

POSUDEK NA MAGISTERSKOU DIPLOMOVOU PRÁCI A. JAROŠOVÉ

Diplomová práce Andrey Jarošové se zabývá analýzou primárních a sekundárních endosymbiontů u vybraných druhů mšic. Tato diplomová práce je zdařilá a čtivá a nemám k ní žádné zásadní výhrady, pouze pár návrhů, drobných připomínek a dotazů, které v posudku uvádím podle řazení jednotlivých kapitol.

V Úvodu autorka vysvětluje endosymbiotický vztah mezi mšicemi a bakteriemi, charakterizuje čeledě Aphididae a Adelgidae a definuje pojmy primární a sekundární endosymbiont. Jaký je hlavní rozdíl mezi primárním a sekundárním endosymbiontem? Je to délka koevoluce mezi mšicí a bakterií? Jaké je evoluční stáří u sekundárních endosymbiontů? Dále je v Úvodu objasněno použití malé ribozomální podjednotky k detekci endosymbiotických prokaryot u mšic a jsou zde popsány dvě metody, které autorka ve své práci používala, a to DGGE - denaturační gradientová gelová elektroforéza a RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů. Chybí zde popis třetí metody, kterou autorka pojmenovala jako diagnostickou PCR. I když jde o metodu základní a v molekulární biologii široce používanou, přesto by měl být - podle mého názoru - alespoň ve zkratce uveden princip této metody. Dále bych navrhovala, aby všechny kapitoly popisující použité metody byly přeraženy z části Úvod do části Metodika, např. jako úvodní odstavce k jednotlivým metodám.

V části Metodika autorka nejdříve popisuje studovaný materiál a způsoby extrakce DNA. Jak autorka uvádí, k izolaci DNA použila 2-5 klonálních jedinců. Jaká je jistota, že jedinci byly skutečně klonální a nereprezentovali potomstvo více samic?

Dále v kapitole Metodika následují podmínky reakcí pro PCR a na obrázku č.1 jsou znázorněny pozice jednotlivých primerů. Chybí zde zakreslení primerů pro metodu DGGE, mohla byste tyto primery doplnit?

V kapitole DGGE je uvedeno „Denaturace dsDNA značně snižuje její mobilitu gelem (Muyzer *et al.*, 1993), takže sekvence mající vyšší obsah GC bazí a tím pádem setrvávající delší dobu ve formě dvouřetězce, putují dále. K zastavení dochází až při dosažení vyšších koncentrací denurantů, kdy dojde k úplné disociaci. Protože by však jednořetězcové fragmenty mohly snadno vycestovat z gelu ven, používá se při pcr amplifikaci tzv. GC-svorka.“ Pokud dochází k zastavení mobility jednořetězcových produktů v gelu, jak si vysvětlujete fakt, že by tyto fragmenty mohly vycestovat z gelu? Mohla byste tuto metodu vysvětlit podrobněji?

Dále bych se chtěla zeptat, co znamenají zkratky U-type, R-type, T-type v tabulce č. 5 na straně 14.

V následující části pak autorka v tabulkách, grafech a dendrogramech uvádí výsledky, které komentuje v závěrečné diskuzi. Autorka uvádí, že bakterie *Ecksteinia adelgidicola* a *Steffania adelgidicola* byly zjištěny pouze u mšic rodu *Dreyfusia*, ale vždy společně. Jak byste vysvětlila tento společný výskyt a jak si vysvětlujete přítomnost *Buchnera aphidicola* u *Adelges laricis*, což je - jak uvádíte - v rozporu s dosavadními publikacemi? Nemohlo zde dojít ke kontaminaci při izolacích DNA nebo přípravě PCR? V diskuzi na str. 36 uvádíte, že standardní PCR má vůči množství bakterií v hmyzím těle malou citlivost, a proto nedetekuje bakterie zastoupené jen v minimálním množství. Jak by se dal tento problém řešit?

Na závěr přidávám souhrn drobných gramatických chyb, které se v textu vyskytly. Jsou to především drobné překlepy a formát písma, který by bylo dobré v celé práci sjednotit

(především použití kurzívy u druhových a rodových názvů). Tyto chyby v žádném případě nesnižují vědeckou kvalitu této diplomové práce.

Str. 1., kapitola Úvod - Symbióza jez hlediska evoluce

Str. 3., kapitola Sekundární endosymbiont - Stejně jako *Buchnera aphidicola* jsou i sekundární endosymbionti přenášeny maternálně (Burke et al., 2009), avšak při krmení na kontaminované rostlině je běžný i horizontální přenos (Sandström et al., 2001; Russell et al., 2003). ...kurzívou latinský název druhu + čárka navíc

Str. 3., kapitola Primární endosymbiont... *Buchnera aphidicola* je blíže příbuzná druhu *Escherichia coli*, od které divergovala před zhruba 420 miliony lety (Unterman et al., 1989), avšak během evoluce došlo ke značné redukci jejího genomu, který svou velikostí i počtem genů představuje jen 15 % svého původního stavu (Shigenobu et al., 2000)...chybí tečka na konci věty

Str. 4., kapitola Sekundární endosymbiont... a *Serratia symbiotica* svého hostitele chrání, pokud je vystaven vyšším teplotám (Burke et al., 2009)...kurzíva

Str. 5....*pcr* amplifikace...PCR velkými písmeny, je to zkratka

Str. 7., Kapitola Cíle - *D. noxia* - měl být vypsán celý latinský název, protože je to první zmínka v textu (Obsah a Anotaci nepočítám)

Str. 14, Tab. 4. – formát písma

Str. 18, Kapitola Izolace DNA z gelu a sekvence...Na základě výsledku elektroforézy a jejího porovnání s velikostním markerem bylo do mikrozkušavky přidáno mezi 8 až 10 ng DNA...bez čárky

Str. 18, Kapitola Izolace DNA z gelu a sekvence ...K té bylo přidáno ještě 0,5 µl primeru *avoda* v takovém množství,

Str. 19, 4. 4.1.1. *Diuraphis noxia* – latinský název kurzívou (také v Obsahu)

Str. 22, Kapitola DGGE...Výskyt jednotlivých druhů bakterií v rámci zemí původu vzorků je vyobrazen v Tab.....Chybí číslo tabulky

Str. 25, kapitola Adelgidae.....*Bacillus* sp. (98 %), primary endosymbiont of *Sitophilus*/secondary endosymbiont of *Curculio/Sodalis glossinidius*....přepsat do češtiny

Str. 28... Výjimku tvoří rody *Eopineus* a *Dreyfusia*, u kterých byl výskyt pod 13 % a u rodu *Pineus* tato bakterie nalezena nebyla ...kurzíva

Str. 35, obr. 12...Migrace a oblasti výskytu *D. noxia* podle analýzy AFLP...kurzíva

Str. 36, kapitola RFLP...Metoda restrikčního štěpení byla vyzkoušena u 32 vzorků čeledi Adelgidae, avšak získaná data nebyla nekorespondovala s očekávanými délkami fragmentů.

Str. 36, Obr. 13...legenda kurzívou – rodové názvy

Str. 37, kapitola Závěr...U *D. noxia* byly v rozporu s údaji v literatuře, kde se uvádí, že tato mšice žádné sekundární endosymbionty nemá, nalezeno 12 bakteriálních druhů....kurzíva

Str. 37, kapitola Závěr... U *D. noxia* byly v rozporu s údaji v literatuře, kde se uvádí, že tato mšice žádné sekundární endosymbionty nemá, nalezeno 12 bakteriálních druhů....věta gramaticky nedává smysl

Cílem této magisterské práce bylo porovnání tří různých metod pro detekci bakteriálních endosymbiontů u mšic a analýza jejich druhového spektra. Tyto cíle byly splněny a také magisterská práce Andrey Jarošové rozhodně splňuje požadavky, které jsou na magisterskou práci kladeny. Proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Práci bych ohodnotila známkou 1-.


RNDr. Petra Dufková, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 14.5.2012



Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: **Bc. Andrea Jarošová**

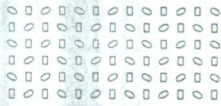
Název práce: **Analýza sekundárních endosymbiontů u vybraných druhů mšic (Aphidae a Adelgidae)**

Předložená diplomová práce zpracovává na 55 stranách velmi zajímavou problematiku endosymbiontů mšic a jejich detekce pomocí metod molekulární biologie (PCR, DGGE a RFLP) a bioinformatických nástrojů. Práce je standardně členěná, po stručné úvodní části a vytyčení cílů následuje popis používaných metodik. Vše je závislé na vstupním souboru vzorků mšic z různých lokalit a hostitelských rostlin, tím je zatíženo i hodnocení dat (někdy pouze 1 exemplář z dané lokality). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách, grafech a souhrnných dendrogramech. Diskuze a závěr shrnují stručně dosažené výsledky, nejdůležitějším výsledkem je ověření použitelnosti metody DGGE pro daný výzkum a detekování řady endosymbiontů u obou skupin mšic. Diplomová práce je napsána srozumitelně s malým množstvím překlepů, zdroje jsou řádně citovány.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- U hmyzu je velmi častý horizontální přenos genetické informace, tj. začlenění bakteriálních genů symbiontů do genomu hostitele (viz např. publikace Dr. Šímy z Mikrobiologického ústavu AVČR v Praze). Nastává tato situace i u studovaných skupin mšic? Pokud ano, jak se odliší DNA endosymbiotických bakterií opravdu žijících v organismech od pozůstatků bakteriální DNA v genomu mšic?
- V experimentech byl použit zástupce čeledi Aphidae *D. noxia*, je zmíněn v cílech práce, ale potom až ve výsledcích, tj. ne v úvodu u popisu Aphidae ani v materiálu, čtenář potom tápe, o jaký organismus se jedná, v cílech může dokonce nabyt dojmu, že se jedná o živnou rostlinu.
- Kde jsou endosymbionti lokalizováni, je to pouze trávicí trakt hostitele?
- Obr. 13 se nachází v diskuzi, ale měl by být uveden ve výsledcích, navíc by mohl být umístěn společně s Obr. 7, protože oba prezentují podobná data.
- Str. 22. Chybí odkaz na Tab. 12.





- Seznam literatury není v jednotném stylu, vyskytují se zde krátké i dlouhé názvy časopisů (např. Journal of Insect Physiology, Human mutation - v práci psáno navíc velkými písmeny), zkrácené názvy s tečkami nebo bez nich, občas chybně mezery (např. Am J Hum Genet x Microbiol. Rev.), název časopisu je někdy psán kurzívou. V názvech článků jsou někdy všechna počáteční písmena slov velká, jindy pouze na začátku. Jiný font citace Gill and Werrett 1987. Velmi často neúplné citace používající zkratku et al. (např. Haynes et al. 2003), v textu práce to samozřejmě lze ale v seznamu literatury je to nepřijatelné. Rok vydání bych uváděl na konci citace nebo za jmény autorů, zde je to před ročníkem a stranou.

Diplomová práce Andrei Jarošové je aktuálním souhrnem informací o endosymbiontech mšic skupin Aphidae a Adelgidae, splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji **doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou.**

Oponent: **RNDr. Pavel Hyrší, Ph.D.**

V Brně 25.5.2012

datum a podpis

