

## Posudek oponenta diplomové práce

Název diplomové práce: **Geny  $\beta$ -tubulinových paralogů u rodu *Aspergillus*: taxonomický význam a markery použitelné v jejich rozlišení**

Jméno autora: **Bc. Vít, Hubka**

Jméno oponenta: **RNDr. Martin Bunčec, Ph.D.**

..

Práce Bc. Víta Hubky se zabývá praktickou využitelností genetických markerů při taxonomii rodu *Aspergillus* a současně poukazuje na určité nevýhody jejich nekritického využívání. Neméně důležitou součástí práce je revize identifikace poměrně rozsáhlého souboru izolátů s pomocí tzv. polyfázového přístupu. Práce je přehledná, úvod do problematiky výstižný a je definován jasný cíl. Experimentální část obsahuje popis jednotlivých pracovních postupů a materiálu potřebného k jejich realizaci. Výsledky jsou shrnuté do dvou částí ve kterých jsou přehledně prezentovány a současně jsou přiloženy manuskripty v impaktovaných časopisech obsahující část výsledků.

Celá práce je psána srozumitelně a čtivě bez zjevných gramatických nedostatků a překlepů. Rozsah a kvalita práce odpovídá spíše práci disertační než diplomové a nabízí se otázka podílu diplomanta na provedení všech experimentů. V každém případě je třeba kladně hodnotit zejména systematický přístup k řešení dané problematiky. Je vzácné, aby dosažené výsledky v úpravě metodiky byly ještě dále využity ve stejné práci a v takovém rozsahu. Podrobná revize 178 izolátů je obdivuhodná o čemž mimo jiné svědčí také publikace v *Medical Microbiology*. Tato revize nejen sbírkových izolátů společně s navrženou úpravou metody taxonomické identifikace na základě sekvence genu *benA* má velký praktický význam nejen z pohledu rodu *Aspergillus*, ale obecně pro taxonomickou identifikaci s využitím molekulární genetiky. Nekritické využívání genetických markerů v taxonomii je totiž často příčinou chyb a nesprávností. Tyto se pak bohužel, z důvodu velmi rychlého rozšiřování molekulární genetiky do dalších oborů, přejímají dále a dochází tak šíření nesprávných údajů.

Formálně si neodpustím dvě poznámky. První se týká upuštění od kontroly kvality izolované DNA „kvůli konstantním výsledkům“ (viz str. 26) – v případě, že je izolovaná DNA využívána pro větší množství nákladných experimentů nebývá tento postup příliš běžný. Druhá se týká uvádění jakéhosi „hybridního“ označení koncentrace či množství prumerů formou „pM/ul“ (viz str. 26) – není jasné zda se jedná o koncentraci pikomolární či o množství v pikomolech na mikrolitr.

### Doplňující dotazy:

1. Jak velký je podíl diplomanta na všech provedených experimentech? (kultivace, PCR amplifikace, analýza amplikonů, návrh a analýza sekvencí primerů a DNA – kromě izolace DNA)
2. Na základě čeho byla vybrána metoda pro izolaci DNA z plísní? Bylo by možné použít nějakou alternativní metodu lýzy buněk a izolace DNA?
3. Na základě čeho byla vybrána metoda „Minimal evolution“ pro sestavení fylogenetických stromů/kladogramů?

4. Byla u všech 178 izolátů provedena analýza všech použitých genetických markerů (viz Tab. 3.1 na str. 32)? U mnoha izolátů chybí jak číslo „accession number“ tak symbol genu – znamená to tedy, že tato analýza nebyla provedena?
5. Na základě čeho byla nahrazena degenerovaná pozice V a R v primeru Ben9Brev za Inosin? Proč nebyly nahrazeny např. vedle ležící degenerované pozice R a S? Jaké by byly další možnosti náhrady degenerovaných bazí a jak si vysvětlujete pozitivní efekt použití inosinu na specifitu PCR?
6. Bylo možné v sekvencích markerů ITS a benA sledovat nějaké sekvenční podobnosti („patterns“) u izolátů z klinického materiálu pacientů s invazivní aspergilózou? Nalezení podobného „markeru“ by mohlo mít velký klinický význam v diagnostice.

**Hodnocení:**

Práci hodnotím jako velmi kvalitní, **doporučuji** ji k obhajobě a hodnotím **výborně** (1).

V Hradci Králové 7.9.2011

Martin Bunčec v.r.