

Oponentský posudek

Disertační práce: **Mykotoxikologická kvalita ovsa**

Autorka práce: **Ing. Hana Pejsarová**

Oponent: **Ing. Martin Žabka, Ph.D.**

Téma disertační práce Ing. Hany Pejsarové pod vedením školitelky doc. Jany Pexové je primárně zaměřeno na problematiku výskytu hub rodu *Fusarium* ve spojitosti s kontaminací zrna ovsa trichotheceinovými mykotoxiny. Sledované kvantitativní a kvalitativní předsklizňové a posklizňové parametry jsou s mnohými faktory, jako je například odrůda, počasí a spektrum izolovaných patogenů, dávány do logického komplexu, v rámci něhož jsou posléze statisticky analyzovány jednotlivé korelace a zkoumány příčinné souvislosti. Z tohoto pohledu si dovoluji práci vyzdvihnout jako poměrně ambiciózní a náročnou i s přihlédnutím k nevyzpytatelnosti zahrnutých externích faktorů, což se také projevilo v jednom z ročníků poničením části úrody, jak autorka sama uvádí. Porozumění fenoménu produkce mykotoxinů považuji za velmi důležité jak z praktického tak z vědeckého hlediska a proto zaměření se autorky na tuto problematiku oceňuji.

Samotná disertační práce je klasicky pojata a členěna dle akademických zvyklostí. Úvod práce je široce pojatý a zasazuje danou problematiku do smysluplného kontextu, přičemž dostatečně hluboce popisuje dosavadní relevantní vědecká fakta, která jsou čerpána z poměrně velkého počtu vědeckých či odborných publikačních zdrojů. Za vhodné považuji kompozici třech hlavních celků úvodu, které se vztahují především k agrotechnice a popisu ovsa, dále k mykologické charakterizaci rodu *Fusarium* a konečně k charakterizaci samotných mykotoxinů s důrazem na skupinu trichotheceinů. Zařazení poměrně moderního a diskutovaného tématu skrytých či maskovaných mykotoxinů jako je DON-3-glukosid velmi oceňuji.

Cíle práce jsou jasně formulovány s výčtem sedmi souvisejících předpokládaných hypotéz.

Kapitola Materiál a metody je rovněž logicky koncipována a poskytuje ucelené informace charakterizující podmínky experimentu, použité odrůdy a stanoviště. Dále je uveden popis metod použitých k izolaci a morfologické i molekulárně genetické determinaci izolovaných druhů, včetně jejich podrobného popisu. Tato kapitola je ukončena popisem metody chemicko-analytického stanovení trichotheceinů za použití UHPLC-MS/MS.

Kapitola Výsledky shrnuje velmi podrobně a v logicky členěných kapitolách zjištěná fakta, která jsou hojně doplněna přehlednými tabulkami s vlastními komentáři opírajícími se o statistické hodnoty. V celkem 13 kapitolách, z nichž některé jsou pro složitost děleny do subkapitol, autorka přehledně popisuje zjištěné korelace, vlivy faktorů a jejich možných interakcí. V kapitole Diskuse jsou získané výsledky poměrně dobře srovnávány a komentovány s dalšími relevantními vědeckými zdroji. Kapitulu Závěr hodnotím jako velice dobře pojatou s celkovým a jasným shrnutím získaných výsledků v podobě stručných a výstižných bodů.

Disertační práce je dobře koncipována. Autorka si poradila s velkým množstvím někdy náročně získaných dat, jejichž ucelenost byla podmíněna cenným multidisciplinárním přístupem. Práci hodnotím kladně a souhlasím s tím, aby byla přijata k obhajobě a aby byl autorce po jejím úspěšném obhájení udělen titul „Doktor“ Ph.D.

V Praze 15.12.2023

Ing. Martin Žabka, Ph.D.



Dotazy k disertaci:

Vzhledem k zaměření autorky a zajímavému úvodu bych měl dotaz, zdali například výskyt snětí či rzí u ovsa může teoreticky ovlivnit výskyt fusarioz či ovlivňovat hladinu mykotoxinů, nebo naopak?

Autorku chválím za výběr a využití metody multiplex PCR při ověřování determinace morfologicky určených kultur. Zajímá mě důvod použití kultivace na šrotu. Souvisí to například s nějakou výhodou pro následnou fenol-chloroformovou extrakci DNA?

Parametry extrakce vzorku a nastavení metody HPLC-MS/MS jste vyvíjeli v rámci práce? V mnohých případech podobného výzkumu se spíše jedná o standardně používaný postup, který bylo dle mého názoru lepší doplnit i o nějakou citaci.

Proč nebyla použita ATB při pasážování a přečišťování kultur? Jaká pak tedy byla zkušenost autorky s bakteriální kontaminací? Byl klasický purifikační proces za užití Sava a Tweenu dostatečný?

Čím si autorka vysvětluje znatelně vyšší hladiny sledovaných trichothecenů právě u pluchatých odrůd? Je fenomén glykosilace DON znám i mimo interakci houba-rostlina?

Drobné připomínky:

Drobnou připomínku mám k zavádějícímu názvu u Obr. č.10. kde jsou mezi trichotheceny zobrazeny i zástupci jiných skupin fusariových mykotoxinů (např. zearalenon, či cyklodepsipeptid beauvericin).

V jinak moc pěkném úvodu bych v kapitole o identifikaci fusarií uvítal alespoň krátkou pasáž o molekulárně genetických či imunochemických metodách identifikace.

OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Téma práce: **Mykotoxikologická kvalita ovsa**

Autor: **Ing. Hana Pejsarová**

Vedoucí práce: **doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.**

Předložená disertační práce se zabývá aktuální problematikou. Fuzariózy jsou celosvětově považovány za jednu z nejvýznamnějších chorob obilnin, která způsobuje velké ekonomické ztráty. Jejich výskyt je významně ovlivněn klimatickými podmínkami i agrotechnickými zásahy. Napadené rostliny se vyznačují nižším výnosem. Dalším rizikem je produkce sekundárních metabolitů - mykotoxinů, které negativně ovlivňují kvalitu zrna a jsou pro zdraví lidí a zvířat škodlivé. Toxiny produkované houbami především z rodu *Fusarium* jsou častým kontaminantem pšenice, kukuřice, ječmene, žita i ovsa. Snížení výnosů a kontaminaci mykotoxiny lze předcházet používáním rezistentních odrůd, střídáním plodin v osevním postupu a používáním vhodných fungicidů.

Práce je napsána na 142 stránkách a je rozdělena do kapitol běžných pro práce tohoto typu: Úvod, Literární rešerše, Cíl, Hypotézy, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Závěr, Seznam použité literatury a Seznam příloh.

Literární část je zpracována na 40 stranách a je rozčleněna do 8 kapitol. Popisuje význam pěstování ovsa, původ a botanickou charakteristiku ovsa, biologické vlastnosti ovsa, šlechtění ovsa, agrotechniku ovsa, houbové choroby ovsa, kvalitu ovsa a mykotoxiny. Úroveň zpracování odborné literatury svědčí o schopnostech doktorandky pracovat s touto literaturou.

Výzkumné cíle a vědecké hypotézy disertační práce jsou jasně stanoveny. Hlavním cílem práce bylo získat poznatky o vlivu odrůdy, ročníku a předplodiny na mykotoxikologickou kvalitu ovsa. Práce testovala 7 hypotéz.

V kapitole "Materiál a metody" uvádí doktorandka informace o pokusném stanovišti, použitých odrůdách, založení polního pokusu, hodnocení pokusů během vegetace, hodnocení po sklizni, analýzách hub na obilkách ovsa pomocí morfologických znaků, identifikovaných zástupců rodu *Fusarium*, ověření přítomnosti hub rodu *Fusarium* pomocí PCR, stanovení fuzariových mykotoxinů metodou HPLC/MS/MS a statistickém hodnocení dat. Použité metody a postupy jsou srozumitelně popsány a vzbuzují důvěru v získané výsledky.

Zvolenými metodami a postupy získala doktorandka značné množství hodnotných výsledků. Výsledky lze shrnout do následujících poznatků: nejčastěji se na povrchu obilek ovsa vyskytovaly houby rodů *Alternaria* a *Fusarium*, nejčastějším druhem bylo *F. poae*, napadení ovsa houbami rodu *Fusarium* bylo ovlivněno průběhem počasí zvláště v době kvetení, vizuální příznaky napadení houbami rodu *Fusarium* byly na rostlinách ovsa zaznamenány jen ojediněle, odrůdy nahého ovsa byly prokazatelně méně napadány houbami

z rodu *Fusarium* a byly také méně kontaminovány všemi sledovanými mykotoxiny než odrůdy pluchatého ovsa, mezi odrůdami ovsa byl rozdíl v intenzitě napadení houbami rodu *Fusarium*, nejčastěji infikovaná byla odrůda nahého ovsa Izák, u odrůd pluchatého ovsa byly nejčastěji kontaminovány odrůdy Salo a Veli, základní morfologické parametry rostlin ovsa byly v korelaci s výskytem fuzarióz, výnos zrna ovsa koreloval s výskytem fuzarióz na obilkách ovsa, napadené odrůdy reagovaly na napadení fuzariózami různým způsobem, sledované parametry technologické kvality byly negativně ovlivněny napadením houbami rodu *Fusarium*, předplodiny měly rozhodující vliv na výskyt fuzárií na ovsu a produkci mykotoxinů a byl prokázán vliv předplodiny na počet zrn v latě, hmotnost zrn v latě a HTZ.

Získané výsledky jsou v kapitole “Diskuze” dány do kontextu se současným stavem výzkumu v oboru.

K práci mám následující připomínky a otázky:

- U centrifugací vzorků při extrakci DNA z mycelia hub nejsou uvedeny otáčky nebo relativní odstředivá síla (g) (str. 64).
- U chemikálií používaných k přípravě reakční směsi pro PCR nejsou uvedeny koncentrace (str. 64).
- V práci chybí sekvence oligonukleotidových primerů, které byly používány k ověření přítomnosti hub rodu *Fusarium* pomocí PCR, nebo literární odkaz na tyto primery (str. 64).
- Překvapuje mě malé napadení ovsa houbovými chorobami po předplodině kukuřici (str. 67 a 68).
- Místo “citlivost jednotlivých odrůd ovsa k napadení houbami” by měla být používána “náchylnost jednotlivých odrůd ovsa k napadení houbami” (např. str. 4).
- V práci jsou často nesprávně používány a zaměňovány výrazy *Fusarium* sp. a *Fusarium* spp..
- V podkapitolách diskuze 6.5.1. až 6.5.8., kromě 6.5.4. a 6.5.7., není diskutováno s literaturou, pouze jsou tam uváděny výsledky.
- Některé statistické analýzy mohou mít menší spolehlivost z důvodu malého počtu pozorování (nevyváženosti dat).
- Má odrůda ovsa vliv na HTZ?
- Jak časté byly směsné infekce zrn ovsa *Fusarium* spp. a směsné kontaminace zrn ovsa mykotoxiny?
- Proč byly při stanovování obsahu mykotoxinů použity různé detekční limity?
- Byl naplněn výzkumný cíl disertační práce?
- Byly vědecké hypotézy disertační práce potvrzeny?

Předložená disertační práce Ing. Hany Pejsarové ukazuje její dobrou orientaci v dané problematice. Náročnost použitých metod jako i zpracování dosažených výsledků potvrzuje dobrý potenciál kandidátky pro tvořivou vědeckou práci v budoucnosti. Práce splňuje všechny požadavky kladené na disertační práce, a proto navrhuji po úspěšné obhajobě udělit autorce akademický titul “Philosophiae Doctor” (Ph.D.).

V Praze dne 10. prosince 2023



doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507/73
161 06 Prah 6 - Ruzyně



Posudek disertační práce Ing. Hany Pejsarové „Mykotoxikologická kvalita ovsa“

Problematicke výskytu fuzarióz u obilnin byla a je, vzhledem k jejich negativním dopadům jak na ekonomiku pěstování obilnin, tak na jejich technologickou jakost a zdravotní nezávadnost, věnována v posledních letech poměrně velká pozornost; oves však byl z tohoto pohledu opomíjený a o to více je téma disertační práce Ing. Hany Pejsarové přínosné a aktuální.

Disertační práce má tradiční členění. Literární rešerše je pojata velmi komplexně a předkládá ucelený přehled o významu, původu, biologické charakteristice, šlechtění i agrotechnice ovsa; nejcennější je ovšem část týkající se fuzarióz – přehledně jsou uvedeny faktory ovlivňující jejich výskyt, identifikace fuzárií a jejich dopad na kvalitu ovsa. Následně je věnována pozornost mykotoxinům, jejich významu a faktorům ovlivňujícím jejich produkci. V literární rešerši autorka zmiňuje i konjugáty mykotoxinů, často označované jako „maskované mykotoxiny“, a stanovení D3G toxinu je i součástí její práce. Zde mám dotaz, zda je známo, co konkrétně vede rostlinu k tvorbě těchto konjugátů a za jakých podmínek se dá případně očekávat jejich vyšší výskyt. Jedná se o nějakou obrannou reakci rostliny ?

Cíl práce je formulován stručně, ale výstižně; navazuje na něj sedm hypotéz, které se autorka snaží v dalších částech práce ověřit. Hypotézy jsou formulovány logicky a ve vzájemných souvislostech.

Část „Metody a materiál“ zahrnuje kromě nezbytných informací o charakteristice pokusného stanoviště, použitých odrůdách ovsa, založení polního pokusu a hodnocených parametrech ovsa podrobné a výstižné informace o charakteristice identifikovaných zástupců rodu *Fusarium*, ověření jejich přítomnosti pomocí PCR a analytickém stanovení fuzariových mykotoxinů. Autorka v Metodice uvádí, že v pokusech nebylo provedeno žádné fungicidní ošetření. Přestože z výsledků jejích pokusů vyplynulo, že napadení ovsa houbami rodu *Fusarium* nebylo vysoké, mám dotaz, zda by případně nebylo na místě uvažovat i o cíleném fungicidním ošetření proti fuzariózám; zda jsou k dispozici nějaké zkušenosti s jeho účinností, v jaké růstové fázi ovsa by bylo ošetření nejvhodnější a zda by byl k dispozici vhodný fungicid.

Část „Výsledky“ shrnuje veškerá zjištění autorky. Výsledky jsou přehledně rozdělené do jednotlivých podkapitol, počínaje vizuálním hodnocením napadení lat a obilek ovsa houbami rodu *Fusarium* a přehledem identifikovaných druhů fuzárií, přes hodnocení výnosu ovsa, výnosotvorných prvků a stupně polehnutí porostů, až po stanovení obsahu jednotlivých mykotoxinů. Autorka hodnotí u stanovených parametrů rozdíly mezi ročníky, mezi druhy a odrůdami ovsa a mezi předplodinami, a uvádí i korelace mezi obsahem jednotlivých



mykotoxinů a kvantitativními parametry odrůd nahého a pluchatého ovsa. Zjištěná data jsou přehledně zpracována v tabulkách. Pozitivní je zjištění, že stanovené obsahy mykotoxinů byly poměrně nízké a v žádném případě nepřesáhly limity povolené pro obsah jednotlivých mykotoxinů v znu ovsa. V kapitole 5.4 autorka na základě přehledu identifikovaných druhů hub z rodu *Fusarium* uvádí, že nejvíce hodnocených vzorků bylo pozitivní na přítomnost *F. poae*; poměrně častý byl i výskyt *F. avenaceum*. Z výzkumů na pšenici, realizovaných před cca 10 lety si vybavuji, že tehdy patřilo k nejčastěji detekovaným druhům *F. graminearum*, které se v pokusech autorky disertační práce vyskytovalo pouze sporadicky a *F. culmorum*, které zde nebylo identifikováno vůbec. Mám dotaz, zda jsou k dispozici nějaké informace o tom, jestli existují rozdíly ve výskytu jednotlivých druhů fuzárií u různých druhů obilnin, nebo je výskyt jednotlivých druhů fuzárií vázán především na klimatické podmínky?

V kapitole „Diskuse“, členěné na podkapitoly zahrnující hodnocení zastoupení fytopatogenních hub na ovsu, vlivu ročníku, druhu a odrůdy ovsa a předplodiny na napadení houbami rodu *Fusarium* a produkci mykotoxinů a vztah napadení a obsahu mykotoxinů ke sledovaným morfologickým, kvalitativním a kvantitativním parametrům ovsa autorka diskutuje vlastní výsledky se zjištěními jiných autorů. Celkově působí Diskuse přehledně a vyváženě.

V „Závěrech“ autorka výstižně shrnuje nejvýznamnější získané poznatky a konstatuje, že k ochraně rostlin při pěstování v polních podmínkách sehrává významnou roli výzkum odolnosti odrůd k napadení fuzárií a následné produkci mykotoxinů.

Při zpracování závěrečného „Seznamu použité literatury“ autorka vycházela především z literárních zdrojů publikovaných v renomovaných vědeckých a odborných publikacích, kterých bylo na 240.

Disertační práce je komplexně a erudovaně zpracována a lze z ní vyvodit řadu cenných informací, které, zejména v případě ovsa, významně rozšiřují poznání v dané oblasti a jsou využitelné i zemědělskou praxí. Na základě toho doporučuji, aby byla práce přijata k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení byl Ing. Haně Pejsarové udělen akademický titul „doktor“.

V Suchdole 4.12. 2023

prof. Ing. Ivana Capouchová, CSc.

Katedra agroekologie a rostlinné produkce

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita v Praze