuklárně, str. 30 michiganennsis; chybějící čárky v souvětích vztažných a důsledkových před spojkami které a a proto (str. 12), díky nímž (str. 13). Občas v komentáři chybí i mezery mezi číslicí a jednotkami, např. °C.
- v seznamu použité literatury by měly být použity tečky ve zkratkách názvů časopisů a mezery mezi iniciálami autorů, protože se jedná o český text.
- přílohy jsou řazeny podle roku publikace. Z hlediska přehlednosti by pro čtenáře asi bylo vhodnější jejich řazení podle jednotlivých kapitol 4.1. – 4.5. s tím, že by u dané kapitoly bylo přímo i číslo příloh(y).
- opět z hlediska přehlednosti a potřeby odkazů by přílohy měly být stránkovány v návaznosti na předchozí text a nikoliv vlastním stránkováním.

Připomínky odborného rázu:

- nevhodně jsou použity některé termíny: str. 12 ...napadených bakteriální chorobou - správně patogenem, str. 22 ...náchylných k chorobě – správně k patogenu. Choroba je určitý stav rostliny, takže ji nemůže napadnout; věta na str. 30 „Celkem ze 113 vzorků rajčat s příznaky choroby se u 68 % vzorků rostlin prokázalo onemocnění“ je z tohoto důvodu logicky zcela nesprávná (choroba = onemocnění, a to lze prokázat právě podle příznaků a nikoliv podle pouhé přítomnosti patogena). Str. 30 a jinde ...semena byla infikována – správněji inokulována či kontaminována, neproběhl zde vlastní infekční proces.

- str. 28: soubor bakterií zahrnoval 36 (resp. 45) bakterií patogenních pro rajče - asi izolátů, kmenů či populací.
- str. 29: nelze tvrdit, že *Cmm* byl izolován...metodami PCR atd.
- nesouhlasí počet odrůd uvedených v 4.5. (celkem 8) a v příloze 8 (celkem 9), ačkoliv doba po inokulaci byla použita právě podle této přílohy.
- podle mého názoru nelze souhlasit se závěry v přílohách 2 a 8 a analogicky na str. 30, že „bylo ověřeno, že *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* může na semenech přežívat měsíce až roky“. Vzhledem k tomu, že analýza probíhala pomocí PCR, byla detekována pouze přítomnost DNA patogena, která tam mohla být i v jeho mrtvých buňkách. Životaschopnost patogena by měla být zjištěna jeho přímou izolací ze semen na nějaké médium. Teprve na základě kladných výsledků tohoto testu by byl platný závěr, že „přenos patogena z povrchu semen do rostlin není příliš častý“.

Dotazy:

Proč jsou primery dle Drier et al. (1995) označovány jako komerční?

Metoda PCR je pro detekci *Cmm* opakovaně označována jako nejcitlivější. Ani v komentáři, ale ani v žádné z relevantních příloh (2, 5, 7, příp. 4) jsem se však nedozvěděl její konkrétní detekční limit. Jaký je?

Výsledky z odstavce komentáře 4.3. a příloh 2, 5 a 7 mi nesedí, pokud jde o detekci *Cmm* z listů. Zatímco v přílohách 2 a 5 se tvrdí, že *Cmm* byl detekován v listech pouze PCR a žádnou jinou metodou, v příloze 7 a v komentáři najednou PCR vychází ve srovnání s imunologickými metodami jako nejhorší. Přitom se zdá, že se jedná o tytéž výsledky s 10 tyčkovými odrůdami rajčat. I kdyby tomu tak náhodou nebylo, tím spíše by si tento rozpor zasloužil diskusi. Prosím o vysvětlení. Byla vždy použita tatáž část rostliny ke všem testům? Z metodiky příloh to jasně nevyplývá.

V příloze 7 je výše uvedená nejhorší spolehlivost PCR při detekci *Cmm* z listů vysvětlována jako možný důsledek přebytku hostitelské DNA. Proč by toto alespoň do určité míry neplatilo u řapíků či stonků? V popisu experimentů se uvádí, že okraje listů už byly nekrotizované. Není to spíše přítomností možných inhibitorů, případně nesprávně zvolené metody extrakce DNA? Máme zkušenosti s kity Qiagen na extrakci RNA. Pro některé účely fungují výborně, někdy však zcela selhávají. Pokud PCR byla současně nejcitlivější, nebylo by řešením použití zředěnějšího vzorku? Tím by se zředily i případné inhibitory. Vhodné je také použití interní kontroly.

Jako poslední cíl práce je uvedeno vytvoření bakteriální sbírky z ověřených kmenů. V komentáři ani v závěrech (a pravděpodobně ani v přílohách – ty jsem však nečetl až tak důkladně vzhledem k tomu, že už byly či jsou recenzovány) není o této sbírce ani slovo. Byl tento cíl splněn?

Závěr:

Podle podepsaných prohlášení, která jsou součástí disertační práce, se Ing. Beran podílel podstatnou měrou na získání a publikaci výsledků, které jsou součástí příloh 1 – 8. Na základě

toho lze konstatovat, že prokázal svou schopnost vědecky pracovat, a to ve všech směrech od studia relevantní literatury přes naplánování a plánování pokusů až po publikaci výsledků. Výše uvedené připomínky nijak nesnižují kvalitu této práce a jsou určeny spíše pro jeho případnou budoucí vědeckou práci či jako náměty pro diskusi. Doporučuji přijmout disertační práci k obhajobě a na základě jejích výsledků udělit Ing. Beranovi vědeckou hodnost „doktor filozofie“, Ph.D..

V Praze 9. 7. 2012

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

KOR ČZU v Praze



O p o n e n t s k ý p o s u d e k

na disertační práci

doktoranda Ing. Pavla B E R A N A

na téma

„DETEKCE A IDENTIFIKACE BAKTERIÍ PATOGENNÍCH PRO RAJČE S POUŽITÍM NĚKOLIKA MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH TECHNIK“

Ing. Pavel Beran zpracoval disertační práci k obhajobě na výše uvedené téma formou publikovaných a veřejně doma i v zahraničí sdělených vědeckých prací. Tato forma navazuje na všeobecný požadavek nepsat zvláštní spis, ale pokud je doktorand schopen, předložit k obhajobě již publikované vědecké práce v recenzovaných vědeckých časopisech, jejichž redakční rady vyžadují náročné posouzení příspěvků svými lektory. Zde bych si dovolila upozornit na skutečnost, že doktorand nastoupil do prezenčního studia v říjnu r. 2009, což znamená, že po úspěšném absolvování všech potřebných zkoušek předkládá finální verzi práce k obhajobě již po necelých 3 letech studia, ačkoli je možné využít pro doktorandské prezenční studium celé 4 roky. Svědčí to o pílí studenta i o předchozích zkušenostech získaných v rámci řešení bakalářské a diplomové práce v oblasti rostlinné bakteriologie. Nutno však podotknout, že kdyby byla práce odevzdána později, 3 vědecká sdělení, která jsou v současné době odeslána do časopisů Crop Protection (2 práce) a African Journal of Biotechnology (1 práce) by mohla být na seznamu prací přijatých do tisku či již opublikovaných.

Kopie vědeckých publikací jsou doplněny úvodním Souhrnem výsledků, kapitolou Prohlášení o impaktovaných a recenzovaných publikacích, kde doktorand specifikuje svůj podíl řešení na jednotlivých publikacích; v části Ostatní činnost je souhrn příspěvků na konferencích a doktorandem řešené granty. Zkoumanou problematiku shrnul v kapitolách Úvod, Hypotézy a cíle práce, Literární přehled, Výsledky a Závěr.

Oceňuji, že disertační práce vznikla za vydatné finanční podpory zejména GAJU, kde Ing. Pavel Beran byl hlavním řešitelem 3 projektů získaných v r. 2010, 2011 i 2012 a dále byl spoluřešitelem dalších 3 grantových projektů agentur GAJU, NAZV a GAČR.

Během svého studia Pavel Beran připravil nebo přispěl k publikaci celkem 14-cti vědeckých sdělení, z nichž u 5-ti figuruje jako první autor. Jedná se o 5 prací již publikovaných nebo pro publikaci v renomovaných zahraničních časopisech odeslaných sdělení, dále o tři práce v recenzovaném českém časopise Úroda a šest příspěvků prezentovaných na mezinárodních setkáních včetně tak prestižních jakými byly XII. Mezinárodní konference o rostlinných patogenních bakteriích na Ile de la Réunion, XVII. konference Eucarpia ve Španělsku a III. Mezinárodní symposium o onemocněních rajčat v Itálii.

Vzhledem k tomu, že většina vědeckých sdělení, která jsou podstatou disertace již prošla oponentním řízením redakčních rad časopisů resp. sborníků, je moje úloha jako oponenta značně usnadněná.

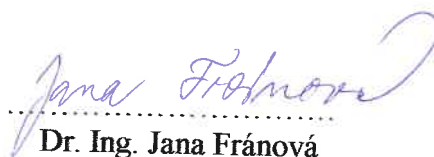
V rámci dotazů žádám o bližší objasnění či zaujetí stanoviska k následujícím bodům:

- Kterou ze studovaných bakteriálních chorob považujete za nejzávažnější a proč? Jaké jiné bakteriální patogeny se mohou na rostlinách rajčete vyskytnout?

- Proč byla v publikaci „A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*“ použita metoda DNA mikročipů?
- Proč byla vybrána právě bakterie *Xanthomonas vesicatoria* pro navržení specifických primerů?
- Je známo, jaké příznaky či škody způsobuje bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na jiných rostlinách než na rajčeti? Např. na dalších rostlinách rodu *Lycopersicum* a *Solanum*, dále např. u fazolu, hrachu, kukuřice, pšenice, ječmene, žita, ovsa, slunečnice, okurky?
- Na str. 29, kap. 4.3. "Spolehlivost detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*" doktorand uvádí: "Metodami PTA-ELISA, DAS-ELISA a IIF byl patogen detekován jen ve 30-70% případů a pomocí PCR byl patogen detekován pouze ve 20% případů." Zde je překvapivé, že detekce pomocí PCR má výrazně nižší citlivost než metody sérologické. Je tato situace u bakterií běžná? Jak si ji vysvětlujete? Je běžné nebo nebylo by vhodné např. použití nested PCR pro zvýšení citlivosti detekce této karanténní bakterie?
- V kapitole 7 - "Obrázky" jsou demonstrovány ukázkové příznaky, které sledované bakterie na rostlinách rajčete vyvolávají. Je zde přesně uveden i odkaz, odkud jednotlivé originály fotografií pocházejí. Zajímalo by mne, zda má doktorand i fotodokumentaci studovaných bakteriálních onemocnění pocházejících z území České republiky. Pokud ano, prosím o ukázkou těchto příznakových rostlin při obhajobě práce.
- Přestože jsou v kapitole Ostatní činnost vyjmenovány příspěvky na konferencích, doporučuji do disertace dodatečně přiložit kopie jednotlivých abstraktů ze sborníků konferencí. Zde by mne zajímalo, která sdělení byla prezentována formou ústního vystoupení a která jako plakátová sdělení, popř. zda všechny či které příspěvky prezentoval na konferencích doktorand osobně.
- V úvodních, česky psaných kapitolách doporučuji při citaci původních literárních zdrojů používat zkratku... "a kol", nikoli "et al.", dále místo anglické zkratky "bp" (base pairs) používat zkratku českou "pb" (párů bází) a v celé práci se vyhnout drobným překlepům. Prosím o objasnění: Na str. 29 je používána zkratka IIF i IF, zřejmě se však jedná o jednu a tutéž zkratku pro imunofluorescenční metodu pro detekci bakterií, která je však na str. 24 popisována a označena jako IFA (*Immunofluorescence Assay*). Která zkratka je správná a proč doktorand nepoužívá správnou zkratku jednotně v celé práci, nebo se jedná o rozdílné metody?

Celkově hodnotím disertační práci pana Ing. Pavla Berana a jeho dosavadní příspěvek rostlinné bakteriologii jako velmi kvalitní a doporučuji komisi jeho disertační práci k obhajobě. Po úspěšném obhájení disertační práce doporučuji autoru Ing. Pavlu Beranovi udělit akademický titul Ph.D..

V Českých Budějovicích dne 10. července 2012.



Dr. Ing. Jana Fránová
BC AVČR, v.v.i. ÚMBR
odd. Rostl. virologie
Branišovská 31

370 05 České Budějovice

Oponentský posudek disertační práce

Autor: Ing. Pavel Beran

Název práce: **Detekce a identifikace bakterií patogenních pro rajče s použitím několika molekulárně biologických technik**

Rozsah disertace: 40 stran textu ve členění na úvod, hypotézy a cíle práce, literární přehled, výsledky, diskuse, závěr, seznam použité literatury a přílohy, které zahrnují kopie jednotlivých publikací autora.

Oponent: Ing. Jan Fousek, Ph.D.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha

Hlavní téma předkládané disertační práce se věnuje vývoji a testování molekulárně biologických technik pro diagnostiku tří hospodářsky významných bakteriálních patogenů rajčete - *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a *Xanthomonas vesicatoria* - společně s mapováním jejich výskytu v rámci naší republiky. Dílčí cíle jsou zaměřeny na přípravu konkrétních detekčních postupů pro každého patogena a jejich srovnání s dalšími v praxi používanými metodami. V práci je pozornost rovněž věnována distribuci patogena v hostiteli a možnosti jeho dlouhodobého přežití. Jako nedílnou součástí podobného výzkumu je i vytvoření sbírky bakteriálních kmenů.

V první z uvedených prací se sleduje variabilita ITS1 oblasti vyskytující se v ribozomálním operonu, který je často používán pro identifikaci. Za tímto účelem byl vytvořen oligonukleotidový DNA mikročip, který měl za úkol odlišit jednotlivé patovary bakterie *Pseudomonas syringae*. Čip v testovaných vzorcích odhalil mozaicismus a poukázal na možné nepřesnosti, které se při analýze rRNA na takto nízké taxonomické úrovni mohou vyskytnout.

Další práce je zaměřena na navržení specifických PCR primerů pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. Oligonukleotidy byly navrženy do oblasti genu *atpD*. Primery byly testovány na souboru více či méně vzdálených bakteriálních druhů s možným výskytem na rajčeti. Po optimalizaci PCR programu umožnily tyto primery specificky detekovat pouze kmeny bakterie *Xanthomonas vesicatoria*.

Následující práce se zabývala spolehlivostí PCR detekce bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (dále *Cmm*) z různých částí infikované rostliny a její srovnání se sérologickými metodami PTA-ELISA, DAS-ELISA a IIF. Se srovnatelnými výsledky zde byly použity dva páry PCR primerů - převzatý z jiné studie a nově navržený. Bylo zjištěno, že spolehlivost detekce je v bázi rostliny, stonku a řapíku rostlin v rámci jednotlivých metod srovnatelná, s výjimkou listů, kde byla výrazně nižší.

V další práci se autor zaměřil na zjištění výskytu bakteriálního vadnutí způsobeného *Cmm* v rámci České republiky. Průzkum probíhal v 22 lokalitách, celkově bylo odebráno 113 vzorků z rostlin vykazujících příslušné symptomy. V 68% případů a 6 lokalitách byla prokázána přítomnost bakterie *Cmm*. Výskyt nebyl ovlivněn geografickou polohou lokality ani způsobem pěstování – skleník, pole.

V poslední z příložených studií se sledovala možnost přenosu bakterie *Cmm* z uměle infikovaných semen. Za pomoci několika molekulárních technik byla zjištěna přítomnost *Cmm* i po 26 měsících. Následnou kultivací rostlin z takto infikovaných semen a jejich PCR testováním nebyl přenos bakterie do rostliny potvrzen.

Dle mého názoru je zpracovávaná tematika využívání molekulárních metod při diagnostice bakteriálních onemocnění hospodářských plodin velmi významná. Její výsledky lze přímo prakticky aplikovat v rostlinolékařských laboratořích a v kombinaci s dalšími technikami tak docílit ještě větší spolehlivosti při detekci významných patogenů.

Samotná práce je velmi detailně a přehledně zpracována. K přehlednosti nemalou měrou přispívají zejména grafické výstupy výsledků z jednotlivých testů. K osvojení potřebných teoretických základů řešených problémů prostudoval autor množství vědeckých publikací z dané oblasti. Téma je zpracováváno za pomoci širokého spektra moderních vědeckých postupů a metod.

Všechny stanovené cíle byly splněny. Jejich řešením se získalo množství experimentálních dat, která mohou být dále využita pro rozšíření poznatků v tomto oboru.

Předložená práce je po formální stránce velmi dobře zpracovaná a v textu se vyskytlo pouze několik drobnějších překlepů, které ovšem kvalitu textu nijak nesnižují.

Dotazy:

Uvažovali jste vzhledem ke zmiňované vysoké homologii genu *atpD* u Xanthomonád při výběru vhodné oblasti pro specifickou detekci o jiném genu?

Co bylo podle Vás nejčastější příčinou vzniku infekce bakteriálního vadnutí rajčete u postižených porostů ?

Ověřovala se schopnost přežití bakterie *Cmm* na semenech kultivačním testem, myšlena kultivace bakterií?

Práce Ing. Pavla Berana splňuje podmínky kladené na disertační práci. Autor v předloženém pojednání prokázal dostatečnou schopnost orientovat se v rozsáhlé světové literatuře, kriticky třídit získané informace a využívat je pro vlastní řešení.

Na základě výše popsaných skutečností souhlasím, aby práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení byl udělen titul „Doktor“.

V Praze 12.7. 2012



Ing. Jan Fousek, Ph.D.

ÚMG AV ČR Praha