



Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

Rozvojová 313

tel.: 225 106 819

165 02 Praha 6

e-mail: cerovska@ueb.cas.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci

Název: „Detekce a identifikace virů pomocí sekvenování nové generace (NGS)“

Autor: Bc. Kateřina Podrábská

Rozsah diplomové práce: 50 stran textu + přílohy, v klasickém členění na úvod, literární přehled, cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuse a závěr, reference.

Hlavním cílem diplomové práce byla bioinformatická analýza sekvenačních dat získaných metodou sekvenování nové generace (NGS) Illumina (Hi-Saq 2500) ze vzorků izolované celkové poly(A) obohacené RNA z jetele lučního za účelem určení stávající populace a nových virů u těchto rostlin vykazujících příznaky virového onemocnění.

Předložená práce je klasicky členěna, první část je stručným literárním přehledem týkajícím se diagnostických a detekčních metod používaných v rostlinné virologii s hlavním důrazem na metody, které jsou schopné detekovat nové rostlinné viry, s podrobným popisem a srovnáním sekvenačních metod, hlavně NGS. Tato část je přehledně zpracována. Obsahově vychází ze studia a analýzy téměř čtyřiceti původních vědeckých prací.

Další část práce obsahuje metodické postupy a výsledky, které jsou uvedeny ve formě tabulek a obrázků dokumentujících skládání genomových sekvencí, dále v bohaté příloze. Z práce je zřejmé, že autorka zvládla základní metody molekulární biologie a hlavně vyhodnocení získaných výsledků. I přes značný rozsah zpracovávaných dat, grafické provedení práce je pečlivé. V celé práci se odráží i pečlivé odborné vedení školitelky a školitele konzultanta.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

Neuvažovali jste o využití jiného systému NGS? Proč jste si vybrali stávající systém a jaké jsou jeho hlavní výhody a nevýhody oproti jiným platformám?

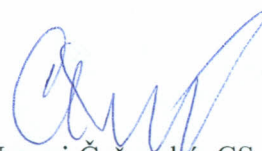
Jaké bylo zastoupení jednotlivých virů v získaných datech? Byla nějaká korelace mezi počtem čtení a přítomností/absencí polyA konce?

K celé práci mám i několik připomínek jazykových: Proč užíváte slovo próba, česky lépe je použít slovo sonda. V práci je použito více anglikanismů, které by mohly být nahrazeny českými ekvivalenty, dále si myslím, že přídavné jméno přivlastňovací „Sangerovo“ (sekvenování) by mělo mít v různých pádech různé pádové koncovky. Dále se chci zeptat, jestli jste opravdu používala 100% ethanol.

V práci chybí seznam zkratek, napomohl by lepší srozumitelnosti textu.

Práce Bc.Kateřiny Podrábské odpovídá jak množstvím výsledků, tak i svým zpracováním požadavkům kladeným na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím jako výbornou.

V Praze 3. května 2017



Doc. RNDr. Noemi Čerovská, CSc.

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Kateřiny Podrábské **Detekce a identifikace virů pomocí sekvenování nové generace (NGS)**

Hned na úvod se přiznám, že o rostlinných virech nevím téměř nic. Jako vášnivý zahrádkář a milovník čerstvého ovoce a zeleniny k nim mám spíše negativní vztah. Jako vědec studující diverzitu a ekologii planktonu zase tuším, že viry obecně jsou nezbytnou složkou ekosystému, jejichž diverzita, četnost a ekologická role není zdaleka známa tak, jak by zasluhovala. Při posuzování práce se tak zaměřím spíše na metodickou část a interpretaci dat a budu doufat, že údaje v obecném Úvodu a Literárním přehledu jsou správné a že použitá literatura je relevantní a reprezentativní.

Práce má standardní členění a je psaná slušnou češtinou. Pokud bych měl po formální stránce něco vytknout výše zmíněným prvním dvěma částem, tak snad nedostatečné strukturování. Odstavce jsou dlouhé a hůře se v nich orientuje. Názvy kapitol by také mohly být zvýrazněny tučným fontem, lépe by tak vynikly v textu a usnadnily orientaci. Autorka se sice občas dopustila drobných formulačních nepřesností (např. strana 8., při porovnání délky čtení NGS a klasické Sangerovy metody z NGS technik vyňala PacBio a OxNan, aniž by to nějak uvedla/zdůvodnila), ale těch jsem objevil minimum. Literární přehled je pak zaměřen spíše metodicky, chybí mi obecnější kapitola o mechanismech interakce hostitel – virus, jakým způsobem se rostliny virové infekci brání a jak se s ní vyrovnávají.

Metodika je pak tradičně obsírná a podrobná. Vzhledem k počtu odevzdávaných kopií každé „diplomky“ je to plýtvání papírem a trest pro poctivého oponenta, který každý rok čte několikrát dokola totéž. Myslím, že tam, kde se studentka pouze drží návodu výrobce, by toto stačilo uvést a ne postup otrocky přepisovat na papír. Výjimkou je část, která popisuje bioinformatické zpracování dat. Ta je pro výsledky práce naprosto stěžejní, protože při ní autorka z krátkých čtení skládala delších fragmenty DNA, z nichž pak usuzovala na přítomnost virů a které se pokoušela prodloužit pomocí RT-PCR a 5' a 3' RACE. Tato část mi přijde naopak stručná až příliš, z velké části totiž chybí parametry použité při výše uvedeném skládání/asemláži. Předložený text působí dojmem, že autorka prostě prohnala ošetřená Illumina čtení za přednastavených parametrů a výsledkem se pak už dále kriticky nezabývala. Přiznám se, že s použitým SW nemám praktické zkušenosti, takže neznám míru parametrizace asemláže, ale pochybuji, že by tato nebyla možná. A pokud opravdu ne, tak existuje velké množství volně dostupného SW, kde to lze. Přitom, pokud by si se skládáním krátkých čtení trochu pohrála, mohla si pak pravděpodobně ušetřit (alespoň částečně) zdlouhavé a nákladné prodlužování fragmentů virového genomu pomocí PCR a 5' a 3' RACE. Možná se mýlím a autorka strávila spoustu hodin optimalizací tohoto kroku, ale v textu o tom zkrátka není ani zmínka. Přes tuto výhradu mi metodika přijde odpovídající stupni studia a problematice.

Výsledky jsou prezentovány v zásadě patřičnou formou a je z nich patrné, že autorka nejspíš vynaložila velké úsilí a strávila spoustu času prodlužováním fragmentů virových genomů získaných bioinformatickou analýzou. Ty pak byly anotovány programem Geneious, zdá se, že opět odpovídajícím způsobem. Pokud bych měl něco vytknout, tak snad pouze občasnou nepřehlednost textu. Ten obsahuje spoustu zkratk, čísel a závorek, díky čemuž je těžké udržet pozornost. Myslím, že to šlo napsat čtivěji, ale u výsledků (na rozdíl od Diskuze) to zas až tak nevádí. Druhou připomínkou je kvalita obrázků. Ty nejspíš pocházejí z výše uvedeného programu Geneious a po grafické stránce i srozumitelnosti trochu pokulhávají. A do třetice, kromě RCCA a SDV virů nebyl obsah genomů nijak specifikován ani komentován. Anotace je pouze uvedena v podobě zkratk na obrázcích, to k tomu opravdu nebylo co říct?

Diskuze se omezuje na kritickou analýzu získaných fragmentů virových genomů jejich porovnáním s nejpodobnějšími publikovanými sekvencemi. Autorka ukazuje schopnost práce s literaturou, je ale opět plná zkratk a čísel, její čtení je dost nezábavné a některé pasáže mi tam chybí (viz níže). Nicméně svou funkci (částečně) plní. Závěr obsahuje stručné a výstižné shrnutí a nemám k němu závažnějších připomínek. Těch vlastně moc nemám ani k práci samotné. Přijde mi sice trochu nedotažená a nemastná-neslaná, ale... jak jsem již uvedl, nejsem odborník na danou

problematiku, takže posouzení atraktivity tématu nechám na ostatních. Nepřesností či nešťastných formulací jsem moc nenašel. Vytýčené cíle se podařilo splnit, i když k nim možná vedla snazší cesta. Diskuze mohla být, pravda, hlubší a rozsáhlejší. Na závěr jsem si pro autorku nachystal následující otázky, jejichž zodpovězení jsem čekal v Diskuzi a které bych si rád vyslechl alespoň u obhajoby:

- přítomnost virů v asembláži čtení z NGS byla detekována pomocí homologního vyhledávání BLAST. Jaké byly použity vstupní parametry, které jsou zásadní pro citlivost metody (mimoходом opět chybí v Metodice)? Připouští si autorka možnost falešně pozitivních a falešně negativních výsledků? Jak k nim případně mohlo dojít?

- byly všechny identifikované viry v okamžiku izolace v rostlině aktivní? Odpověď, prosím, zdůvodněte?

- jak ovlivňuje koinfekce několika viry stav hostitelské rostliny? Liší se výrazně zátěž mnohonásobné infekce od infekce jednoduché? Je taková mnohonásobná infekce běžná?

I přes výše uvedené výhrady považuji práci za odpovídající magisterskému stupni, známkou ji však ohodnotím až po shlédnutí obhajoby.

V Českých Budějovicích 19. 5. 2017



Aleš Horák