

Posudek na magisterskou diplomovou práci Tomáše Vodičky „Molekulární identifikace a fylogeneze produkčních kmenů *Chlorella* spp. používaných v řasových biotechnologiích“

Diplomová práce má zajímavé „aplikované“ téma – protože uvažovaný patentový kmen není možno charakterizovat jinak, je nutno použít molekulární marker. Volba tématu a to, že tohoto cíle bylo dosaženo, patří mezi velmi výrazné klady práce.

Rovněž literatura má solidní rozsah a v jejím seznamu jsem neobjevil žádné podstatné chyby – což je u studentských prací téměř rarita.

Průvodní rysy tohoto projektu však mají své chyby a to ne úplně malé. Úvodní kapitoly mají být rešerší k dané problematice. V případě této práce je to rešerše velmi intenzívně zmatená, informace plynou přes sebe bez ladu a skladu, myslím, že si v tom autor sám udělal dokonale bláznec. Zpracovávaný problém fylogeneze zelených řas sice nemá definitivní řešení a např. některé rody zcela jistě doznají změn, ale takový chaos, jak postuluje diplomant, v tom přece jen není. Určitě by celé věci prospělo, kdyby magisterský uchazeč více pracoval s primárními zdroji a méně pak s kompilačními učebnicemi typu Kalinovy skripta (!) z roku 1994 (na ty se odkazuje velmi často) nebo učebnici Váňa-Kalina a Lee. To jsou úctyhodné zdroje při učení se na zkoušku, ale i když jejich roky vydání vypadají recentně, jsou to znovuvydání, jejichž první edice pochází z počátku osmdesátých let, čili v „předmolekulární“ éře systematiky – tudíž je úplně mimo vydávat je za „nejnovější systém zelených řas“ – strana 6. Mám temné podezření, že diplomant na mých přednáškách spal, nebo je (ó hrůzo) vůbec nenavštěvoval, protože kdykoliv mluví o řasách jako o laboratorních „bílých myších“ je v obraze, ale jakmile zabředne do textu o řasách jako o organizmech, dostaví se značné problémy, spousta informací se tam ocitá v jakémisi náhodném výběru (třeba výčet typů stélek s příklady zahrnuje jen něco a klíč výběru je zcela náhodný). Proč jsou například v kapitole 3.3. Ulvophyceae za několika vyjmenovanými zástupci uvedené ty studie, které tam jsou? Proč je v kapitole která se jmenuje „rod *Chlorella*“ (str. 11) náhle odstavec o primární endosymbióze? Mnohá data jsou pak zcela chybná (ne každý zástupce rodu *Volvox* má tisíce buněk, kokální buňky nemají bičíky atd. – těchto chyb je v textu skutečně dost).

Obrázky mají velmi neortodoxní řazení – jmenují se a jdou po sobě přesně takto: Obr. 1,

Obr.2, Obrázek 2, Obr. 3a, Obr. 3b, Obr.5, Obr. 6, Obr.7, Obr.4, Obr.5, Obr.6, Obr.4

Jsou obrázky Obr.1 a Obr.2 autorova vlastní tvorba?

Ale jak jsem již předeslal, části C až E, což je vlastní jádro práce, jsou už výrazně lepší. Kromě pochval, které už jsem vyjádřil hned na začátku mám jeden dotaz a dvě poznámky. Metodika od strany 19. po stranu 23. na mě dělá dojem zcela standardní metodiky, dopodrobna opsané přesně podle návodů, přiložených v krabici s kitem a podobně. Je tomu tak? Jestliže ano, pak by tyto zdroje měly být citovány, takhle bez jakékoliv citace to vzbuzuje dojem vlastní autorovy tvorby celé metodiky.

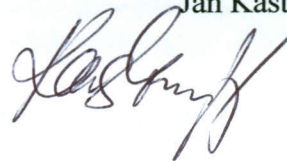
Poznámka č.1: strana 32 – autor píše, že zjistil, že obě malé podjednotky nenesou dostatek informace potřebné k rozlišení druhů *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* a *C. pyrenoidosa*. O těchto úsecích genu se ale už dlouho ví, že nejsou vhodné k rozlišení prakticky jakýchkoliv druhů, oba jsou dobré nástroje na vymezení rodů.

Poznámka č. 2: strana 30 – širší spektrum kmenů není k dispozici. Nemyslím si, že by v magisterské diplomové práci musel autor zpracovávat desítky různých kmenů, dobře zpracované tři mi nepřijdou jako něco zásadně chybného, ovšem postulovat celou věc tak, že kmeny největšího řasového plevele (*Chlorella* promine) nejsou k dispozici, pravda není. Jen v Budějovicích a jejich bezprostředním okolí je takových kmenů k dispozici ihned a zcela zdarma nejméně padesát.

Tyto dost vážné výhrady mě nutí ohodnotit diplomovou práci známkou velmi dobře, ale s definitivním soudem si počkám až na obhajobu.

V Českých Budějovicích , 14.1.2010

Jan Kaštovský

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Kaštovský', written in a cursive style.

## Oponentský posudek magisterské práce:

**Tomáše Vodičky**

### **Molekulární identifikace a fylogeneze produkčních kmenů *Chlorella* spp. používaných v řasových biotechnologiích**

Ve své práci se autor věnuje molekulární charakterizaci tří produkčních kmenů řasy chlorela. Primárním cílem práce bylo najít vhodné sekvence a navrhnout kmenově specifické primery použitelné pro identifikaci kmenů a jejich patentování. Sekvenování konzervativních 18S rDNA a části 16S rDNA bylo potom využito k zařazení těchto kmenů do fylogenetických stromů. Výsledky navíc ukázaly na nutnost revize komplikovaného rodu chlorela.

V rozsáhlém úvodu se autor zabývá taxonomií zelených řas, rolí chlorely při výzkumu fotosyntézy a v biotechnologiích a jednotlivými geny použitými pro molekulární identifikaci kmenů. Taxonomická část úvodu se mi jako neoborníkovi jevila značně neuspořádaná. Zdá se mi, že autor čerpal z několika systémů zelených řas a tyto systémy v úvodu střídá, navíc přeskakuje z jedné skupiny na druhou. Např. na straně 6 se ve druhém odstavci věnuje skupině Chlorophyta, v úvodu třetího přechází na Charophyta, aby na jeho konci opět skončil u Chlorophyt. V kapitole 3.- Chlorophyta opět řeší Charophyceae, v kapitole věnované třídě Chlorophyceae se věnuje řádu Chlorellales, který ale patří do třídy Trebouxiophyceae?, které je ale věnována kapitola další. Na úrovni rodu *Chlorella* se potom zabývá primární endosymbiózou, která definuje tři základní skupiny fotosyntetických eukaryot.

V metodách bývají standartně uvedeny pouze metody, které autor používal. Kultivaci produkčních kmenů (bez technických detailů) bych přesunul do úvodu.

- Jaké jsou výhody enzymatického čištění PCR produktu pro sekvenování ve srovnání s dalšími metodami purifikace PCR produktu? (K označeným dotazům/připomínkám prosím o vyjádření autora)

K výsledkům nemám zásadní připomínky, množství dat považuji za přiměřené. Navržené primery spolehlivě rozlišily tři testované kmene. Vzhledem k variabilitě dostupných sekvencí v oblasti navržených primerů je pravděpodobné že primery budou vhodné i k jejich identifikaci v případě patentování. Nicméně testování na širším spektru kmenů je zapotřebí a mělo bychom být i součástí této práce. Autor uvádí že žádné další kmene nebyly k dispozici, nicméně např. kmene z treboňské sbírky <http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php> jsou poměrně dobře dostupné.

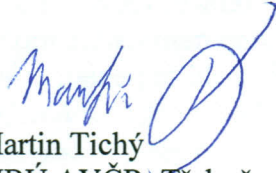
- Z výsledků se zdá, že 16S rDNA byla amplifikována primárně za účelem získání sekvencí pro kmenově specifické primery. Je konzervativnost získaných sekvencí opravdu tak překvapivá (str. 26)?

- U sinic se stává, že obsahují několik (různých) 16S rDNA. Je na to zapotřebí brát ohled i u řas? Jaký je původ druhého PCR produktu u A1 kmene (obr. 5)

V diskusi je uvedeno že základním problémem taxonomie rodu *Chlorella* je malá variabilita morfologických znaků. Já se domnívám, že základním problémem je nedostatek těchto znaků u malých kulatých buněk, kdy do tohoto rodu mohou být řazeny kmene které mají společné jen to že vypadají stejně pod mikroskopem. • Na rozdíl od autora si však nemyslím, že by existující morfologické znaky byly ovlivněny konvergencí.

Závěrem konstatuji, že autor zvládl škálu metodických postupů molekulární biologie a fylogenetiky, získal cenná experimentální data a naučil se tato data zpracovávat. Cíle práce byly splněny, magisterskou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení velmi dobře.

V Třeboni, 20.1. 2010

  
Martin Tichý  
MBÚ AVČR Třeboň