

Oponentský posudek magisterské práce Jana Michálka "Využití DGGE k popisu interakce mezi padlí dubovým Erysiphe alphitoides a společenstvem mikromycet ve fyloplánu dubů letních"

Předkládaná práce se pokouší řešit problém analýzy společenstev mikromycet na listech dubů infikovaných padlím dubovým pomocí relativně nové metody DGGE, která posouvá možnosti klasické PCR a gelové elektroforézy o další úroveň. Hned na úvod chci zdůraznit že se autor se nebál riskovat a pustil se do (často problematické) optimalizace podmínek denaturační gelové elektroforézy s vervou a výsledkem je velmi povedená magisterská práce. Ke kladným bodům za odvalu musím také přidat jednoznačnou aktuálnost tématu (padlí dubové patří mezi hospodářsky nejvýznamnější patogeny listnatých stromů) a novou metodiku, která se určitě bude hodit i ostatním laboratorním přírodovědecké fakulty, případně Biologického centra AVČR.

Mezi další klady řadím standardní a logické členění a výbornou úroveň češtiny. Z textu je jasné, že autor je formulačně velmi zdatný a množství překlepů a pravopisných chyb podprůměrné. Přiznám se, že jsem zavilým nepřítelem dlouhých úvodů a metodiky, ale v tomto případě jsou obě kapitoly (i při nadprůměrné délce) velmi čtivé a informativní. Rozhodně jsem neměl pocit, že by se autor snažil objem práce pouze nafouknout a nahnat počet stránek. Při řešení diplomové práce bylo použito poměrně široké spektrum metod „bílé“ i „zelené“ biologie. Přiznám se, že jsem schopen kriticky posoudit pouze „molekulární“ část metodiky, ale tady nemám připomínky. Oceňuji pečlivost a obezřetnost s jakou prováděl kontroly a interpretoval výsledky zatížené informačním šumem, který je spojený s DGGE. Z textu je vůbec patrné obrovské množství práce, které za ním stojí. Výsledky jsou prezentovány přehledným a odpovídajícím způsobem a i Diskuze, která bývá slabinou většiny prací, je dostatečně kritická a komplexní.

Vyložená negativa jsem neshledal, ale několik připomínek a dotazů ano. Nejprve k metodice a designu odběru vzorků... Stromy, ze kterých byly odebírány vzorky listů jsou rozděleny do dvou dvojic, přičemž v jedné dvojici se stromy bezprostředně dotýkaly, v té druhé jsou od sebe vzdáleny 244 metrů. Toto rozdělení nebylo v textu vysvětleno, ale předpokládám, že bylo úmyslné a jeho účelem bylo porovnání vývoje společenstev v závislosti na vzdálenosti jednotlivých stromů. Nejsem mykolog, ale předpokládám, že spory mikromycet se velmi efektivně přenáší větrem. Je podle autora 607 (případně 244) metrů dostatečných?

Z tabulky porovnávající účinnost různých metod izolace DNA u několika druhů hub (tab. 2, strana 14) vychází jako nejúčinnější metoda s využitím tekutého dusíku a fyzického násilí, kterou (předpokládám, že s menšími změnami) používal i autor. V Diskuzi pak ale upozorňuje na možné zkreslení výsledků suboptimální metodou izolace DNA u některých mikromycet. Jedná se pouze o spekulaci, nebo je toto tvrzení podpořeno konkrétními daty? Z vlastní zkušenosti, pravda na jiných organismech, vím, že jde v zásadě o nejúčinnější metodu, které se další můžou blížit, či vyrovnat.

Použitý molekulární marker, ITS, je (opět neznám situaci u hub) nechvalně známý konvergentní evolucí a tvorbou, mnohdy velmi odlišných, kopií. Bral autor v potaz podobná rizika a nemohly některé z detekovaných ampliconů při DGGE být právě takovými paralogy? Přítomnost dvou ampliconů u kultur 4 a 18 k tomu takové interpretaci přímo vybízí

Vytyčené cíle se podařilo splnit (v mezích možností) bezesbytku. Obávám se však, že i přes velké kvantum odvedené práce, se autorovi nepodařilo nashromáždit dostatečně reprezentativní vzorek pro publikaci v rozumném periodiku, což sebekriticky hodnotí v Diskuzi a je to samozřejmě škoda. Doufám, že si najde čas, prostředky, případně pokračovatele, který by projekt dotáhl do úspěšného konce. Předkládanou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm **Výborně**.

V Českých Budějovicích 28. 5. 2012


Aleš Horák

Posudek magisterské práce

Jan Michálek

Využití DGGE k popisu interakce mezi padlí dubovým *Erysiphe alphitoides* a společenstvem mikromycet ve fyloplánu dubů letních

Předložená práce Jana Michálka zkoumá společenství mikromycet ve fyloplánu dubů letních ve vztahu k padlí dubovému (*Erysiphe alphitoides*) za použití nástrojů molekulární ekologie, především DGGE a sekvenování. Jde o zajímavou práci, technicky náročnou a je jen škoda, že její celkovou hodnotu snižují nepřesnosti či drobné chyby/opomenutí především v úvodních kapitolách:

Str. 12 - absence kurzívy v latinském názvu padlí v prvním odstavci - *E. alphitoides*

- absence čárky ve 3. odstavci:

Protože naprostá většina hub vyniká nutričním minimalismem a ohromnou schopností regenerace můžeme prostřednictvím kultivace.....

- a konečně opět absence kurzívy v posledním odstavci:

.....charakteristického pro Ascomycota a Basidiomycota, zatímco *Zygomycota*, *Chytridiomycota* a *Oomycota* (říše *Chromalveolata*) mají mycelium nepřehrádkované (coenocytické).

Str. 13

- následující formulaci nepovažuji za příliš vhodnou pro vědeckou práci:

Využití molekulárních znaků umožňuje postihnout nezanedbatelnou část mikromycet, které nelze kultivovat, nebo je v kultuře „donutit“ k tvorbě struktur, na nichž závisí jejich identifikace.

Str. 15

- vyšínutí z vazby:

O mitochondriálních genech kódující cytochrom oxidázu

Str. 16

- opět absence čárky:

Pokud pracujeme s environmentálním vzorkem postupuje se následovně

Str. 18

- opět opomenutí kurzívy:

Charakterizovat interakci mezi *E. alphitoides* a společenstvem

Str. 21

- nesprávná formulace:

Za účelem základní kvantifikace životaschopných buněk v suspenzi

Při kultivaci na miskách neurčíme životaschopné buňky, ale pouze kultivovatelné!

- chybně uvedená stránka:

(obr. 5., str 18). – správně strana 23

Str. 24

- domnívám se, že metodická část by měla uvádět přesné údaje, a proto by bylo vhodné v prvním odstavci doplnit o jaké vzorky se jednalo a ve třetím co bylo lyzováno.

Str. 26

- v tabulce chybí většina primerů uváděných na předešlé straně

Str. 27

- formulace posledního odstavce o složení použitých gelů by si zasloužila upřesnění – v předkládané formě bude jasná zřejmě jen osobě dobře obeznámené s použitou metodou

Str. 28

- i následující formulace nejsou pro vědecké pojednání nejvhodnější:

Část roztoku se odlije stranou do mikrozkušavky pro kontrolu polymerace, která trvá přibližně hodinu. – tato formulace zpochybňuje procenta denurantu ve výsledném gelu

Před nanesením do jamek byly vzorky smíchány s 1x nanášecí barvou v poměru přibližně 4:1 až 3:1 (2x *loading dye* obsahovala 0.05% (w/v) bromphenol blue, 0.05% (w/v)

....nerovnoměrné rychlosti sloupců..... – sloupce asi žádnou rychlost nemají

....nechají se nejprve při požadovaném napětí 10 minut „zatáhnout“ do gelu a potom....

Str. 30

Způsob „optimalizace“ podmínek DGGE za použití pokusu a omylu mi připadá ne právě nejvhodnější. Klasická optimalizace DGGE spočívá v použití „perpendikulárního“ gelu pro stanovení vhodného gradientu denurantu a tzv. „time-travel“ gelu pro stanovení vhodné kombinace napětí a doby elektroforézy.

Str. 44

- následující větu by bylo vhodné upravit, či blíže vysvětlit:

Příležitostí pro tyto houby je bohužel také médium, použité k jejich izolaci a to je zásadním zdrojem zkreslení při využití kultivace k popisu složení společenstva mikroorganismů.

I přes všechny výše uvedené připomínky/komentáře považuji práci za zdařilou a doporučuji ji k obhajobě. Hodnotím ji známkou „velmi dobře“.

V Brně dne 24.5.2012


Ing. Martin Krsek, CSc.