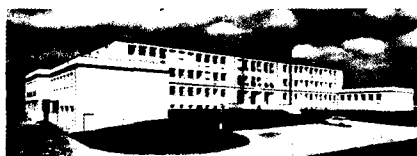


## Oponentský posudek na diplomovou práci



**Biofizikální ústav Akademie věd České republiky**  
RNDr. Roman Hobza, Ph.D.  
Laboratoř vývojové genetiky rostlin  
Královopolská 135, 612 65 Brno  
tel. 41517203, fax: 41240500, e-mail: hobza@ibp.cz

Název práce: Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*)

Autor: Bc. Miroslava Sýkorová

Diplomová práce Miroslavy Sýkorové na téma „Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*)“ je komplexním dílem, které zahrnuje jak pěknou tématickou rešerši v rámci úvodních kapitol, tak výsledkově pestrou a především zajímavou hlavní část. Formální a gramatické chyby jsem nenašel žádné zásadní a to možná i proto, že text je velmi čtivý a člověka pohltí děj natolik, že ztratí motivaci zabývat se formalitami. V rámci metodického přístupu autorka musela zvládnout mnoho technik molekulární biologie a to jak zejména klonování, různé variace Southernovy hybridizace, kvantitativní PCR, tak cytogenetické metody, jež jsou završeny FISH experimenty. Obdivuji zejména překrásné (učebnicové) hybridizace po štěpení samčí a samičí genomové DNA s genově specifickými sondami (obrázek 2). Na druhou stranu hybridizace BAC knihoven by byla možná lépe provedená použitím standardních procedur pomocí radioaktivních značících systémů. Tím snad ani nemyslím citlivost hybridizace, která je dostatečná, ale hybridizační pozadí, které je pravděpodobně dáno přítomností bakteriálních fosfatáz na použitých BAC membránách.

K vlastní práci mám několik otázek. Jakou dáváte důležitost jednotlivým metodám zmíněným v textu, které slouží k mapování genových oblastí, jmenovitě genetické mapování, Southernova hybridizace (alespoň v případě mapování na pohlavních chromozomech), FISH? Kdybyste měla možnost vybrat jen jednu z těchto metod pro prokázání vazby na pohlavní chromozomy, která by to byla? Máte představu o velikosti translokované oblasti původně autozomálního lokusu na pohlavní chromozomy? Jak by šlo eventuálně provést přesné zjištění místa, ve kterém došlo k fúzi? V závěru autorka píše, že výsledky diplomové práce pomohou vysvětlit podstatu rychlého vývoje resistance u obaleče jablečného. Jak by měl vypadat přímý důkaz, že zjištěná translokace (a tím změna evolučního kontextu pravděpodobně mnoha genů) je příčinou rychlého vývoje resistance u obaleče jablečného? V tomto ohledu jaké jsou autorčiny konkrétní vize v případě, že bude dále pokračovat v řešení daného tématu, popřípadě, co by doporučila jako vhodnou badatelskou cestu svým nástupcům? A snad poslední otázka. Na hotových výzkumných „produktech“ jako jsou diplomové práce či přímo vědecké publikace

nejsou často vidět útrapy jejich vzniku. Kdyby autorka předem znala průběh řešení, navrhla by experimenty jinak? Co bylo nejobtížnější částí realizace diplomové práce?

Celkově působí diplomová práce velmi vyzrálé a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě s celkovým hodnocením výborně.

V Brně dne 20. ledna 2011

RNDr. Roman Hobza, Ph.D.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized initials 'RH' followed by a long horizontal stroke.



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 Miroslavy Sýkorové 'Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) je členěna standardním způsobem a obsahuje celkem 7 hlavních kapitol. Úvodní pasáže se věnují obecným mechanismům vzniku a udržení rezistence hmyzu k insekticidům. Vzhledem k tématu diplomové práce se autorka nejvíce věnovala odolnosti k ochranným prostředkům na bázi inhibice acetylcholinesterázy, která vede k hromadění acetylcholinu v synapsích příslušných nervových vláken a tudíž k narušení cholinergních přenosů. Značná část úvodu je zaměřena na dva hmyzí paralogní geny kódující acetylcholinesterázu (*Ace-1* a *Ace-2*). Autorka podrobně popisuje jejich evoluci, včetně bodových mutací majících za následek desensitizaci k příslušným insekticidům a tedy vznik rezistence. Další kapitoly jsou věnovány dědičnosti acetylcholinesterázové rezistence a syntenii *Ace-1* a *Ace-2* paralogů v rámci motýlů (*Lepidoptera*). Úvodní kapitoly jsou psány jasně a srozumitelně bez nadbytečných informací, které nemají přímý vztah k řešené problematice. Na tomto místě bych vytkl poměrně velké množství překlepů, které se bohužel objevuje i v dalších kapitolách a kazí tak celkový dojem z jinak dobře sepsané diplomové práce.

Cíle práce jsou vytčeny jasně a srozumitelně. Kapitola Materiál a metody je sepsána standardně. Zde bych pouze vytkl nepřiměřenou stručnost při popisování postupu při odečítání výsledků z membrány (str 13), kdy autorka na tomto místě uvádí pouze odkaz na příslušnou publikaci.

Výsledky jsou sepsány jasně a výstižně. Dvěma nezávislými přístupy (Southernova hybridizace a kvantitativní PCR) se autorce podařilo potvrdit pracovní hypotézu, která předpokládala translokaci genu *Ace-1* u *C. pomonella* z autozómu na Z pohlavní chromozóm. Zároveň stejným přístupem potvrdila autozomální pozici jeho paralogu (*Ace-2*). Pro účely

fluorescenční *in situ* hybridizace, která již nebyla součástí předkládané diplomové práce, autorka úspěšně identifikovala BAC klon nesoucí *Ace-2* gen. Na druhou stranu se nepodařilo nalézt klon pro variantu *Ace-1*. Velmi kladně hodnotím kapitolu Diskuse, kde autorka podrobně a věcně rozebírá své dosažené výsledky. Na druhou stranu zde uvádí (str. 22), že geny *RpS23*, *RpL7A* a *RpS5* byly u obaleče jablečného během evoluce translokovány na pohlavní chromozóm Z. Jaký má autorka pro toto tvrzení důkaz? Z diplomové práce, respektive z výsledků P. Nguyena, vyplývá, že tuto translokaci podstoupily pouze geny pro *Ace-1* a *RpPO*.

Jak jsem již uvedl, diplomová práce je sepsána jasně a výstižně a přináší velmi zajímavé výsledky z pohledu chromozomální evoluce Motýlů. O to víc jsem byl zklamán značným množstvím chyb v citacích: str. 3 – Voss a kol, 1964 – v seznamu literatury je Voss a Matsumura, 1964, str. 3 – Rossenberry, 1975 – v seznamu literatury je Rosenberry, 1975, str. 4 – Baek a kol., 2005 – v seznamu literatury je Beak a kol, 2005, str. 5 – Brown, 1991 – chybí v seznamu literatury, str. 5 – Emelianov a kol., 2004 – chybí v seznamu literatury, str. 5. – Fuková, 2005 – v seznamu literatury je Fuková a kol., 2005, str. 6 – Heater, 1986 – v seznamu literatury je Heather, 1986, str. 7 - Radhakrishna a Devi, 1992 – v seznamu literatury je Radhakrishna a Delvi, 1992. Ještě horší obraz se mi naskytl při kontrole kapitoly 7 - Literatura, kdy 32 z celkem 101 citací má chybné abecední pořadí. Autorka si musí do budoucna uvědomit, že tento typ chyb vede k automatickému vyřazení grantové aplikace či k odmítnutí vědeckého článku redakcí prestižního impaktovaného časopisu.

Na závěr svého posudku bych rád zdůraznil, že předložená diplomová práce je velmi kvalitní a přínosná pro širší vědeckou komunitu. Na druhou stranu vzhledem k výše uvedeným výtkám navrhuji hodnocení stupněm velmi dobře.

V Praze dne 7.1. 2011

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.

