



Prof. RNDr. František Marec, CSc.

¹⁾ Biologické centrum AVČR, Entomologický ústav, Lab. molekulární cytogenet.

²⁾ Přírodovědecká fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích

Branišovská 31, CZ-370 05 České Budějovice

Tel.: +420-387 775 250 (218, 249, 269); Fax: +420-385 310 354

e-mail: marec@entu.cas.cz

<http://www.entu.cas.cz/>



OPONENTSKÝ POSUDEK

na magisterskou diplomovou práci Bc. Daniely Chundelové

Molekulární analýza mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* (Aphididae)

Cílem práce bylo kompletní osekvenování a detailní srovnávací analýza mitochondriálního genomu u jednoho z nejvýznamnějších současných škůdců obilovin, mšice zhoubné. Přehledné zpracování řešené problematiky na 10 úvodních stranách s četnými odkazy na dřívější i recentní publikace svědčí o hluboké znalosti studované problematiky a dobré práci s literárními prameny. Přehledně a dostatečně detailně jsou zpracovány použité materiály a metody, i když tato obsáhlá kapitola vykazuje drobné nedostatky (viz Připomínky a dotazy 1-5). Vlastní výsledky jsou nejzdařilejší částí práce – jsou logicky uspořádány, jasně a srozumitelně popsány a dokumentovány kvalitně zpracovanými tabulkami a obrázky, na které jsou v textu příslušné odkazy. Ocenil jsem, že autorka přesunula některé zdlouhavé tabulky a obrázky do příloh. Výsledky jsou odpovídajícím způsobem zhodnoceny a porovnány s publikovanými údaji v Diskuzi, která však obsahuje některé nadbytečné pasáže. To se týká kap. 5.1. (Izolace DNA) a 5.2. (Optimalizace PCR reakční směsi a PCR profilu) na str. 44-46), které pouze popisují (částečně i hodnotí) zkoušené metody a postupy a které dle mého názoru do Diskuze nepatří. Nejdůležitější dosažené výsledky jsou shrnuty v jednostránkovém Závěru. Velmi dobrý dojem z celého spisu a zejména z kvalitních výsledků poněkud kazí řada drobných formálních nedostatků, které pro potřeby autorky a doufám i pro její poučení uvádím v příloze mého posudku.

Připomínky a dotazy:

1. V kap. 3.1. na str. 13 je uvedeno, že byly mšice zmrazeny na -82°C . Znamená to, že byly zmrazeny v hlubokomrazícím boxu a nikoliv v tekutém dusíku, který má teplotu -196°C ?
2. V kap. 3.4.1. na str. 18 je uvedeno, že do PCR byl použit $1,0\ \mu\text{l}$ templátové DNA, ale chybí její koncentrace? Jaké množství DNA bylo používáno? (Koncentrace chybí i u BSA.)
3. V kap. 3.5. na str. 20 je v Obr. 1 vložen neostrý obrázek velikostního markeru (zřejmě stažen v nízkém rozlišení z internetu); vhodnější by bylo uvést velikosti fragmentů přímo u proužků markeru na gelu, jak je to obvyklé v publikacích. Jaká byla velikost amplifikovaných COI a ND5 fragmentů?
4. Popis trojlístkové struktury na Obr. 2. (kap. 3.8., str. 22) je prakticky nečitelný, zřejmě též stažen v nízkém rozlišení; je lépe textové popisky vymazat a přepsat např. v Adobe Photoshop.
5. Co znamená, že byl nejvhodnější model pro metodu Maximum likelihood vybrán dle „Akaike kritérií“ (kap. 3.8., str. 22)? Prosim vysvětlit („klouzavé okénko“ na str. 23 je vysvětleno ukázkově).

6. Nepochopil jsem, k čemu se vztahuje vysvětlivka pod Tab. 7 (kap. 4.1.2., str. 29), označená číslem „0“ a sdělující, že stop kodon nebyl detekován. Prosim vysvětlit.
7. Proč jsou některé vazby v trojlítkové struktuře tRNA na Obr. 4. (kap. 4.1.3, str. 29-31) označeny červeným puntíkem, zatímco většina je modrým?
8. Co znamená exponent 1 v Tab. 14, znázorňující přesuny genů a tRNA (kap. 4.2.2., str. 37-38)?
9. Lze vyvodit ze zjištění (Diskuze, kap. 5.3., str. 46), že mitogenom *Diuraphis noxia* (Macrosiphini) je podobnější mitogenu mšice *Schizaphis graminum* (Aphidini) než mšice *Acyrtosiphon pisum* (Macrosiphini), že *D. noxia* by měla být řazena do taxonu Aphidini? Existují jiné příklady rozporu mezi příbuzností mitogenomů a současnou taxonomickou klasifikací?
10. Jakou strategii či jaké metody by autorka zvolila, aby u vybraných lokusů/markerů pro studium genetiky populací (viz Závěr, str. 51) vyloučila působení selekce nebo efektu zakladatele?

Závěr

Bc. Daniela Chundelová ve své diplomové práci zcela splnila stanovené cíle. Úspěšně osekvenovala celou mitochondriální DNA mšice *Diuraphis noxia*, sestavila její strukturu a srovnávací analýzou s mitogenomy příbuzných i vzdálenějších druhů identifikovala 4 variabilní úseky vhodné pro populačně genetická studia. Sekvence mitogenomů využila i pro zpřesnění fylogenetických vztahů mezi příbuznými druhy a čeleděmi hmyzu skupiny Sternorhyncha. Prokázala tak schopnost samostatné výzkumné práce a získala kvalitní původní výsledky, publikovatelné v renomovaných vědeckých periodících. Předložená práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce v magisterském studijním oboru Experimentální biologie a

d o p o r u č u j i j i k o b h a j o b ě .

Vzhledem k řadě drobných formálních nedostatků doporučuji práci 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.



František Marec

V Českých Budějovicích, 28. května 2012



RNDr. Iva Fuková, Ph.D.
Laboratoř molekulární cytogenetiky
Ústav molekulární biologie rostlin, BC AVČR, v.v.i.
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
Telefon: (+420) 387 775 511
Fax: (+420) 385 310 356
E-mail: ifukova@umbr.cas.cz

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Daniely Chundelové:

Molekulární analýza mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* (Aphididae)

Ve své diplomové práci se Bc. Daniela Chundelová zaměřila na získání sekvence mitochondriálního genomu mšice zhoubné (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov) a její analýzu, s cílem navrhnout úseky vhodné pro přípravu molekulárních markerů pro populační studie. Dále sekvenční data využila k ověření fylogenetických vztahů v rámci podřádu Sternorrhyncha.

Práce je klasicky členěná na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a literaturu. Úvod plně pokrývá studovanou problematiku a mám k němu snad jedinou výhradu: mitochondriální DNA je prezentována jako téměř dokonalý molekulární marker jak pro fylogenezi, tak pro populační genetiku. Je jeho využití opravdu tak bezproblémové, jak vyplývá z úvodního textu? A dále, skutečně nedochází k rekombinaci mitochondriální DNA?

Kapitola materiál a metody je psána velmi podrobně a pečlivě. Přesto bych měla několik dotazů a drobných připomínek:

- 1) U tabulky 2 na str. 12 není zcela jasné, ke kterým sekvencím se vztahují uvedená přístupová čísla. Je to naprosto evidentní z kontextu a zaměření práce, nicméně by to mělo být zřejmé ze samotné tabulky. Také bych v této tabulce uvítala informaci o čeledi, k níž analyzované druhy patří. Na základě kterých kritérií byly tyto druhy vybrány?
- 2) Složení reakčních směsí a roztoků by bylo lépe psát jako výčet koncentrací jednotlivých složek a nikoli jejich objemů (jak je uvedeno na str. 18, 19 a 21) – to je zřejmě přínosné jako laboratorní manuál pro ostatní členy skupiny, nicméně je to méně vhodné pro publikaci.
- 3) Jak funguje metoda čištění sekvenční reakce pomocí enzymatické směsi ExoSAP? Co se tam děje s volnými nukleotidy?

Analýzy sekvenčních dat jsou pečlivě zpracované a výsledky pak jasně prezentované a diskutované. Za poněkud matoucí považuji pouze popis nekódujících oblastí mitochondriálního genomu. Není mi např. zcela jasné, proč se autorka zastává nejednoznačného označení těchto úseků uvedeného v Genbank (text a tabulka 11 na str. 35, kap. 4.2.1)? Dále u mapy mitogenomu *D. noxia* (obr. 3 na str. 28) jsou vyznačené celkem tři nekódující úseky, přičemž třetí z nich není popsán a až v diskuzi je osvětleno, že se jedná o oblast pravděpodobného výskytu tří genů pro tRNA. Tyto tři geny se nepodařilo jednoznačně identifikovat a autorka je vyňala ze sekvenčních analýz. Chtěla bych se zeptat, co by mohlo být příčinou tohoto nezdaru? Jsou tyto geny u mšicovitých více variabilní? Mohlo by se jednat o nefunkční geny? Jak by se to dalo ověřit?

Jak si autorka vysvětluje větší podobnost mitogenomu *D. noxia* sekvenci mšice obilné, *Schizaphis graminum*, přestože je *D. noxia* taxonomicky blíže kyjatce hrachové, *Acyrtosiphon pisum*?

Vzhledem ke svému rozsahu obsahuje práce relativně málo překlepů a pravopisných a mluvnických chyb, proto nemá smysl se zde jimi příliš zabývat. Pouze bych chtěla upozornit na některé z nich, které se objevují opakovaně. Výrazy „naamplifikovaná oblast“ či „vyizolovaná DNA“ (např. strana 10, 24 a 44) by se zcela jistě obešly bez přípony na- a vy-. Dále považuji za poměrně nešťastný termín „polospecifický primer“ (poprvé použitý na str. 16, kap. 3.3). Sekvence je buď specifická, nebo není, případně může být specifická jen její část, což je zřejmě případ použitých primerů – pak by se spíše hodil termín částečně specifické primery.

Celkově hodnotím předloženou práci velmi kladně. Bc. Daniela Chundelová prokázala, že se dobře orientuje ve studované problematice, zdárně si poradila s optimalizací metodiky jak pro izolaci DNA *D. noxia*, tak pro amplifikaci a sekvenování obtížného templátu, a získala tak řadu kvalitních výsledků. Její práce je nezbytným podkladem pro další výzkum populační struktury, odhalení šíření a identifikaci jednotlivých biotypů tohoto významného škůdce. Diplomovou práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a navrhuji známku výborně.

České Budějovice, 27. 5. 2012

Iva Fuková