

Posudek na diplomovou práci Anny Voleníkové s názvem: Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialoidea)

Diplomová práce Anny Voleníkové představuje ucelenou studii na dvou druzích bazálních motýlů zaměřenou na jejich karyotypovou analýzu a podrobné prozkoumání jejich pohlavních chromosomů. Práce se zaměřuje na zajímavé téma evoluce pohlavních chromosomů, používá moderní laboratorní postupy a přináší důležitá a zajímavá zjištění.

Jedním z nejsilnějších bodů celé práce je jednoznačně již výběr studované skupiny. Jak jsem se dozvěděla z přehledného úvodu, čeleď hrotnokřídlecovití zaujímá významné postavení ve fylogenezi motýlů s ohledem ke studiu evoluce pohlavních chromosomů. Zaměření práce na tuto skupinu je tedy nesmírně přínosné.

Další silná stránka práce je vysoká technická úroveň všech zvládnutých metod. I když schopnost dovést k dokonalosti pravděpodobně jakoukoli metodu molekulární cytogenetiky a genomiky je nesporně zvykem laboratoře, ve které Anna působí a lze ji tedy očekávat, chtěla bych vyzdvihnout, že Anna během řešení své diplomové práce zvládla celou škálu technik od preparace Malpigiho žláz a jiných orgánů z larev motýlů, přes klasickou a molekulární cytogenetiku, až po bioinformatiku a metody molekulární genetiky. Takový rozsah je u magisterského studenta obdivuhodný.

Annina práce přinesla zajímavé a důležité výsledky, které jistě zaujmou významné místo v představě historického původu pohlavních chromosomů u celé skupiny motýlů. Díky přispění této práce v kombinaci s výsledky jiných autorů se skupina Hepialoidea stává nejbazálnější skupinou motýlů s přítomným diferencovaným pohlavním chromosomem W. Anna navíc zjistila, že tato skupina sdílí jistou syntenii pohlavních chromosomů s pohlavními chromosomy pokročilejších skupin motýlů, což naznačuje, že pohlavní chromosomy mohly vzniknout u celé skupiny ze stejného základu.

Formální úroveň práce je dobrá. Práce obsahuje užitečné tabulky a velmi kvalitně zpracovanou obrazovou přílohu. Obsahuje také přijatelné množství překlepů a jazykových nepřesností. Styl psaní je na dobré úrovni a bylo příjemné práci číst. V úvodu a pak i v diskuzi bych nicméně uvítala schématické grafické znázornění fylogenetických vztahů zkoumaných druhů v souvislosti s dalšími druhy čeledi. V diskuzi by takový obrázek se zvýrazněnými výsledky práce a výsledky dalších autorů u jiných druhů čeledi napomohl orientaci a umožnil zasadit výsledky do širšího evolučního rámce. Práce obsahuje úctyhodných 147 původních citací, všechny zmíněné práce jsou relevantní a jsou citovány správně.

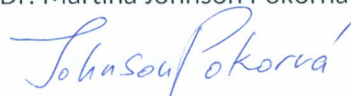
Závěrem bych chtěla poznamenat, že diplomová práce Anny Voleníkové představuje kvalitně zpracovanou detailní studii významné skupiny organismů a její výsledky přispějí k zamyšlení i nad obecnějšími otázkami evoluce pohlavních chromosomů. Práci tedy jednoznačně doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení výborně.

Detailnější komentáře a otázky:

- V úvodu práce autorka popisuje rozdíl mezi holokinetickými a monocentrickými chromosomy. Mimo jiné uvádí, že pokud dojde u monocentrických chromosomů ke zlomu nebo fúzi, vznikají acentrické či polycentrické útvary, které nemohou správně segregovat a během dělení buňky jsou ztraceny, což má ve většině případů letální následky. To je samozřejmě v řadě případů pravda, ale toto tvrzení neplatí obecně. I u monocentrických chromosomů dochází k přestavbám, které nejsou letální. Příkladem mohou být občasné přestavby v karyotypech lidí, které nemusí být spojeny s žádným onemocněním, nebo řada přestaveb, které se zafixovaly během evoluce řady druhů. Nejvýrazněji to můžeme pozorovat u savců, kde jsou karyotypy výrazně přestavěné i mezi blízkými příbuznými druhy. Řada karyotypových přestaveb má tedy i výrazný evoluční, v některých případech i speciální význam.
- Autorka se zmiňuje o tom, že přestože jsou chromosomy motýlů relativně konzervativní, byla u motýlů pozorována extrémní rychlost genomové evoluce. Tento rozpor je pak přisuzován specifickým vlastnostem motýlích chromosomů. Zajímalo by mě, jestli něco podobného bylo pozorováno i u jiných skupin hmyzu s holokinetickými chromosomy.
- Anna v práci použila fluorescenční *in situ* hybridizaci s telomerickou sondou ke stanovení přesného počtu chromosomů. Zajímalo by mě, jestli se u hmyzu nevyskytují intersticiální telomerické sekvence – tedy telomerické nebo telomerám podobné sekvence lokalizované nejen na konci chromosomů, jako klasické telomery, ale uvnitř chromosomu. U obratlovců se soudí, že jsou takové sekvence pozůstatkem chromosomových fúzí, ale ukazuje se, že mohou být do jiných míst na chromosomech přeneseny např. pomocí retrotranspozonů. Pokud by se takové sekvence vyskytovaly i u hmyzu, ztížilo by to použitelnost metody pro účely stanovení počtu chromosomů.
- Jedním z významných zjištění práce je specifická morfologie chromosomů studovaných druhů. Anna v práci uvádí, že chromosomy vypadají jako monocentrické a na základě obrazové dokumentace s ní v tomto názoru souhlasím. Zajímalo by mě, jestli byla podobná pozorování zjištěna i u jiných motýlů. Pokud ne, jedná se opravdu o unikátní zjištění. Protože byl karyotyp studován i u několika dalších druhů čeledi a všechny mají shodný počet chromosomů, zajímalo by mě, jestli i u těchto druhů vypadají chromosomy jako monocentrické. Doporučila bych také vyšetřit metafáze studovaných druhů pomocí FISH se sondou specifickou pro univerzální centromerické sekvence.

V Praze dne 15.1.2016

RNDr. Martina Johnson Pokorná, Ph.D.



Posudek oponenta diplomové práce

Název práce: **Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialoidea)**

Student: **Anna Voleníková**

Oponent práce: **Ing. Martin Knytl, Ph.D.**

Katedra buněčné biologie

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Diplomová práce Anny Voleníkové je zaměřená na analýzu pohlavních chromosomů vybraných druhů motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialidae). Literární rešerše, čerpá z velkého množství kvalitních cizojazyčných zdrojů. Autorka popisuje cytogenetické metody, které lze v této oblasti uplatnit, zmiňuje počty chromozómů motýlů včetně sesterské skupiny chrostíků, chromozómovou evoluci a na závěr rešerše se zabývá chromozomálním určením pohlaví typu Abraxas. Cíle práce jsou jasně definovány a splněny, jednotlivé oddíly na sebe logicky navazují. Metodicky je práce na vysoké úrovni, pozitivně hodnotím velké množství odvedené práce během molekulárních a cytogenetických analýz. Co považuji za největší nedostatek práce, je absence závěrů a jejich formulace. Určité výhrady mám k nevhodnému použití kurzívy a dále také zájmen uvnitř souvětí, která musí čtenář číst opakovaně, aby je pochopil. U prvně zmíněných druhů by měl být uveden autor, který daný druh poprvé popsal a rok zařazení do nomenklatury. Dále bych do názvu práce zařadil latinské jméno čeledi, která je zde na rozdíl od řádu a nadčeledi uvedena pouze česky. Vzhledem k náročnosti tématu a širokému spektru metodických postupů (od sekvenací až po vizualizaci karyotypu), hodnotím práci chvalitebně.

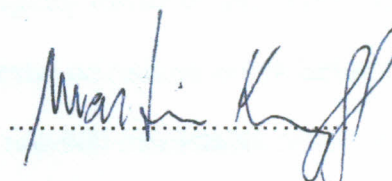
K práci mám následující dílčí připomínky:

Zaujal mě vysoký počet chromozómů ($n = 223-226$) u modráška *Polyommatus atlantica* na straně 2. V publikaci, která je uvedena za touto informací (Lukhtanov et al. 2015, nikoliv Lukhtanov 2015, jak uvádí autorka), jsem bohužel zmínku o počtu chromozómů tohoto druhu nenašel. Může to autorka objasnit, případně vyvrátit?

Autorka neuvádí velikost sondy ani velikost kompetitorové DNA, což považuji za nedostatek. Dělala se kontrola velikosti na gelu? Pokud ano, jak byly fragmenty velké? Jaký bývá optimální počet párů bází u celogenomových sond?

Proč nebyla použita kompetitorová DNA u metody CGH?

Datum: 15.1.2016.



Ing. Martin Knytl, Ph.D.

Podpis oponenta práce