



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) 387 775 511
Fax: (+420) 385 310 356
E-mail: ifukova@umbr.cas.cz

Posudek bakalářské práce Anety Pilíkové: Analýza vybraných W obohacených repetitivních sekvencí v předivce brslenové *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera)

Práce Anety Pilíkové se zaměřuje na studium obsahu pohlavního chromosomu W u modelu předivky brslenové (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner 1813). Předivky jsou jedním z významných motýlích modelů pro studium speciace a evoluce vztahu s hostitelskou rostlinou. Navíc nabízí i zajímavé využití z cytogenetického pohledu díky násobným počtům pohlavních chromosomů a přítomností neo-pohlavních chromosomů.

Členění práce je klasické na Úvod, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi, Závěr, Seznam použité literatury a Přílohy. Rozsah jednotlivých kapitol odpovídá typu práce, snad pouze s výjimkou kap. 3 Materiál a metody, která je svým obsahem poněkud přebujelá a značně přesahuje délku ostatních kapitol. Sice v ní nalezneme úctyhodný přehled metod, ale kapitola rovněž obsahuje řadu naučných pasáží, které jsou zbytné či vhodné spíše do úvodu, a části textu, které náleží do kapitoly Výsledky. Popisy metod také často zahrnují zbytečné podrobnosti. Například v kapitole 3.4 Elektroforetická separace na str. 15 je velmi do detailu popisován postup přípravy agarózového gelu. Text je pak hůře přehledný a orientace v něm je pomalá a obtížná.

Vzhledem k objemu spisu však text obsahuje poměrně malé množství chyb, překlepů a drobných nepřesností. Naopak se v něm relativně často vyskytují anglicismy a soustavně dochází také k porušování pravidel sazby, kdy se zejm. předložky a jednopísmenné spojky dostávají na konec řádky. Obě lze nalézt dokonce již v názvu práce: místo „W obohacené repetice“ by asi lépe (resp. česky) znělo repetice obohacené na chromosomu W. Obdobně by pak u často se opakujících slovních spojení jako „Maverick transpozony“, „PCR produkt(-y)“ a „W chromosom“ bylo vhodnější opačné pořadí slov.

Úvod je velmi pěkně napsaný, obsahuje všechny podstatné informace a dosavadní poznatky v oboru. Hezké je též představení modelového organismu v poslední části úvodu, od biologie druhu a jeho fylogenetického zařazení až po cytogenetiku předivek. Text celé kapitoly je dobře srozumitelný a velmi hladce a příjemně plyne. K této kapitole nemám žádné dotazy.

Cíle práce jsou obsáhlěji uvedeny, ale jsou formulovány stručně a jasně.

Následující kapitolou jsou Materiál a metody. Mimo již zmíněného bych zde měla několik drobných připomínek či dotazů:

1) V kap. 3.2.2 na str. 13 a kap. 3.7.4 na str. 22 se píše, že vzorek byl centrifugován na maximální otáčky. Tento údaj není bez doplnění typu centrifugy a rotoru (jeho poloměru) příliš vypovídající. Obdobně uvedení zrychlení při centrifugaci v jednotkách rpm v kap. 3.7.2 na str. 19 - je lépe hodnoty převést na násobky tíhového zrychlení (g).

2) V kap. 3.4 na str. 15 je napsáno: „Gelová elektroforéza probíhala při napětí 110 V...“ Je lépe používat jednotky V/cm (napětí vztaheno ke vzdálenosti mezi elektrodami). Podobně pak v kap. 3.9 na str. 26.

3) Jak se vztahuje teplota praní sklíček po hybridizaci *in situ* k T_m sondy vypočtené podle vzorce v kap. 3.7.2 na str. 20?

Výsledky jsou zdokumentované a prezentované pěkně a přehledně. Je patrné, že autorka vynaložila zejména na lokalizace kandidátních sekvencí vázaných na samičí pohlavní chromosom W značné množství práce. Bohužel přes zjevné úsilí nebyla tato část práce příliš úspěšná. K provedeným hybridizacím bych chtěla požádat o zodpovězení následujících dotazů:

4) Jak vypadal preparát mitotických figur ze samičích křídelních disků? Byl po barvení DAPI patrný chromosom W? Hybridizovala na chromosomy samičí celogenomová sonda? Zvýraznila některé chromosomy či jejich části? Výsledek hybridizace totiž není v textu nijak komentován (a to ani později v diskuzi).

5) Autorka se opakovaně vyjadřuje o sondách připravených nick-translací jako o „nevyhovujících“. Co to znamená? Jaká byla délka fragmentů DNA?

6) Nezdá se mi vhodné, že po neúspěchu nepřímé FISH se sondami značenými biotinem (příp. digoxigeninem), autorka změnila metodu značení, ale s ní i celý protokol hybridizace *in situ* - v podstatě ke složitějšímu postupu (TSA-FISH). Uvažovala autorka o použití přímo značené sondy? Podle mého názoru by tak odpadla většina problémů s vysokým pozadím na preparátech. Navíc lze i lépe ověřit kvalitu sondy: nejen délku fragmentů, ale též inkorporaci značeného nukleotidu. Fluorescence je jednak patrná na gelu pod UV zářením (záleží však na emitované vlnové délce, zda neinterferuje s emisí barvičky použité na zviditelnění DNA) anebo je možné měřit fluorescenci v dané vlnové délce přímo na spektrofotometru. Detekce repetitivních sekvencí s vysokým zastoupením v genomu, kterými se práce zabývá, by neměla vyžadovat amplifikaci signálu.

K dalším výsledkům bych měla již jen drobnější připomínky a dotazy:

7) V popisu k tabulce III (kap. 4.2 na str. 33) by mělo být uvedeno, co je v tabulce zvýrazněno tučně a proč.

8) Vykazovala inserce uvnitř satelitu o délce 152 bp zmíněná na str. 34 nějakou podobnost se známými sekvencemi? Zkoušela autorka použít dot plot k identifikaci podobností uvnitř satelitu? Jejich přítomnost by mohla vysvětlovat problémy s přípravou sondy na FISH, resp. s následnou hybridizací *in situ*.

V kapitole Diskuze je pozornost věnována jak metodám a možným příčinám nezdaru jejich použití, tak interpretaci vlastních výsledků. Pouze kap. 5.3 Geny ribozomální DNA je trochu nejasná a matoucí. V prvním odstavci autorka píše, že bioinformatická analýza sekvenčních dat, ze které ve své práci vycházela, ukázala vyšší obsah rDNA u samic oproti samcům nizozemské populace, ale že její výsledky kvantitativní PCR ukázaly značnou variabilitu počtu kopií rDNA genů u jedinců obou pohlaví. To ale nic neříká o případném rozdílu v obsahu kopií mezi populacemi či pohlavími. Ve výsledcích je to přitom popsáno zcela jasně a jednoznačně. Přestože autorčiny výsledky k vazbě na pohlavní chromosomy nepoukazují, z první věty druhého odstavce této kapitoly diskuze plyne, že NOR by se měly nacházet právě na pohlavních chromosomech. To je v rozporu s výsledky práce a zbytečně to působí zmatečným dojmem.

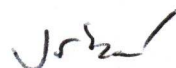
V případě transpozonu *Maverick* je komentována a diskutována pouze jeho lokalizace na chromosomu W. Přitom podle výsledků qPCR je poměrně bohatě zastoupen i jinde v genomu (viz přítomnost repetice v samčích vzorcích). Rozdíly v počtu kopií mezi samicemi a samci nejsou tak výrazné jako u satelitu, kde jsou několikanásobné.

Poslední otázka se týká satelitu, který je podle výsledků qPCR silně obohacený na chromosomu W: Plánuje autorka klonovat a charakterizovat delší fragmenty, případně okolí již získané sekvence?

Seznam použité literatury je nešťastně formátován. Velmi často dochází k roztažení textu na celou řádku a údaje jsou tak nepřehledné. U několika citací také vypadla čísla stránek, příp. i číslo časopisu.

Celkově je předkládaná práce zdařilá a pečlivě zpracovaná a přináší nové výsledky, které mohou být podkladem k publikaci v odborném periodiku a také navazujícího studia. Bezesporu si zasluhuje být přijata jako podklad k úspěšné obhajobě bakalářského titulu Anety Pilíkové.

České Budějovice 17. 1. 2020



Iva Vrbová