



19. května 2011

OPONENTSKÝ POSUDEK

Bakalářská práce: Genetická variabilita přírodních populací *Diuraphis noxia* (autor práce: Michala Korandová)

Bakalářská práce Michaly Korandové se týká evoluční studie geografického rozšíření mšice obilné. Cílem práce bylo optimalizovat reakční podmínky metody RAPD s vybranými primery pro rozlišení původu a příbuznosti jednotlivých populací tohoto druhu mšice. Dalším cílem bylo vybrat primer, který dává optimální výsledky a sekvenčně charakterizovat reakční produkty, které tento primer poskytuje. Na základě sekvenčních dat bylo konečným cílem navrhnout specifické primery pro SCAR analýzu.

Na rozdíl od alozymové elektroforézy, mikrosatelitů, analýzy endosymbiontů či AFLP, metoda RAPD se v předcházejících studiích ukázala jako jedinou dostupnou metodou, která je schopna identifikovat genetickou variabilitu uvnitř populací mšic. Nicméně metoda RAPD má nízkou reprodukovatelnost a velkou citlivost k nepatrným změnám reakčních podmínek, což vedlo k všeobecné snaze najít vhodné primery a vhodné reakční podmínky, které by při evolučním studiu mšic zajistily reprodukovatelnost této metody. Pro studium populací mšic byla v minulosti použita série primerů, nicméně jen malé množství z nich detekovalo variabilitu (Shufrán a Payton 2009; Puterka et al. 1993). A právě část těchto primerů byla použita v této bakalářské práci pro studium populací mšice obilné. Autorka optimalizovala reakční podmínky s využitím pěti primerů. Jako optimální, tzn. poskytující dostatečně robustní a reprodukovatelné výsledky, vyhodnotila primer BAM. Reakční produkty, které byly poskytnuty na základě primeru BAM, byly zaklonovány a osekvenovány. Analýza získaných sekvencí ukázala, že se jedná o sekvence z nekódujících oblastí. Použitím několika statistických metod autorka na základě výsledků metody RAPD vyhodnotila míru příbuznosti získaných populací. Z časových důvodů se autorce bohužel nepodařilo navrhnout specifické primery pro analýzu SCAR, které byly jedním z jejich cílů.

Až na některé drobnosti, textové zpracování bakalářské práce je velmi kvalitní. Práce je psaná precizně, bez jakýchkoliv překlepů, styl psaní je na velmi dobré úrovni. K úvodu práce, který poskytuje všechny potřebné informace a je psán, tak jak by měl, nemám jakýchkoliv připomínek. Některé výtky mám ale k sekci Materiál a metody. Tato část, ač napsaná precizně, obsahuje v některých pasážích informace tak detailní, že to překračuje až hranici optima. Rovněž bych chtěla připomenout že při psaní českého textu by se autorka měla vyvarovat anglických gramatických spojení jako je „RAPD metoda“ či „RAPD reakce“, protože češtinou správně je „metoda RAPD“ či „reakce RAPD“. Rovněž existují správné české ekvivalenty k anglicko-českému „yeast extrakt“ nebo počestělému „smír“, jak je použito v textu. Rovněž bych chtěla autorce připomenout, že „etidium bromid“ je dvouslovný název a že při uvádění reakčního složení PCR, je třeba uvést koncentraci DNA a ne jen její objem. K sekci Materiál a metody mám i následující otázku. Bylo vyhodnocováno 12 populací. Tabulka 1 uvádí počet dostupných vzorků pro každou populaci. Pojmem „vzorek“

je míněn jedinec nebo soubor geneticky identických jedinců? Jakým způsobem probíhal odběr vzorků a rovněž na kterých místech v rámci ČR odběr probíhal?

K sekci Výsledky a Diskuze mám několik připomínek a otázek:

Na straně 24 by autorka k druhu mšice *A. pisum*, který zde zmiňuje, měla uvést i jeho rodové jméno. V tabulce 6 autorka uvádí procentuelní zastoupení polymorfních fragmentů. U populací získaných ve Francii, Moldávii, Chile a Maďarsko je uvedeno 0% polymorfních fragmentů. Vzhledem k tomu, že ve všech těchto populacích byl získán pouze jeden vzorek, považují uvedení 0% za poněkud zkrslující. Nerozumím obrázku 6, který znázorňuje variabilitu fragmentů. Je počet variabilních fragmentů celkovým počtem variabilních fragmentů? Pokud ano, proč je tento počet nižší než počet fragmentů s danými frekvencemi? Byl již osekvenován genom mšice obilné?

Jako největší problém práce, který ale zjevně autorka nemohla ovlivnit, vidím v nízkém počtu získaných vzorků. Mšice obilná je obávaným škůdcem obilí, která se vyskytuje celou vegetační sezonu. Jaký je tedy důvod tak malého počtu vzorků, který byl autorce k dispozici? V diskuzi autorka uvádí, že dle Neiho (1978) nízký počet vzorků může být kompenzován dostatečně velkým množstvím fragmentů. Je tedy množství fragmentů, se kterým autorka pracovala, dostatečné?

Autorka uvádí, že sekvence, které získala, mohou být sekvencemi genomu endosymbionta této mšice. Patrně měla na mysli nějakého sekundárního symbionta a ne tedy bakterii *Buchnera aphidicola*, jejíž genom je v současnosti již znám. Proto bych se chtěla zeptat, jaká je pravděpodobnost výskytu takového symbionta a jestli variabilita v genomové sekvenci symbiotického organismu může být využita k evolučním studiím tohoto druhu mšic. Závěrem konstatuji, že předložená práce má sice své metodické nedostatky, ale přesto svým rozsahem splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci. Vzhledem k tomu a vzhledem k výjimečně pečlivému textovému zpracování a řadě molekulárně-biologických technik, které autorka zvládla, doporučuji tuto práci k obhajobě.



Dr. Radmila Čapková Frydrychová
Oddělení genetiky,
ENTÚ, Biologické centrum AVČR
Branišovská 31
České Budějovice
Telefon: 387775282
Email: Radmila.Frydrychova@seznam.cz