

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Tomáš Mašek
	Datum: 7.9. 2015
Autor: Tomáš Zelenka	
Název práce: Comparison of ITS nrDNA and alternative markers for fungal metabarcoding in enviromental samples	
Cíle práce Cílem práce bylo posoudit vhodnost jednotlivých genetických markerů pro metabarcoding hub z enviromentálních vzorků a to, jak z hlediska taxonomického pokrytí, tak k odhadu kvantitativního zastoupení taxonů hub. K tomuto účelu měla být připravena a dále pomocí NGS analyzována knihovna genomových DNA získaných z konkrétních vzorků hub.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 62 bez referencí, doprovodných tabulek a příloženého manuskriptu Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Izolace DNA, PCR, kvantifikace DNA, příprava knihoven pro NGS, zpracování hrubých NGS dat, pokročilé bioinformatické analýzy Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO s malou výhradou Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO, s malou výhradou	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň práce naprosto splňuje požadavky pro tento typ prací a to, jak po stránce jazykové tak grafické. Práce je napsána v anglickém jazyce.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce Tomáše Zelenky je zaměřena na validaci jednotlivých markerů pro odhad diverzity a kvantity jednotlivých houbových taxonomických skupin v enviromentálních vzorcích pomocí NGS. Tomáš připravil DNA z 693 izolátů pokrývajících 463 druhů, dále připravil jejich směsnou knihovnu a tu použil pro získání ITS1, ITS2, EF1- α a RPB2_B amplikonů. Ty byly sekvenovány přístrojem Illumina a hrubá data dále analyzována. Výsledky ukazují limitace současných vysoce průchodných metod sekvenování při analýze směsných vzorků. Ani jeden z markerů nevykazoval uspokojivé pokrytí taxonomických skupin a překvapivě počet druhů detekovaných všemi markery dosahoval pouze 16 %. Jako nejlepší se ukázaly ITS2 a RPB2_B a práce se dále věnuje jejich popisu z hlediska taxonomického pokrytí a nadhodnocení taxonomických jednotek vyplývající z vnitrodruhové variability použitých lokusů. Součástí diplomové práce je též manuskript zaslaný do recenzního řízení, jehož je Tomáš Zelenka spoluautorem. Předložená práce je hodnotná tím, že kombinuje experimentální a bioinformatické analýzy, což z hlediska budoucího uplatnění diplomanta na trhu práce reflektuje směřování současné molekulární biologie. Také oceňuji snahu kriticky validovat moderní sekvenační techniky v taxonomii a ekologii houbových společenstev. Mám za to, že předložená práce splnila požadavky kladené na diplomové práce, jak po stránce obsahové, tak formální, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

1. Popis optimalizace PCR v kapitole 4.4.1. by měl být doprovázen obrazovou dokumentací, protože popis optimalizace je poněkud nepřehledný a oponent nemůže posoudit vhodnost jednotlivých řešení. Celkově nevidím důvod nezpracovat kapitoly týkající se výběru primerů a amplifikace jednotlivých markerů do kapitoly výsledky, jelikož samotné provedení PCR v tomto případě zajisté mělo veliký vliv na konečné výsledky.
2. Na stránce 12 autor popisuje počet sekvenčních variant protein-kódujícího genu (bez mutací vedoucích ke změně proteinové sekvence). Pro sekvenci dlouhou 45 nt odhaduje počet variant na 4^{15} (15X 3. pozic v kodónu). Tento výpočet však pomyjí, že 3. pozice kodónu není plně degenerovaná, a že počet variací na 3. pozici se pohybuje od 2-4.
3. Na str. 17 u databáze INSD je uveden odkaz na NCBI.
4. U citace Větrovský et al. Submitted v textu bych uvedl odkaz na přílohu, nebo bych citaci uvedl v seznamu referencí.
5. Str. 22 – There are several translation elongation factors among fungi ...chápu, co chtěl autor vyjádřit, ale věta je zavádějící.
6. Str. 31-33, u koncentrace primérů – Final concentration 10 μ M – není to naopak vstupní koncentrace?
7. Str. 32, nechápu – ...maximize yield of diverse sequences because of poor DNA content?
8. Figure 4, doporučil bych přeformulovat název osy y.

Otázky:

1. V příložené publikaci byly použity primery ITS1 a ITS4 pro amplifikaci celé ITS oblasti. V kapitole 5.1 vztahující se k uvedenému článku se však uvádí ITS1 amplikon? Jaký byl důvod ke změně sekvenovací platformy (a změně primérů) při analýze velké knihovny? Tímto krokem se autoři totiž zbavili možnosti nashromáždit další opakování. Při interpretaci celé práce je nutno mít na zřeteli, že se jedná o jediný pokus. Žádná opakování nebyla provedena a výsledný bias je jistě součtem přípravy konkrétní DNA knihovny, konkrétní primérové dvojice a PCR reakce a přípravy knihovny na sekvenování (polyadenylace, ligace adaptérů, další amplifikace).
2. Jakým způsobem se určoval počet cyklů PCR při amplifikaci ITS1,2, RPB_2 a EF-1 α ? Nedošlo k preamplifikování uvedených markerů (35-37 cyklů, genomová DNA o koncentraci 1 ng/ μ l)?
3. U taxonů, kterým nebyly přiřazeny žádné OTUs (např. Figure 11), předpokládám, že nedošlo k amplifikaci markerů. Ověřovali jste zpětně účinnost amplifikace na nesmíchaných izolacích DNA nebo na SM vzorcích? Testovali jste bias způsobený samotným PCR na směsných SM vzorcích (tedy stejnou účinnost PCR pro daný marker pro každý houbový druh ve směsném vzorku SM) ?
4. V práci nebylo dostatečně diskutováno srovnání výsledků analýzy "big mock community" a výsledků z příložené publikace. Prosím tedy o komentář (srovnání 2 sekvenovacích platform, jiných primérů, atd...).
5. Jak si vysvětlujete rozdíl mezi klastrovacími algoritmy USEARCH na straně jedné a UPARSE a CROP na straně druhé při nadhodnocení počtu OTUs pro ITS (1) a ne v případě RPB_2 (Figure 5)?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: