



OPONENTSKÝ POSUDEK

na diplomovou práci Bc. Renaty Kružíkové

(Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta)

Název práce: Analýza pohlavních chromozomů u vybraných druhů rodu *Orthosia* (Lepidoptera)

Předložená práce se zabývá převážně cytogenetickou analýzou pohlavních chromozomů u šesti druhů motýlů rodu *Orthosia*. Práce se zejména zaměřuje na ověření druhotné ztráty chromozomu W u druhů, kde samice mají v karyotypu o jeden chromozóm méně než samci. Na podkladu dat metod GISH a CGH a při srovnání velikostí genomů samců a samic práce přináší důležitý poznatek, že studovaní motýli chromozóm W mají, ale je součástí mnohočetného systému neo-pohlavních chromozomů typu WZ_1Z_2 . Do budoucna testovatelnou hypotézou zdůvodňující absenci typického sex chromatinu v polyploidních buňkách těchto druhů je změna epigenetického stavu chromozomu W vlivem adované autozomové části.

Diplomová práce má i s přílohami 54 stran a co do obsahu je standardně a logicky členěna a vyskytuje se v ní minimum překlepů. Z jazykového hlediska se autorka nevyvarovala některým běžně rozšířeným anglicizmům (př. chromosomální místo chromosomové nebo „PCR produkt“ místo „produkt PCR“). Místy je text psaný více hovorově, než by si odborný text zaslouhoval (př. staré pohlavní chromozomy), popř. se vyskytují nepřesné formulace (př. největší žijící skupina organismů – největší v jakém smyslu?) nebo anekdotální použití slova „poněkud“ (např. evoluční vývoj chromozomu W je poněkud rychlý). Práce celkově cituje 68 literárních zdrojů. Citace v textu se bezchybně překrývají s citacemi v seznamu literatury. K citování jen pár drobností: i) citace v textu občas v závorkách „lítají“ bez chronologie; ii) při citování prací typu např. Hejníčková et al. XXX se jedná o kolektiv autorů, tedy „Hejníčková et al. XXX zjistili“ nikoliv „zjistila“; iii) na str. 7 má být „Nguyen a Carabajal Paladino 2016“.

Po technické stránce je práce velmi zdařilá, metody jsou detailně popsány i provedeny, výsledky i obrazové přílohy jsou přesvědčivé a v podstatě v publikační kvalitě. Pakliže práce někde ztrácí, tak je to literární přehled o evoluci pohlavních chromozomů na prvních deseti stránkách. Zde se autorka dopustila řady interpretačních omylů a nepřesností a je tímto zřejmé, že se zdráhala vydat se prozkoumat důkladněji tajuplný svět pohlavních chromozomů za hranice motýlí říše. Bohužel, bez absolvování této "výpravy" není možné správně uchopit toto velmi komplexní téma, ani pakliže ho chcete jen stručně představit. Například je třeba rozlišovat mechanismus vzniku determinanty pohlaví (alelickou diverzifikací nebo skrze duplikaci spojenou s neofunkcionalizací), primární mechanismus suprese rekombinace na nepárovém pohlavním chromozomu (pohlavně-antagonistická selekce, heterochiasmie, neutrální model popsán Jeffriesem a kol. 2021 a dva modely spojené s tzv. "lucky inversion"), z jakého materiálu vznikají pohlavní chromozomy (autozomy, původní pohlavní chromozomy, B chromozóm) a za jaké ancestrální situace k tomu dojde (např. hermafroditismus nebo negenetické určení pohlaví). S těmito informacemi v ruce můžete sami posoudit, jak následující tvrzení ze str. 1 míchá různé roviny popisu evoluce pohlavních chromozomů dohromady, aniž by z toho vyplýval jasný a obecně platný koncept: "Teorií o vzniku pohlavních chromozomů lze nalézt v literatuře několik, nicméně tradičně přijímaná teorie o vzniku pohlavních chromozomů popisuje jejich vznik z páru autozomů přes pohlavně antagonistickou selekci (B. Charlesworth, 1991). Alternativně přijímaná teorie popisuje vznik pohlavních chromozomů adopcí chromozomu B (Clark & Kocher, 2019; Lewis et al., 2021)." K některým dalším nešvárům se vyjadřuji v následující sekci. Naštěstí kapitola Diskuze je opravdu relevantní diskuzí získaných dat a nedostatky literárního přehledu se do ní příliš neotiskly. Metodám GISH a CGH by ale slušel širší rámec (tj. zasadit aplikovatelnost metod a/nebo diskuzi výsledků do analýzy pohlavních chromozomů obecně, ne pouze u motýlů).

K obsahu práce mám následující připomínky (k podtrženým místům bych rád vyjádření autorky):
Literární přehled:

Str. 1: U pohlavních chromozómů plazů, oboživelníků a ryb bych rozhodně neuváděl, že je pro ně charakteristický systém WZ/ZZ. Jsou to velmi variabilní skupiny a např. u ryb je poměr samčích vs. samičích heterogametických systémů 2:1.

Str. 1 a 2: Je pouze okrajově naznačeno, co je to pohlavně-antagonistická selekce. Navíc, pohlavně-antagonistické obvykle nejsou „geny specifické pro určité pohlaví“ – ty geny jsou obvykle u obou pohlaví, ale mají různé alely. V následujícím odstavci na str. 2 je zavádějící interpretace, že se lokus determinující pohlaví přesune na budoucí pohlavní chromozóm. Ten lokus obvykle vznikne *de novo* alelickou diverzifikací nebo duplikací spojenou s neofunkcionalizací a nemusí to navíc být nutně u hermafroditů. Hotová determinanta pohlaví sice může i přeskakovat mezi chromozómy, ale to už je trochu jiné téma.

Str. 2: „pohlavně deterministický lokus“ mi přijde jako nešťastné použití jazyka českého

Str. 2: Nepřesné a zavádějící formulace: turnover nemusí nutně znamenat vznik nového systému pohlavních chromozómů (např. může dojít k tranzici z ancestrálního XY na nový XY v rámci jiné nebo dokonce i stejné vazebné skupiny). K turnoveru nemusí nutně dojít (a často ani nedochází) až po úplné degradaci/eliminaci chromozómu Y nebo W.

Str. 2: Na konci stránky autorka zmiňuje úlohu genové konverze, ale nevysvětluje, jak to konkrétně myslí.

Str. 3: místo „několikanásobné“ se používá „mnohočetné“ pohlavní chromozómy. Tyto systémy ale nevznikají jen štěpením ancestrálních pohlavních chromozómů. Existuje překryv mezi pojmy neo-pohlavní chromozómy a mnohočetnými pohlavní chromozómy (např. systém X_1X_2Y vzniklý fúzí $Y+aut$).

Str. 4: Tvorba multivalentů automaticky nezaručuje správný rozchod mnohočetných pohlavních chromozómů.

Str. 4: Není vysvětlen pojem „syntenie“ (kap. 1.3.1). V následné větě „To bylo zjištěno porovnáváním chromozómů Z různých druhů.“ není jasné, co a jak se konkrétně porovnávalo.

Str. 4: Lokus *Fem* na W u *Bombyx mori* je zmíněn zde a pak ještě na str. 7. Místo duplicitního sdělení by bylo vhodné tuto situaci objasnit jen jednou a pořádně (tj. co *Fem* vlastně kóduje a jak to funguje).

Str. 6: Neo-pohlavní chromozómy nemusí nutně vznikat pouze přestavbou.

Str. 7: Netvrdil bych, že práce Yoshida a Marec 2023 poprvé představuje důkaz o „Z-counting“ mechanismu u motýlů. Doporučuji nastudovat dřívější práci těchto autorů (Yoshida et al. 2016, Heredity, doi:10.1038/hdy.2015.110)

Dílčí cíle práce jsou zmateně formulovány. Měly by spíše vyjadřovat výzkumné otázky a jejich propojenost než seznam metodických kroků. Týká se to především dílčích cílů 3 (sestavení fylogenetického kladogramu) a 4 (určení velikosti genomů). Účel cíle 4 je vysvětlen až na str. 32.

Materiál a metody: Této kapitole neprospívá používání trpného rodu na úkor aktivní „ich“ formy. Na druhou stranu oceňuji, že je precizně definováno, co dělala autorka DP a jaká data dodali, popř. s jakými metodami pomohli její kolegové. Práce neobsahuje seznam zkratk, tudíž v textu chybí vysvětlení zkratky TAE pufru. U jednotek času se běžně používají zkratky h, min, s. Dále: nezdá se mi centrifugace na 14 000 x g (při takovém tíhovém zrychlení by se asi rotor vydal na výlet; asi bylo myšleno 14 000 rpm) a není mi jasné, proč byl u GISH vynechán pre-hybridizační krok s kompetitorem. Účel telomerické FISH je objasněn až ve Výsledcích (str. 32), účel rDNA FISH s ohledem na cíle práce je nejasně definován.

Výsledky: Pro lepší přehlednost bych shrnující přehled výsledků (Obrázek 11) umístil již na začátek Diskuze a v legendě bych uvedl, že přítomnost/absence chromozómu W byla detekována na základě GISH/CGH. Bylo by také vhodnější unifikovat pseudobarvy, kterou barvou je při GISH a CGH značen samičí genom.

Diskuze: Str. 37: Bylo by vhodné podpořit tvrzení o ancestrálním stavu $n = 31$ u motýlů také nějakou více recentní přehledovou prací. Přecejen, od publikace Robinson 1971 nějaký ten pátek uběhl a nové informace o karyotypech motýlů mohly představy o ancestrálním počtu chromozómů modifikovat.

Str. 37: Bylo by vhodné uvést, že se ta vnitrodruhová variabilita týká konkrétně druhu *Leptidea sinapis* (mimočodem, recentní posun tohoto tématu v Nazari et al. 2023 doi: 10.3897/compcytogen.17.102830).

Otázky:

- 1) Mohla by autorka představit alespoň jednu teorii objasňující supresi rekombinace na nepárovém pohlavním chromozómu, která je alternativou pro pohlavně-antagonistickou selekci?
- 2) Existuje „Z-counting“ mechanismus i u nějaké jiné skupiny živočichů? Pokud ano, jak to tam funguje?
- 3) Na str. 38 je diskutováno, že chromozómové přestavby „mohou hrát důležitou roli v evolučních procesech jako je speciace či adaptace a jsou usnadněny holocentrickou stavbou motýlích chromozomů“. Tato idea není rozpracována. Chtěl bych tedy požádat o vysvětlení, jak konkrétně přestavby přispívají ke zmíněným procesům a proč konkrétně holocentrické chromozomy toto podporují.

Závěrem bych chtěl konstatovat, že i přes četné moje připomínky se jedná o zdařilou práci. Byly získány originální výsledky, které významně doplňují a rozšiřují současný stav poznání problematiky evoluce W chromozómu a sex chromatinu u motýlů. Autorka zároveň svými výsledky dokázala, že si osvojila potřebné cytogenetické, molekulární a fylogenetické metody, a že je schopná ze získaných dat vyvodit relevantní závěry.

V případě uspokojivé prezentace (včetně zodpovězení otázek) doporučuji práci k úspěšné obhajobě.

V Liběchově, 15.5.2023

Mgr. Alexandr Sember, Ph.D.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR, v.v.i.
Rumburská 89, 277 21 Liběchov