



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 magisterské práce Bc. Dagmar Voříškové:

**Mapování fragmentu chromosomu Z v ASF-liniích zavíječe moučného,
*Ephestia kuehniella***

Práce Dagmar Voříškové je zaměřena na odhalení principu samčí letality u linií ASF (abnormálně segregující samice) zavíječe moučného, které byly vyvíjeny s cílem jejich využití pro genetickou kontrolu populací tohoto skladištního škůdce. Kromě této aplikace však tyto linie nabízejí též materiál vhodný pro studium dynamiky vývoje pohlavních chromosomů.

Formální členění práce a její rozsah je obvyklý a neshledávám zde nic v nepořádku. Kapitola úvodu pokrývá celou studovanou problematiku poměrně dostatečně. Za příliš stručnou považuji pouze kapitolu 1.3. věnovanou modelovému druhu, kde chybí představení alespoň základní cytogenetiky tohoto modelu. Navíc je text úvodu bohužel často hůře čitelný. Některé části je třeba číst opakovaně nebo zpětně, protože jsou špatně srozumitelné (např. první odstavec kapitoly 1.3.1. na str. 4). Text také obsahuje nepřesná vyjádření, která mohou být matoucí. Ve druhém odstavci kapitoly 1.3. chybí vysvětlení zkratky ASF-linie. To by mělo být uvedeno na místě prvního výskytu daného termínu, přestože je příprava a genetice těchto linií věnována již celá následující kapitola.

Cíle práce jsou definované stručně a jasně, včetně navržení metod, které hodlá autorka použít k jejich dosažení.

V kapitole 3. Materiál a metody autorka popisuje veškeré metody, které v práci používala. Postupy jsou popsány dostatečně podrobně, ale bohužel nepřiliš pečlivě. Složení reakčních směsí popsané stylem, kolik jakého zásobního roztoku je třeba pipetovat, je možná účelné a užitečné pro laboratorní návody, ale naprosto nevhodné pro diplomovou práci či publikaci. Měly by zde být uvedeny konečné koncentrace jednotlivých složek v roztoku či reakci. Také se zde autorka opakovaně dopouští typografických chyb v psaní jednotek. Mezi číselnou hodnotou a značkou jednotky se obvykle vynechává mezera. Píšeme tedy např. 20 mM KCl a nikoli 20mM KCl.

Zásadnějším nedostatkem je ovšem výskyt nepřesných, velmi často příliš familiárních výrazů a formulací, které ztěžují porozumění textu či jej činí nejednoznačným. Tato žoviálnost je až obtěžující, neboť se vyskytuje soustavně v celé kapitole. Např. v kapitole 3.2.1. zaobírající se jednou z metod izolace DNA se na str. 8 uvádí: „V zadečcích samiček se nacházejí vajíčka..., což by mělo za následek nižší čistotu DNA. Zároveň bylo potřeba mít jistotu, že nedojde ke kontaminaci samčí DNA, ke které by zpravidla došlo po oplodnění.“ V tomto případě je sice zřejmé, co chce autorka sdělit, nicméně formulace je velmi nešťastná, až příliš zkratkovitá.

Hned v následující kapitole, rovněž věnované izolaci DNA, autorka píše, že „v případě potřeby vyšší“ byla metodou volby izolace pomocí cetyl trimetylamonium bromidu (CTAB). Zajímalo by mě, v případě jaké vyšší potřeby byla tato metoda použita? Vyšší koncentrace DNA? Nebo její čistoty? Nebo snad množství? Zde bych měla ještě jednu poznámku k pravopisu, neboť v textu uvedené „pomocí CTABu“ je špatně, zkratky se neskloňují.

Jaká DNA sloužila jako templát při přípravě hybridizačních sond (kapitola 3.5.1. na str. 12)? „Amplifikace materiálu“ je opět nepřesné.

Nejednoznačná vyjádření se vyskytují i v následujících kapitolách, např. v kapitole 3.7.1. autorka nanášela na sklíčka antifade DABCO pro „delší výdrž preparátu po expozici světlu“ či v kapitole 3.7.2. v prvním odstavci přiznává: „Abychom získali lepší obrázky chromosomu W, zkoušeli jsme kromě zelené barvy i červenou...“ Co to je prosím za termíny? V prvním případě se jedná o drobnou nepřesnost, ale ve druhém případě takové sdělení neposkytuje téměř žádnou užitečnou informaci. Při lehké extrapolaci by v souladu s tímto tvrzením mohlo být např. i to, že na zatažení preparátu byl použit červený lak namísto zeleného.

Nesprávně formulovaná je i věta: „Templát pro tuto sondu byl připraven jinými členy laboratoře...“ v kapitole 3.5.2. na str. 13-14. Bylo by žádoucí napsat spíše, kým byl daný templát připraven a darován.

Ještě bych měla několik následujících drobných připomínek či dotazů na některé detaily u použitých postupů:

1) V kapitole 3.2.1. je ve druhé větě (str. 8) uvedeno: „K získání 50 μ l DNA tímto způsobem...“ Objem izolované DNA je poměrně neužitečným údajem a není třeba ho uvádět.

2) Z jakých jedinců byla izolována RNA pro přípravu cDNA (kapitola 3.3., str. 9)? Ze samic či samců? Předpokládám, že to bylo z divoké linie WT-C02. Dále autorka píše, že izolovaná RNA byla skladovaná pouze při teplotě -20 °C. To je v pořádku?

3) Byla cDNA před přípravou hybridizačních sond nějak přečištěna?

4) Jak rychle narůstala teplota během tání produktů kvantitativní PCR (kapitola 3.6., str. 15)?

Výsledky jsou originální a nové. Obrázky jsou pěkné, jasné, názorné a dobře popsane (až na několik málo chyb). Nicméně text kapitoly obsahuje obdobné nešvary jako předchozí části práce. Často je hůře srozumitelný díky nepřesnostem ve vyjadřování či chybějícím údajům.

K výsledkům pozorování pohlavního chromatinu by mě zajímalo následující:

1) Vyskytovala se někdy deformovaná či vícečetná pohlavní tělíska i u divoké linie WT-C02?

2) V kolika případech z celkového počtu pozorování se u samic linií ASF-1 a 2 vyskytovala deformovaná nebo vícečetná pohlavní tělíska?

3) Byli testováni jedinci linie ASF-4? V textu kapitoly je tato linie zmíněna, ale chybí ve vlastních výsledcích.

4) Zda se tělíska různých tvarů a četností vyskytují u různých jedinců či u téže samice, jsem se dozvěděla až z diskuze (kapitola 5.2. na str. 29), nicméně mělo by to být uvedeno již zde ve výsledcích.

V následující kapitole 4.2. Kvantitativní PCR by v textu měly být rozepsány zkratky genů pro acetylcholinesterázu (Ace) a 6-fosfoglukonát dehydrogenázu (6-PGD). V téže kapitole se objevuje formulace, že počet kopií sledovaného genu byl „napříč pohlavími“ shodný. To působí vzhledem k počtu pohlaví úsměvně. A konečně v posledním odstavci kapitoly by mělo být doplněno, že sledovaný parametr je „účinnost PCR reakce“. Bez přívlasku nemusí být zřejmé o jakou účinnost se jedná.

Několik dotazů či připomínek bych měla i k části 4.3. Výsledky hybridizace *in situ*:

Co myslí autorka správným zobrazením chromosomu W v prvním odstavci kapitoly 4.3.1.? V následujícím odstavci je totiž uvedeno, že část chromosomu W u samic linií ASF zůstala nenaznačená malovací sondou.

Obrázek 8 na str. 26 je velmi pěkně vyveden včetně schémat pohlavních chromosomů, škoda pouze malého zvětšení pachytenního jádra na obrázku 8f. Bohužel se zde ale vyskytuje několik chyb v popisku. Na obrázku 8b je W-specifická sonda červeně a nikoli zeleně; dále v obrázku 8c chybí poznamenáno, že se jedná o jádro samice linie ASF-1 a konečně schémata párování nejsou na všech obrázcích, ale pouze na obr. 8a, c a d.

V obrázcích 8b a e se zdá, že W-specifická sonda značí kromě pohlavního chromosomu W ještě další menší chromosom. Lze to pozorovat i na jiných figurách? Jak by vypadal obrázek rozložený na jednotlivé kanály?

Bylo pro detekci fragmentu Z^{dz+} u samic linií ASF použito ještě nějaké jiné barvení?

V této části by bylo vhodné uvést alespoň počet chromosomů u *E. kuehniella*. Tento údaj chybí jak v úvodu, tak v kapitole Materiál a metody, a není uveden ani zde. Přitom autorka sama poznamenává, že kontrolovala počty chromosomů, zda jsou jádra kompletní (str. 25, 2. odst. kap. 4.3.1.).

Lokalizace pohlavně vázaných genů pomocí TSA-FISH bohužel nebyla úspěšná, přestože metoda byla několikrát optimalizována. Některé kroky optimalizace mi ale nejsou úplně jasné:

1) Jak bylo optimalizováno ošetřování skel? V textu je to pouze zmíněno, ale konkrétní kroky v metodách chybí.

2) Proč byla při výskytu nespecifického signálu sondy po TSA-FISH ještě zvýšená koncentrace protilátky? Nepomohlo by spíše její větší naředění?

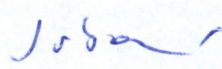
3) Jak byly zpracovávány sekvence klonovaných fragmentů pohlavně vázaných genů? Nevykazují náhodou nějaké podobnosti v motýlím genomu s dalšími geny? Neobsahují např. části sekvencí nějaké rozšířené doménové rodiny?

4) Je si autorka vědoma toho, proč byly sondy připravovány z cDNA?

V diskuzi jsou shrnuty a rozebrány získané výsledky, ale bohužel bez dostatečné hloubky a šíře. Tato část by zasloužila daleko více pozornosti. Ráda bych se zeptala, jak si autorka vysvětluje, že fragment Z^{dz+} obsahoval pouze jediný pohlavně vázaný gen z šesti testovaných, přestože je podle literatury u všech linií ASF tvořen poměrně velkou částí chromosomu Z (35-50 %)? Když se ukázalo, že pravděpodobně došlo k fúzi fragmentu Z^{dz+} a chromosomu W, nebyla náhodou testována též linie ASF-4 na přítomnost této fúze? Nebo není to v plánu? Jak vypadají chovy ASF-linií? Probíhají v chovu nějaké kontroly přítomnosti fragmentu Z^{dz+} ? Vyskytují se u linií ASF-4 a 6 samci divokého fenotypu nesoucí fragment Z^{dz+} ?

Text práce Bc. Dagmar Voříškové působí místy nepřehledně, neboť je třeba dohledávat údaje jinde v textu. Navíc práce obsahuje celou řadu chyb. Výsledky jsou ale pěkné a zajímavé a relativně dobře prezentované. Proto práci doporučuji k obhajobě magisterského titulu autorky, nicméně navrhuji snížený stupeň hodnocení.

České Budějovice, 19. 1. 2019


Iva Vrbová

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Dagmar Voříškové „Mapování fragmentu chromosomu Z v ASF-liniích zavíječe moučného, *Ephesia kuehniella*“

Diplomová práce Bc. Dagmar Voříškové byla zaměřena na odhalení genetického obsahu fragmentu Z^{dz+} ve vybraných ASF-liniích zavíječe moučného a přispět tak k odhalení podstaty samčí letality. K tomuto účelu studentka vybrala celkem 6 genů pro stanovení relativního počtu kopií u samců (ZZ) a samic (WZ + fragment Z^{dz+}) metodou kvantitativní PCR (qPCR). Přítomnost na fragmentu Z^{dz+} byla u všech čtyř testovaných linií prokázána pouze u jediného z těchto genů, a to genu *tan*. U zbývajících pěti byla potvrzena přítomnost na chromozómu Z. Je škoda, že nebyly učiněny žádné pokusy o zamapování dalších markerů z okolí genu *tan*. Výsledky by pak měly mnohem větší vypovídací hodnotu. V další fázi se studentka pokusila lokalizovat pozici genů *tan* a *apterous* metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH), avšak detekce těchto genů na chromozómech se nezdařila. Zde musím podotknout, že lokalizace genů na chromozómech metodou FISH není snadná ani pro zkušeného experimentátora a proto tento dílčí neúspěch nepovažuji pro hodnocení za důležitý. Zásadní a nečekané výsledky přinesly experimenty zaměřené na detekci DNA chromozómu W metodou FISH. Malovací sonda připravená z mikrodisektovaného chromozómu W označila u samic divoké linie celý chromozóm W, ale pouze jeho část u všech čtyř ASF-linií. Vzhledem k tomu, že samostatný chromozóm odpovídající fragmentu Z^{dz+} nebyl pozorován a že chromozómy W a Z se v meióze párují po celé délce, učinila studentka logický závěr, že neoznačená část chromozómu W je tvořena fragmentem Z^{dz+} .

Domnívám, že předložená diplomová práce kvantitativně i kvalitativně splňuje kritéria kladená na tento typ práce a proto ji doporučuji k obhajobě. Mám však tyto další poznámky či kritické připomínky:

Strana 5 - Obrázek 1: V obrázku je chyba. Samec s genotypem $dz/dz+$ by měl mít divoký fenotyp, tedy světlá křídla.

Strana 6 - Obrázek 2: Některé popisy jsou v obrázku špatně čitelné. V legendě k obrázku postrádám vysvětlení co je W^{del} . Že se jedná o chromozóm W, který ztratil 20% své délky, se sice dá odvodit z příslušné části úvodu (str. 6), ale ani zde ani nikde jinde není použito označení W^{del} .

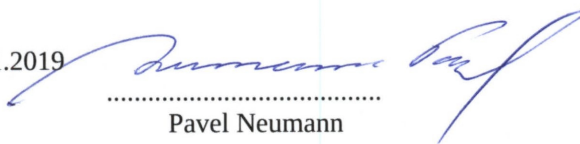
Strana 14 - Random priminig: V popisu reakční směsi chybí hexanukletidy. Pro popis použitého postupu by se neměl používat přítomný čas.

Strana 18, TSA-FISH, 2. odst: Zatímco pokusy o eliminaci nespecifických signálů snižováním množství sondy dávají smysl, zvyšování koncentrace protilátky nikoli. Osobně bych se při optimalizaci metody vydal jiným směrem. Jaké možnosti se nabízí?

Strana 19-20 - FISH: Pro popis označení sond by měly být uvedeny konkrétní fluorochromy a ne jejich barva. Dělení filtrů ve fluorescenčním mikroskopu podle barev je také příliš neurčité.

Strana 29-30 - Diskuse: Pokud by Z^{dz+} opravdu byl součástí chromozómu W pak by všechny samice měly mít $dz+$ fenotyp (světlá křídla). Naopak všichni samci by měli mít dz fenotyp (tmavá křídla). To ovšem platí pouze za předpokladu, že nedochází k rekombinaci mezi pohlavními chromozómy W a Z. Předpokládám, že při udržování chovů ASF linií se alespoň částečně sleduje fenotypová variabilita/uniformita u obou pohlaví a proto mě překvapuje, že tyto informace nejsou součástí výsledků a diskuse.

V Českých Budějovicích 18.1.2019


Pavel Neumann