

RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

Entomologický ústav

Biologické centrum AVČR

Branišovská 31

370 05 České Budějovice

Věc: Oponentský posudek na bakalářskou práci

Bakalářská práce Hany Švellerové se zabývá zvýšením účinnosti tzv. techniky sterilního hmyzu ("sterile insect technique - SIT") využívané k regulaci obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). V úvodu autorka stručně představuje obaleče jablečného coby významného škůdce jádrového ovoce a princip metody SIT, která spočívá v produkci a vypouštění sterilního hmyzu obou pohlaví do divoké populace škůdce. Mimo jiné autorka shrnuje také výsledky cytogenetického studia obaleče jablečného. Bylo by však dobré, kdyby je zasadila do širšího kontextu. Obecné informace o evoluci pohlavních chromosomů by jistě osvětlily, v čem se pohlavní chromosomy W a Z obaleče liší a co "... činí z obaleče jablečného skvělého kandidáta pro vytvoření pohlavně oddělitelných linií na základě pohlavních chromosomů". Z úvodu je jasná motivace práce a čtenáři poskytuje všechny potřebné informace. Neodpustím si však připomenout, že motýli (Lepidoptera) jsou hmyzím řádem a nikoli čeledí, jak je uvedeno hned v první větě kap. 1.1.

Efektivita SIT by mohla být významně zvýšena eliminací samic pomocí dominantní podmíněně letální alely genu *Notch* vnesené na chromosom W, což je také ultimátním cílem předložené práce. Autorka si vytyčila tři dílčí cíle: (i) určit restriktivní teplotu podmiňující letální účinek použitého transgenu pomocí GAL4-UAS systému u *Drosophily melanogaster*, (ii) optimalizovat transfekční experimenty a (iii) získat transgenní linie obaleče jablečného.

Kapitola Materiál a metody je poměrně obsáhlá a detailně představuje použité postupy. Bohužel při dalším čtení vyšlo najevo, že ne všechny metody jsou v této kapitole zahrnuty. V metodice chybí vyhodnocení intenzity transienční exprese s použitím programu Adobe Photoshop CS5 (viz kap. 4.1) a genetické mapování konstruktů u octomilek (viz kap. 4.2).

K této kapitole mám ještě několik připomínek a otázek. Na str. 10 v posledním odstavci patrně chybí odkaz na Obr. 5B. V Tabulkách 1 a 2 by měly být uvedeny citace prací, z nichž byly převzaty koncentrace DNA použité k injikaci (že autorka vycházela z prací Shamila & Mathavan (1997), Handler et al. (1998) a Fergusson et al. (2011), se dozvídáme až v diskusi (kap. 5.1)). Zaujal mě použitý protokol pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) (kap. 3.9). Sonda byla značena biotinem a signál byl amplifikován pomocí Cy3-streptavidinu a biotinihovaného antistreptavidinu. Jaká je celková délka použité sondy? A je opravdu nezbytné při hybridizaci na polytenní chromosomy *D. melanogaster* provádět amplifikaci signálu? Byl použitý protokol pro FISH vyvinut *de novo* nebo převzat?

Výsledky jsou vzhledem k nejednotnému označení použitých konstruktů a linií octomilek značně nepřehledné. V metodice je uvedena linie *yw; ACT-GAL4:PR/TM3,Tb*. Ve výsledcích se objevuje další linie *yw; Act-GAL4/TM6,Tb*, která v metodice chybí. Dále se v textu objevuje linie *yw; GAL4:PR/TM6, Tb*. Jak potom interpretovat následující text z kap. 4.3: "Po křížení *yw; Act-GAL4/TM6,Tb* s liniemi 12, 15 a 16 se po podání jakýchkoliv koncentrací mifepristonu, a to i těch nulových, objevují pouze jedinci *Tb*, tedy veškeré potomstvo nesoucí *RATom* v kombinaci s *GAL4:PR* je letální. To může být způsobeno tím, že *GAL4* má bazální expresi i bez podání hormonu, která u těchto linií stačí na aktivaci UAS, a tím dochází ke stálé letalitě jedinců s konstruktem *RATom*." Byla v

křížení skutečně použita linie bez progesteronového receptoru *yw; Act-GAL4/TM6,Tb*? Vysvětlovalo by to letalitu *GAL4/RATom-UAS* genotypu i při nulové koncentraci mifepristonu.

V kap. 4.1 také autorka uvádí, že injikační experimenty probíhaly s konstrukty Tom i RATom. Autorka však prezentuje pouze souhrnné výsledky pro oba konstrukty. Jaký konstrukt byl injikován do úspěšně transformovaného vajíčka? Podařilo se založit transgenní linii?

V případě Obr. 9 a 10 by pro demonstraci injikace vajíček a životaschopnosti larev stačily pouze dva obrázky. Jednotlivé panely v obrazových platech Obr. 9-11 by měly být řádně označeny písmeny. V textu je s odkazem na Obr. 12 uvedeno, že byla vajíčka injikována různými koncentracemi konstruktů, což mělo vliv na intenzitu transienční exprese. Není jasné, zda je to také případ vajíček na Obr. 12 C-F. V textu postrádám odkaz na Obr. 13.

Kap. 4.2 představuje získané transgenní linie octomilek a pozice transgenů zjištěné křížením a fyzickým mapováním metodou FISH. Uvedené pozice však nejsou ničím doložené. Výsledky genetického ani fyzického mapování nejsou ukázány.

Diskuse sestává ze dvou částí. V první se autorka zabývá nízkou úspěšností provedených injikací do vajíček obaleče jablečného a metodickými problémy, které musela řešit. Autorka se s pomocí dostupné literatury zabývající se transgenezí u motýlů snaží najít možné příčiny neúspěchu, mezi které vedle složení injikační směsi mohou patřit neošetření vajíček desinfekcí nebo místo a neošetření vpichu. Zajímalo by mě, zda je vysoká mortalita způsobena samotným procesem injikace či přítomností konstruktů. Byla při injikacích použita nějaká negativní kontrola, např. roztok bez konstruktů?

V další části diskuse se autorka věnuje pokusům se systémem GeneSwitch *GAL4-UAS* kontrolovaným hormonem mifepristonem. Použitý systém se choval poněkud nestandardně. U linií 12, 15 a 16 byl genotyp *Act-GAL4:PR/RATom-UAS* letální i v nepřítomnosti mifepristonu. V kontrolních kříženích linií *yw; ACT-GAL4:PR/TM3,Tb* s *yw; Sb/TM6* nebo *yw; 11-5* navíc způsobovala letalitu i samotná přítomnost *GAL4* s mifepristonem. V liniích 1, 3 a 14 vliv teploty na letalitu genotypu *Act-GAL4:PR/RATom-UAS* nebyl prokázán. Autorka selhání tohoto systému vysvětluje třemi způsoby: (i) vazbou *GAL4:PR* k sekvenci *UAS* i v nepřítomnosti mifepristonu (což zcela popírá princip použité metody), (ii) pozičním a (iii) pleiotrofním efektem. Byly experimenty opakovány? Mohou některé transgenní linie *UAS-RATom* nést i další transgen kontrolovaný *UAS* např. v důsledku chyby při křížení?

Z prezentovaných výsledků je patrné, že autorka práci věnovala spoustu času a úsilí a osvojila si základní molekulární metody i práci s modelovým druhem *D. melanogaster*. V mezích možností se jí podařilo splnit vytyčené cíle a předložená bakalářská práce, přes všechny mé připomínky, splňuje nároky kladené na tento typ kvalifikační práce a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 16. 1. 2014


RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.