

Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci

Ing. Dagmar Stehlíkové

(JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH,
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA)

Metoda loop-mediated isothermal amplification pro detekci fytopatogenních mikroorganismů

Oponent

doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

(Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta, ústav Mendeleum)

Obecná charakteristika práce:

Předložená dizertační práce je členěna ve formě, která je pro tento typ prací standardní. To znamená, že obsahuje abstrakt, obsah, literární přehled včetně použitých literárních zdrojů, cíle a hypotézy, výsledky, diskusi a závěr. Těmto obvyklým kapitolám předchází bližší představení dizertantky prostřednictvím výčtu jejích dosavadních výzkumných aktivit včetně realizovaných nebo zamýšlených publikací a řešených projektů. Zde je možné konstatovat, že hlavní podíl dosud realizovaných publikačních výstupů je v recenzovaných časopisech mimo databáze WoS nebo Scopus, 1 x se jedná o spoluautorství u článku v časopise s IF. V současné době jsou odeslány do redakcí časopisů s IF také 3 další rukopisy. Celkový rozsah práce je 87 číslovaných stran, tabulky a obrázky jsou zařazovány na příslušná místa v textu.

Zhodnocení dizertační práce:

V **literárním přehledu** se dizertantka nejdříve detailně zabývá představením patogenů, na jejichž detekci je předkládaná dizertační práce zaměřena. Následují pasáže zabývající se obecnými možnostmi detekce důležitých fytopatogenních mikroorganismů z okruhu *Xanthomonas* spp. a karanténní houby *Fusarium circinatum*. V poslední části je představena metoda LAMP z hlediska jejího principu, možností navrhnout vlastní detekční systém a způsobů detekce amplifikačního signálu. Celkově je možné konstatovat, že literární přehled je

zpracován přehledně a srozumitelně, zahrnuje nejnovější poznatky podložené širokou škálou citovaných literárních zdrojů a celkově nabízí kvalifikovaný základ pro kvalitní zpracování řešené problematiky.

Cíle a hypotézy práce se podařilo formulovat jasně, jsou aktuální a s ambicí rozšířit úroveň poznání v oblastech, které byly identifikovány jakožto důležité pro zlepšení ochrany vůči vybraným patogenům. Na základě představených **výsledků** lze konstatovat, že stanovené cíle byly splněny. Následuje **diskuse**, kde dizertantka dle mého názoru využila možnost konfrontace nově získaných poznatků s aktuálním stavem poznání pouze částečně. V některých pasážích jsou popsány již dříve zmiňované nebo všeobecně známé skutečnosti, v případě kapitoly 6.1.4. by bylo dle mého názoru vhodnější zařazení do literárního přehledu. Přítom množství zcela jistě prováděných optimalizačních experimentů nebo například srovnání s jinými detekčními technikami nabízí možnost diskutovat získané výsledky mnohem důkladněji. **Po formální stránce** má práce dobrou úroveň a má odpovídající grafickou dokumentaci. Míra výskytu překlepů nebo problematických formulací dosahuje úrovně běžné pro tento typ prací (některé příklady viz níže).

Připomínky oponenta:

Jak již bylo uvedeno, v předkládané práci lze nalézt sporadické formální chyby nebo překlepy. Mezi zásadnější připomínky patří:

s. 28, 38 (např.) – v rámci dizertační práce najdeme pro stav, kdy DNA oligonukleotid hybridizuje s DNA termíny typu „nasedání primerů“ nebo „annealing“. Je potřeba terminologii sjednotit a nepoužívat laboratorní slang. Podobně např. „cycler“ (str. 32) nebo „filtrované špičky“ (str. 42).

s. 38 – Část tabulky č.2 v rámci kapitoly „Materiál a metodika“ nesprávně obsahuje také výsledky testování, které mají být prezentovány až v příslušné kapitole.

s. 40,43 – obecně je pro čitatele dizertační práce obtížné vysledovat, které konkrétní *in silico* analýzy byly u jednotlivých patogenů provedeny v rámci výběru cílových genomových oblastí. Příkladem budiž například první 2 věty na stranách č. 40,43.

s. 43 – několikrát je použita zkratka INSTA. Předpokládám, že se ve skutečnosti jedná o organizaci ISTA (The International Seed Testing Association; viz např. strana 43).

s. 50 – legenda k obrázku č. 12 je zmatečná

s. 62 – legenda k obrázku č. 26 chybí

Dotazy oponenta:

- na obrázku č. 23 jsou zachyceny výsledky detekce navrženou LAMP metodou v uměle infikovaných rostlinách. Těch bylo celkem 40, proč výsledky analýzy zobrazují pouze 3 vzorky?

- v rámci prezentace pro obhajobu dizertační práce prosím popište jak a které *in silico* analýzy v jednotlivých krocích pobíhaly.

- LAMP je prezentována jakožto velmi citlivá metoda. Jaké máte zkušenosti s falešně pozitivními vzorky? Nenastane problém, pokud bude v jedné laboratoři opakovaně prováděn test stejného patogenu?

- Vzhledem k charakteru LAMP metody mají tyto analýzy vysoký potenciál pro využití v praxi. Můžete odhadnout cenu 1 stanovení metodou LAMP? Jak vychází s jinými detekčními metodami?

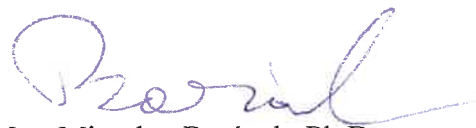
Souhrnné hodnocení práce:

Přes menší zaznamenané nedostatky je možné konstatovat, že předložená dizertační práce přináší mnohé nové poznatky, které jsou důležité v oblasti aplikace moderních testovacích metod jak ve výzkumu, tak i v praxi. V tomto ohledu byl kladen důraz na vytvoření protokolů s nízkými materiálními a přístrojovými nároky, které umožňují detekce příslušných rostlinných patogenů přímo v terénu. Z prezentovaných výsledků je evidentní, že doktorandka je schopna samostatné vědecké práce, velmi dobře se orientuje ve studované problematice, je schopná formulovat pracovní hypotézy a zvolit k jejich ověření vhodné experimentální nástroje. Ne zcela optimální diskuse je pravděpodobně odrazem menších zkušeností dizertantky, které se jistě budou v průběhu její kariéry zvyšovat. Dosažené výsledky jsou dokladem, že stanovené cíle dizertační práce byly splněny v odpovídajícím rozsahu.

Závěr:

Konstatuji, že oponovaná dizertační práce Ing. Dagmar Stehlíkové splňuje v plném rozsahu požadavky kladené na tento typ prací. Proto ji doporučuji k obhajobě a po úspěšném obhájení doporučuji udělení titulu Ph.D.

V Lednici dne 2.11. 2019



doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

Posudek doktorské disertační práce Ing. Dagmar Stehlíková

Vypracoval: prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Předložená práce je v podstatě monotematická a věnuje se metodám detekce patogenních agens pomocí metody LAMP.

Práce má klasický formát a přiměřený rozsah.

Literární úvod nejprve popisuje patogenní bakterie rodu *Xanthomonas*, jejich vlastnosti a způsob jejich patogenního působení a účinky na hostitele. Všiml jsem si drobné chyby, na straně 14 studentka tvrdí, že zkoumané bakterie „jsou katalyticky pozitivní“. Dovoluji si poznamenat, že xanthan je bezbarvý.

Další část je věnována vývoje detekce několika patogenů náležících k rodu *Xanthomonas*. Podobně se další kapitola teoretického úvodu věnuje patogenní houbě *Fusarium circinatum*, jejímu rozšíření a účinkům na vybrané rostliny.

Dále se teoretický úvod věnuje popisu a hodnocení jednotlivých molekulárních metod detekce patogenů, zvláště LAMP. Zaujalo mě, že se metoda LAMP stala, zdá se, poměrně perspektivní a široce využívanou a existuje v mnoha aplikacích.

Metodická část je poměrně podrobná. Jednotlivé kroky vývoje metody jsou v některých případech detailně popsány a jsou též identifikovány kritické body při vývoji a provedení metod. Tato část práce je tedy velmi přínosná a může být také výborným návodem pro další studenty a vědecké pracovníky, kteří by chtěli na tuto práci navázat. Naopak některé kroky, zvláště při vývoji primerů a selekci cílových sekvencí jsou jen letmo zmíněny, a jak jsem později zjistil, nejsou rozebrány ani v části výsledků.

Výsledková část je na disertační práci svým rozsahem poměrně stručná i s přihlédnutím k tomu, že obsahuje řadu fotografií, které ovšem dokumentují výsledky experimentů.

První část výsledkové části se věnuje detekci bakterií rodu *Xanthomonas*, jak jsem uvedl, je poměrně stručná, jsou uvedeny výsledky úspěšných experimentů, není příliš patrné, zda v průběhu řešení docházelo k nějaké optimalizaci metody, či byly řešeny nějaké problémy. Určitá optimalizace je sice zmíněna, ale není dokumentována. Nepovažuji za příliš šťastné, že je diskuze od výsledků oddělena, navíc je diskuze do značné míry rekapitulací výsledků. U kapitoly diskuze 6.1.4 není zcela jasné, kde autorka píše o svých výsledcích a kde o výsledcích jiných autorů.

Posudek doktorské disertační práce Ing. Dagmar Stehlíková

Vypracoval: prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Předložená práce je v podstatě monotematická a věnuje se metodám detekce patogenních agens pomocí metody LAMP.

Práce má klasický formát a přiměřený rozsah.

Literární úvod nejprve popisuje patogenní bakterie rodu *Xanthomonas*, jejich vlastnosti a způsob jejich patogenního působení a účinky na hostitele. Všiml jsem si drobné chyby, na straně 14 studentka tvrdí, že zkoumané bakterie „jsou katalyticky pozitivní“. Dovoluji si poznamenat, že xanthan je bezbarvý.

Další část je věnována vývoje detekce několika patogenů náležejících k rodu *Xanthomonas*. Podobně se další kapitola teoretického úvodu věnuje patogenní houbě *Fusarium circinatum*, jejímu rozšíření a účinkům na vybrané rostliny.

Dále se teoretický úvod věnuje popisu a hodnocení jednotlivých molekulárních metod detekce patogenů, zvláště LAMP. Zaujalo mě, že se metoda LAMP stala, zdá se, poměrně perspektivní a široce využívanou a existuje v mnoha aplikacích.

Metodická část je poměrně podrobná. Jednotlivé kroky vývoje metody jsou v některých případech detailně popsány a jsou též identifikovány kritické body při vývoji a provedení metod. Tato část práce je tedy velmi přínosná a může být také výborným návodem pro další studenty a vědecké pracovníky, kteří by chtěli na tuto práci navázat. Naopak některé kroky, zvláště při vývoji primerů a selekci cílových sekvencí jsou jen letmo zmíněny, a jak jsem později zjistil, nejsou rozebrány ani v části výsledků.

Výsledková část je na disertační práci svým rozsahem poměrně stručná i s přihlédnutím k tomu, že obsahuje řadu fotografií, které ovšem dokumentují výsledky experimentů.

První část výsledkové části se věnuje detekci bakterií rodu *Xanthomonas*, jak jsem uvedl, je poměrně stručná, jsou uvedeny výsledky úspěšných experimentů, není příliš patrné, zda v průběhu řešení docházelo k nějaké optimalizaci metody, či byly řešeny nějaké problémy. Určitá optimalizace je sice zmíněna, ale není dokumentována. Nepovažuji za příliš šťastné, že je diskuze od výsledků oddělena, navíc je diskuze do značné míry rekapitulací výsledků. U kapitoly diskuze 6.1.4 není zcela jasné, kde autorka píše o svých výsledcích a kde o výsledcích jiných autorů.

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Dagmar Stehlíkové

„Metoda loop-mediated isothermal amplification pro detekci fytopatogenních mikroorganismů“

Oponent: Ing. Miloň Dvořák, Ph.D., Ústav ochrany lesů a myslivosti, Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Autorka se ve své práci zabývá mimořádně aktuálním, akutně potřebným tématem s velkým potenciálem praktického využití. Jde o aplikaci molekulárně-biologické metody LAMP v oboru detekce fytopatogenních bakterií a hub. Konkrétně jde o karanténní patogeny z rodu *Xanthomonas* způsobující bakteriální skvrnitost rajčete a papriky a *Fusarium circinatum*, které je původcem pryskyřičné rakoviny borovice. Doktorandka vyvinula a různou měrou i otestovala nové sady primerů s asimilačními sondami. Navíc aplikovala metodiku na platformě Smart-Dart umožňující velice citlivou a specifickou detekci patogenů přímo v terénu, bez nutnosti využití nepřenosného laboratorního vybavení.

Práce je uvedena anglickým souhrnem, který čtenáře vhodně seznamuje s postupem práce a nejdůležitějšími výsledky. Pokud by ale měl být tento souhrn jakkoliv publikován, vyžaduje jazykovou korekturu. Angličtina tohoto textu obsahuje řadu chybných výrazů a místy se bohužel nedokáže oprostít od českého větného slovosledu.

Následuje seznam recenzovaných a impaktovaných publikací, které autorka během svého studia (spolu)publikovala, nebo alespoň odeslala k publikování. Obsahuje šest publikací typu Jrec, jednu publikovanou impaktovanou publikaci (Jimp) a tři publikace odeslané k publikování do periodik prvního, druhého a čtvrtého kvartilu. Právě tyto tři posledně zmíněné tituly prokazují schopnost autorky aktivně a velmi intenzivně spolupracovat s mezinárodními výzkumnými týmy špičkové kvality, jako je například Italská akademie věd a její Institut pro ochranu rostlin v Sesto Fiorentino. Autorka také mj. zmiňuje aktivní účast na zahraničních konferencích v Brazílii a Itálii, což vypovídá nejen o jejím aktivním přístupu k vědecké práci, ale i o dobrém zázemí na Zemědělské fakultě. Pro podporu své práce získala několik interních i externích grantů.

Další text se odvíjí podle standardního schématu; k dispozici je dostatečně zevrubná literární rešerše, ve které autorka shromáždila maximum poznatků o zmíněných fytopatogenech a metodách jejich detekce, následuje popis použité metodiky, přehled výsledků, diskuze, závěr a seznam použité literatury.

Po formální stránce se dá práci leccos vytknout, i když celkově je formální úprava (členění kapitol, formátování textu) odpovídající a logické. Překlepy se neobjevují zřídka a

některé formulace jsou natolik nešťastné, že vedou buďto k nepochopitelnosti sdělované informace, nebo přinejmenším k pousmání, jako například věta: „Inokulační metoda byla zvolena pomocí páráték.“ Nešvarem je také nedostatečné citování obrázků; autorka vždy přímo pod obrázkem uvádí jen internetový odkaz. U všech fotografií chybí standardní informace o jejich autorovi, místě a času snímku. Vysvětlivky obrázků jsou někdy nahoře, někdy dole, někdy chybí úplně a zejména v kapitole Výsledky, např. obr. 12, jsou díky tomu poměrně těžko pochopitelné. Věřím, že během prezentace při obhajobě práce autorka snímky elektroforetických gelů dostatečně okomentuje. Naopak formálně správně autorka psala latinské názvy, ačkoliv často za prvně uváděným názvem chybí autorské zkratky.

Literární přehled je vhodně koncipován a poměrně přehledně uvádí čtenáře do problematiky. Mezi hůře čtivé pasáže patří doslovný výčet všech států s výskytem xantomonád, který by bylo vhodné nahradit mapkou, tak, jak to autorka udělala v případě *F. circinatum*. Výčet hostitelských rostlin by zasloužil více citací. Obrázek 1 je zřejmě chybný; ukazuje symptomy houbového patogenu *Septoria* sp.

1. Na příkladu vhodně zvoleného obrázku se symptomy infekce xantomonádami ukažte správný způsob citace internetového obrazového zdroje.

Kapitola týkající se biologie, obrany a ochrany před xantomonádami nepůsobí příliš uspořádaným dojmem. Strohé věty tématicky nenavazují a např. u zmínky o existenci rezistentních odrůd postrádám citaci. Kapitola o obranných opatřeních u fusária má obdobný problém.

2. Vysvětlíte, proč je *F. circinatum* v podmínkách českých lesních školek hrozba pro modřín a smrk, ačkoliv je pryskyřičná rakovina onemocnění borovic (douglasky).

3. V souvislosti s genomem *F. circinatum* zmiňujete „neortologické oblasti ITS 2“. Co tento pojem znamená a proč může tato vlastnost vést k nesprávné interpretaci fylogenetických dat?

Metodika dostatečně a detailně popisuje použité metody a materiál. Mezi řešením detekčních technik jednotlivých druhů xantomonád jsou ale rozdíly, a to jak ve strukturování textu, tak především v preciznosti přístupu k návrhu primerů a jejich testování. Zdá se, že narůstá postupně podle jednotlivých druhů; v případě *X. euvesicatoria* zahrnuje testování dokonce *in planta* inokulační test.

4. Proč se metodika návrhu a testování primerů druh od druhu částečně liší? Např. proč není spektrum druhů použitých pro testování specifity primerů obdobné? Proč se vybíralo k zacílení detekce v případě *X. vesicatoria* mezi 24 genů a u dalších druhů se různé genové oblasti neporovnávaly; byl vybrán jeden a u *X. euvesicatoria* navíc není zmíněno jaký.

5. Specifita primerů LAMP byla prvně testována pomocí PCR s použitím pouze páru vnějších LAMP primerů. V literárním přehledu uvádíte, že LAMP má ve srovnání s PCR lepší účinnost a nižší detekční limit. Proto by mohla zůstat určitá část nespecifity reakce neodhalena. Zopakovala jste test specifity primerů také s kompletní sadou primerů z metodou LAMP?

Výsledky jsou podány odpovídajícím způsobem a doloženy vhodnými obrazovými výstupy s již zmíněnými formálními nedostatky. Úchvatná je fotografie výstupu

kolorimetrického LAMP, kde je patrný pozitivní vzorek podle jasného zabarvení zkumavky. Trochu nadbytečně autorka uvádí výsledky opakovaním pasáží z kapitoly o metodice.

6. *Na str. 48 u návrhu primerů pro X. vesicatoria se píše: „Vzhledem k velkému množství DNA amplifikované metodou LAMP byl postupně snižován čas reakce z 1 hodiny na 30 min při dodržení stejné teploty, čímž bylo docíleno pozitivního detekčního signálu pouze u X. vesicatoria.“ Znamená tedy tato formulace, že při hodinové reakci byly detekovány i nespecifické druhy? Existuje riziko, že při reakci zkrácené na 30 minut dojde k nespecifické amplifikaci např. X. perforans, pokud bude v reakci 10x více DNA než v uvedeném testovaném případě?*

7. *Z obr. 25 vyplývá, že se na platformě Genie II amplifikuje vzorek o nejvyšší koncentraci DNA nejpomaleji. Jaké proto máte vysvětlení?*

Diskuze není špatná. Pouze u *X. vesicatoria* jde spíš o shrnutí výsledků; chybí konkrétní srovnání s ostatními publikovanými metodami. Obecně bych v diskusi uvítal detailnější srovnání s existujícími detekčními technikami, zejména co se týká detekčního limitu.

8. *Detekční techniky pro xantomonády jste optimalizovala na real-time PCR termocykleru a nakonec převedla na platformu Smart-Dart. Projevil se převod na „primitivnější“ hardware zvýšením detekčního limitu metody?*

9. *Bylo by možné doladit techniku LAMP detekce na platformě použitelné v terénu v triplexu (tj. pro X. vesicatoria, X. gardneri a X. euvesicatoria)?*

Disertační práci Ing. Dagmar Stehlíkové hodnotím kladně a **doporučuji k obhajobě**. Přes některé formální nedostatky odpovídajícím způsobem dokumentuje komplexní experiment týkající se čtyř významných karanténních fytopatogenů a prokazuje mimořádnou erudici autorky.

V Brně, dne 4. 11. 2019



Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.