

## OPONENTSKÝ POSUDEK NA DOKTORSKOU DOZERTAČNÍ PRÁCI

---

Autorka:	Ing. Kateřina Šimáčková
Název:	Polyfaktoriální hodnocení kmenů mitosporických hub v systému řízených selekcí (na modelu <i>Beauveria bassiana</i> )
Vedoucí práce:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra rostlinné výroby a agroekologie Studentská 13, 370 05 České Budějovice
Oponent:	prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc. Jihočeská univerzita v Č. Budějovicích Zemědělská fakulta, Katedra rostlinné výroby a agroekologie Studentská 13, 370 05 České Budějovice

---

Ing. Kateřina Šimáčková zpracovala a k obhajobě předložila doktorskou dizertační práci (DDP), jejíž finální verze má 139 stran. DDP je členěna do 8 standardních kapitol, z nichž nejrozsáhlejší jsou kapitoly 2 (Literární rešerše – 32 stran), 4 (Materiál a metody – 33) a 5 (Výsledky – 31). Součástí DDP je 31 obrázků a 21 tabulek a závěr reprezentuje rozsáhlý soubor informačních zdrojů, které doktorandka ve své práci použila. Uvedené formální parametry DDP dokladují jak vhodnou proporcionalitu klíčových a doplňkových kapitol, tak i zjevnou snahu autorky zpracovat rozsahem přiměřené dílo. Po obsahové stránce představuje DDP Ing. Šimáčkové značně nevyvážené a z mnoha ohledů i přímo rozporuplné dílo, které se velmi nesnadno oponuje. Tento obecně formulovaný názor si dovoluji v posudku konkretizovat postupným vyjádřením se k jednotlivým kapitolám, resp. obsahovým aspektům DDP.

### Název práce a zvolené téma

Název doktorských prací obvykle nestojí za pozornost oponenta, nicméně v tomto případě nelze přehlédnout skutečnost, že mezi názvem a obsahem DDP je zjevná disproporce. Jako vedoucí řady doktorských projektů vím, že vývoj řešení často posouvá původní název DDP mimo faktický obsah konečného díla a nemám sebemenší problém respektovat změnu názvu i v době finálního zpracování DDP a takovéto změny považuji za funkční a korektní. V názvu DDP Ing. Šimáčkové jsou mezi klíčovými slovy i termíny „polyfaktoriální hodnocení“ a „řízené selekce“, jejichž experimentální odrazy však v práci samotné de facto nelze najít. Samotné téma DDP (viz kapitola 3. Cíle) je naproti tomu aktuální a reflektuje aktuální požadavky současného výzkumu v oblasti vývoje a používání mykoinsekticidů, resp. ekologických aspektů souvisejících s jejich velkoplošným používáním.

### Kapitoly 1. Úvod, 2. Literární přehled a 3. Cíle

V úvodu DDP je poměrně dobře formulován základní záměr doktorského projektu, zejména pak v té části, kdy autorka klade důraz na cílené využití DNA markerů pro potřeby diagnostiky entit na úrovni poddruhové, tj. kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub.

Na struktuře a obsahu literární rešerše lze asi nejlépe demonstrovat moji výše uvedenou výhradu ohledně (ne)vyváženosti DDP Ing. Šimáčkové. Tato kapitola sestává ze dvou kvalitativně velmi odlišných částí. Prvá část (2.1., str. 3-10) literární kompilace je věnována entomopatogenním houbám. Nemohu jinak než konstatovat, že se jedná a jednoznačně nejslabší část DPP a že úroveň této části literární rešerše nedosahuje ani úrovně průměrných magisterských prací. Obdobnou úroveň má i závěrečná podkapitola (2.4) věnovaná problematice praktického využití houby *Beauveria bassiana* v biologické ochraně rostlin. Z formálního hlediska je kapitola zatížena citacemi nerelevantních zdrojů, neuvedením citací u významných informací, resp. uvedením citace v textu bez jejich vazby na bibliografický záznam v seznamu použité literatury. Příkladem používání irelevantních informačních zdrojů jsou citace magisterských a doktorských prací (Bieliková 2001, Bobková 2006, opakovaně Šedrlíková 2008), resp. irelevantních zdrojů (opakovaně Landa 1998, Turčáni et al. 2009) k podpoře informací, které mají snadno dostupné pertinentní verze v recenzovaných vědeckých a odborných

seriálech a monografiích. Nelze přehlednout, že s úrovní použitých zdrojů informací souvisí i obsahová kvalita rešerše, která je v této části zatížena řadou terminologických nepřesností, nesprávných konstatování a v kontextu zaměření DDP i obsahovou odtržeností. V oponovaném výtisku DDP jsem si dovolil vyznačit řadu sporných míst a konstatování, z nichž si pro ilustraci dovolím uvést následující:

- Diagnostický význam konidií (tvar, velikost) není z hlediska diagnostiky a determinace entomopatogenních hub klíčový (str. 1 a opakovaně i dále v textu)
- Předpoklad 10 milionů druhů hmyzu je dávno překonaný a tvrzení o 5 % druhů hmyzu napadených specifickou houbou je velmi sporné a neobstojí ani v kontextu formální logiky (bibliografický záznam podpůrné citace Hawksworth 1991 není uveden v seznamu; pravděpodobně se jedná o: Hawksworth D.L. (1991): The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.*, 6:641-55.
- Syntaktickou formou ... kmen (izolát)... (str. 4) autorka tyto termíny de facto synonymizuje, což si dovoluji posoudit jako nesprávné a zároveň si dovolím požádat o názor na tuto připomínku.
- *Lecanicillium lecanii* – druhové jméno, které se opakovaně objevuje v celé práci. Prosím o vyjádření se k poznámce, zda v kontextu práce nejde spíše o druh *L. muscarium*
- Za sporné si dovolím označit tvrzení o výrazné predeterminaci hostitelského spektra (?) druhem hostitele, z kterého byl konkrétní kmen izolován
- Vývojový cyklus a navazující informace (např. popis charakteru povrchu konidií apod.) je zatížen řadou nepřesností
- Název a obsah tematického okruhu „Fyziologie a infekce (průběh patogeneze)“ je nesrozumitelný, obsahově velmi sporný a pro téma práce de facto irrelevantní
- Biologická ochrana není chápána tak, jak je uvedeno v paragrafu 2 na str. 37 s podporou velmi sporného zdroje (Šeberlová 2008)
- V textu je opakovaně používán výraz „kontrola“ (zjevně „překlad“ z anglické verze *control*) v kontextu informací z oblasti praktické ochrany rostlin, což ale naznačuje, že autorka s terminologií z oblasti rostlinolékařství nakládá až příliš volně
- Neznalost a laxní přístup k rostlinolékařské problematice práce autorka prokazuje i v řadě dalších částí, např. označení plošnice *Orius insidiosus* za třásněnku (str. 38, mimochodem se jedná o predátora využívaného proti třásněnkám a doporučení použít proti tomuto „škůdci“ houby *B. bassiana* je spíše úsměvné), zmínka o „suché kordiální směsi“ (str. 38), nesrozumitelná formulace týkající se ...*dostatečně suprese patogen*... (poslední odstavec na str. 38 a na začátku str. 39), a další.

Ilustrativním příkladem povrchnosti některých částí literární rešerše je podkapitola 2.2 Morfologické markery (hodnocení fenotypu) (str. 11). Rozsah kapitoly je mizivý (1/2 stránky), morfologické markery jsou definovány zcela obecně a opakovaně s vynecháním klíčových diagnostických systémů (soustava struktur souvisejících se sporulací entomopatogenních hub), zmínka o fenotypových markerech je opřena o konstatování týkající se nesouvisející enzymatické aktivity a zcela irrelevantní citací (Oborník 1995). Stejně tak i zmínka o biotestu zaměřeném na objektivní hodnocení virulence kmenů entomopatogenních hub pomocí indexového systému FDI je jednak irrelevantní a zároveň i citace zdroje (Osborne, Landa 1992) je nesprávná, protože se této tématice nevěnuje.

Větší část rešerše (podkapitoly 2.2 a 2.3, 25 stran) je věnována problematice molekulárních markerů, včetně bodu 2.3.5., který je specificky zaměřen na molekulární markery u hub. Tato část rešerše je zjevně kvalitnější a dokazuje, že autorka se v oblasti molekulární genetiky orientuje mnohem lépe než v tematicky propojené oblasti aplikované mykologie. V logické posloupnosti jsou podrobně popisovány zejména různé techniky specifického restričního štěpení DNA a následné hybridizace (podkapitola 2.3.1.); techniky založené na PCR reakci (2.3.2) a techniky sekvenování DNA, v závěru pak je zpracována podkapitola věnovaná molekulárním markerům hub. Obecné tematické okruhy sice spíše připomínají dobře zpracovanou studijní pomůcku, ale tomu asi nebylo možné se zcela vyhnout, nicméně část věnovaná molekulárním markerům entomopatogenních hub mohla být zpracovaná detailněji a s použitím modernějších zdrojů, protože v citacích převažují publikace s datem 199X a jen malý podíl informací překročil hranici roku 2000. Mimochodem zadáním dotazové syntaxe složené z rodových názvů 4 nejvýznamnějších rodů entomopatogenních hub a doprovodného klíčového slova DNA markery lze jen za období let 2010 a 2011 získat více než 40

bibliografických záznamů z relevantních, což je mimochodem i objektivním měřítkem zvyšujícího se zájmu o tuto problematiku a podporuje to vhodnou volbu tématu a zaměření DDP ing. Šimáčkové.

Cíle DDP jsou formulovány stručně a jsou harmonizovány s dalšími kapitolami, nicméně mezi názvem a cíly je zjevná již zmíněná disproporce.

#### *Kapitola 4 Materiál a metody*

Metodické aspekty DDP jsou zpracovány velmi detailně, což lze dokladovat tím, že tato kapitola je z celé DDP nejrozsáhlejší (33 textových stran). Informačně osciluje v kontinuu od dílčích informací po velmi detailní popis postupů používaných při kultivaci hub, izolaci DNA až po detekci fragmentů DNA a statistické hodnocení dat. Z této kapitoly je zřejmé, jak rozsáhlou metodickou výbavu musela autorka v průběhu řešení svého projektu zvládnout. S respektem ke kvalitě této části kapitoly si dovoluji několik poznámek a připomínek:

- V kapitole velmi postrádám adekvátní prezentaci informačních zdrojů. Citace zdrojů jsou uváděny pouze v případě popisu protokolů tří odlišných technik AFLP a ojedinele v kontextu tabulek, ve kterých jsou prezentovány primerové sekvence.
- Některé metodické popisy jsou až příliš detailní a působí spíše dojmem návodu k používaným přístrojům a zařízením (viz např. konstatování .....*Zapneme elektroforetickou stanici a spustíme software...* apod.)
- Některé části jsou zatíženy formulacemi vhodnými spíše pro literární rešerši nebo pro diskusi (viz např. str. 49 – Izolace DNA)

Samostatnou část kapitoly tvoří přehled kmenů jednotlivých druhů entomopatogenních hub použitých v experimentech. V této části jsou kmeny rozděleny do tří skupin na: 1) základní, 2) modelové a 3) kmeny určené k širší verifikaci metod a interpretačních možností. Výběr a složení všech tří souborů považuji za vhodný a pro účely plánovaných záměrů a cílů za dostatečný. Nicméně bych za korektní považoval, kdyby v některé z částí práce bylo zřetelněji naznačeno, že všechny kmeny, které byly v DDP použity, pocházejí ze sbírky sekce Rostlinolékařství KRV ZF JU, a většina z nich představuje poměrně unikátní soubor lokálních kmenů zachycených v průběhu rozsáhlého monitoringu přirozeného výskytu entomopatogenních hub asociovaných s populacemi lýkožrouta smrkového na území NP Šumava. Tyto informace v textu sice lze zaznamenat, ale nikoliv na úrovni a v rozsahu, který by si (dle mého názoru) vzhledem ke svému významu zasloužily.

#### *Kapitola 5. Výsledky*

V logické posloupnosti jsou postupně prezentovány výstupy dílčích studií začínajících optimalizací izolace DNA, přes analýzu všech tří modelových souborů kmenů pomocí analýzy mikrosatelitů, ITS – RFLP, sekvenční analýzu ITS regionu a LSU-RFLP, až po AFLP. Každá z uvedených dílčích studií (s výjimkou vstupní studie zaměřené na optimalizaci izolace DNA) představuje svým způsobem uzavřený tematický okruh a to včetně prezentace výsledků. Výsledky jednotlivých studií jsou i takto formulovány, protože v rámci každé z uvedených technik je použita více méně identická struktura: a) optimalizace na základním souboru, b) ověření funkčnosti na modelovém souboru a c) verifikace na kompletní sadě kmenů, s převažujícím souborem kmenů *B. bassiana* pocházejících z oblasti NP Šumava. Toto pojetí si dovoluji velmi ocenit, protože umožňuje poměrně snadnou orientaci v rozsáhlém souboru výsledků.

Autorka opakovaně prokázala a) možnost kmenově specifické identifikace kmenů hub rodu *Beauveria*; b) význam molekulárně genetických technik při determinaci a identifikaci druhů, jejichž morfologické charakteristiky neumožňují jistou determinaci a c) genetickou homogenitu kmenů pocházejících z oblasti NP Šumava. Každý z uvedených výstupů je sám o sobě přínosný a cenný a rád konstatuji, že v této části je DDP v souladu se zadáním, resp. stanovenými cíly. K této části si dovoluji několik poznámek a dotazů:

- V souborech dat působí poněkud disharmonicky zařazení kmene PFR 97 a jednoho šumavského kmene IFR. Změnila by se prezentace a formulace výsledků analýz, kdyby tyto kmene v rámci studií nebyly použity? Mám na mysli zejména případy, kdy PFR 97 se v dendrogramech přiřazuje do příbuzenských skupin s některými kmeny *B. bassiana* resp. *B. brongniartii*, což do určité míry relativizuje běžně zažitou představu větší intraspecifické příbuznosti (viz např. grafy 11-14,
- Prakticky každá z uvedených technik umožňuje odlišnou interpretaci vztahů mezi kmeny, zejména pak vztahové charakteristiky v modelových souborech 2 a 3. Lze na základě výsledků objektivně rozhodnout a doporučit, kterou z použitých technik použít pro různé účely? Například pro účely:
  - a) objektivní identifikace kmene určeného patentování resp. pro registrační řízení
  - b) anonymní identifikace konkrétního kmene v souboru jiných kmenů téhož druhu
  - c) identifikace konkrétního kmene ve směsi s jinými kmeny téhož druhu?
- V textu je opakovaně zmiňována geografická oblast jako prekondice příbuznosti, přičemž jednotlivé dílčí studie sdružují kmene z geograficky odlišných oblastí v různých kombinacích. Jak tuto variabilitu chápat?
- Jedním z klíčových slov prolínajících se všemi částmi DDP je „optimalizace“. Prosím autorku o naznačení, jak v obecné rovině tento termín chápat, resp. kde a konkrétně v kterých částech její práce došlo k naplnění tohoto cíle.

#### *Kapitoly 6. Diskuze a 7. Závěry*

Diskuze výsledků a formulace závěrů jsou stručné, výstižné a akcentují relevantní výstupy projektu. Nicméně si dovoluji podotknout, že dle mého názoru autorka zdaleka nevyužila možností, které tyto kapitoly doktorandům poskytují, zejména pak v kontextu mezioborového tématu, který Ing. Šimáčková zpracovávala.

#### *Kapitola 8. Citovaná literatura*

Autorka zpracovala rozsáhlý seznam literatury, který má převážně správnou formální provázanost s citacemi informačních zdrojů v textu. Některé připomínky k použitým informačním zdrojům jsem již prezentoval, a proto si v této části dovolím autorku pouze upozornit na to, že v bibliografických záznamech monografií používá nesprávnou citační normu (např. stránky v knihách či kapitolách monografií, včetně diplomových a doktorských prací), špatné nebo neúplné citace některých zdrojů, včetně obrázků a grafů, neúplné citace zdrojů z internetu apod. Na druhé straně rád konstatuji, že v seznamu je jen minimum záznamů, které jsou v textu citovány (např. již zmíněný Hawksworth 1991) a naopak (např. LI, Z.; LI, C.; HUANG, B. A; MEIZHEN, F.; 2001).

#### *Závěrečné hodnocení*

Ing. Kateřina Šimáčková zpracovala náročné téma a k obhajobě předložila DDP, která sice vykazuje řadu nedostatků, nicméně prokázala schopnost samostatné vědecké práce a zejména s ohledem na výsledky její experimentální práce lze konstatovat, že splnila podmínky, které jsou kladeny na DDP. Doporučuji tuto práci přijmout k obhajobě před příslušnou odbornou komisí a v případě jejího úspěšného obhájení **doporučuji**, aby byl Ing. Kateřině Šimáčkové udělen titul **Ph.D.**

V Českých Budějovicích dne 6. listopadu 2011

.....  
prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.

# OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Téma práce: **Polyfaktoriální hodnocení kmenů mitosporických hub v systému řízených selekcí (na modelu *Beauveria bassiana*)**

Autor: **Ing. Kateřina Šimáčková**

Školitel: **Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

---

Předložená disertační práce je sepsána na 139 stranách a je členěna do 8 hlavních kapitol, které odpovídají požadavkům na disertační práce a potřebě vnitřního členění podle zaměření obsahu.

Hlavním cílem disertační práce bylo zavedení a optimalizace metod analýz molekulárních markerů u hub a jejich využití u modelového druhu entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*. Vzhledem k tomu, že se u nás doposud nikdo touto problematikou nezabýval, jednoznačně považuji zvolení tohoto tématu za velmi aktuální a žádoucí. Nedostatek morfologických a biologických znaků způsobil, že molekulární markery se staly nedílnou součástí při studiích ekologie, biologie a genetiky hub.

Již od úvodních kapitol ("Literární přehled") je zřejmé, že autorka velmi dobře zvládla teoreticky celou problematiku, tzn., že se velmi podrobně seznámila s odbornou problematikou týkající se daného problému. Nasvědčuje tomu i obsáhlá kapitola "Citovaná literatura". Literární rešerše je podrobná, dobře strukturovaná a svým obsahem odpovídá zaměření práce. Rešerše obsahuje rozsáhlý soubor převážně zahraničních citací z posledních let, které mají vztah k řešenému tématu a které jsou logicky utříděny do dílčích podkapitol.

Cíle vlastní práce jsou jasně a přehledně definovány do tří hlavních cílů, které jsou uvedeny na straně 41. Cíle jsou stanoveny velmi náročně co do obsahu i rozsahu. Po prostudování disertační práce lze konstatovat, že všechny tyto cíle byly splněny v plném rozsahu. Byly získány významné výsledky na velmi dobré vědecké úrovni a současně s praktickými výstupy, a tak bylo poslání této práce naplněno.

Vlastní experimentální část je klasicky rozdělena na kapitoly "Materiál a metody", "Výsledky", "Diskuze" a "Závěry". Všechny použité metody jsou popsány podrobně a srozumitelně. To samé platí o výsledcích vlastních experimentů. Zvolené metody jsou plně odpovídající navrženým cílům disertace. Velkým kladem práce je značný počet analyzovaných kmenů hub ze sbírky entomopatogenních hub Oddělení rostlinolékařství, Katedry rostlinné výroby a agroekologie, ZF JČU v Českých Budějovicích.

K formální a grafické stránce předložené práce nemám připomínek. Jedná se o práci velmi dobře zpracovanou, která je psána jasným a stručným způsobem a která vede čtenáře bez oklik k podstatným výsledkům. Práce je doplněna kvalitními a výstižnými obrázky, grafy a tabulkami.

Práci považuji za zdařilou. Předkladatelka se zabývala výzkumně velmi zajímavou problematikou, která přinesla řadu poznatků, které by měly být publikovány. V "Seznamu vlastních publikovaných prací" je řešitelka uvedena jako další autor u 2 článků v recenzovaných časopisech, 1 uznané certifikované metodiky a 1 kapitoly v knize.

## K práci mám do diskuze následující dotazy a připomínky:

- Název disertační práce podle mého názoru neodpovídá jejímu obsahu.
- V publikaci Dictionary of the Fungi (2008) jsem našel zcela odlišné taxonomické zařazení rodu *Beauveria* než se uvádí v disertační práci. Kdo je autorem zařazení, které uvádíte?
- V práci chybí citače prací zabývajících se *B. bassiana* z posledních let (např. Abdulhai M. *et al.*: Pakistan Journal of Biological Sciences, 13 (21) (2010): 1052-1056; Meyling N.V., Eilenberg J.: Biological Control, 43 (2007): 145-155; Vega F.E. *et al.*: Biological Control, 46 (2008): 72-82).
- Obrázky 2 (str. 8) a 3 (str. 10) mají stejný popis. Popis obrázku 6 (str. 24) není úplný, chybí v něm zmínka o primerech.
- Do práce by bylo užitečné zařadit seznam používaných zkratk, většina zkratk je sice v textu vysvětlena, ale musí se delší dobu hledat.
  - Jsou Oborník *et al.* (2001) opravdu autoři primerů pro amplifikaci genů pro LSU rRNA NL1 a NL4 (str. 59)?
  - Názvy některých reagensů jsou v práci používány nejednotně (např. *Taq* DNA polymerázy, T4 DNA ligázy, adaptérů aj.).
- U složení reakčních směsí pro PCR je opakovaně nesprávně uváděna koncentrace primerů (10 pM) (např. str. 55).
- Na straně 55 je chybně uvedeno, že protokol SSR analýz vychází z metodiky Williams *et al.* (1990).
- Doktorandka používá v práci často anglické termíny (např. set molekulárních markerů, bramborová infuze, DNA ladder, cold blok, Nei-Li metrika, 1 min na max, fingerprint ke skórování, krok "stop", alignment sekvencí vzorků aj.)
- Opakovatelnost a reprodukovatelnost jsou slova stejného významu, stačí tedy uvádět jedno z nich (např. str. 77, 78).
- V tabulce 15 je výtěžek DNA nesprávně uváděn v nanogramech. U izolačního kytu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN má být výtěžek DNA 0,5-2,0 µg a podobně i u ostatních metod. Podle mých několikaletých zkušeností není možné zvládnout tímto kitem izolaci 96 vzorků za jeden den.
- Jak jste vypočítala cenu izolace jednoho vzorku DNA kitem od firmy QIAGEN? Podle mě je cena 120 Kč příliš vysoká.
- Svým tvrzením na straně 78 chcete říci, že izolace DNA klasickými metodami nejsou u více vzorků dobře opakovatelné?
  - Pracnost čipové elektroforézy mi po přečtení postupu jejího provedení připadá ve srovnání s dalšími metodami vyšší než je uvedeno v tabulce 17.
  - V některých dendrogramech (např. str. 88 a další) jsou špatně čitelné kódy použitých kmenů hub.
  - Myslím, že není rozdíl v nárocích na kvalitu templátové DNA pro PCR analýzy oblasti ITS a LSU rRNA (str. 78 a 79).
- V textu na straně 99 dole je odkaz na tabulku x (Má být 25.).

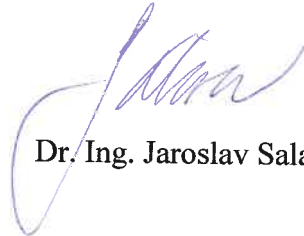
- Na straně 101 by mělo být uvedeno "... je homogenita populace NP Šumava potvrzena již třetím typem molekulárních markerů" místo "... třetím molekulárním markerem".
- Co máte na mysli "poddruhovou úrovní" na straně 103?
- Kdo určoval kmeny *B. bassiana* ze sbírky entomopatogenních hub ZF JČU v Českých Budějovicích pomocí morfologických a biologických znaků?
- Doktorandka zatím nepublikovala výsledky studie genetické variability kmenů *B. bassiana* z oblasti Národního parku Šumava. Proto bych se chtěl zeptat, jestli už byl připraven rukopis vědeckého sdělení, a pokud ano, v jaké fázi publikování se nachází?

### **Závěrečné hodnocení:**

Předložená disertační práce "Polyfaktoriální hodnocení kmenů mitosporických hub v systému řízených selekcí (na modelu *Beauveria bassiana*)" splňuje všechny formální požadavky. Autorka používala odpovídající metody a prokázala, že je schopna samostatné tvůrčí práce. Získané výsledky jsou na velmi dobré úrovni. Práce přináší nové praktické informace o metodách analýzy molekulárních markerů u hub a poznatky o genetické diverzitě kmenů *Beauveria bassiana* z oblasti Národního parku Šumava. Dosažené výsledky jsou významné, jak pro mykologický výzkum, tak pro praktické vedení sbírky entomopatogenních hub na ZF JČU v Českých Budějovicích a pro biologickou ochranu proti lýkožroutu smrkovému. Výsledky jsou dobrým přínosem pro další rozvoj vědeckého poznání v této oblasti.

Na základě dosažených výsledků prezentovaných v předložené práci **souhlasím, aby předložená disertační práce byla přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení byl Ing. Kateřině Š i m á č k o v é udělen akademický titul " D o k t o r "**.

V Praze dne 6. listopadu 2011

  
Dr. Ing. Jaroslav Salava

# OPONENTSKÝ POSUDEK

dizertační práce

**Doktorand:** Ing. Kateřina Šimáčková  
Katedra rostlinné výroby a agroekologie  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Téma dizertační práce:**

**Polyfaktoriální hodnocení kmenů mitosporických hub v systému řízených selekcí (na modelu *Beauveria bassiana*)**

**Rozsah dizertační práce:** 139 stran včetně 21 stran přehledu literatury se 189 citacemi, 31 obrázky a 21 tabulkami v textu

**Vedoucí dizertační práce:** Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Katedra rostlinné výroby a agroekologie  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
České Budějovice

**Oponent dizertační práce:** Doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.  
Oddělení rostlinné virologie  
Ústav molekulární biologie rostlin  
Biologické centrum AV ČR  
České Budějovice



Doktorská dizertační práce je zaměřena na problematiku polyfaktoriálního hodnocení kmenů mitosporických hub v systému řízených selekcí na modelu *Beauveria bassiana*. Mitosporické houby čili houby nedokonalé (*Deuteromycota, Fungi imperfecti*) je označení pro stopkovýtrusné a vřeckovýtrusné houby, u nichž nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování. Někdy se také označují jako anamorfní či konidiální. Houby nedokonalé se zpravidla nehodí do žádného z oddělení hub, protože mykologická taxonomie se zakládá především na pohlavních znacích, a ty u *Deuteromycota* chybí. Výtrusy (spory) vznikají u těchto hub jen nepohlavní cestou.

Rod *Beauveria*, do něhož se řadí i druh *Beauveria bassiana* reprezentují převážně druhy, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se vyskytují v půdě (např. při přezimování). Jedná se pravděpodobně o nejrozsáhleji studovaný rod entomopatogenních hub vzhledem k jejich potenciálu v biologické ochraně rostlin. Všechny druhy jsou fakultativními patogeny hmyzu a řada testovaných kmenů vykazuje vysokou patogenitu vůči významným listovým hmyzím škůdcům a některému půdnímu hmyzu. Proto lze jejich potenciál využít k biologické ochraně proti více jak 70 druhům hmyzu.

Předložená doktorská dizertační práce, v níž jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují, působí uceleným dojmem. Z celé práce je zřejmé, že převažuje experimentální, tedy originální část práce (97 stran včetně 21 tabulek a 24 obrázků v textu) nad částí kompilační (38 stran textu včetně 7 obrázků, z toho ÚVOD - 1 strana a obsáhlý, avšak velice čtivý LITERÁRNÍ PŘEHLED o 37 stranách).

Kapitola MATERIÁL A METODY v rozsahu 34 stran jasně, srozumitelně, přehledně a v některých případech snad až příliš podrobně popisuje použitý materiál a metody kultivace analyzovaných kmenů hub, uchování kultur, různé varianty izolace DNA, analýzy molekulárních markerů, separace a detekce PCR produktů apod. Domnívám se, že právě např. u přehledu různých variant izolace DNA popř. některých technik analýzy molekulárních markerů apod., pokud se jedná o rutinně používané komerční kity či použité protokoly bez modifikací, by stačil odkaz na příložený návod v kitu či příslušná citace.

Doktorandce se podařilo naplnit hlavní cíle dizertace. CÍLE PRÁCE jsou definovány jasně a přehledně s jednotlivými etapami, které je možné kontrolovat.

Jako velice zdařilou hodnotím kapitolu VÝSLEDKY celkem na 33 stranách textu pro jasné a srozumitelné formulace získaných údajů a rovněž pro velice fundované porovnání jednotlivých metod s přehledně uvedenými výhodami či nevýhodami. Jako příklad lze uvést tabulku 17 na str. 81, v níž jsou porovnány jednotlivé metody separace mikrosatelitů

s uvedením nákladů, časové náročnosti, vstupním množstvím DNA, pracností a citlivostí rozlišení. Následují kapitoly DISKUSE v rozsahu 5 stran a ZÁVĚR (2 strany).

Velice obsáhlý je pak přehled publikací v kapitole CITOVANÁ LITERATURA v rozsahu 21 stran zahrnující celkem 189 citací odpovídajících danému tématu. V literárním přehledu doktorandka využila především zdrojů zahraniční literatury. Vhodně je na závěr zařazen SEZNAM PUBLIKACÍ doktorandky.

Řešením doktorské dizertační práce byla získána celá řada nových poznatků. Pro hodnocení genetické variability všech zkoumaných souborů byly použity čtyři různé typy molekulárních markerů (SSR - analýza mikrosatelitů, analýza ITS regionu, analýza LSU rDNA a AFLP). Tyto typy analýz byly vybrány za účelem zahrnutí všech typů molekulárních markerů, které se v populačních analýzách používají nejčastěji, aby se tak získal co nejlepší výsledek v porovnání daných metod. Všechny analýzy prokázaly stejný charakter příbuznosti zkoumaných vzorků, a to jak naprostou homogenitu populace *Beauveria bassiana* sebranou v NP Šumava, tak polyfyletický charakter celého druhu *Beauveria bassiana*. Rovněž bylo potvrzeno, že všechny použité molekulární markery jsou vhodným nástrojem pro rodové i druhové zařazení neznámých vzorků, stejně tak i pro potvrzení taxonomického zařazení po provedených morfologických charakteristikách. Pro správnou taxonomickou determinaci se jevila jako nejvhodnější sekvenační analýza LSU rDNA nebo ITS regionu.

V posuzované dizertační práci je vhodně použito desetinného členění, práce je psána jasným a srozumitelným slohem, až na některé výjimky bez závažnějších stylistických a pravopisných chyb. Úroveň práce zvyšuje zařazení přehledných tabulek a obrázků v textu. Pozitivně hodnotím úpravu celé dizertační práce a rovněž tak i kulturu psaného projevu.

Doktorandka se dle SEZNAMU PUBLIKACÍ, který je součástí předložené dizertace, podílela celkem na 1 publikaci v impaktovaném časopise (IF = 0,594), na 1 publikaci v recenzovaném neimpaktovaném časopise, jedné metodice a jedné kapitole v knize.

#### **K posuzované doktorské dizertační práci mám následující připomínky:**

- 1) str. 3, odd. 2.1., 4. ř.: správně má být .....existuje.....
- 2) str. 3, odd. 2.1.1., 4. ř. zdola: správně ...*fumosorosea*...
- 3) str. 4, 6. ř.: správně ..... predeterminováno .....
- 4) str. 4, 9. ř.: větná stavba - použít souvětí (bez tečky), ne dvě věty
- 5) str. 7, 10. ř. zdola: správně .....jejich ....
- 6) str. 10, 2. ř. zdola: správně .....napadnou ...
- 7) str. 11, 2. ř. zdola: správně .... kterými .....

- 8) str. 27, 3. ř.: správně ..... ethidiumbromidu .....
- 9) str. 29, odd. 2.3.4.3., 9. ř.: správně ..... speciálního software .....
- 10) str. 35, odd. 2.3.5.5., 8. ř.: správně ..... *Ascomycetes* ....
- 11) str. 50, 51, 52, 53, 61: Při centrifugaci uvádíte RPM (otáčky) bez informací o rotoru, vhodnější by bylo uvádět hodnoty v g.
- 12) str. 55, 2. ř.: správně by mělo být ..... (Nováková 2008).
- 13) str. 77, 4. ř. a 2. ř. zdola: Opravit interpunkci - větná stavba - věty, souvětí.
- 14) str. 86, 7. ř.: správně ..... vyplývá .....
- 15) str. 91, odd. 5.3.2., 2. ř.: Opravit interpunkci - větná stavba - věty, souvětí, ...na jehož ...
- 16) str. 92, 7. ř.: Třetí podskupina (bez A).
- 17) str. 96, ř. 3 - 4: Opravit interpunkci - vytvořit souvětí, dále nejasné.
- 18) str. 96, 6. ř.: správně ..... jeho zařazení .....
- 19) str. 98, 2. ř.: správně ...po testování jak na .....
- 20) str. 104, odd. 5.7.1., 1. ř.: správně ...extrahovaná....
- 21) str. 104, odd. 5.7.1., 2. ř. zdola: chybí číslo tabulky (viz Tab.)
- 22) str. 106, ř. 1-3 zdola: Vytvořit souvětí z těchto 2 vět.
- 23) str. 110, 10. ř. zdola: Vytvořit souvětí z těchto 2 vět.
- 24) str. 111, 11. ř. zdola: správně ..... vykazovaly ....
- 25) str. 112, 5. ř. : Vytvořit souvětí z těchto 2 vět.
- 26) str. 124: Uvedena citace **Hardys et al.** (1992) na rozdíl od str. 18 - zde **Hadrys et al.** (1992).
- 27) str. 131: Uvedena citace **Riesberg** (1996) na rozdíl od str. 32 - zde **Riesbergr** (1996).
- 28) str. 104: Citace Suazo (2003) chybí v přehledu CITOVANÁ LITERATURA.

**Bližší vysvětlení požadují k níže uvedeným dotazům:**

1) Na str. 49 uvádíte, že pro optimalizaci množství a kvality extrahované DNA byly použity tři metody izolace komerčně dodávanými kity a dvě metody izolace pomocí CTAB v různých modifikacích. Pro každou metodu byly použity dva typy vzorků - čerstvé mycelium z kultury kultivované dva týdny na pevném médiu PDA a lyofilizovaná submerzní kultura kultivovaná tři dny v tekutém médiu PDB.

a) Byl nějaký průkazný rozdíl ve výtěžnosti DNA mezi těmito dvěma typy vzorků?

b) Kterou metodu izolace DNA z výše 5 uvedených byste vybrala jako neoptimálnější?

2) V amplifikačním programu na str. 55 uvádíte úvodní denaturaci pouze 45 sec. na rozdíl od dalších amplifikačních programů, kde se úvodní denaturace pohybuje v rozmezí 2-5 min. Mohla byste vysvětlit, proč je v tomto případě na rozdíl od ostatních tento časový interval dostačující?

3) Na str. 57 uvádíte, že štěpení amplifikovaných fragmentů DNA je možno provádět pomocí různých restričních endonukleáz a dále máte uvedeno celkem 14 použitých restriktáz. Byly tyto restriktázy použity záměrně nebo pouze proto, že byly k dispozici, tedy náhodně?

4) Na str. 75 uvádíte, že DNA fragmenty byly vizualizovány barvením pomocí ethidium bromidu. Barvivo SYBRGreen, které jste rovněž použila, nedoporučujete z důvodu možnosti ovlivnění mobility DNA v gelu v závislosti na její koncentraci. Zkusila jste použít i některá další interkalační činidla, např. Gel Red apod.? Pokud ano, jaké s nimi máte zkušenosti.

5) Na str. 113 píšete, že by mohlo dojít k využití aplikace kmene *Beauveria bassiana* odebraného z NP Šumava zpátky do této oblasti pro ochranu proti lýkožroutu smrkovému, než aplikovat komerční biopreparát, u něhož by nebyl znám původ.

a) Byla zaznamenána rezistence lýkožrouta smrkového proti kmenu *Beauveria bassiana*?

b) Domníváte se na základě Vašich zjištění, že by mělo opodstatnění použít např. v NP Šumava v boji proti lýkožroutu kmen *Beauveria bassiana* odebraný v jiné geografické oblasti ČR, popřípadě i v zahraničí, oproti použití kmene pocházejícího z NP Šumava?

### **Závěrečné hodnocení doktorské dizertační práce:**

V doktorské dizertační práci se podařilo splnit vytčené cíle v plném rozsahu. Předložená dizertace svědčí o pracovitosti doktorandky a splňuje podmínky kladené na tento typ práce, neboť doktorandka v předložené práci prokázala dostatečnou schopnost orientace v rozsáhlé světové literatuře, schopnost kriticky třídit informace a využívat je pro vlastní řešení. Ve své práci přináší důkazy o samostatném tvůrčím přístupu, který byl završen řadou výsledků, které jsou přínosem pro daný obor.

Na základě této skutečnosti proto **doporučuji doktorskou dizertační práci k obhajobě** a po uspokojivém zodpovězení a vysvětlení připomínek a dotazů doporučuji udělení titulu Ph.D. podle stávajícího vysokoškolského zákona a prováděcích předpisů MŠMT.

V Českých Budějovicích dne 3.11.2011

Doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.  
Biologické centrum AV ČR  
Ústav molekulární biologie rostlin  
České Budějovice