



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. Ireny Hladové:

### Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika karyotypu motýlů

Ve své diplomové práci se Bc. Irena Hladová věnuje testování a využití cytogenetických markerů ke sledování evoluce karyotypů motýlů. Poměrně obsáhlá práce je klasicky členěná na úvod, cíle práce, metody, výsledky, diskuzi, souhrn a literaturu. Všechny části jsou důkladně a pečlivě zpracované, metody a výsledky jsou velmi detailně popsány. Úvod je pěkně napsaný a poskytuje dostatek informací pro vhléd do problematiky. Měla bych pouze jednu poznámku ke kapitole 1.3.1 na str. 4, kdy autorka tvrdí, že věrohodnost signálů při BAC-FISH je zapříčiněna dlouhým insertem. Je tomu skutečně tak? Co když bude část insertu obsahovat repetitivní sekvence?

Metody jsou rozepsané vyčerpávajícím způsobem včetně odkazů na původní literaturu. K této části bych měla jen jednu otázku: Postup při fluorescenční hybridizaci *in situ* (FISH) je sice podrobně popsán, ale chybí tam (pokud ovšem bylo provedeno) odmytí nenavázané nebo nespecificky navázané sondy po hybridizaci (kapitola 3.4., str. 16). Při jakých podmínkách ho autorka případně prováděla?

Jinak k použitým metodám nemám námitky. Odpovídají stanoveným cílům a navíc byly v návaznosti na průběžné výsledky vhodně doplněny. Konkrétně pak v případě, kdy možná příčina neúspěchu detekce krátkých genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA byla ověřena dvěma nezávislými metodami (testování počtu kopií těchto repetitiv v genomu pomocí Southernovy hybridizace a kvantitativní PCR).


Dosažené výsledky jsou prezentovány a diskutovány velmi detailně přitom však přehlednou formou – velmi nápomocná k utvoření celkového obrázku o lokalizaci a počtu studovaných markerů na chromosomech zástupců jednotlivých skupin motýlů jsou schemata na obr. 3-7 v Diskusi.

Vzhledem ke svému rozsahu obsahuje práce relativně málo překlepů a pravopisných a mluvnických chyb a nechci se zde jimi příliš zabývat. Pouze možná v některých případech může být překlep nebo chyba zavádějící. Například ve výsledcích, kap. 4.1.2. na str. 24 je uveden diploidní počet chromosomů u běláška *Pieris rapae*  $2n=25$ , správně se ale jedná o haploidní počet.

Celkově působí práce vynikajícím dojmem a hodnotím ji jako velmi zdařilou. Autorka se nejen velmi dobře orientuje ve studované problematice, ale také zdárně zvládla celou řadu molekulárních metod. Dokáže pečlivě zdokumentovat výsledky a přehledně je prezentovat

a diskutovat. Věřím, že její práce bude podkladem k více kvalitních publikací. Diplomovou práci doporučuji bez výhrad k obhajobě magisterského titulu a navrhuji známku výborně.

České Budějovice, 18. 1. 2016

  
Iva Fuková



DEPARTMENT OF ZOOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

---

### Oponentský posudek

Diplomová práce Bc. Ireny Hladové "Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika karyotypů motýlů" představuje komplexní cytogenetickou analýzu, jejíž hlavním cílem bylo testování nových cytogenetických markerů využitelných pro studium karyotypové evoluce motýlů. Přestože se jedná o intenzivně studovanou skupinu hmyzu tak chromosomové přestavby a mechanismy karyotypové evoluce u tohoto řádu ještě nejsou plně pochopeny. K tomu mimo jiné přispívají holokinetické chromosomy, které při aplikaci standardních cytogenetických metod poskytují pouze ty nezákladnější charakteristiky. Další komplikací představuje absence detailnějších cytogenetických analýz u některých evolučních linií motýlů. Autorka se proto pokusila zjistit pomocí FISH technik variabilitu v počtu a pozici celkem pěti genů, které se úspěšně využívají při rekonstrukci karyotypové evoluce u jiných organismů, a to na úctyhodném materiálu 29 druhů z 12 nadčeledí motýlů. V případě genů pro 18S rRNA a histonu H3 se jí tak podařilo získat zcela nová data a potvrdit vhodnost těchto markerů při rekonstrukci karyotypové evoluce motýlů. Negativní výsledky mapování krátkých sekvencí 5S rRNA a U1 a U2 snRNA metodou TSA-FISH jí přimělo hledat uspokojivé vysvětlení a obohatit diplomovou práci o další metodické přístupy studia organizace genomu. Odhalení nižšího počtu kopií sledovaných genů a jejich možné rozptýlení v genomu tak odhalilo, že tyto geny nepředstavují u motýlů vhodné cytogenetické markery vzhledem k obtížné detekci pomocí TSA-FISH.

Práce je členěna standardním způsobem a je patrné, že autorka plně využila možnosti dobře zavedené a publikačně aktivní Laboratoře molekulární cytogenetiky Entomologického ústavu. Úvod zahrnuje základní cytogenetickou charakteristiku motýlů i přehled možných fluorescenčních metod a různých markerů při studiu karyotypové evoluce. Použitá literatura v této části je svým rozsahem dostatečná a zahrnuje i nejnovější publikace. Použité metody zjevně z větší části vychází z dobře zavedených postupů a jejich popis a i vlastní výsledky svědčí o dobrém zvládnutí všech těchto metod. Nejpodstatnější část výsledků se věnuje popisu pozice a počtu klastrů genů pro 18S rRNA a histonu H3 u jednotlivých druhů podle jednotlivých nadčeledí s kvalitní doprovodnou obrazovou dokumentací. Ta je nicméně podle mě trochu nešikovně zařazena až na konec práce jako přílohy. Ve výsledcích jsou zařazeny i některé již publikované údaje, které by bylo možné zařadit spíše do diskuse. Chápu nicméně snahu o uvedení základních charakteristik analyzovaných druhů na jednom místě a odlišení vlastních a převzatých výsledků. Diskuse se pak snaží nová data vztáhnout k již publikovaným výsledkům, ke známým fylogenetickým vztahům uvnitř motýlů a snaží se

osvětlit karyotypovou evoluci na základě těchto údajů. Z celé diplomové práce je patrné, že si autorka osvojila práci s odborným textem. Na některých místech sice vyžaduje plnou soustředěnost čtenáře, jehož bdělost je udržována navíc zejména u počtu chromosomů častým střídáním haploidních a diploidních počtů chromosomů u jednotlivých druhů. Nebylo by jednodušší si vybrat jen jednu variantu? Nevedlo by to k chaosu typu např. „...drvopleněm obecným (*Cossus cossus*), u kterého byl stanoven haploidní chromosomální počet na  $2n♂=60$ “. Což se bohužel objevuje na více místech. Orientaci ve schématech v diskusi pak snižuje velké množství dodatečných symbolů a dlouhý vysvětlující text. V tabulkách se občas objevuje zkratka bez vysvětlivky. V úvodu bych také přivítal alespoň krátkou kapitulu seznamující s fylogenezí motýlů a přehledem všech nadčeledí. To by možná lépe osvětlilo výběr analyzovaných druhů. V Tab. 1 by u laboratorních kmenů možná stálo za to uvést přímo laboratoř, ze které materiál pochází. U všech druhů je vždy uvedena jen jedna lokalita – nesnažili jste se zjistit případnou vnitrodruhovou variabilitu zahrnutím materiálu i z jiných lokalit? Z kolika jedinců pochází data zejména u výrazně odlišných druhů? V metodice je popsána příprava sondy i pro 28S rDNA. Popis FISH s touto sondou ale v následující části není. Naopak ve výsledcích se objevuje „dvojitá FISH s 18S a 28S sondami“ jak přesně v tomto případě tedy bylo postupováno? U *Bombyx mori* je uvedena hypotéza o navýšení kopií genů pro 18S rRNA v důsledku selekce na vysokou produkci hedvábí. U *Hepialus humuli* byl zjištěn signál tohoto genu pokrývající přibližně polovinu bivalentu. Dá se u něj také předpokládat navýšení kopií genů ze stejného důvodu? Cytogenetická data jsou mapována na stromy zobrazující předpokládané fylogenetické vztahy studovaných druhů. Neexistují nějaké alternativní hypotézy, které by některé chromosomové přestavby lépe vysvětlili? Je topologie použitého fylogenetického stromu dostatečně podpořená? Je u bělásků rodu *Leptidea* možnost navýšení počtu klastrů histonu H3 vlivem polyploidie? Přijde mi, že v diskusi nejsou příliš častým vysvětlením změny polohy klastrů uváděné fúze či rozpady chromosomů. Jak častý je asi tento typ chromosomových přestaveb u motýlů?

Celkově představuje předkládaná diplomová práce velmi kvalitní práci a doporučuji ji proto k úspěšné obhajobě.

V Praze 18.1.2016



RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

Katedra zoologie PŘF UK

Praha 2, Viničná 7