



RNDr. Iva Vrbová, Ph.D.
Laboratoř molekulární cytogenetiky
Ústav molekulární biologie rostlin, BC AVČR, v.v.i.
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
Telefon: (+420) 387 775511
Fax: (+420) 385 310356
E-mail: ifukova@umbr.cas.cz

Oponentský posudek bakalářské práce Kristiny Pinkrové:

Role repetitivních sekvencí v molekulární diferenciaci pohlavních chromosomů bělásků rodu *Pieris*

Bakalářská práce Kristiny Pinkrové se věnuje charakterizaci pohlavního chromosomu W a popisu výskytu satelitních sekvencí v genomu tří příbuzných druhů bělásků. U studovaných druhů se často vyskytují heterochromatinové bloky, které nejsou v karyotypech motýlů běžné a které právě vedly k očekávání přítomnosti tandemových repetitivních sekvencí v genomu.

Práce sestává z následujících kapitol: Úvod, Cíl práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Závěr a Použité zdroje. Jednotlivé kapitoly jsou vyvážené a jejich rozsah odpovídá typu práce. K formální stránce bych měla výhradu k porušování pravidel sazby, kdy se např. předložky a jednopísmenné spojky dostávají na konec řádky, případně dochází k oddělení číselné hodnoty a jednotky koncem řádky. Pravopisné chyby a překlepy se v práci sice také vyskytují, ale je jich minimální množství, takže se práce poměrně dobře čte.

Úvod dobře pokrývá studovanou problematiku. Jeho jednotlivé části jsou věnovány evoluci pohlavních chromosomů, cytogenetice motýlů, satelitním sekvencím a krátce jsou zde též představeny studované druhy bělásků, b. zelný (*Pieris brassicae*), b. řepkový (*P. napi*) a b. řepový (*P. rapae*). Právě v této poslední části úvodu bych však uvítala uvedení fylogenetických vztahů mezi těmito druhy. Tato informace je až v diskuzi v kap. 5.3. Výskyt satelitních sekvencí napříč zkoumanými druhy na str. 31. V prvním odstavci kap. 1.4. Bělásci (*Pierinae*) na str. 6 autorka píše, že počty chromosomů bělásků jsou radikálně odlišné od modálního počtu chromosomů u motýlů, ale není jasné, zda v této skupině došlo ke zvýšení či ke snížení jejich počtu. Bylo by vhodné rovnou zde uvést rozpětí počtu chromosomů. Také mi není jasný význam druhého odstavce téže kapitoly, kde jsou popisovány unikátní proteiny bělásků sloužící k adaptaci na hostitelskou rostlinu a k obraně proti parazitoidům, což se podle mě nijak nevztahuje k tématu bakalářské práce.

Cíle práce jsou předneseny jednoznačně a stručně (možná až příliš stručně). Mohl by zde být už naznačen zvolený postup práce.

Kapitola Materiál a metody představuje řadu molekulárních a cytogenetických metod. Zajímalo by mě zde několik detailů či upřesnění:

1) V celé kapitole se opakovaně vyskytuje uvedení zrychlení při centrifugaci v jednotkách rpm. To je bez dalších údajů nepřesné. Je proto lépe používat jednotky násobků tíhového zrychlení g (konkrétně pak v kap. 3.3. na str. 10, v kap. 3.5. na str. 12 a v kap. 3.7. na str. 15).

2) Sondy pro hybridizaci na chromosomy metodami CGH a FISH (kap. 3.5. na str. 12, resp. kap. 3.9. na str. 16) byly sráženy etanolem za přítomnosti octanu sodného. V textu je uvedena hodnota pH tohoto roztoku 8. Je to v pořádku?

3) V tabulce 3 na str. 14 vypadl správný údaj jednotky koncentrace DNA polymerázy. Správně by v tabulce mělo být 0,04 U/ μ l.

4) Do tabulky 4 na téže stránce se dostal anglický výraz “melting temperature” místo teploty tání.

5) V kap. 3.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR) se mi zdá zbytečné rozepisovat postup přečištění DNA pomocí komerčního kitu.

6) Proč jsou nukleotidy použité pro značení sond v kap. 3.8. označené jako vysoce koncentrované?

7) V tabulce 5 téže kapitoly na str. 16 vypadlo v prvním sloupečku 1 mM Cy3-dUTP.

8) A v tabulce 6 také na str. 16 chybí v posledním sloupečku ve výčtu koncentrací nukleotidů značený nukleotid. Níže je pak chyba ve výsledné koncentraci polymerázy. Správně by měla být 0,025 U/ μ l. Hodnota v tabulce je absolutním množstvím enzymu v reakci.

Výsledky jsou pěkně popsány a zdokumentované. Nedobře působí pouze názvy jednotlivých podkapitol podle použitých metod. Informativnější je podle mě rozepsání čeho se autorka snažila dosáhnout a jak: např. u první kapitoly výsledků 4.1. DAPI na str. 18 by se mi jako vhodnější zdál název Identifikace pohlavního chromosomu W pomocí barvení DAPI. U této kapitoly navíc chybí v textu odkazy na obr. 2. Na obrázku je vzhledem k tomu, že představuje pachytenní jádra šipkami ukázán spíše bivalent WZ než chromosom W. Jinde v textu i jinde v obrázcích je to již správně.

V obr. 4 na str. 20 je v legendě odkazováno na schéma, které ale v obrázku chybí, naopak je tam výřez, který se mi ale zdá nadbytečný, protože neposkytuje žádné další detaily struktury bivalentu WZ.

Ke kapitole 4.3. na str. 21 by mě zajímalo, jak vypadaly výsledky amplifikace satelitu CL118? Vznikal nějaký produkt? Neplánujete narhnout další primery? Proč byly produkty před značením amplifikovány dvakrát?

Satelit CL21 vykazuje po amplifikaci jinou délku než očekávanou (viz obr. 6 na str. 23). Podle tohoto obr. byly přesto vyříznuté dva fragmenty pro přípravu sondy. Co ukázalo sekvenování těchto fragmentů?

V popisu obrázku 6 chybí použitý marker a naopak je v legendě uvedená negativní kontrola, která na gelu není.

Na obr. 7 na str. 24 chybí v legendě vysvětlení zkratk v popisu jednotlivých nanášek (totéž chybí i v textu).

U tabulky 8 není příliš vyvedená legenda. Bylo by vhodnější popis údajů v tabulce více rozepsat, aby byl text srozumitelnější. Např. místo „Souhrná tabulka satelitů“ napsat „Souhrná

tabulka výsledků lokalizace satelitů v genomu bělásků“. Vysázení textu je také nešťastné, trhají se poslední písmena slov na další řádek. Možná by pomohlo použití menšího písma.

CL26 byl mimo chromosom W, jak je uvedeno v tabulce, přítomen též v heterochromatinných blocích na autosomech. To plyne také ze zastoupení této sekvence v genomu samic a samců.

Diskuze je velmi dobře vedená, navíc obsahuje část s navržením dalšího postupu práce, která mi nejen zodpověděla řadu dotazů, ale též poukazuje na autorčin vzhled do řešeného problému, povědomí o případných nedostatcích práce a jejich nápravě a doufám, že též na vůli a motivaci pro pokračování ve studiu. Během své práce autorka čerpala z úctyhodného počtu publikací. V jejich výčtu vypadl pouze autor a název práce:

Benson G. 1999. Tandem repeat finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27(2):573-580.

Rovněž v textu je citace chybně uvedena (kap. Další postup na str. 32).

I přes uvedené připomínky je práce zdařilá a dobře zpracovaná a obsahuje kvalitní a zajímavé výsledky. Práci proto jednoznačně doporučuji k úspěšné obhajobě bakalářského titulu Kristiny Pinkrové.

České Budějovice, 12. 7. 2020

Iva Vrbová