



Magda Vítková  
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
a  
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav  
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05



Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Jiřího Pašíkovského

## „Fylogeografie a genetická variabilita *Diuraphis noxia* (Aphididae)“

Jiří Pašíkovský se ve své práci zabýval zavedením a optimalizací dvou metod, které mají sloužit ke studiu variability populací mšice zhoubné. První z nich je amplifikace mikrosatelitních sekvencí a jejich následná elektroforetická separace, druhou je EPIC-PCR, metoda, která umožňuje amplifikaci intronových sekvencí z exonů. Z obou metod se podařilo získat data, která byla následně použita pro statistické analýzy.

Práce má sice klasické členění na úvod, materiál a metody, výsledky a diskusi, nicméně sám autor toto členění příliš nerespektuje. Část informací z metodiky patří do výsledků, diskuse, kde by měly být získané výsledky interpretovány a dány do kontextu s již publikovanými daty, je z velké části opakováním informací z kapitoly Výsledky, přičemž často chybí jejich interpretace. Na druhou stranu Úvod je zpracován pěkně a Materiál a metody jsou popsány podrobně a jasně. K práci mám následující otázky a komentáře.

### Úvod

- Autor na straně 6 píše: „Abychom mohli proti škůdcům účinně bojovat, musíme správně určit jeho druh.“ Zajímalo by mě, jestli je určení druhu na úrovni DNA skutečně tak nezbytné pro účinný boj proti škůdci a pro jaký druh boje by toto platilo.
- Na straně 3 autor píše, že na světě se vyskytuje kolem 4700 druhů mšicovitých a zhruba 450 druhů se nachází na rostlinách. Myslím, že tento údaj je chybný, protože všechny druhy mšicovitých jsou fytofágní a tudíž se nacházejí na rostlinách.
- Ze seznamu výhod EPIC-PCR prosím vysvětlit tyto:
  1. Můžeme se vyhnout klonování a sekvenování cílových sekvencí, protože je možno použít primery heterologního (odlišného) genu.
  3. Pro stejnou reakci uvnitř jednoho druhu jsou s menší frekvencí očekávány PCR artefakty jako např. prázdné alely.

### Materiál a metody

- Pro kontrolu kvality DNA byla prováděna amplifikace mitochondriálního genu COI pomocí PCR. Vzhledem k tomu, že studované markery byly jaderné, bylo by strategičtější pro kontrolní PCR použít jaderný gen. Mitochondriální DNA je v buňce přítomna ve více kopiích, takže úspěšná amplifikace mitochondriálního genu není zárukou, že se totéž podaří i u jaderné DNA.

- Napětí 120 V pro elektroforézu a agarózovým gelem ve příliš vysoké. Bylo by lepší pro separaci podobně dlouhých fragmentů použít delší gel, nižší napětí (5 V/cm gelu) a delší dobu na separaci. Podle velikostí alel uvedených v tabulce 1 by tyto podmínky měly stačit pro úspěšnou separaci.

- U každého vzorku byla DNA izolována z několika jedinců téhož klonu, čili po amplifikaci by se na gelu měly objevit maximálně 2 proužky. Jak si autor vysvětluje přítomnost mnoha proužků např. u vzorků 5, 17 a 33 mikrosatelitu SmM23 na obr. 4, vzorků 1-6 (mimo jiné) na obr. 6 a vzorku č. 6 na obr.7?

- Obrázky 4-8 patří spíše do výsledků než do metodiky.

- V tabulce 1 není vysvětlena zkratka MSA.

- Nadpis 4.3.2.1. je anglicky.

- U obrázku 6 by u velikostního markeru měly být popsány všechny relevantní proužky, ne jen jeden.

- V reakční směsi pro PCR (kapitola 4.5.) a sekvenační reakci (kapitola 4.7.) by mělo být uvedeno skutečné množství DNA, ne objem v  $\mu$ l.

- Z popisu ligační reakce vyplývá, že do ligační směsi bylo přidáno 400 U enzymu, což je vysoce nepravděpodobné (kapitola 4.6.2.1.).

- V kapitole o klonování a sekvenování PCR produktů EPIC-PCR není zmíněno, zda bylo z každého vzorku analyzováno více inzertů. Vzhledem k možné přítomnosti různých alel v jednom vzorku je to důležitá informace.

- Kolikrát bylo provedeno sekvenování každého vzorku, čili jak spolehlivé jsou hodnocené polymorfismy?

- Prosím o vysvětlení pojmu „zdroj variability“ ve větě „V programu Arlequin 3.1 byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA), jejímž výsledkem by měla být identifikace zdroje variability na základě frekvencí alel.“ na straně 24.

## Výsledky

- V kapitole 5.3. o EPIC-PCR autor píše, že na gelu nebyl pozorován žádný délkový polymorfismus. Jak si tedy vysvětluje přítomnost dvou proužků u vzorků 20,40 a 45 (Aktin) a 40 a 45 (Cytochrom C)? Nemohla být přítomnost dvou proužků v aktinovém PCR produktu příčinou, že se z tohoto vzorku nepodařilo získat žádné sekvence?

- Na straně 31 jsou uvedeny variability intronů u populací z různých lokalit. Byly nějak zohledněny vzdálenosti lokalit v rámci jednoho státu (Alžírsko – velká variabilita vs. ČR – malá variabilita)?

- Jak si autor vysvětluje, že na základě analýzy mikrosatelitů vyšla populace v ČR jako nejvíce variabilní, zatímco na základě sekvence intronu jako nejméně variabilní?

## Diskuse

- Vyplývá něco z informace, že 12% genetické variability mezi populacemi, zatímco 83% genetické variability se vyskytuje uvnitř populací? Co vyplývá z rozdílných očekávaných a pozorovaných heterozygotností a fixačních indexů?


- V kapitole 6.2. autor zdůvodňuje nečitelné sekvence získané sekvenováním insertů vysokým podílem AT bohatých oblastí. Kdyby toto skutečně bylo příčinou špatných sekvencí, tak by se je, podle mého názoru, nepodařilo získat ani po čištění PCR produktů ExoSap-IT.

Práce je po formální stránce téměř v pořádku, vyskytuje se v ní poměrně malé množství překlepů. Pro poučení autora však uvedu tyto drobné formální chyby:

- Popisky k obrázkům mají být umístěny pod obrázkem.
- Jedna věta by neměla tvořit odstavce.
- Popisky k obrázkům by měly obsahovat všechny důležité informace, i když jsou tyto již zmíněny v textu (např. u obrázku 4 mělo být uvedeno, že se jedná o agarózový gel).
- U jména H. Loxdale (str. 33) by měla být uvedena instituce, na které působí, a stát, ve kterém se tato instituce nachází.

Závěrem prohlašuji, že předložená práce splňuje požadavky kladené na magisterskou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a proto ji doporučuji k úspěšné obhajobě a předběžně ji hodnotím stupněm 2.

V Českých Budějovicích  
19.5.2011



RNDr. Magda Vítková, Ph.D.



Ústav: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta

Student: Bc. Jiří Pašíkovský

Studijní obor:

Název diplomové práce: Fylogeografie a genetická variabilita *Diuraphis noxia* (Aphididae)

Oponent diplomové práce: Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.

## Hodnocení práce:

**hodnocení 1 = nejlepší, 5 = nejhorší  
pokud je hodnocení 3 – 5, nutno odůvodnit  
písemným komentářem**

|  | 1                                   | 2                                   | 3                        | 4                        | 5                        |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Volba tématu práce a její význam             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Formulace cílů práce                         | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Metodika zpracování                          | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Práce s daty a informacemi                   | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Celkový postup řešení                        | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Teoretické zázemí autora                     | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Práce s odbornou literaturou (citace, norma) | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Úroveň jazykového zpracování                 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |



|   |                                     |                                     |                          |                          |                          |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Přesnost formulací a práce s odborným jazykem   | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Formální zpracování – celkový dojem             | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Splnění cílů práce                              | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Rozsah a význam závěrů práce a jejich formulace | <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Odborný přínos práce a její praktické využití   | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <b>Celkové hodnocení práce známkou 1 - 4</b>    | <b>1</b>                            | <b>2</b>                            | <b>3</b>                 | <b>4</b>                 |                          |
|   | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |                          |

Otázky k obhajobě

1.

2.

Další připomínky, vyjádření a náměty k obhajobě práce resp. k jejímu dalšímu využití:  
Předložená diplomová práce dle mého názoru splňuje po obsahové i formální stránce požadavky na diplomovou práci. Téma je zvoleno velmi vhodné, cíle práce jsou jasně formulované. Metodika práce je zpracována velmi dobře, autor práce při optimalizaci metod určitě odvedl řádný kus práce. Zpracování výsledků je korektní a stejně tak jejich interpretace. Stanovené cíle práce byly naplněny, zejména co se týče optimalizace mikrosatelitních markerů a markerů pro EPIC-PCR. Obojí může nalézt využití na pracovišti kde byla práce realizována.

Datum: 19.5.2010

Podpis oponenta diplomové práce:

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.