

Posudek diplomové práce

Diplomová práce: Studium genetické variability fytoplazem

Diplomant: Bc. Helena Čermáková

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jana Fránová, Dr.

Diplomantka přistoupila k řešení zadaného úkolu velmi zodpovědně. Pracovala velmi iniciativně pod dohledem vedoucí diplomové práce. Své teoretické poznatky získané z literatury konzultovala po praktické stránce i s pracovníky aplikovaného výzkumu. Zájem o danou problematiku potvrdila účastí na XVIII. České a slovenské konferenci o ochraně rostlin v září 2009, kde vystoupila se svým příspěvkem.

Zcela využila shromážděných literárních zdrojů i podkladů z konzultací s výzkumnými a provozními pracovníky. Cituje 69 literárních zdrojů, dotýkajících se věcně řešené problematiky. Všechny poznatky beze zbytku využila ve své práci.

Diplomantka se osvědčila i při praktických dovednostech. V rámci řešení diplomové práce provedla řadu laboratorních testů. Nedržela se pouze jedné testovací metody, ale pro porovnání výsledků vyzkoušela i další.

Diplomová práce je velmi dobře řešena. Některé dosažené výsledky jsou na vysoké odborné úrovni. V rámci této práce byly objeveny izoláty, které dosud nebyly zařazeny do genové databáze.

K obsahu mám pouze několik drobných připomínek:

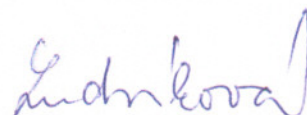
- str. 8, 31, 32 ... doporučila bych používat formu viz Příloha než vizte
- str. 13 ... Co je myšleno větou: Použití real time PCR pro zjištění fytoplazem se stále zlepšuje.
- Str. 15 ... Ozdravení množitelského materiálu termoterapií a meristémovými kulturami. V praxi se toto vůbec neprovádí. Množitelský materiál je odebírán z roubových množáren, z matečnic nebo z izolátů, kde jsou rostliny podle schématu EPPO testovány. Jako hlavní testovací metoda je brán biologický indexing, laboratorní metody jsou pouze doplňující. V ČR je podle zákona 326/2004 Sb. a vyhlášky 332/2006 Sb. testován množitelský materiál ovocných dřevin na proliferaci jabloně (AP) a šarku švestky (PPV).
- Str. 17 ... ESFY bylo zjištěno na třešních i višních. V cizí literatuře, hlavně německé, se používá jen jeden výraz pro třešně i višně.

Práce obsahuje všechny náležitosti a přes výše uvedené drobné připomínky hodnotím práci jako velmi zdařilou.

Diplomovou práci klasifikuji stupněm: **v ý b o r n ý**

V Holovousích 20.5. 2011

Ing. Hana Ludvíková



**Oponentský posudek na diplomovou práci „Studium genetické variability fytoplazem“
studentky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích Bc.
Heleny Čermákové**

Předložená diplomová práce představuje svým tematickým i metodickým zaměřením značně náročnou a zároveň aktuální problematiku. Přestože jsou pro detekci fytoplazem celosvětově rutinně používány molekulární analýzy jako je PCR v kombinaci s následným RFLP štěpením, často dochází k nespecifickým reakcím, zejména při použití některých kombinací primerů. U ovocných stromů je problémem i nepravidelná distribuce fytoplazem v jednotlivých částech rostlin v kombinaci s různou koncentrací těchto patogenů v rostlinách v závislosti na ročním období. Neméně významnou úlohu při molekulární detekci má i přítomnost inhibitorů v rostlinných tkáních zejména u dřevin a zároveň podobnost sekvence chloroplastové či plastidové RNA hostitelských rostlin s 16S rRNA fytoplazem. Znalost sekvenční variability izolátů zejména karanténních fytoplazem infikující rostliny na našem území má proto velký význam v souvislosti s požadavky kontroly zdravotního stavu rostlinného materiálu a s tím souvisejícími spolehlivými detekčními a identifikačními metodami.

V předkládané práci byla pro detekci vybraných izolátů fytoplazem a určení jejich genetické variability zvolena taktéž polymerázová řetězová reakce s následnou analýzou délkového polymorfizmu restričních fragmentů a sekvenční analýzou amplifikovaných fragmentů DNA. Do testu bylo zařazeno celkem 73 vzorků. Z toho 40 vzorků představovaly rostliny jetele, 26 vzorků bylo odebráno ze stromů hrušní, 4 vzorky z jabloní, 2 ze stromů meruněk a 1 z rostliny barvínku růžového. Pro sekvencování bylo vybráno celkem 5 izolátů fytoplazem, z nichž 4 jsou řazeny mezi karanténní organizmy. Získané sekvence byly odeslány do celosvětové genové databáze NCBI, z čehož sekvence genu *secA* u izolátu fytoplazmy chřadnutí hrušně je zde tímto zveřejněna vůbec poprvé.

Práce je zpracována na velmi dobré úrovni a odpovídá svou náplní požadavkům kladeným na diplomové práce. Přestože se jedná o značně náročnou problematiku, k samotnému zpracování mám následující připomínky spíše formálního charakteru:

- 1) U obsahu práce u kapitol 2.1, 2.2. a 2.3. bych doporučil doplnit slovo...fytoplazem. Taktéž na následující straně u popisu příloh doporučuji u přílohy 1, 2 a 3 uvést podrobnější popis alespoň tak, je uvedeno na str. 44 – 48.
- 2) V textu na str. 16 uvádíte jako příznak onemocnění fytoplazmou pouze anglický název witches' broom. Jak byste tento termín přeložila do češtiny?
- 3) Na str. 22 uvádíte, že společně s markerem či vzorky nanášíte do jamek agarózového gelu 1,5 μ l barvy. Lépe je používat termín nanášecí pufr, jelikož obarvení vlastní DNA je zajištěno prostřednictvím barviva GelRed.
- 4) Na téže straně č. 22 jste mezi primery pro amplifikaci 16S rRNA a mezerníku chybně zařadila i dvojice primerů AP13/AP10 a rpAP15f/rpAP15r. Sekvence jakých genů tyto primery skutečně amplifikují?
- 5) Slabinou studentských prací bývá komplexnost literatury citované v textu a v seznamu použité literatury. I zde je na str. 11 citována práce Bertaccini 2003, avšak na str. 34 chybí, podobně je na str. 20 uváděn článek Lee a kol. 1991, který v použité literatuře uveden není. Na str. 11 uvádíte práci Lee a Davis 1992, avšak v seznamu použité literatury na str. 38 je citována práce Lee a kol. 1992, podobně práce Hogenhout a kol. (str. 37 x str. 15). V textu i v seznamu literatury uvádíte článek Martini a kol. 2006, ve

skutečnosti se však jedná o článek Martini a kol. 2008, kde navíc na str. 39 chybí rozmezí stránek u tohoto literárního zdroje. Citace prací v seznamu použité literatury by měly být psány vždy jednotným stylem.

6) Ostatní nedostatky považuji za minoritní či za přehlédnutí.

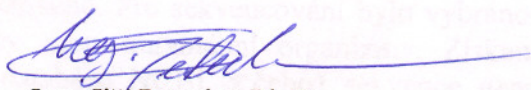
Ke studentce mám následující dotazy a žádám o jejich zodpovězení:

- 1) Proč jsou fytoplazmy citlivé na antibiotika tetracyklinové řady a né na penicilin?
- 2) Jaký literární zdroj z hlediska klasifikace fytoplazem považujete za nejvýznamnější?
- 3) V práci jste sekvencovala dva izoláty fytoplazmy chřadnutí hrušní. Kdy byla tato fytoplazma poprvé zaznamenána na území České republiky a jak probíhal její výzkum právě na našem území?

Vzhledem k obtížnosti tématu a rozsahu zpracovávaného materiálu, a to i přes výše uvedené připomínky, celkově hodnotím tuto diplomovou práci klasifikačním stupněm

- výborně-

a po zodpovězení výše uvedených dotazů ji doporučuji k obhajobě před státní zkušební komisí.



Ing. Jiří Peterka, Ph.D.
Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií,
ZF JU České Budějovice

V Českých Budějovicích, 12. 5. 2011