

## Oponentský posudok habilitačnej práce

Názov: DNA BARCODING- METÓDA UĽAHČUJÚCA IDENTIFIKÁCIU ORGANIZMOV

Autorka: MVDr. Lenka LUPTÁKOVÁ, PhD. Katedra biológie a genetiky ,UVLF v Košiciach

Oponent : Prof. Ing. Jozef BULLA, DrSc. Katedra fyziológie živočíchov ,FBP SPU v Nitre

Problematika využívania molekulárno-genetických metód a ich zdokonaľovania pri poznávaní pôvodu a fylogény organizmov predstavuje novú dimenziu hľadania vzťahov medzi rozdielnymi genómami a prostredím v procese ich evolúcie a druhovou diverzitou. Genetické markéry sú už stálou súčasťou nielen teórie, ale aj praxe v genetickom mapovaní, šľachtiteľskom procese, hodnotení premenlivosti a biodiverzity druhov i v ostatnom širokom spektre poznávania biologických zákonitostí . Existuje veľmi široká škála publikácií a následne aj poznatkov o genotypových a fenotypových súvislostiach v zaužívaných a platných terminologických uzenciach. Predložená habilitačná práca okrem metodológie prináša novum DNA barcoding resp. DNA barcode nie tak často frekventovaný *terminus technicus* v predmetných oblastiach genetiky.

Habilitačná práca je prvotinou predovšetkým v metodológii mapovania a spresňovania taxonómie druhov ich biodiverzity a monitorovania v rôznych biologických vzorkách . Základné ciele práce sú jednoznačne definované od DNA barcodingu oomycét, húb a kryptosporidií . Modelové organizmy či analyzované vzorky boli uhynuté ryby, pôda, sezamové a borovicové semená ,trus ošípaných a teliat.

Kapitola 2 nazvaná DNA BARCODING je v podstate literárnym vstupom, ktorý v jednotlivých častiach charakterizuje problematiku a približuje aj organizačný systém výskumu vrátane existencie iniciatív, konzorcií, projektov a medzinárodných sietí spolu s ich databázou. Považujem túto časť za dôležitý zdroj zásadných informácií pre pochopenie nielen vlastnej problematiky, ale aj nasledujúcich výsledkov práce.

Kapitola 3 - Ciele práce -sú veľmi stručne, ale jednoznačne definované ako využitie metódy DNA barcodingu na zistenie druhového zastúpenia predovšetkým diferencovaných špecifických ,ale aj komezálnych plesní , húb a kryptosporidií už pri vybraných génových sekvenciách a fylogenetických analýzach. Niektoré charakteristiky globálnych cieľov sú uvedené vyššie. Každý špecifický cieľ je uvedený v rozsiahlej a hlavnej kapitole 4.

Kapitola 4 – postupne ,logicky napíňa všeobecné ciele a netradične oproti klasickým spisom tohto druhu v úvode charakterizuje rozdiely medzi oomycétami a pravými hubami, konštatuje použitie špecifických primerov hlavne sekvencií génov Cytochrom c oxidázy a jej podjednotiek. Popísané sú základné druhy oomycet patogenných pre človeka, zvieratá a rastliny . Sú špecifikované ciele metodologické, identifikácia mortality rýb a genetická variabilita izolovaných kmeňov rodu

Saprolegnia vo švajčiarskych riekach. Zrejme je to aktívna spolupráca so zahraničnými partnermi. Podobne ako ďalej v spise je uvedená detailná metodika a veľmi zaujímavé prostredové rastlinné či iné prekulivačné médiá. Vždy potom nasleduje séria pôvodu vzoriek a referenčných izolátov, ktorá predstavuje použitý materiál pre následné metodické molekuláro-genetické postupy definované a charakterizované v systéme postupov analýzy ( kultivácia, extrakcia, molekulová analýza, gény, primery, sekvencie atď. Výsledky analýz sú založené na precízne spracovaných fylogenetických rodostromoch pre každú oblasť r- DNA. Táto schéma sa presne opakuje aj v ďalších častiach kapitoly 4.4. DNA barcoding zástupcov rodu Phytophthora po použití u húb 5 s využitím ITS génu. Celá časť výsledkov bohatá na vlastné poznatky a optimálne využiteľné od švajčiarskych kolegov. Aj a hlavne tento faktor pomáha originalite poznania. Bohatá dokumentácia výsledkov obrázkami a schémami má príslušnú vypovedaciu hodnotu zodpovedajúcu textu, ale je súčasne čitateľne náročná pri porovnaní textu a obrázku aj, keď farebne odlišená.

Kapitola 5 je venovaná DNA barcodingu pri hubách s analýzou druhovej diverzity na semenách sezamu a borovice. Výsledky sú prezentované na úrovni ITS génu s bohatou dokumentáciou druhov, rodov, čeľadí a ich fylogenetického postavenia pri jednotlivých rastlinných semenách. Významnou je problematika cryptosporidií ako infektov prenášajúcich sa zo zvierat na ľudí s mnohými fatálnymi dôsledkami na zdravie i život. Kryptosporidióza je zaradená medzi zoonózy a vodou prenosné nákazy vo svetovom merítke s poukazaním na širokú škálu genotypovej variability a geografického prostredia, ktoré autorka širšie dokumentuje. Detekcia kryptosporidií bola realizovaná na vzorkách trusu ošípaných a teliat s klinickými príznakmi na úrovni ssr RNA génu ako markéra.. Výsledky tejto časti práce považujem za originálne a ťažiskové pre veterinársku i humánnu prax so širokou možnosťou ďalších výskumov.

Diskusia (kap. 6) je veľmi dobre a komplexne spracovaná. Práve v súvislosti s habilitáciou autorky je priamou charakteristikou jej osobnosti schopnej odborne a kriticky hodnotiť nielen vlastné výsledky a poznatky, ale ich aj racionálne a cielene konfrontovať so všeobecným poznaním v aktuálnej teórii a praxi.

Pripomienky, názory a otázky:

1. Nemám zásadné pozmeňujúce návrhy stanoviská k cieľom, výsledkom a záverom. Formálne a vecne má habilitačná práca všetky náležitosti, ktoré požaduje platná legislatíva. Rukopis je precízne spracovaný bez závažných gramatických a terminologických nedostatkov. Odporúčam používať termín ošípaná a nie sviňa (s. 120 i ďalej). Pokúste sa poslovenčiť bar code- bar coding lebo napriek snahe stále sa jedná o klasické molekulárno-genetické postupy (extrakcia genomickej DNA, PCR metodika, purifikácia, sekvenovanie atď.). Dokumentácii by boli prospeli aj reprezentatívne výsledky PCR analýzy produktov génov in natura a schématické ich usporiadanie.
2. Bar-coding je v princípe založený na využití krátkych sekvencií DNA? Stále je však nielen aktuálna, ale významná prítomnosť dlhých sekvencií jadrovej DNA. Ako sa vysporiadať s konzervativizmom genómu? Úloha neutrálnych mutácií, mitochondriálna DNA a epigenetika. Je reálne, že DNA barcoding je univerzálna metóda pre všetky organizmy vo vzťahu k často zložitej amplifikácii a malej variabilite?
3. Zaujímavé niektoré metodické momenty napr. listy rododendronu ako prostredie (návnady) pre oomycety vo vode. Jedna uhynutá ryba s.55 nemôže byť relevantná pre sledovanie.

4. V práci sú výsledky z biologického materiálu rôznej proveniencie aj geograficky vzdialenej. Napr. sezamové semená zrejme z Indie borovicové z Poľska, VB, Turecka, Srbska, Rakúska. Chýba mi Slovensko, kde lesy trpia podobne alebo aj viac. To čo vo výsledkoch autorka pri biologickom materiály špecifikuje na Východné Slovensko sú kryptosporídie a hospodárske zvieratá. Čo bolo momentom pre analýzy napr. sezamových a borovicových semien a kde boli vykonané. Je to v spolupráci so Švajčiarskom či Poľskom?

Záver: Habilitačná práca MVDr. Lenky Luptákovej, PhD. je pôvodné originálne dielo podložené bohatou publikačnou aktivitou vyplývajúcou z dlhodobého výskumu doma a v zahraničí. Je dielo, ktoré prináša nové terminologické, metodické i všeobecne kultúrne hľadiská pochopenia genetických funkcií a interakcií prostredia pri mikroorganizmoch a evolučne vyšších organizmoch v procesoch evolúcie a biodiverzity. Významná je pedagogická činnosť habilitantky a jej spoločenské pôsobenie.

**Odporúčam, aby MVDr. Lenke Luptákovej, PhD. bol udelený vedecko-pedagogický titul „DOCENT“ v študijnom odbore 4.2.1 Biológia.**

V Nitre 26.1.2018.

prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc.