

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Martiny Flegrové

Diplomová práce Bc. Martiny Flegrové si klade za cíl především ověřit nepřítomnost pohlavního chromozómu W metodou komparativní genomové hybridizace u dohromady šesti druhů vakonošů (Lepidoptera, Psychidae), spolu s dodatečně zařazeným molem šatním jako srovnávacím druhem. Vzhledem k **fylogenetické pozici** vakonošů i molů může tato analýza značně přispět k pochopení evoluce W chromozómu u motýlů. Navíc si autorka vytyčila za cíl stanovit diploidní počty a analyzovat distribuci genů pro ribozomální **RNA** a histon **H3** pomocí FISH u stejného souboru druhů. Až na dva druhy se základním karyotypovým popisem totiž vakonoši představovali **dosud cytogeneticky neprobádanou** skupinu. Autorce se podařilo získat kompletnější cytogenetická data jen u poloviny, tj. třech z původně plánovaných druhů vakonošů, nicméně i s přispěním analýz na molu šatním dospěla nakonec k zajímavým a hodnotným závěrům.

Na základě výsledků autorka zavrhl hypotézu, že by se W chromozóm vyskytoval již u **bazálních skupin Ditraysia**, tedy u molů a vakonošů. Dále přinesla nové informace o karyotypech vakonošů (i mola šatního), včetně **prvních molekulárně-cytogenetických analýz**.

Samotná diplomová práce má rozsah **49 stran** včetně příloh, je co do obsahu standardně a logicky členěná a obsahuje minimum překlepů. Práce má vysokou slohovou i odbornou úroveň. **87 literárních zdrojů** citovaných v textu odpovídá až na jeden (**Tamura a kol., 2013**) seznamu literatury. Pouze bych chtěl vytknout **nesourodost z hlediska chronologie citovaných prací** v závorkách napříč textem a také, že v případě dvou knih (citace Bhat a Wani 2017, Sharma a kol. 2002) měla být citována jen konkrétní kapitola. Z formálního hlediska dále na první pohled překvapí **absence klasického členění textu na odstavce** (text je členěn do bloků oddělených celým řádkem). Jako drobný nedostatek bych ještě uvedl nezarovnání textu doprava v úseku od str. 12 do str. 28 včetně.

Z jazykového hlediska se autorka nevyvarovala některým běžně rozšířeným **anglikanizmům** (př. chromozomální) nebo nenahradila anglický výraz **českým ekvivalentem** (př. screening), eventuálně mohla volit **přesnější odbornou terminologii** (př. transponovatelné elementy místo mobilní elementy). V textu rovněž chybí přesné znění některých anglických **zkratk** (BAC FISH, BSA, TSA FISH), případně **objasnění termínů** (Zoo-FISH). Místy se vyskytují nejasná vyjádření či formulace, jako např.: „Rozhodla jsem se jej (pozn. mola šatního) zahrnout do této práce poté, co jsem zjistila stav u vakonošů.“ – není primárně zřejmé, čeho „stav“ byl zjištěn.

Literární přehled odpovídá tématu, je napsán srozumitelně a cituje většinou relevantní literární zdroje, včetně recentního výzkumu. Nicméně v některých úsecích jsem narazil na následující nedostatky, nepřesnosti či omyly, které buď komentuji nebo bych rád znal vysvětlení:

- (1) Hned v prvním odstavci úvodu autorka uvádí, že pohlavní chromozómy významně ovlivňují **plodnost** jedince. Přestože tuším, kam autorka tímto výrokiem míří, toto vyjádření je značně nekonkrétní a chtěl bych proto požádat o více detailní rozvedení.
- (2) V celém odstavci zabývajícím se evolucí pohlavních chromozómů mi chybí celá **řada významných a jindy notoricky citovaných prací** (namátkou: Rice 1996, Bioscience 46:331–343; Charlesworth a Charlesworth 2000, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355:1563–1572; Charlesworth et al. 2005, Heredity 95: 118–128; Steineman a Steineman 2005, Cytogenet Genome Res. 110: 134–143; Bachtrog 2006, Curr Opin Genet Dev. 16: 578–585; Bergero a Charlesworth 2009, Trends Ecol Evol. 24:94–102; Bachtrog 2013, Nat Rev Genet. 14:113–124). Ideálně by zde pasovala i práce Wrightové

• ABSENCE CITACÍ
• DOPLŇKOVÉ CITACE
• VĚTŠÍ KONTAKT
NA PODPORU
DANÉHO PRVU

a kol. (2016), která je naopak přiřazena k informaci o pohlavních chromozómech motýlů, o nichž ale téměř vůbec nepojednává. Naopak mě - zde i v diskuzi - překvapilo, že není citována knižní kapitola „Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera“ (Marec et al. 2010).

- (3) V téže kapitole autorka uvádí, že výsledkem diferenciací pohlavních chromozómů je vysoce degenerovaný, z velké části heterochromatinizovaný, pohlavně specifický chromozóm Y nebo W. Znála by autorka nějaké výjimky napříč živočišnou říší, kdy tomu tak ani u evolučně starších pohlavních chromozómů není?
- (4) Na str. 2 mohl být uveden ještě druhý zástupce stejnokřídlého hmyzu, u něhož došlo ke vzniku Y chromozómu z B chromozómu (Nokkala et al. 2000, *Genetica* 108:181–189).
- (5) Str.2, druhý odstavec: pro informaci, že systém XX/XY se vyskytuje u většiny hmyzu a téměř všech savců, chybí jakákoliv citace pro savce. Analogicky chybí citace pro systém ZZ/ZW u hadů a ptáků. V obou případech se mohla citovat recentní přehledová práce Scharrtl et al. 2016, *Chromosoma* 125: 553-571, kterou autorce vřele doporučuji k přečtení.
- (6) Z hlediska nomenklatury systémů pohlavních chromozómů mi není jasné: pakliže je používán zápis WZ/ZZ, proč není analogicky použito YX/XX? Podobně by mě zajímal důvod upřednostnění zápisu Z/ZZ před Z0/ZZ.
- (7) Na str. 3 se v úvodní větě dané podkapitoly píše, že systém ZZ/ZW se u hmyzu vyskytuje výhradně u motýlů a chrostíků. Přehledová práce Blackmon et al. 2017 (v textu citovaná jako Blackmon a kol. 2016) ovšem naznačuje samičí heterogametii i u sedmi druhů dvoukřídlých (Diptera).
- (8) Str.3, třetí odstavec: nepřesné vyjádření, že byl *Fem* gen lokalizován „na malé oblasti chromozómu W“; zároveň adekvátní citace by měla být Abe et al. 2008, *Genetica* 133:269–282.
- (9) Str.4, poslední odstavec: nepřesné vysvětlení možného původu chromozómu W – v případě varianty zahrnující fúzi gonozómu Z s autozómem mělo být vysvětleno, že fúzí vznikne neo-Z, zatímco zbývající homolog původního autozomového páru se stane W chromozómem. V případě vzniku W z B chromozómu není z textu jasné, jakou povahu by mělo následné párování W a původního Z chromozómu v meióze. Mohla by tuto informaci autorka doplnit?
- (10) Str.6, poslední odstavec: definice GISH je nepřesná – není zde ani v následné kapitole o CGH jasné, že samičí (či samčí) sondou se myslí celogenomová DNA. To je objasněno až na straně 21 v rámci metodiky CGH. Navíc by bylo dle mého názoru přehlednější, kdyby v podkapitole „Cytogenetické markery“ byla spíše uvedena stručně FISH s tandemově repetitivními sekvencemi/multigenovými rodinami, dále BAC FISH (spolu s alternativou TSA FISH, která zde chybí) a WCP, zatímco pasáže o GISH bych přemístil do následné kapitoly, ve které by potom bylo přehledně popsáno, jaký je rozdíl mezi GISH a CGH. Zároveň by tato GISH/CGH kapitola mohla zahrnout odstavec na str. 21, který vlastně znovu vysvětluje princip metody CGH.
- (11) Na str. 7, první odstavec: přehledová práce van Beers a Nederlof 2006 pojednává převážně o array-CGH. Pro klasickou CGH v nádorové cytogenetice by zde asi bylo příhodnější citovat původní práci Kallioniemi et al. 1992, *Science* 258:818–821.
- (12) Str.8, první odstavec: u problematiky histonů, jejich posttranslačních modifikací a nukleozómů mohlo být citováno i nějaké více recentní review (např. Luger 2006, *Chromosome Res.* 14:5–16; Castillo et al. 2017, *Adv Exp Med Biol.* 2017;966:65-92).

- (13) Na str.9 je jaksí opomenuto, že rDNA zahrnují dva odlišné klastry – 5S a 45S. Obecně není příliš rozebráno, že rDNA i histonové geny jsou organizovány v klastrech tandemově-uspořádaných kopií, což umožňuje jejich snadnější vizualizaci metodou FISH. Tak by bych očekával pár stručných vět ohledně dynamiky tandemových repetit a multigenových rodin – tj. vysvětlení konceptů „concerted evolution“ a „birth-and-death evolution“. Mohla by, prosím, tyto koncepty autorka dodatečně vysvětlit?

● Cíle práce jsou jasně definovány.

● Část **Materiál a metody** byla vesměs srozumitelně popsána, nebylo mi však jasných několik detailů, popř. jsem narazil na některé nepřesnosti:

- (1) Na str. 17 bych se rád zeptal, proč bylo nutné sondu pro histon H3 přechistit zrovna Sephadexem?
- (2) Na str. 17-18 z textu mi není úplně jasné, proč se sonda pro histon H3 značila pomocí PCR, zatímco sonda pro 18S rDNA pomocí nick translace.
- (3) Navíc by mě zajímalo, proč autorka použila pro nick translaci kit od Abbott Molecular a zároveň enzymy z firmy ThermoFisher Scientific? Nebo se jedná o bližší specifikaci enzymového mixu firmy Abbott? Osobně jsem v návodu výrobce tuto specifikaci nenašel.
- (4) Je zde nějaká výhoda v použití histonu H3 jako cytogenetického markeru oproti histonu H4?
- (5) Str.17, v podkapitole „3.7. FISH“ je zřejmě překlep nebo nešťastně formulována věta: “Chromosomální DNA je za přítomnosti formamidu denaturována při vyšší teplotě...” Přítomnost formamidu naopak umožňuje denaturovat chromozómy při nižší teplotě než-li kolem 95°C, což umožňuje zachovat strukturu chromatinu.
- (6) V následné sekci o **TSA FISH** není vysvětlen **princip** této metody. Chtěl bych tedy o dodatečné stručné vysvětlení autorku požádat.
- (7) Zároveň by mě zajímalo: bylo skutečně nutné v případě detekce genů pro histon H3 použít TSA FISH? Zkoušeli jste i standardní protokol FISH?
- (8) Str. 19, druhý odstavec: není zřejmé, co obsahuje inkubační komůrka a zda je to totéž co vlhká komůrka na str. 20.
- (9) Str.20, třetí odstavec: 25 ng není koncentrace nýbrž množství.
- (10) Napříč metodikou není nikde vysvětlena použitá zkratka **BSA** a tím pádem ani není jasný blokovací účinek takového roztoku při nepřímo značené FISH.
- (11) Zkoušela autorka i jiné varianty protokolu CGH než s půlhodinovou pre-hybridizací sondy, aby si ověřila své výsledky?

● V části **Výsledky** chvíli trvá se zorientovat, které analýzy se na kterých druzích vlastně podařilo zrealizovat. Ideální by proto byla nějaká shrnující tabulka, v níž by se zároveň čtenář ihned dozvěděl (dříve než v Diskuzi), proč nebyla provedena FISH se sondou pro histon H3 u mola šatního. Na str. 25 by pak bylo pro snadnější orientaci vhodné uvést do závorky v textu přímo písmeno obrázku, který ukazuje úsek na chromozómu u *Psyche crassiorella* silněji značený samičí sondou.

● **Dokumentace výsledků** je zdařilá a dostačující, obrazové přílohy jsou prezentovány v podstatě v publikační kvalitě. Snad jen na Obr.6 chybí členění na A, B, C a u některých pachytenních jader na Obr. 6 a 7 by bylo možné výrazněji ořezat přebytečné černé pozadí. A ještě detail: informace o měřítku se v legendě většinou umísťuje až na konec textu.

Diskuze je opravdu diskuzí a její rozsah je dostačující. Zejména pasáže ohledně možnosti vzniku W chromozómu u motýlů jsou pojaty přímo vyčerpávajícím způsobem. Jsou i uvedeny návrhy na další řešení problematiky. V rámci této sekce bych měl následující dotazy a připomínky:

- (1) Str.29.: V úvodní větě podkapitoly o distribuci klastrů pro histon H3 by se neměla **zaměňovat sekvence DNA a sekvence proteinu**, neb zatímco zde zmíněný údaj o 93% shodě pravděpodobně odpovídá nukleotidové sekvenci, sekvence aminokyselin v proteinovém produktu mohou vykazovat shodu vyšší, díky degeneraci genetického kódu.
 - (2) **S hodnocením konzervativity distribuce lokusů pro histon H3 bych byl více opatrný.** Sice se dá souhlasit, že zatím až na výjimky (Hladová 2015, Šíchová et al. 2015) se tento marker jeví u motýlů jako konzervativní, ale pro více komplexní pohled na možnou dynamiku tohoto markeru je potřeba se podívat i na jiné skupiny živočichů. Zejména u některých ryb, ale i u některých sarančat (př. Palacios-Gimenez et al. 2015, Chromosoma 124:353-365; Daniel et al. 2015, Cytogenet Genome Res. 146:311-318; Costa et al. 2016, J Hered. 107:173-180; Utsunomia et al. 2016, PLoS ONE 11: e0150573) byly pozorovány i značně zvýšené počty lokusů této multigenové rodiny.
 - (3) Str.31 – na prvním řádku i dříve v textu se opakuje chyba se špatným letopočtem v citaci Nguyen a kol. 2009 (správně 2010).
 - (4) Str. 31, druhý odstavec: **jakým typem chromozómové přestavby** by se ještě (kromě fúzí a kromě mechanismu transpozice) dala vysvětlit přítomnost tří klastrů rDNA na témže chromozómu u *Taleporia tubulosa*?
 - (5) **Metoda CGH**, přestože se jedná o spíše hrubý cytogenetický nástroj, se ukázala být v mnoha případech velmi přínosná. Nesmíme ovšem zapomínat na to, že má i své **limity**. Věděla by autorka o případech, kdy CGH nedetekovala pohlavně-specifický segment na pohlavních chromozómech, jejichž přítomnost byla ovšem potvrzena jinou metodou?
- **Závěr** by mohl být stručnější a více shrnující, do jisté míry mi přijde redundantní s pasážemi ve Výsledcích a Diskuzi.
 - **Celkové hodnocení:** Cíle práce byly podle mého názoru splněny. Třebaže se nepodařilo získat komplexnější cytogenetická data u třech ze šesti druhů vakonošů, získaná originální data významně doplňují a rozšiřují současný stav poznání problematiky evoluce W chromozómu u motýlů. Některé údaje z této práce již byly publikovány v recentní studii Dalíková et al. 2017. Autorka zároveň svými výsledky dokázala, že si osvojila základní metody cytogenetické analýzy a že je schopná získané výsledky kriticky srovnat s literaturou a vyvodit relevantní závěry.

V této fázi doporučuji práci k úspěšné obhajobě a v případě uspokojivé prezentace (včetně zodpovězení otázek) doporučuji práci hodnotit známkou výborně.

V Praze, 11.1.2018



Mgr. Alexandr Sember, Ph.D.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky
AVČR, v.v.i.
Rumburská 89, Liběchov



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

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Martiny Flegrové:

Analýza karyotypu vakonošů (Psychidae, Lepidoptera) metodami klasické a molekulární cytogenetiky

Diplomová práce Martiny Flegrové na cytogenetické téma se zabývá studiem karyotypu nočních motýlů vakonošů (Psychidae), což je skupina velmi zajímavá hned z několika hledisek: jednak z pohledu jejich biologie (např. stavbou vaku nebo přítomností výrazného pohlavního dimorfismu), tak např. z pohledu evoluce pohlavního rozmnožování (díky existenci parthenogenetických a polyploidních populací vedle populací rozmnožujících se sexuálně). Motivací této práce je však studium evoluce pohlavních chromosomů, kdy mohou vakonoši na základě své fylogenetické pozice na bázi Ditrysia poskytnout důležitá fakta o původu pohlavního chromosomu W u motýlů.

Práce je v odpovídajícím rozsahu, je klasicky členěna a jednotlivé podkapitoly na sebe logicky navazují. V úvodu autorka předkládá všechny relevantní údaje jak o biologii a evoluci pohlavních chromosomů, tak o metodách jejich studia a také o modelové skupině hmyzu. Úvod je pěkně napsaný, původní literatura řádně citována, text obsahuje minimum pravopisných či gramatických chyb a nemám k němu vážnějších výhrad.

V kapitole Materiál a metody oceňuji fylogenetické schéma na obr. 1, str. 13, bez kterého by byly následující výsledky práce obtížněji čitelné. Celkově jsou metody popsány dostatečně podrobně, hybridizační techniky pak dosti podrobně, takže veškeré pokusy by měly být snadno reprodukovatelné. V popisech se vyskytují pouze drobné nepřesnosti, jako např. použití jednotek rpm bez uvedení poloměru rotoru na str. 20, kap. 3.7.2. a označení streptavidinu za protilátku v téže kapitole, str. 21.

Výsledky jsou pak jasně a přehledně popsány a dobře zdokumentovány. Autorka je pěkně diskutuje a v příslušné kapitole zodpověděla některé mé dotazy, které vyvstaly během čtení práce. Chtěla bych se zeptat pouze na několik málo věcí, případně požádat o objasnění následujícího:

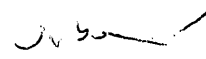
- 1) Co je známo o cytogenetice partenogenetických populací vakonošů? Vyskytují se někde smíšené populace nebo se nacházejí výhradně odděleně od populací rozmnožujících se sexuálně? Jak je tomu u nás (v ČR)?
- 2) Sondy pro značení nick-translací byly amplifikovány pomocí Ilustra GenomiPhi (viz kap. 3.6.3. na str. 17). Jedná se skutečně o rovnoměrnou amplifikaci přes celý genom, jak autorka uvádí ve zmíněné kapitole? Nemohla by nerovnoměrná amplifikace vysvětlit výsledek hybridizace u *Psyche crassiorella*, kdy došlo k silnějšímu označení terminální části jednoho

bivalentu samičí sondou (kap.4.4. na str. 25)? Byla hybridizace opakována se sondou z jiného jedince?

3) Je možné určit, zda pro přípravu preparátů bylo použito potomstvo jedné samice? Z kapitoly Materiál a metody to není patrné a bylo by to užitečné pro interpretaci výsledků výše uvedené hybridizace na chromosomech *Psyche crassiorella*.

Práce je celkově velmi zdařilá a přináší originální výsledky na zajímavé téma, které budou jistě podkladem nejen k impaktované publikaci, ale hlavně k dalšímu studiu. Diplomovou práci proto jednoznačně doporučuji k obhajobě a navrhuji známku výborně.

České Budějovice, 12. 1. 2018


Iva Vrbová