

OPONENTSKÝ POSUDEK

Diplomová práce: **Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (L.) metodou BAC-FISH**

Autor: Petr Nguyen

Tématem předložené diplomové práce je syntenie genů lokalizovaných na chromosomu Z u obaleče jablečného jako zástupce motýlů (*Lepidoptera*) ve srovnání s jinými zástupci stejného řádu. Ke studii bylo vybráno šest kandidátních genů z chromosomu Z. S pomocí PCR byly z genomové DNA nebo cDNA obaleče jablečného získány sekvence těchto genů, které byly po zaklonování použity pro produkci hybridizačních sond. Tyto sondy byly využity k prohledávání BAC knihovny obaleče jablečného a k selekci klonů nesoucích kandidátní geny. Na experimentech spojených s prohledáváním BAC knihovny, které probíhaly v rámci jiné diplomové práce se autor neúčastnil a tak nejsou součástí předložené práce. Prohledání BAC knihovny poskytlo celkem dvanáct klonů pro geny *laktat dehydrogenaza*, *ketin*, *triosa fosfat isomerasa*. Nicméně autor pomocí PCR identifikoval řadu z nich jako falešně pozitivní, a tak pro každý gen bylo získáno jen po jednom specifickém klonu. Takto identifikované klony byly použity pro konstrukci hybridizačních sond, které byly následně využity při BAC-FISH. K testování byl rovněž zahrnut gen *period*, jehož klon byl získán již v minulosti. Experiment ukázal lokalizaci všech testovaných genů na chromosomu Z a to v pořadí *Ket-Tpi-Per-Ldh*. Lokalizace genů *6-pdg* a *apt* na chromosomu Z byla potvrzena pomocí Southernovy hybridizace. Po srovnání těchto výsledků s publikovanými daty z bource morušového byla konstatována zachovaná syntenie mezi chromosomy Z mezi oběma druhy, a to společně také se zachovaným pořadím testovaných genů.

Co se týče literárního zpracování, slohově je diplomová práce psaná velmi dobrým, vyzrálým stylem.

V úvodu, který je členěn na několik podkapitol, se autor zabývá vznikem, diferenciací a evolucí pohlavních chromosomů s detailním přihlédnutím k řádu motýlů. Text je díky zajímavým informacím, které autor zmiňuje velmi čtivý, nicméně spatřuji zde jeden nedostatek. Na některých místech v textu chybí kvalitnější vysvětlení některých aspektů. Autor se ne zcela dostatečně přizpůsobil čtenářům, kteří nejsou natolik obeznámeni s danou problematikou a některé pasáže tak mohou působit matoucím či zcela neinformativním dojmem. Týká se to především kapitoly vysvětlující evoluci pohlavních chromosomů motýlů, kde autor uvádí příklady motýlů z různých taxonů, aniž by předem alespoň ve zkratce základní taxonomii motýlů přiblížil. Tento konkrétní problém se tím pádem dotýká i diskuze, kde se srovnává syntenie genů mezi různými motýlími druhy.

V úvodu autor cituje práce Jiggins et al. (2005) a Beldade et al. (2007), kteří porovnávali syntentii mezi bourcem morušovým jako zástupcem Bombycidae a dvěma druhy z čeledi Nymphalidae. Na základě zachovalé syntenie mezi testovanými druhy vyplývá, že bource lze využívat jako referenční druh pro studium syntenie u motýlů. Nicméně bylo by třeba také dodat, že Bombycidae a Nymphalidae jsou pouze vzdáleně příbuzné čeledi. To naznačuje, že syntenie se nevyskytuje jen mezi blízkými příbuznými taxony motýlů, a proto je využití bource jako referenčního druhu napříč řádem motýlů oprávněné.

Na tomto místě bych se ráda autora dotázala, zda byla někdy srovnávaná míra syntenie mezi bourcem a jinými modelovými druhy či některým ze zástupců chrostíků.

Vlastní cíle práce jsou formulovány do třech bodů:“(i) izolace genů obaleče jablečného ortologních k Z-vázaným genům bource morušového, (ii) příprava hybridizačních sond, které budou použity k prohledání BAC knihovny obaleče jablečného, (iii) ověření syntenie získaných genů obaleče jablečného metodou BAC-FISH”. Cíle práce mohly být definovány o něco lépe, protože z popisu není zcela jasná návaznost mezi těmito jednotlivými kroky a může to působit matoucím dojmem. Bod jedna, tak jak je definován, je poněkud zavádějící, protože pomocí PCR zde byly amplifikovány pouze úseky kandidátních genů, které byly zaklonovány a použity jako sondy a tedy izolace genů jako taková prováděná nebyla. Bod dva je rovněž zavádějící, protože prohledávání BAC knihovny nebylo součástí této práce, jak autor ostatně sám uvádí ve výsledcích.

Studium syntenie bylo konečným cílem práce. Nicméně v textu nenajdeme vysvětlení pojmu syntenie. Ač lze polemizovat do jaké míry je pojem „syntenie“ obecným pojmem a je či není ho třeba vysvětlovat, s přihlédnutím k tomu, že se jedná o diplomovou práci, by tento pojem měl být vysvětlen.

K sekci Materiál a metody mám pouze dvě připomínky. Autor uvádí, že kandidátní geny pro mapování syntenie chromosomu Z obaleče jablečného byly vybrány na základě práce Provozník (2008). Mohl by autor lépe přiblížit kritéria pro výběr těchto genů?

Za druhé, v popisu BAC FISH autor používá termín „stripovací roztok“. Pokud chápu správně, jedná se o laboratorní hantýrku a v tomto případě by bylo vhodné termín nahradit adekvátním českým výrazem - ku příkladu „vymývací roztok“.

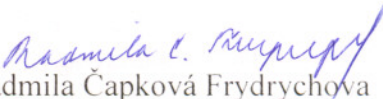
V sekci Výsledky snímky z BAC FISH jsou velmi zdařilé a autor jimi zcela jasně prezentuje lokalizaci testovaných genů na chromosomu Z. Nicméně k výsledku ze Southernovy hybridizace mám zásadní výtku. Při kvantifikaci signálu nebyla použita vnitřní kontrola, která by jednoznačně dokazovala, že rozdíly v intenzitě signálu nebyly způsobeny rozdílem v množství nanesené DNA, ale jak autor vyvozuje, lokalizací testovaných genů na chromosomech Z. Tímto na rozdíl od BAC FISH výsledky ze Southernovy hybridizace nelze chápat jako nezpochybnitelné. Pro případné opublikování výsledků bych autorovi doporučila experiment zopakovat, s tím, že z membrány odmyje sondu specifickou pro testované geny a membránu opětovně hybridizuje se sondou ke genu na autosomu. Případně, a to jako velmi elegantní a jednoduché řešení, bych autorovi doporučila Southernovu hybridizaci nahradit kvantitativní Real-time PCR.

Protože v textu práce není uvedeno, jestli získané sekvence byly srovnávány k ortologním sekvencím u *B. mori*, ráda bych se zeptala, pokud byly srovnávány, tak do jaké míry jsou sekvence mezi ortology zachovány.

V tabulce 3 mi nebylo zcela jasné proč u genu *6-pdg* jsou uvedeny primery označené jako *Tpi*. Ale pravděpodobně se jedná jen o chybu v textu.

V Diskuzi autor srovnává míru syntenie mezi obalečem jablečným a jinými zástupci motýlů, což dokládá hezkými obrázky 4 a 5, které velmi přidávají na přehlednosti. Pro lepší srovnání a interpretaci výsledků by diskuzi také prospěl kladogram s fylogenetickými vztahy zmiňovaných zástupců. Diskuzi pokládám za velmi zdařilou a přínosnou díky zajímavým informacím, které přináší.

Celkově mohu konstatovat, že diplomová práce Petra Nguyena, i přes mé výtky, vysoce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci tohoto typu. Práci hodnotím jako velmi kvalitní a přínosnou.


Radmila Čapková Frydrychová



UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra Buněčné biologie

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.
Viničná 7
128 44 Praha 2

tel: 420 2 21951773
fax: 420 2 21951758
e – mail: vkrylov@natur.cuni.cz

Věc: Oponentský posudek na diplomovou práci

Diplomová práce Petra Nguyena 'Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (L.) metodou BAC-FISH' je klasicky členěna a obsahuje celkem 7 kapitol. Po stručném úvodu následuje vyčerpávající literární přehled, který mapuje původ a evoluci gonozómů, cytogenetiku motýlů a jejich karyotypizaci včetně dostupných údajů týkajících se jejich pohlavních chromozómů. Na tomto místě bych rád podotknul, že text je psaný perfektní češtinou s naprostým minimem překlepů. Po odborné stránce je vysoce přínosný a hlavní předností je jeho kompaktnost. Na pouhých 10 stranách je uvedeno vše, co by čtenář měl o problematice vědět a mohl tím pádem pochopit podstatu provedených experimentů a důsledky interpretace získaných dat. Literární přehled neobsahuje zbytečné kapitoly, které jsou bohužel nešvarem mnohých diplomových prací s cílem 'nafouknout objem'.

Cíle práce jsou jasně formulovány. V kapitole materiál a metody mám dvě výhrady. Na straně 19 je uvedeno, že DNA fragmenty byly separovány rychlostí 5V/cm. Myslím, že vhodnější je použít termín: pod napětím 5V/cm. Dále autor při popisu klíčové techniky - BAC FISH odkazuje na literaturu. Vzhledem k tomu, že diplomová práce je na této metodice postavena, zasloužila by si podrobnějšího rozepsání.

Kapitola Výsledky jasně a srozumitelně shrnuje data z lokalizačních experimentů a Southern blotů. Obrázková dokumentace je zpracována na velmi vysoké úrovni. Na tomto místě bych se rád zeptal, zda získané výsledky vyústí v samostatnou publikaci či budou součástí většího celku. Pokud ano, bylo by vhodné tuto skutečnost zmínit. Diskuze je sepsána věcně a získaná data jsou zasazena do širokého kontextu jak příbuzných druhů, tak vyšších obratlovců. Autor zde jasně prokázal, že je schopen pracovat s odbornou literaturou a že výsledky experimentů dokáže kriticky interpretovat.

Na závěr bych chtěl podotknout, že jsem si práci přečetl s chutí a vřele jí doporučuji přijmout jako práci diplomovou. Pokud je oponentovi dovoleno provést známkové hodnocení, jednoznačně se kloním ke stupni výborně.

V Praze dne 22.5. 2009

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.



Otázka oponenta:

Jsou u motýlů (např. Bourec morušový) známy sex determinující geny? Pokud ano, leží na W chromozómu nebo na autozomech ?