

Posudek oponenta diplomové práce

Vliv sekundárních metabolitů (esenciálních olejů) na endofytické houby kolonizující listy *Rhododendron tomentosum*

Autorka DP: Bc Barbora Koudelková

Vedoucí DP: Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Oponent DP: Ing. Martin Žabka, Ph.D.

Diplomová práce Barbory Koudelkové pod vedením Dr. Ondry Koukoly měla vytyčený nelehký cíl prokázat dlouhodobě zvažovanou hypotézu o přirozené adaptaci kmenů hub, kolonizujících rostlinná pletiva, bohatá na biologicky aktivní chemické sloučeniny. Předem je třeba zdůraznit a uznat, že cti školiteli a autorce práce, že tento cíl není obecně snadný a pro klasický rozsah a možnosti běžné diplomové práce je poměrně náročný. Na tento fakt v minulosti narážely a narážejí i celé vědecké týmy, snažící se takovýto logický předpoklad prokázat ve svých pracích. Některé příklady autorka v práci sama uvádí v kontextu svých závěrů. Zpracování diplomové práce naplňuje dle mého názoru standardní kritéria. Jednotlivé kapitoly jsou přehledné a logicky navazující. Oceňuji taktéž, že v mnohých pasážích je práce psána velice čtivým způsobem. Autorka zcela nezaujatě s vědecky správnou kritikou interpretuje získané výsledky z provedených pokusů, z nichž posléze striktně vyvozuje možné závěry. Vyzdvihnout je možné dále celkové zaměření diplomové práce, kdy je na autorku kladen požadavek multidisciplinárního přístupu, který autorka obstojně naplnila. Toto je patrně především v metodické části, kde jsou kromě mykologicko determináčních a kultivačních metod využívány moderní mikroextrakční a analytické metody plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Zaujala mne také schopnost improvizace autorky, například při výpočtu přibližné koncentrace chemických látek za užití ploch peaků chromatogramu v kombinaci s dostupnými daty z literárních zdrojů, což uznávám pro účely DP jako postačující. Schvaluji také použitý postup uchování a kultivace získaných kmenů s ohledem na minimalizaci rizika ztráty sledovaných vlastností. Ačkoliv by se dalo polemizovat nad jiným, propracovanějším a rozsáhleším designem pokusů, který by mohl vyústit v hlubší nebo jiné interpretace získaných dat, rád bych se k práci vyjádřil pozitivně, doporučil ji k obhajobě a navrhl Barboře stupeň hodnocení **výborně**.

K práci mám tyto připomínky:

- 1) V práci se vyskytují některé nepřesné formulace, jako je tomu například v části úvodu v prvním odstavci. Zde je uvedena například věta, ze které nesprávně vyplývá, že samotný esenciální olej je považován za jeden z nejvíce zkoumaných sekundárních metabolitů v listech rododendronu. Je třeba upozornit, že významová hierarchie termínů zde byla převrácena. Protože esenciální olej sám o sobě zahrnuje směs samotných sekundárních metabolitů, nelze ho tudíž zmiňovat, jak je v práci uvedeno, jako jeden ze sekundárních metabolitů. Tato drobná nejasnost vznikla nejspíše nepřesným překladem vět či automatickým začleněním již nepřesného textu z původního vědeckého článku.
- 2) Některá slovní spojení znějí neobvykle: např. Kmeny do testování, navrhoval bych spíše užít Kmeny pro testování, či kmeny zahrnuté do testů, atd.
- 3) V části Metodika je uvedena GC/MS instrumentace a popis metody dosti stručný. Informace o konkrétní přístrojové sestavě a nastavení metody by podala lepší analytický náhled.
- 4) V práci by se pěkně vyjímал nějaký vzorový chromatogram a hmotnostní spektrum

- 5) K designu pokusu: Je možné připustit i fakt, že samotná rychlost růstu nemusí být nutným nebo jediným ukazatelem vyšší odolnosti k antifungálním sekundárním metabolitům. Radiální růst kolonie může být v důsledku biochemických změn atypický, dokonce rychlejší, ale např. s menší hustotou mycelia. Mohla by se tedy např. měřit také celková biomasa kultur v submerzi. Jednoduché porovnání kmen s kmenem na chemicky obohaceném médiu nemusí poskytnout relevantní informaci. Zde by se dalo doplnit porovnání rozdílů růstu kmenů jako souborů dat mezi sebou, kde by každý jeden soubor byl tvořen hodnotami rozdílů růstu jednoho kmene na médiu s metabolity a na kontrolním čistém médiu. Tedy porovnáním intenzit reakcí jednotlivých kmenů na metabolity v médiu. V neposlední řadě bych upravil koncentrační gradient do smysluplnějšího sledu, tedy nikoliv klesání v řádech, ale vybral bych například běžně užívaný exponenciální gradient klesajících koncentrací. Zachycení většího počtu koncentrací s měřitelným efektem by bylo v tomto případě pravděpodobnější. Dalo by se také stavět, spíše než na porovnávání rychlosti růstu, na hodnotách nejvyšší hladiny tolerance kmenů, tedy použít tzv. MIC (minimální inhibiční koncentrace látek). Přísloví o tom, že po bitvě je každý generál zde ovšem platí dvojnásob, proto tuto dlouhou úvahu nemíním jako negativní kritiku.

Otázky:

- 1) Obecně platí, že stárnutí či senescence listu značně ovlivňuje obsah sekundárních metabolitů kvantitativně i kvalitativně. Proč byl tedy odběr listů uskutečněn až na podzim?
- 2) Vysvětlete důvody a přínos modifikace objemu roztoků posledních elučních kroků při izolaci a purifikaci DNA.
- 3) Jak staré byly kultury, z nichž se DNA izolovala?
- 4) Jaká byla délka a kvalita ITS sekvencí a jak si vysvětlujete, že pro několik izolátů nebyla na základě ITS sekvencí nalezena dostatečná shoda se sekvencemi v GenBank? Například špatně čitelné sekvence? Dosud nesekvencované druhy? PCR primery?
- 5) Zhodnoťte prosím, dle vlastního uvážení, pozitiva a negativa výběru metody SPME pro Vaši práci. Metoda zatím v ČR není úplně rozšířena. Stručně metodu popište.
- 6) SPME v práci uvádíte jako metodu pro tzv. získávání EO, je toto správné pojmenování když se jedná pouze o metodu pro čistě analytické účely? Jaká klasická metoda se jinak běžně používá pro skutečné získávání EO?
- 7) Popište, v čem například spočívá problém s určením % poměru látky dle plochy peaku. Byl užít nějaký molekulárně podobný standard o známé koncentraci pro kalibraci?
- 8) Mohla být překvapivá nepřítomnost některých předpokládaných sekundárních metabolitů jako je např. ledol způsobena výběrem extrakční metody tedy jinou specifickou sorpcí na zmíněný modifikovaný polydimetylsulfoxid užitý při SPME? Některé práce, které uvádíte, většinou používaly jinou metodu extrakce EO.
- 9) V diskusi uvádíte, že se v listech vyskytovaly látky ledolu „strukturálně velmi podobné“ co jste tím přesně měla na mysli?