

**Oponentský posudek na doktorskou  
disertační práci Mgr. Ivy Fukové**

**„Molecular cytogenetic analysis of the W sex chromosome in Lepidoptera“**

Předložená disertační práce se skládá z 68 stran textu, které shrnují poznatky v dané oblasti, metodiku, výsledky a diskuzi týkající se tématu disertační práce. Základním předmětem disertace jsou čtyři práce publikované v impaktovaných časopisech, které se zabývají výzkumem zaměřeným na molekulární cytogenetiku Lepidoptera.

Jedna z prací se zabývá cytogenetickým studiem zavíječe datlového, závažného polyfágního škůdce skladovaných potravin. Základní karyotyp byl stanoven na  $2n=62$ . V pachytenních jádrech byly pozorovány 2 bivalenty nesoucí organizátory jadérek, avšak nepodařilo se identifikovat pohlavní chromozomy W a Z. K jejich identifikaci proto byla použita genová in situ hybridizace a komparativní genová hybridizace. První z těchto metod umožnila detekovat pohlavní chromozom W podle silné hybridizace se značenou samičí genomovou sondou. Při použití druhé metody chromozom W hybridizoval stejně se značenou samčí i samičí genomovou sondou. Autoři z toho vyvozují, že chromozom Y je tvořen převážně repetitivními sekvencemi DNA rozptýlenými po celém genomu, avšak akumulovanými na chromozomu W.

V další práci autoři prezentují detailní analýzu karyotypu obaleče jablečného se zvláštním zřetelem na identifikaci a molekulární diferenciaci pohlavních chromozomů. Autoři ukázali, že W chromozom, jenž determinuje samičí pohlaví, lze snadno rozlišit pomocí genové in situ hybridizace a komparativní genové hybridizace. Použili také laserovou mikrodisekci s následnou DOP-PCR pro vyvinutí malovací sondy pro W chromozom. Pomocí metody fluorescenční in situ hybridizace prokázali, že tato sonda značí s vysokou specifitou celý chromozom W.

V další práci autoři získali pomocí laserové mikrodisekce sex chromatinu obaleče jablečného a následně DOP-PCR vzorek sekvencí DNA pohlavního chromozomu W. Tento vzorek využili pro přípravu W-specifické malovací sondy pro fluorescenční in situ hybridizaci a pro získání primárních sekvenčních dat z tohoto chromozomu. Prokázali, že heterochromatinový chromozom W je převážně tvořen repetitivními sekvencemi dvou typů a obsahuje i sekvence

unikátní. Ukázali, že složení chromozomu W u obaleče jablečného není principiálně odlišné od druhů se systémem determinace pohlaví typu XY.

V neposlední řadě autoři v další práci navrhli transgenní přístup jako metodu likvidace motýlých škůdců pomocí vrozené sterility. Přístup byl založen na konstrukci transgenních samic nesoucích dominantní letální mutaci na W chromozomu.

Jak je z výše uvedeného přehledu patrné, v disertační práci byly použity nejmodernější molekulární cytogenetické metody a získané výsledky byly publikovány v časopisech, kde prošly náročným oponentním řízením. V práci je zcela jasně uveden podíl Mgr. Ivy Fukové na jednotlivých publikacích a je zcela zřejmé, že byl zásadní. Úvod, přehled výsledků, diskuze i výhled do budoucna, jsou naprosto jasné, stručné a výstižné. K dané práci nemám připomínek a oceňuji vysokou metodickou úroveň i odbornou způsobilost disertantky.

Disertační práce Mgr. Ivy Fukové splňuje všechny předpoklady pro její přijetí, a proto doporučuji, aby byla připuštěna k obhajobě disertační práce.

v Brně dne 10. 10. 2007



Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.





**Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky**  
RNDr. Eduard Kejnovský, CSc.  
Laboratoř vývojové genetiky rostlin  
Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel. 41517203, fax: 41240500,  
e-mail: kejnovsk@ibp.cz, www.ibp.cz/labs/PDG

Oponentský posudek dizertační práce doktorandky Mgr. Ivy Fukové  
“Molecular cytogenetic analysis of the W sex chromosome in Lepidoptera”

Dizertační práce Mgr. Ivy Fukové je zaměřena na strukturně-evoluční studium pohlavních chromozomů u motýlů. Jedná se o velice zajímavou a aktuální tematiku, která je v laboratoři školitele, profesora Marece, dlouhodobě řešena. Práce je napsána dnes již poměrně běžnou formou, kdy jsou jejím jádrem publikace, na nichž je doktorandka hlavní autorkou či spoluautorkou, k nimž je napsán stručný úvod, shrnutí výsledků a diskuse. Práce je psána anglicky. V úvodu je stručně pojednáno o moderních metodách cytogenetiky, se zaměřením na cytogenetiku motýlů, jakož i pojednáno o pohlavních chromosomech. Těžištěm výsledkové části jsou tři originální publikace a jedna kapitola v knize, v případě dvou prací je Iva Fuková první autorkou. Za nejvýznamnější výsledek považuji provedení karyotypu dvou druhů motýlů, *Ectomyelois ceratoniae* a *Cydia pomonella*, a zejména vizualizaci chromosomu W pomocí různých metod - GISH, komparativní genomové hybridizace (CGH) a pomocí paintovací sondy připravené mikrodisekcí a následnou amplifikací chromosomu W. Práce je sympatická i tím, že je monotematicky, pouze kapitola 2 na mě působí poněkud cizorodě v kontextu hlavního cíle práce – cytogenetické analýzy chromosomu W.

Nechci se zabývat detaily, drobnými nejasnostmi či nepřesnostmi. Místo toho bych si dovolil položit doktorandce několik, spíše obecnějších, otázek:

1. Porovnáme-li metody GISH a CGH, která z nich je vhodnější pro malování chromosomu W?
2. Co je tou genomovou komponentou, která maluje chromosom W? Jsou to chromosomově specifické (resp. akumulované) repetice anebo unikátní či nízkokopiové sekvence? Nemohla by o tom rozhodnout doba hybridizace – krátká versus dlouhá?



3. Má doktorandka nějaký názor na to proč je painting snazší u živočichů než u rostlin? Jak by to mohlo odrážet rozdíly ve struktuře genomů, jako důsledek odlišných procesů?
4. V souvislosti s prací Fukova et al 2007 (Chromosoma) by mne zajímalo, zda autorka nezkusila použít na FISH také jednotlivé klony odvozené z mikrodisektovaného chromosomu W, např. klon CpW27 by možná mohl krásně hybridizovat na chromosom W, zatímco klon CpW34 bych očekával spíše na chromosomu Z. Nebyla by někdy lepší jako paintovací sonda nějaká jednotlivá repetice specifická pro W než komplexní sonda vzniklá amplifikací mnoha repeticí, z nichž mnohé nemusí být specifické pro W chromozom. Navíc primery používané pro DOP-PCR často přednostně amplifikují genové oblasti a ne repetice.
5. Zajímala by mne také zda je něco známo o zastoupení různých typů DNA transposonů a retrotransposonů (gypsy, copia aj.) v genomu studovaných motýlů a zejména míra jejich akumulace na chromosomu W.
6. Autorka uvádí, že paintovací sonda odvozená z chromosomu W nemalovala konce chromosomu W. Nemůže být příčinou nějaký subtelomerický satelit? Jsou známy nějaké satelity (či obecně tandemové repetice), případně jejich akumulace na chromosomu W?

Závěrem musím konstatovat, že celkově hodnotím dizertační práci Mgr. Ivy Fukové jako velmi zdařilou. Doktorandka získala značné množství originálních výsledků, což svědčí nejen o výborné laboratorní dovednosti, ale i o její schopnosti získané výsledky správně interpretovat a při tom zúročit i svoje teoretické znalosti. K úspěchu práce nepochybně významně přispěla skutečnost, že byla vypracována ve špičkové laboratoři profesora Marece. Z uvedených důvodů jednoznačně doporučuji dizertační práci k obhajobě.



Posudek  
na doktorskou disertační práci Mgr. Ivy Fukové  
*Molecular cytogenetic analysis of the W sex chromosome in Lepidoptera*

Posuzovaná doktorská disertační práce je pojata jako soubor čtyř již vyšlých publikací, uveřejněných ve třech mezinárodních časopisech s impaktním faktorem a v knižním sborníku vydaném nakladatelstvím Springer. Všechny tyto vědecké práce spojuje jednotné tématické zaměření na cytogenetiku pohlavních chromosomů u motýlů, přičemž teoretické studie vyúsťují také v praktickou implikaci pro tlumení početnosti některých škodlivých druhů. Celá práce, napsaná v dobré angličtině, tak představuje obsahově sevřený celek, který přináší řadu původních vědeckých poznatků.

Zvláště oceňuji příkladné zpracování úvodních a závěrečných partií disertace, které velmi vhodně spojují jednotlivé články a přispívají tak k vytvoření jednotného a vyváženého spisu. V úvodu je podán přehled dnešního stavu molekulární cytogenetiky, výzkumu chromosomů u motýlů a problematiky pohlavních chromosomů se zvláštním zřetelem na Lepidoptera. Tyto odstavce svědčí o dokonalém literárním přehledu autorky a o její schopnosti stručně, ale zcela srozumitelně podat a vyložit náročnou problematiku. Úvodní kapitoly tak mají charakter kvalitních mini-review, které jsou napsány v podstatě v publikovatelné podobě. Podobně v závěrečné kapitole je předložen syntetický přehled i souhrnná diskuse dosažených poznatků a jsou nastíněny perspektivy dalších výzkumů.

Čtení této disertace pro mě znamenalo dosti neobvyklý a překvapující zážitek, protože jsem nebyl schopen ve spisu nalézt žádné závažnější poklesky nebo nedostatky, které by stálo zato v posudku zmínit a kritizovat. To je pro mě doposud nepoznaná zkušenost a mohu se tedy omezit pouze na pár zvědavých dotazů:

- Jsou známy mechanismy environmentálního určení pohlaví u motýlů?
- Je možné heterochromatinové úseky na pohlavních chromosomech některých druhů vizualizovat C-proužkováním?
- Existuje nějaká představa o povaze repetitivních úseků, které se u některých druhů vyskytují roztroušeně v genomu a akumulují se na pohlavním chromosomu W? Vyskytují se u motýlů přídatné (B-) chromosomy?
- Jak by se chovala barvicí sonda chromosomu W při aplikaci u zástupců jiných řádů hmyzu?
- Byla metoda vypouštění sterilních samců u příslušných druhů skutečně ověřena v terénní praxi?

#### Závěr

Doktorská disertační práce Mgr. Ivy Fukové je vyzrálým vědeckým dílem, které již bylo odpovídajícím způsobem publikováno ve vysoce kvalitních periodikách. Vědecké studie provedené v rámci doktorského projektu přinesly významné metodické inovace s širším významem a vyústily v originální vědecké poznatky, které mají dopad na další rozvoj cytogenetiky motýlů i na další řešení obecných otázek evoluce pohlavních chromosomů. Dosažené základní poznatky byly vhodným způsobem využity v praktické aplikaci. Disertační práci proto bezvýhradně doporučuji k úspěšné obhajobě.

