

Oponentský posudek diplomové práce Jindry Šíchové:

Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae)

Diplomová práce Bc. Jindry Šíchové se zabývá velmi žhavým tématem evoluce pohlavních chromosomů u motýlů. Na rozdíl od systémů určení pohlaví XY jsou systémy s heterogametickým samičím pohlavím poměrně málo probádány a práce tak přináší velmi důležité výsledky pro ověření hypotéz popisujících evoluci sekvencí vázaných na pohlavní chromosomy. Pro vlastní studium divergence pohlavních chromosomů Jindra nejprve zpracovala karyotypy vybraných zástupců studované čeledi Tortricidae a ověřila jejich fylogenetické vztahy, již dříve publikované na základě morfologických znaků. K určení divergence pohlavních chromosomů a autosomů u jednotlivých druhů využila dvou různých přístupů, a to molekulárně cytogenetických metod na straně jedné a porovnání nesynonymních a synonymních substitucí v sekvencích genů obaleče jablečného a bource morušového na straně druhé.

Po formální stránce je práce členěna klasicky na úvod, cíle práce, materiál a metodiku, výsledky, diskusi, souhrn a literaturu. Pečlivému a přehlednému zpracování práce nelze nic vytknout. V textu se vyskytuje naprosté minimum překlepů a chyb, jediné bych snad zmínila častější opakování chyb ve shodě přísudku s podmětem (např. str. 6, poslední odstavec kapitoly 1.4. Úvodu). Úvod je psán čtivě, jednotlivé kapitoly na sebe dobře navazují a poskytují slušný přehled problematiky. Cíle práce jsou formulovány stručně a jasně. Měla bych pouze jediný dotaz: V bodě (5) autorka plánuje izolaci genů pro stanovení fylogenetických vztahů mezi studovanými druhy. Ve výsledcích je však použit jen jediný. Navrhla snad autorka původně více sekvencí pro danou analýzu?

Metodika práce zahrnuje velmi široké spektrum technik. Veškeré metody jsou velmi precizně a detailně popsány a mohou dobře sloužit jako návod pro další studenty laboratoře. Původní výsledky jsou na velmi vysoké úrovni a předpokládám, že budou podkladem pro kvalitní publikaci ve vědeckém časopise. Dokumentace výsledků a jejich diskuze je velmi svědomitá. Veškeré obrázky a tabulky jsou logicky řazeny a dobře popsány. Přesto bych požádala autorku o upřesnění v několika bodech:

1. Kolik figur z kolika jedinců bylo hodnoceno pro stanovení haploidních počtů chromosomů?
2. Jak si autorka vysvětluje, že pohlavní chromosom W je u obaleče východního a mramorovaného heterochromatinizovaný podél celé jeho délky a přesto je v interfázních jádrech naprosto minimální

W-chromatin či dokonce dochází k rozpadu tělíska u dospělých samic? Bylo toto pozorování konzistentní? Kolik bylo studováno jedinců?

3. V případě, že autorka hodlá pokračovat v práci na pohlavních chromosomech, jaké by navrhla další experimenty? Jaké pokusy by pomohly rozlišit, zda má významnější vliv na rychlejší adaptivní evoluci pohlavního chromosomu Z selekce nebo genetický drif?

Předkládanou práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm výborně.

Penryn, 20. května 2011



Iva Fuková



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 Jindry Šíchové 'Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae)' je klasicky členěna a obsahuje 7 hlavních kapitol a rozsáhlou obrazovou přílohu. Úvodní kapitola jasně a výstižně mapuje obecné mechanismy evoluce pohlavních chromozómů včetně podrobnějšího pojednání týkajícího se evoluce pohlavních chromozómů motýlů ze studované čeledi Tortricidea. Na str. 2 studentka píše, cituji „ Značná divergence heteromorfních chromosomů v průběhu evoluce byla potvrzena mezidruhovými srovnávacími analýzami. Hughes a kol. (2010) srovnávali Y chromosomy šimpanze a člověka a potvrdili značné rozdíly v jejich složení. Tyto změny zahrnovaly expanzi palindromických sekvencí a velké ztráty genů kódujících proteiny“, konec citace. Má otázka zní: u koho z obou studovaných druhů došlo k expanzi palindromických sekvencí a u koho ke ztrátě genů kódujících proteiny. Na str. 4. se předkladatelka zmiňuje o hromadném exodu genů z X chromozómu na autozomy u savců. Bylo by možné přiblížit jaké druhy a jak evolučně vzdálené byly zahrnuty v citovaných studiích? Např. studie provedená v naší laboratoři mapující evoluci vzniku savčího chromozómu X, zahrnující obojživelníky (*Xenopus tropicalis*), ptáky (kuře), vačnatce (vačice) a člověka odhalila vysokou konzervovanost X chromozómu s tím, že 97,6% lidských X orthologů leží na dvou chromozómech X *tropicalis*. Tyto dva chromozómy dokonce představují X konzervovanou oblast (XCR – část žabího chromozómu 8) a X přidanou oblast (XAR – část žabího chromozómu 2). Celkem shrnuto, je skutečně velmi diskutabilní, zda vůbec k nějakému hromadnému exodu z X chromozómu na autozomy docházelo a zda citované studie pouze netrpí nedostatkem srovnávacího materiálu. Úvodní kapitola jako celek je psaná velmi dobrou češtinou s minimem překlepů. Jedinou chybu týkající se citací jsem našel na str. 5. V textu je uvedena citace (Qvarnström a Baley 2009). V seznamu citované literatury je místo příjmení Baley uvedeno Bailey. Na základě databázových údajů (PubMed) se jako správná jeví verze s příjmením Bailey.

Cíle práce jsou jasně a srozumitelně formulovány. V rámci třetí kapitoly, Materiál a metody, mám dvě otázky: 1) Jak se připravuje 4% formaldehyd z paraformaldehydu a 2) na str. 17 (Tabulka 3) je teplota nasedání primeru označena jako T_a . Jaký je rozdíl mezi T_a a T_m . Jakým programem byla tato teplota zjištěna? Na str. 18 autorka píše, cituji „V programu MEGA4 jsem nejdříve získané sekvence přiložila a zjistila jejich základní charakteristiky, tj. zda existuje variabilita v jejich nukleotidovém složení či poměr tranzicí a transverzí“, konec citace. Jak si mám vysvětlit termín přiložit sekvence. Míni tím předkladatelka anglické slovo alignment? Pokud ano, bylo by možná vhodnější použít český ekvivalent porovnat sekvence.

Kapitola Výsledky velmi přehledně shrnuje data z provedených experimentů. Na tomto místě bych rád vyzdvihl obrovský kus práce, který musela Jindra Šíchová odvést jak z pohledu karyotypizace čtyř nových druhů příbuzných s modelovým motýlem, obalečem jablečným, tak z pohledu následných Zoo-FISH a BAC-FISH analýz majících za cíl odhalit rychlost divergence pohlavních chromozómů a autozómů. Obrázková dokumentace, která je součástí závěrečné kapitoly 8 (Přílohy) je na velmi vysoké úrovni. Ke snímkům mám dvě poznámky. Na str. 43 a 44 jsou šipkami označené chromozómy W a Z. Já osobně jsem měl mnohdy problém rozeznat velikostní rozdíl u některých WZ párů. Jakým způsobem předkladatelka určovala, že se jedná o Z či W chromozóm? Studentka dále uvádí, že na základě obrázků P1 i,j je počet chromozómů u obalečička jednopásného roven třiceti. Podle mého názoru je tento počet vyšší. Na druhou stranu je tento počet akceptovatelný u obrázku P1 l.

Diskuze je sepsána jasně a přehledně. Asi nejzajímavější část této kapitoly se týká srovnání dvou metodických přístupů pro studium divergence genomů zástupců čeledi Tortricidae, zvláště pak snaha potvrdit či vyvrátit tzv. Fast-Z efekt. První skupinu technik lze souhrně nazvat technikami hybridizačními zahrnujícími Zoo-FISH a BAC-FISH metody. Druhý přístup byl založen na stanovení poměru nesynonymních a synonymních substitucí (dN/dS) u vybraných sekvencí *C. pomonella* a *B. mori*. Zatímco první přístup podle autorky potvrzuje rychlejší divergenci Z chromozómu na rozdíl od autozómů, stanovení poměru dN/dS tuto teorii vyvrací a spíše poukazuje na vyšší konzervovanost chromozómu Z. Tento výsledek se zdá být v souladu s evolucí savčího X chromozómu, kde lze pozorovat jeho vyšší konzervovanost oproti autozómům. Předkladatelka však dává větší váhu svým hybridizačním výsledkům a snaží se tak teorii Fast-Z potvrdit. Jako důkaz podává výpočet teploty tání DNA/DNA duplexu s ohledem na koncentraci sodných iontů a procentického zastoupení GC

párů. Autorka dále vyvozuje, že v rámci použití jí používaného promývacího protokolu by cílová sekvence měla mít identitu alespoň 88% aby nebyla odmyta. Na druhou stranu výsledky naší laboratoře týkající se fyzického mapování dvou paralogních genů *mdh2* u *X. laevis* pomocí metody FISH-TSA ukazují, že přes to, že oba paralogy jsou sekvencně shodné na 95% byli jsme schopni získat 85% specifitu signálu (tj. sonda pro *mdh2a* paralog hybridizovala s lokusem pro tento gen s pravděpodobností 85% a *vice versa*. Pokud přihlédnu k tomu, že odmyváání sondy probíhalo v 50% formamidu ve 2 x SSC a při teplotě 42°C vyjde mi výsledná teplota T_m 57,8 °C. To znamená, že při teplotě 42°C by se mi měla odmyt sonda, která je s cílovou sekvencí shodná na 84%. Jak je tedy možné, že jsme byli schopni získat takto vysokou specifitu signálu? Tento příklad uvádím z toho důvodu, že hybridizační techniky a zvláště Zoo-FISH a FISH nelze podle mého názoru natvrdo kvantifikovat a svým způsobem se jedná o 'černé skříňky'. Na druhou stranu si velice vážím analytického přístupu, který autorka v diskuzi uplatnila a tuto kapitolu hodnotím velmi vysoko.

Na závěr bych chtěl zdůraznit, že se jedná o skvěle provedenou a sepsanou diplomovou práci, o jejíž náročnosti ani v nejmenším nepochybují. Přímo brilantním kouskem je příprava malovací sondy z jediného mikrodisektovaného chromozómu, což jak autorka správně uvádí, otevírá možnosti srovnávacího mapování v rámci jednotlivých autozómů, které jsou u motýlů velmi obtížně rozlišitelné. Diplomovou práci jsem si s chutí přečetl a doporučuji ji přijmout jako práci diplomovou. Z pohledu hodnocení se jasně kloním ke stupni výborně.

V Praze dne 17.5. 2011

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.

