

Oponentský posudek

na bakalářskou diplomovou práci **Anny Kuřátkové**

Charakteristika mitochondriálního genomu korovnice *Dreyfusia prelli* (Adelgidae)

Předložená práce je součástí projektu Grantové agentury AV ČR, řešeného odborníkem na taxonomii a biologii mšic J. Havelkou ve spolupráci s laboratoří M. Žurovcové, zabývající se populační a evoluční genetikou hmyzu. V úvodní části diplomantka stručně a výstižně seznamuje čtenáře s problematikou mtDNA včetně současného širokého využití molekulárních markerů mtDNA pro výzkum, popisuje strukturu mtDNA a biologii korovnic čeledi Agelidae včetně detailního popisu komplikovaného reprodukčního cyklu hlavního objektu studia, korovnice *Dreyfusia prelli*. Uvádí též motivaci pro analýzu mtDNA u tohoto druhu. Tato část práce je velmi pěkně a věcně správně napsaná, mám k ní pouze jeden doplňkový dotaz:

- 1 - Na str. 3 diplomantka správně uvádí, že molekula mitochondriální DNA živočichů je kruhová. Existují organismy s lineární molekulou mtDNA?

Cíle práce jsou sice konkrétní a jasně uvedené, ale bohužel jsou uvedeny pouze v bodech bez bližšího vysvětlení proč zrovna tyto cíle a co bylo od nich očekáváno.

V kapitole 3 (Materiál a metody) je uveden původ studovaného materiálu, 5 metod extrakce mtDNA, popsány postupy při zpracování mtDNA metodami PCR, gelové elektroforézy a přímým sekvenováním včetně metod použitých při analýze sekvencí. Tato část je doplněna Tabulkami 1, 3 a 4 (Tabulku č. 2 jsem nenašel – chyba číslování tabulek nebo vypadla při závěrečném zpracování?) a jedním obrázkem s ukázkou výsledku gelové elektroforézy. Kromě několika drobných formálních připomínek (viz níže) nemám k této části žádné výhrady ani dotazy.

Ve vlastní práci se diplomantce podařilo osekvenovat přibližně polovinu z předpokládaných 15 kbp mtDNA korovnice *D. prelli*, což lze, vzhledem k jejím předchozím nulovým zkušenostem, známým problémům při extrakci DNA z titěrných chitinem bohatých tělíček mšic a obvyklým potížím při optimalizaci PCR reakcí během izolace neznámých sekvencí, rozhodně považovat za velký úspěch. Získala sekvence z celkem 15 genů mtDNA a výsledky analýzy těchto sekvencí zpracovala v Tabulkách 5-9, Přílohách 1-3 a Obrázcích 3-5. Kromě získaných a detailně analyzovaných sekvenčních dat včetně názorného souhrnu osekvenovaných úseků na Obrázku 3 a navržené sekundární struktury pěti tRNA obsahuje výsledková část i srovnání mtDNA studovaného druhu s již osekvenovanými mtDNA třech jiných druhů mšic formou fylogenetického stromu na Obrázku 5 a kalkulace mezidruhových genetických vzdáleností v Tabulce 10. Výsledky jsou zpracovány přehledně a velmi pečlivě (dokonce i bez formálních chyb), mám k nim pouze následující doplňkové dotazy.

- 2 - Byly ke konstrukci fylogenetického stromu použity všechny sekvence nebo jen některé?

- 3 - Co znamenají modrá čísla nad diagonálou v Tabulce č. 10?

V kapitole 5 (Diskuse) diplomantka nejprve kriticky zhodnocuje použité metody, v hlavní části pak diskutuje zjištěnou molekulární strukturu a organizaci genů mtDNA u studovaného druhu a porovnává ji se známou strukturou osekvenované mtDNA u třech druhů mšic a jednoho druhu molice, použitého jako „outgroup“. Mezidruhové srovnání pořadí genů je velmi názorně graficky zpracováno v Příloze 4, škoda jen, že na tuto přílohu není v textu žádný odkaz. Diskuse je dobře a logicky napsaná a vyvozené závěry o mezidruhových vztazích odpovídají předpokladům. Výsledky práce jsou pak stručně a výstižně shrnuty v kapitole 6, Závěr (vhodnější název pro tuto kapitolu by dle mého názoru byl Souhrn). K diskuzi mám tyto dotazy:

- 4 - Diplomantka uvádí, že extrakce DNA vzorků ze 100% etanolu nebyla úspěšná na rozdíl od extrakce ze zmražených vzorků kvůli pronikání etanolu do měkkých tkání a následné degradaci. S tímto vysvětlením nesouhlasím, to je naopak účel – rychlé pronikání a totální odvodnění. Samozřejmě i přitom dochází k degradaci DNA, ale mělo by zůstat dostatek templátu pro PCR. Má diplomantka nějaké alternativní vysvětlení? Jaké množství DNA bylo získáváno z mšic u zmražených vzorků?

- 5 - Poněkud matoucím způsobem je diskutován gen pro tRNA-Leu. V Tabulce 11 na str. 26 je uvedena jeho mezidruhová variabilita, na str. 28 dole je však napsáno, že tento gen nebyl u korovnice *D. prelli* nalezen a že není jasné, zda se u tohoto druhu vůbec vyskytuje. Jak to tedy je?

- 6- V úvodu práce je zmíněno, že jedním z důvodů proč studovat mtDNA u korovnic, je nalezení vhodných molekulárních markerů pro taxonomii korovnic. Lze na základě sekvencí získaných v této práci nějaký vhodný gen či úsek mtDNA vytipovat?

Formální připomínky k celé práci.

- str. 2 – název mšice *S. graminum* je použit poprvé, proto musí být uveden celý, tj. včetně názvu rodu;

- str. 3, poslední odstavec – při větším počtu citací v závorce by měly být citace řazeny nejdříve podle roku od nejstarší po nejnovější, v případě stejného roku dle abecedy – tady nejsou řazeny podle žádného kritéria; podobně jsou „cik-cak“ řazeny publikace i na str. 6;

- str. 4, druhý odstavec – latinské názvy druhů jako *Daktulosphaira vitifoliae* se neskloňují!

- str. 4, začátek kapitoly 1.3. – diplomantka uvádí nelogické taxonomické řazení korovnic tvrzením, že „Korovnice (*Adelgidae*, *Aphidini*, *Sternorrhyncha*) jsou malá skupina hmyzu uvnitř nadčeledi mšice (*Aphidoidea*, *Hemiptera*)“. Navíc píše vyšší taxony kurzívou, která je v odborné literatuře vyhrazena pouze pro rody, druhy a poddruhy. *Aphidini* je nejnižší taxon, tribus (obvykle se v pracích tohoto typu neuvádí), pak je čeleď *Adelgidae*, nadčeleď *Aphidoidea*, podřád *Sternorrhyncha* a řád *Hemiptera*; správněji měla věta znít: „Korovnice (*Adelgidae*) jsou malá skupina hmyzu uvnitř nadčeledi mšice (*Aphidoidea*, *Sternorrhyncha*, *Hemiptera*)“.

- str. 4 – při odkazu na kolegu J. Havelku je lépe používat (J. Havelka, osobní sdělení) než (Havelka, osobní komunikace);

- str. 4 – co je správně, Kokawa (1961) nebo Kokava (1961), jak je uvedeno v seznamu literatury?

- str. 5 – při uvádění více prací od stejných autorů stačí uvést autora či autory pouze jednou a vypsát roky publikací či písmena u roků, pokud jsou roky stejné – čili místo (Francke-Grossmann, 1937a, Francke-Grossmann, 1937b) stačí (Francke-Grossmann, 1937a,b);

- str. 5 – místo (Kapitola, P. 2003) má být (Kapitola, 2003);

- str. 6 – Havill et al. (2007) je zřejmě chybná citace - má být Havill & Footitt (2007)?;

- str. 9-12 – u údajů typu „10 mM“ nebo „200 µl“ má být mezera mezi číslem a jednotkami;

- v kapitole 3 (Materiál a metody) jsou některé termíny psány nejednotným způsobem, např. ethanol versus etanol, proteináza versus proteínasa;

- str. 10-11 – místo slova „zvortexováno“ je lépe použít např. promícháno vortexem;

- Kapitola 7, Literatura (str. 30-34) – značná nejednotnost ve formě citování prací – např.:

- u některých citací uváděn zbytečně nejen ročník, ale i číslo;

- některé časopisy uvedeny zkratkou, u jiných vypsán celý název;

- u některých citací tečka na konci, jiné bez tečky;

- str. 30 – u citace Boore (1999) není tečka za názvem článku a časopis má být kurzívou;

- str. 30 – u citace Boore & Brown (1998a) je nadbytečné „a“, neboť není citace „b“;

- str. 30 – u citace Clay & Wolstenholme (1985) má být *Drosophila yakuba* kurzívou;

- str. 30 a 31 – u citací Cook et al. (2002, 2005) jsou nesprávné zkratky časopisů;

- str. 31 – též má být kurzívou *Drosophila melanogaster* u citace de Bruijn (1983);

- str. 31 – časopis *Journal of molecular evolution* – slova chybně malým písmenem;

- str. 32 – podobně časopis *Bulletin of entomological research*;

- str. 32 – u citace Havill et al. (2006a) chybí ročník časopisu a stránky;

- str. 31 – citace von Dohlen & Moran (1995) – chybně abecední pořadí podle „D“ místo „V“;

- str. 33 - citace Simon et al. (1994, 2006) má být zkratka u jména Simon „C.“ místo „Ch.“;

- str. 33-34 - u citací Tamura & Aotsuka (1988), Vila & Björklund (2004) a Zhang & Hewitt (1997) jsou chybně velká první písmena u většiny slov.

Z á v ě r

Anna Kuřátková navzdory řadě experimentálních potíží, se kterými se musela potýkat (v posledních měsících i sama bez možnosti bezprostřední konzultace se školitelkou, jež byla na zahraniční stáži), nepochybně splnila zadané cíle. Vlastní práce je napsána dobrým slohem, zvláště oceňuji kvalitní zpracování výsledků práce a na diplomantku bakalářského stupně překvapivě bohatou a po odborné stránce kvalitní diskuzi; pouze škoda řady formálních chyb zejména v seznamu literatury (kupodivu, v kapitolách Výsledky a Diskuze jsme formální chyby vůbec nenašel).

Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě. Vzhledem k řadě formálních připomínek doporučuji klasifikovat stupni **v ý b o r n ě** až **v e l m i d o b ř e**, v závislosti na kvalitě ústní prezentace.

V Českých Budějovicích, dne 25.5.2009



František Marec