



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 1760, České Budějovice 370 05



BIOLOGY
CENTRE
CAS

a
Entomologický ústav, Biologické centrum AVČR
Branišovská 31, České Budějovice 370 05

Oponentský osudek na bakalářskou práci Nicole Jánové s názvem

Genetické markery pro druhovou identifikaci a studium genetické variability forenzně významných druhů masařek (*Sarcophagidae*)

Práce se zabývá testováním markerů, které by bylo možné použít pro určení druhu nebo populace u forenzně zajímavé čeledi masařkovitých (*Sarcophagidae*). Úkolem bylo vytipovat takové markery z literatury a vyzkoušet jejich použitelnost u této konkrétní čeledi, dále ověřit možnou kontaminaci vnitrobuněčnou bakterií *Wolbachia*, která je u členovců velice častá a její DNA může interferovat s analýzou mitochondriální DNA testovaného hmyzu. Autorka vyzkoušela 12 markerů na 72 jedincích z 9 druhů plus 2 lokusy na přítomnost wolbachie. Pro zhodnocení markeru *COI* pak autorka získala a analyzovala množství dalších sekvencí z veřejných zdrojů. Práce zahrnovala celé spektrum metod, konkrétně izolace DNA, optimalizace PCR, klonování, po bioinformatické zpracování sekvencí a jejich analýzu.

Úvod je psán velmi čtivě a poskytuje informace, které čtenář potřebuje, aby pochopil následující části práce i její význam. Metody jsou detailně popsány, snad jen u podkapitoly 3.2.6c Inkubace bakterií bych ocenila více informací, např. jaká byla příčina toho, že se nedařilo sekvenovat přímý PCR produkt, zatímco DNA z klonů ano. Byla důvodem směs fragmentů v původním produktu PCR? Dostali jste po sekvenování z různých kolonií různé sekvence? Výsledky jsou popsány jasně a v diskusi autorka interpretuje získaná data a reflektuje problémy, jako je třeba variabilní počet jedinců jednotlivých druhů a jejich nerovnoměrná geografická distribuce. V závěru autorka navrhuje budoucí směřování projektu. Práce obsahuje jen malé množství překlepů a formálních chyb, zmínila bych jen, že čísla na osách X některých grafů v příloze 12 se překrývají a jsou tak nečitelná a na obrázku 5 je na fotografii gelu negativní kontrola v půlce ustřižená, což není moc elegantní.

K práci mám následující dotazy a komentáře:

- 1) Autorka zjistila, že mitochondriální marker *COI* vykazoval vnitrodruhovou variabilitu jen u tří zkoumaných druhů, zároveň však uvádí, že to mohlo být způsobeno nerovnoměrným množstvím sekvencí získaných z jednotlivých druhů. Neuvažovali jste o získání vlastních vzorků masařek jejich lovem nebo spoluprací s dalšími entomology? Získali byste tak vzorky i ze vzdálenějších českých lokalit,

což by se na populační studii jistě hodilo a měli byste materiál i na amplifikaci markerů, které jsou méně studované, než je *COI*.

- 2) V metodách i ve výsledcích autorka zmiňuje, že se nepodařilo osekvenovat PCR produkty markeru *ITS*. Zároveň jsem v metodách nikde nenašla zmínku, že by měřila množství DNA, které do sekvenační reakce dávala. Možná by kvantifikace DNA mohla pomoci. Také mě napadá, když už byly tyto PCR produkty zaklonované, jestli by nebylo bývalo lepší k jejich amplifikaci použít univerzální primery M13. Odpadla by tak ztráta počátku sekvence, která je vždy špatná, ale v případě amplifikace pomocí M13 by počáteční sekvence patřila vektoru, který je stejně potřeba odstranit.
- 3) Podobně v metodách v kapitole 3.2.2 PCR je uvedeno množství templátu v mikrolitrech, ale není tam uvedeno množství DNA (v ng), které do reakce přišlo. Předpokládám, že je to proto, že jste množství DNA po izolaci nekvantifikovali. Myslím, že při testování nových markerů by bylo vhodné měření koncentrace provést nebo při optimalizaci PCR použít vnitřní kontrolu, která ukáže, že je v reakci dostatek templátu. U reakcí, kde se nepodařilo získat očekávaný produkt, bych zkusila zvýšit koncentraci primerů.
- 4) Ve výsledcích v obrázku 6 jsou uvedeny grafy, ve kterých je znázorněna korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností tří druhů, u kterých tato korelace vyšla signifikantně (narozdíl od ostatních testovaných druhů). V případě *Sarcophaga africa* není korelace příliš patrná a i hodnota p je na hranici signifikantnosti. Nemůže být tato korelace způsobena malým množstvím vzorků ze vzdálených lokalit?

Bakalářskou práci Nicole Janové hodnotím velmi kladně, jak kvůli objemu laboratorní práce, tak samotnému zpracování dat a jejich interpretaci. Bakalářská práce nepochybně splňuje nároky kladené na tento druh kvalifikačních prací na PŘF JU a hodnotím jí známkou výborně.