



RNDr. Iva Fuková, Ph.D.  
Laboratoř molekulární cytogenetiky  
Ústav molekulární biologie rostlin, BC AVČR, v.v.i.  
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
Telefon: (+420) 387 775 511  
Fax: (+420) 385 310 356  
E-mail: [ifukova@umbr.cas.cz](mailto:ifukova@umbr.cas.cz)

## Oponentský posudek diplomové práce Bc. Jany Veselé:

### Molekulární diferenciacce pohlavních chromosomů předivek rodu *Yponomeuta*

Diplomová práce Bc. Jany Veselé je zaměřená na studium struktury a původu pohlavních chromosomů předivek rodu *Yponomeuta*. Tato skupina motýlů je z cytogenetického hlediska zajímavá přítomností násobného systému pohlavních chromosomů ( $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ ). Předivky by tak mohly sloužit jako model pro studium evoluce a degenerace pohlavních chromosomů.

Práce je klasicky členěná na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a literaturu. Je psána stručně a čtivě. V textu se vyskytuje minimum chyb a překlepů. V úvodu autorka shrnuje dosavadní poznatky o evoluci pohlavních chromosomů a o cytogenetice studované skupiny motýlů. Kapitola materiál a metody dokládá široké spektrum cytogenetických a molekulárních technik, které se během studia autorka naučila. Výsledky jsou svědomitě zdokumentovány a přehledně prezentovány. Velmi kladně hodnotím zejména pečlivě zpracovaná cytogenetická data. Diskuze je dobře vedená a veškeré dosažené výsledky jsou zhodnoceny a porovnány s literárními údaji. Více podrobností bych očekávala pouze v případě diskuze výsledků komparativní genomové hybridizace (CGH) a genomové *in situ* hybridizace (GISH). Autorka uvádí, že pokud by u předivek došlo k translokaci autosomu na chromosom W (a nikoli k rozpadu chromosomu Z), existuje možnost, že translokovaná část takto vzniklého neo-pohlavního chromosomu W ještě není příliš degenerovaná a plně heterochromatinizovaná, a tudíž by bylo možné ji na chromosomálních preparátech odhalit. Následně v diskuzi se však k této hypotéze již nevrací a nekonfrontuje ji se získanými výsledky. Např. u předivky ovocné je část chromosomu W jak po GISH tak po CGH výrazně značená samičí sondou (obr. 3c, f na str. 33 a obr. 4c na str. 34). Mohl by tento signál poukazovat na evolučně starší část tohoto chromosomu? Jaký by autorka vyvodila závěr o složení trivalentu pohlavních chromosomů na základě cytogenetických dat?

Dále mám k práci ještě několik následujících připomínek a dotazů:

- 1) Názvy genů, použitých k testování hypotézy o fúzi pohlavního chromosomu W a autosomu, jsou v práci uvedené pouze zkratkami. Plné názvy by se měly objevit již při první zmínce těchto genů, tj. na str. 12 (kap. 3.7), autorka je však zmiňuje až v diskuzi na str. 23.
- 2) Příprava sond pro Southernovu hybridizaci z klonovaných sekvencí cDNA je svědomitá a naprosto precizní, nicméně zvolená metoda značení zřejmě není úplně optimální, o čemž svědčí slabá hybridizace se sondou pro gen ATP syntázy (tento údaj navíc není vůbec uveden ve výsledcích, kam podle mě patří, ale je pouze okomentován v diskuzi na str. 24). Dále považuji za nepříliš šťastné řešení přípravu sond z genomové DNA obsahující introny. Dokládá to neutěšený obrázek hybridizace

s takovouto sondou (obr. 5 na str. 35) a tím pádem nejednoznačný výsledek. Pokud by byla délka sondy jediným argumentem pro zahrnutí intronů, dovolím si na základě uvedených přibližných délek amplifikovaných fragmentů genů považovat tento argument za neopodstatněný. Úspěšné hybridizace lze dosáhnout i s řádově kratšími fragmenty sondy než těmi použitými v této práci. Navrhla bych značení sond pomocí nick-translace. Tato metoda by vyřešila i problém použití sond z cDNA, které překlenují případný intron přítomný v genomové DNA použité jako templát pro hybridizaci, neboť během reakce dochází k nalámání sondy na kratší fragmenty.

- 3) Jaké další metody by se daly použít pro testování původu systému pohlavních chromosomů  $WZ_1Z_2$ ?

Celkově hodnotím předloženou práci jako poměrně zdařilou a předpokládám, že získané výsledky budou podkladem pro další práci a případnou publikaci. Diplomovou práci proto doporučuji k obhajobě a navrhuji známku výborně.

České Budějovice, 27. 5. 2012

  
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**

Předložená diplomová práce Jany Veselé 'Molekulární diferenciacce pohlavních chromosomů předivek rodu *Yponomeuta* je standardně členěna do 7 základních kapitol včetně seznamu použité literatury. Obrazová příloha pak tvoří závěrečnou kapitolu č. 8. Na tomto místě bych rád podotkl, že podle mého názoru vhodnější, je umístění jednotlivých obrázků přímo v textu.

Kapitola Úvod, která v sobě zahrnuje i literární přehled, je velice stručná. Na pouhých pěti stranách nás autorka seznamuje s obecnými principy evoluce vzniku pohlavních chromozómů, včetně vzniku chromozómů W a Z u motýlů. Přes avizovanou stručnost je literární rešerše srozumitelná a výstižná. Výhradu mám k používání některých slovních spojení, jako např. na str. 1 'genetický draft' (nemá autorka na mysli genetický drift ?), dále pak na téže straně 'amplikonické oblasti' a na str. 2 'palindromicky uspořádané geny'. Na str. 4 autorka uvádí citaci Abe a kol., 2005, která chybí v seznamu citované literatury. Na str.5 diplomantka zmiňuje chromozóm B. Bohužel mi zde chybí jeho stručná charakteristika.

Cíle diplomové práce jsou jasně a srozumitelně popsány a nemám k nim žádné výhrady. Kapitola Materiál a metody je velmi podrobná. Z textu jasně vyplývá, že autorka byla nucena zvládnout různorodé a mnohdy i náročné techniky. Na tomto místě bych se rád ujistil, zda diplomantka v rámci izolace nukleových kyselin provedla inkubaci vzorku s Proteinázou K při 37° nebo při 56°C, což bývá obvyklejší. V názvu kapitoly 3.2. bych zaměnil slovo výroba za příprava.

Kapitola Výsledky přehledně shrnuje získaná data z cytogenetických a hybridizačních experimentů. Diplomantka jasně prokázala, že je schopná získané údaje utřídit a srozumitelně analyzovat. Velmi mne zaujal autorčin přístup potvrzující přítomnost pohlavních trivalentů v samičích buňkách pomocí kombinace GISH a telo-FISH. Jedná se o velice elegantní řešení

s možností jednoznačné kvantifikace párujících se partnerů. Kladně hodnotím taktéž kapitulu Diskuze, ke které nemám větších výhrad.

Na závěr svého posudku bych shrnul, že předložená diplomová práce svou vysokou kvalitou navazuje na předcházející studie vzešlé z laboratoře Prof. Marece, které jsem měl to potěšení oponovat. S radostí konstatuji, že podle mého názoru diplomová práce splňuje nároky kladené na tento druh výstupu a hodnotím známkou výborně.

V Praze dne 22.5. 2012

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.



#### **Otázky oponenta:**

1. Proč nebyla autorkou pomocí Southernovy hybridizace testována také rozdílná dávka genu pro  $\beta$ -karboxylesterázu u studovaných druhů. Vzhledem k tomu, že tento gen byl u předivek prokazatelně nalezen na chromozómu Z, sloužil byl tento experiment jako pozitivní kontrola.
2. Představte si, že k testované fúzi chromozómu W s autozómem došlo relativně nedávno. Nebylo by po té možné získat stejně intenzivní signál na Southern blotu od samice a samce i přes vazbu studovaných genů na pohlavních chromozómech. Jinak řečeno autozomální část W nesoucí např. gen APC by nestačila degradovat a tento gen by se u samic stejně jako u samců vyskytoval ve dvou kopiích a tudíž by obě pohlaví vykazovala stejnou intenzitu proužků na Southern blotu.
3. Plánuje autorka lokalizace genů APC, CPK a AS do chromozómů pomocí BAC-FISH, metodou skvěle zavedenou v laboratoři školitele? Kombinace BAC-FISH a Telo-FISH na pachytenních preparátech by podle mého názoru jasně prokázala přítomnost těchto genů na gonozómech či autozómech.