

## Posudek

### na doktorskou disertační práci Mgr. Leony Leišové:

„Studium genetické variability houbových patogenů a možnosti jejich detekce v pletivech hostitelské rostliny“.

Předložená doktorská disertační práce je tradičně členěna na úvod, kapitulu věnovanou literárnímu přehledu a na stěžejní část obsahující výsledky, diskusi a závěr.

V úvodu jsou jasně definovány tři hlavní cíle práce zaměřené na studium vybraného významného původce listových skvrnitostí ječmene, houby *Pyrenophora teres* v České republice. Hlavním úkolem bylo postihnout variabilitu populace této houby metodami molekulární biologie, využít DNA markerů pro diagnostiku jejích speciálních forem a vyvinout metody pro kvantitativní stanovení houby v pletivu ječmene.

Literární rešerše i počet citovaných titulů svědčí o schopnosti autorky orientovat se v problematice v celé šíři různých aspektů studia, a to nejen jmenovaného druhu houby. Nejvíce pozornosti je věnováno molekulárně biologickým metodám studia houbových patogenů, přednostem i nedostatkům jejich využití. Z aktuální úrovně znalostí těchto metod autorka vycházela a svou práci na ně úspěšně navazuje.

Předložená disertace je jedním z výstupů pětiletého výzkumného projektu finančně podporovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum České republiky. Výsledky jednotlivých etap výzkumu řešitelé průběžně publikovali a závěrečnou zprávu projektu úspěšně obhájili. Hlavní část doktorské disertace tedy tvoří pět vědeckých sdělení, na jejichž autorství se doktorandka spolupodílela. Dvě práce vyšly ve sbornících přednášek z pracovních seminářů (s mezinárodní účastí) a další dvě v renomovaných zahraničních fytopatologických časopisech (Journ. Phytopathology, Plant Pathol.). Poslední předložený článek je přijat do tisku rovněž v zahraničním vysoce impaktovaném periodiku (Journ. Microbiol. Methods).

První část práce je věnována molekulárně genetickým metodám diagnostiky původců listových skvrnitostí. Symptomy onemocnění těmito patogeny jsou často nespecifické. Vyvinuté molekulární metody umožňují podstatně preciznější determinaci než klasické metody observační a kultivační. Během přípravné fáze

bylo izolováno a následně zpracováno 83 monosporických izolátů čtyř původců listových skvrnitostí. Převážná většina byla izolována z ječmene a určena jako *Pyrenophora teres* ve dvou speciálních formách f. sp. *teres* a f. sp. *maculata*. O genomu této houby existují jen kusé informace, proto byla ke studiu variability izolátů postupně použita analýza různých částí genomu, např. analýza ITS, která se však ukázala jako nevhodná k rozlišení druhů a forem studovaných původců listových skvrnitostí. Naopak metodou AFLP, která byla dříve úspěšně použita k postihnutí variability a virulence u jiných hub, bylo možno bezpečně odlišit nejen jednotlivé druhy, ale i obě speciální formy *P. teres*. V důsledku toho bylo tedy možné navrhnout specifické markery pro detekci obou zmíněných forem *P. teres*, které byly použity k testování izolátů a výsledky porovnány s determinací podle znaků morfologických. V téže studii autorka věnuje pozornost i časové a geografické proměnlivosti populací tohoto patogena.

Ve druhé části disertace je pozornost věnována stanovení množství houby v pletivu ječmene. Míra napadení, tedy kvantitativní stránka studovaného problému, byla hodnocena klasickými metodami podle devítibodové stupnice po umělé inokulaci listů ve skleníku a navíc analýzou obrazu symptomů na infikovaných listech. Ke zpřesňujícímu stanovení míry napadení byl nejen vypracován postup, jak vzorky odebírat, ale hlavně spolehlivá metodika jejich molekulární analýzy. Byla optimalizována metoda TaqMan real-time PCR a byly navrženy specifické primery a TaqMan sondy pro kvantitativní stanovení obou forem *P. teres* v pletivu ječmene. Byly tak získány výsledky, na jejichž základě je možné vypočítat počáteční množství DNA patogena a hostitele a také hmotnostní zlomek obsahu DNA rostliny ku obsahu DNA obou forem patogena. Stanovení kvantitativního zastoupení obou forem *P. teres* v pletivu ječmene je důležitá informace pro posouzení odolnosti daného testovaného kultivaru.

Spolehlivost kvantitativního stanovení patogena v pletivu hostitele je podpořena dobrou mírou korelace mezi detekcí patogena metodou Real – time PCR a metodou měření velikosti symptomů obrazovou analýzou. Vypracovaná metoda je tudíž použitelná jak ve šlechtitelské praxi, tak pro další základní studium interakcí dané houby a hostitele.

Moje připomínka se týká pouze nomenklatury jmenovaných druhů hub. Alespoň v úvodní kapitole by měly být uvedeny autorské zkratky za jmény všech taxonů. Nevhodné je použití jména *Helminthosporium sativum* (do rodu *Helminthosporium* jsou řazeny pouze lignikolní anamorfy). Lépe je použít platné jméno anamorfy *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. či synonymum *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram et Jain. Nebo ještě lépe, jako v případě *Pyrenophora*, použít jméno teleomorfy *Cochliobolus sativus* (S. Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur.

Čistě formální připomínka se týká používání termínu „odrůda“ v českém textu. Podle Mezinárodního kódu nomenklatury pro pěstované rostliny je třeba použít termín „kultivar“ a v textu používat před jménem kultivaru zkratku cv. nebo jméno kultivaru dát do jednoduchých uvozovek.

Poněkud zavádějící je obr. 3, kde u fotografií chybí měřítko a rovněž rozdíly v barvě mezi oběma formami pěstovanými na agaru asi neodpovídají skutečnosti. K obr. 4 by se hodilo zařadit i fotografii symptomů napadení f. sp. *maculata*.

Další drobné opravy jsou uvedeny přímo v textu.

Závěrem konstatuji, že předložená práce svědčí o autorčině schopnosti na úrovni vyřešit zadaný úkol a jasně formulovat závěry. Dosažené výsledky představují významný přínos pro exaktní determinaci a kvantitativní zhodnocení napadení ječmene původci listových skvrnitostí, které lze využít ve fytopatologické a šlechtitelské praxi.

Práce splňuje veškeré požadavky kladené na doktorskou disertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze, 12.5.2006



RNDr. Jaroslava Marková, CSc.