

## Posudek na diplomovou práci: „Genealogická struktura populací parazitického hlísta *Haemonchus contortus*“ autorky Terezy Marvanové

Předložená diplomová práce se zabývá populační strukturou a genealogickými vztahy hlísta druhu *Haemonchus contortus*. Tereza Marvanová měla k dispozici jako výchozí materiál velké množství vzorků DNA tohoto parazita a její vlastní práce se opírala o molekulární metody vedoucí k získání sekvenčních dat, které následně analyzovala. Množství získaných dat je na poměry bakalářské práce více než dostačující. Celkem se diplomantce podařilo osekvenovat 69 izolátů. Vztahy mezi izoláty jsou názorně vyjádřeny haplotypovými sítěmi a kladogramem.

Úvod práce je napsán srozumitelně a výstižně. Je dobře členěn na jednotlivé kapitoly. Čtenář je seznámen s vlastním parazitem, obecnou problematikou populací parazitů a molekulárními markery s důrazem na mitochondriální DNA markery. Ve druhém odstavci úvodu je popisována významná genetická diference mezi populacemi *H. contortus* na základě bodového polymorfismu, mikrosatelitů atd., v následujícím odstavci se víceméně tato informace opakuje s odkazem na jinou literaturu.

Práce si klade za cíl pomocí mitochondriálních genů provést analýzu populační struktury a genealogických vztahů vybraného parazita. V metodice ani v dalších oddílech bakalářské práce není uvedeno, které geny studentka analyzovala. Ve výsledcích je pouze zmíněn úsek mtDNA o délce kolem 650 bp. To, že autorka pravděpodobně amplifikovala jeden gen a to 16S rDNA lze usuzovat z názvu primerů (primery 16S rDNA, str. 10), které jsou uvedeny v metodice a se kterými byla provedena PCR. Ovšem při blastování krátkého úseku primeru vychází nejbližší shoda s cytochrom c oxidázou. Který gen se ve skutečnosti amplifikoval? Které další geny měly být původně analyzovány? Proč se amplifikace nezdařila? Odpovědi na poslední dvě otázky mohli být shrnuty do krátkého odstavce v části diskuze.

Úvodní dvě věty v metodice si odporují: „Pro tuto práci byla použita izolovaná mtDNA zasláná spolupracující laboratoří Dr. Gillearda. Celkem bylo zasláno 150 jedinců parazitických hlístů ...“ Odporují si tedy v tom smyslu, že první věta říká, že byla zaslána DNA a druhá, že byly zaslány přímo hlísti. Z metodiky není zcela jasné, zda autorka klonovala PCR produkty a poté sekvenovala plasmidovou DNA a nebo sekvenovala přímo PCR produkty. Po oddíle 3.1. PCR amplifikace a 3.2. Elektroforéza následuje oddíl 3.3. Purifikace plazmidu. Buď vypadl z metodiky oddíl o izolaci PCR produktu z gelu a celá metodika klonování nebo autorka chybně nazvala oddíl 3.3. Purifikace plazmidu namísto purifikace PCR produktu. Tomu by napovídala skutečnost, že jak autorka píše „Plasmidová DNA byla poté přečištěna pomocí PCR Product Purification Spin Kit...“. Ovšem v oddíle 3.4. Sekvenační reakce se znovu objevuje jako výchozí templát plasmidová DNA. Prosím o vysvětlení. Bohužel se obávám, že student, který v budoucnu sáhne po předložené bakalářské práci jako po metodickém zdroji, by nedosáhl kýženého cíle.

Tereza Marvanová v předložené práci zjistila, že laboratorní izoláty mají nízkou genetickou diverzitu a nejsou od sebe izolovány. Naproti tomu izoláty pocházejících z Indie tvoří jednotlivé izolované haplotypy. Toto zajímavé zjištění autorka vysvětluje tím, že v případě indických vzorků jde o části velké populace, která není dostatečně prosbírána. Na tomto místě mohla autorka připustit, že se jí podařilo získat pouze 13 sekvencí ze vzorků pocházejících z Indie z celkového počtu 70 izolátů, které měla k dispozici. Právě tento relativně nízký počet sekvenovaných vzorků mohl mít také vliv na výsledek analýzy, který je v práci prezentován. Zajímalo by mne, jestli má diplomantka v plánu pokračovat v této práci s tím, že by se například zaměřila právě na indické vzorky.

Nepovažuji za správné uvedení tabulky 2 se seznamem zaslaných vzorků do části výsledků. Tento seznam by bylo vhodné zařadit do oddílu materiál a metodika.

Ví se jaký geografický původ mají vzorky pocházející z dlouhodobých laboratorních chovů?

V úvodu je zmíněno, že *H. contortus* je blízce příbuzný *H. placei* a odlišit se dají pouze molekulárními metodami. Byly vzorky před zpracováním testovány jestli jde o *H. contortus* nebo *H. placei*?

Diskuzi bych si představoval více propojenou s publikovanou literaturou. Opírá se pouze o dvě citované práce, přičemž jedna z nich není uvedena v seznamu literatury (Redman a kol. 2007).

Formální chyby:

- různé zarovnávání řádků (vlevo a do bloku, např. na str. 6)
- na straně 1 uvedena zkratka SNP, vysvětlení, že jde o bodové polymorfismy je až na straně 2
- v seznamu literatury chybí pět citovaných prací, naopak na dvě citace není v textu odkaz
- názvy časopisů by měly mít velké počáteční písmena ve všech slovech (kromě předložek, spojek a členů), ne pouze v prvních slovech

Předložená bakalářská práce prezentuje velké množství získaných sekvenčních dat, které jsou kvalitně zanalyzovány. Kvalitu práce bohužel snižují nepřesnosti a chyby při jejím sepsání zejména v metodické části.

Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím jí známkou 2.

V Českých Budějovicích, 15. 5. 2008

  
RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.