

**Oponentský posudek
na bakalářskou práci**

Anny Voleníkové

**Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*
(Lepidoptera)**

Studie Anny Voleníkové je poměrně obsáhlou bakalářskou prací, zaměřenou na problematiku B chromozomů u motýlů. Má 43 stran, zahrnuje také 18 obrázků a anglický abstrakt. Seznam literatury obsahuje 76 pramenů. Práce má dobrou formální úroveň, prakticky se v ní nevyskytují překlepy a frekvence stylistických nedostatků je nízká. Jistě by ale bylo možné zvolit výstižnější název práce, autorka se také zcela neoprostila od anglikanismů a laboratorního slangu. Anglikanismy chromozomální, autozomální, ribozomální a Robertsonovská translokace se zřejmě nepodaří vymýtit, používá je například i kolektiv renomovaných genetiků v českém překladu monografie Klinická genetika (2004).

Úvodní kapitola je poměrně obsáhlá, věnovaná vzniku a evoluci B chromozomů. Je dobře zpracovaná a dokládá autorčinu znalost problematiky. Část této kapitoly se zabývá výskytem B chromozomů u motýlů.

K úvodní kapitole mám následující připomínky:

- str. 1, odst. dole: translokace Robertsonova typu nemusí být doprovázena vznikem centrických fragmentů
- str. 2, 2. odst.: oblasti přiléhající centromeře se označují jako pericentromerické (či pericentrické) nikoliv paracentromerické
- str. 2, 3. odst.: při vzniku B chromozomů mezidruhovým křížením hraje významnou úlohu také kompetice rodičovských genomů

Vlastní práce je zaměřena na analýzu B chromozomů u zavíječe moučného metodami molekulární cytogenetiky s cílem formulovat hypotézu o jejich původu. Tyto chromozomy nebyly dosud u zavíječe popsány. Dalším tématem byla analýza vlivu B chromozomů na reprodukci zavíječů.

Metodická část je opět obsáhlá, je patrná velká časová náročnost práce. Pro každou generaci zavíječů bylo nutno zakládat jednopárové linie, jejichž rodiče byli nositeli B chromozomů. Výskyt B chromozomů u rodičů byl ověřován cytologicky v endopolyploidních

jádrech Malpighiho trubic, v každé generaci bylo analyzováno 30 náhodně vybraných párů. DNA B chromozomů byla analyzována různými variantami FISH a sekvenováním. Kromě standardních preparátů z gonád použitých pro detekci sekvencí byly připravovány také speciální preparáty endopolyploidních jader Malpighiho trubic, z nichž byly laserovou mikrodisekcí izolovány B chromozomy. DNA těchto chromozomů byla amplifikována a použita pro přípravu řady sond (telomerická, chromozomy B a W, r DNA, celogenomová samčí a samičí sonda pro GISH). Pro detekci byla použity jak přímo tak i nepřímo značené sondy. Telomerické sekvence byly detegovány také pomocí Southernovy hybridizace. Pro sekvenování byly připraveny klony *E. coli* nesoucí sekvence specifické pro B chromozomy. Přítomnost sekvencí v klonech byla ověřována dot-blotem a následně pomocí FISH.

K této kapitole mám jen několik připomínek:

- v kapitole 3.10 je uveden odkaz na podkapitoly 3.2.1 a 3.2.2, ty jsem však v textu nenašel. Podle mého názoru nelze analýzou endopolyploidních jader jednoznačně stanovit počet B chromozomů.

Výsledky GISH naznačují, že B chromozomy vznikly nejspíše z jiných chromozomů zavíječe. DNA B chromozomů nehybridizovala s DNA telomer či W chromozomu ani s klastry rRNA genů. Sekvence nebyla úspěšná, takže zatím není jasné ze kterých chromozomů jsou B chromozomy odvozeny. B chromozomy nesnižovaly významně fitness svých nositelů.

K výsledkům a doprovodným obrazovým přílohám mám následující připomínky:

- str. 26, 1. odst.: měla by být uvedena lokalizace heterochromatinového bloku
- str. 26, 2. odst.: při dot-blotu byly použity vždy dvě membrány. Byla na ně nanášena DNA všech klonů najednou nebo vždy určitého klonu? Z textu to není úplně zřejmé
- str. 26, 5. odst.: z textu není jasné co má autorka na mysli poznámkou ... celkem páry 1-5 B ...
- v obr. 1-2 by měla být označena také endopolyploidní jádra
- v popiscích k obr. 8, 9, 11, 12, 17, 18 není uvedeno pohlaví
- v popiscích k obr. 10 by měly být vysvětleny zkratky *DIG marker* a *B-body ampl.* uvedené v obrázku
- v popiscích k obr. 12 – 16 je uvedena v závorce poznámka biotin resp. Cy-3, znamená to že byla použita takto značená sonda?
- obr. 11: podle mého názoru se jedná o mitotickou metafázi, nelze tedy hovořit o mitotickém jádře

Práce je doplněna zajímavou diskusí a souhrnem. Autorce se sice nepodařilo prokázat s jistotou původ B chromozomů, za velmi významný objev lze však považovat absenci

telomerických sekvencí na B chromozomech. Bylo by jistě zajímavé sledovat, zda se tento jev vyskytuje u B chromozomů častěji popř. vystopovat jeho korelaci s dalšími charakteristikami B chromozomů popř. genomu. Zkoušela autorka detegovat telomerické sekvence i na B chromozomech embryonálních mitóz?

K této části mám dvě připomínky:

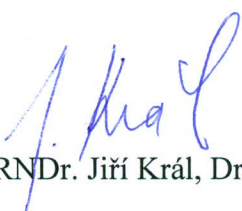
- str. 29, 3. odst.: z absence telomerických repetitiv DNA u B chromozomů nelze usuzovat na redukci nebo absenci jejich telomer jako struktur
- v diskusi na str. 31, 2. odst. autorka uvádí, že příčinou neúspěchu sekvenace byl pravděpodobně směšný vzorek, v souhrnu na str. 32 to prezentuje již jako fakt

ZÁVĚREČNÉ HODNOCENÍ

Rozsáhlá a dobře zpracovaná bakalářská práce A. Voleníkové dokumentuje její pracovitost a zaujetí pro vědeckou práci. Autorka se dobře orientuje v problematice a osvojila si řadu metod molekulární biologie a cytogenetiky. Úroveň zpracování se její studie v řadě charakteristik blíží diplomové práci. Získané výsledky jsou velmi zajímavé a předpokládám že budou brzy publikovány v impaktovaném periodiku. Připomínky a dotazy jsou většinou formálního rázu a nesnižují dobrou kvalitu práce.

Bakalářskou práci proto jednoznačně **doporučuji k obhajobě**

V Praze 21. ledna 2013


RNDr. Jiří Král, Dr.