



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Entomologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice
telefon: +420 387 775 211
fax: +420 385 310 354

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344
číslo účtu: 600773445/0300, ČSOB a.s.
www.entu.cas.cz | e-mail: entu@entu.cas.cz

OPONENTSKÝ POSUDEK

Na diplomovou práci Bc. Moniky Hrubé

Vývoj molekulárních markerů pro chromozom W u modráška *Polyommatus icarus*

Diplomová práce Moniky Hrubé je založena na využití sekvenačních technologií a bioinformatické analýze sekvenačních dat s jasně formulovaným cílem získat unikátní sekvence z pohlavního chromosomu W modráška jehlicovitého (*Polyommatus icarus*), čili molekulární markery samičího pohlaví, a s jejich pomocí vyvinout jednoduchou PCR metodu na určení pohlaví raných vývojových stádií modráška, což by umožnilo řešit řadu dalších výzkumných otázek.

V úvodní části práce jsou přehledně zpracovány informace a literární údaje podstatné pro řešené téma včetně zvláštností genomů modrášků a polymorfismu ve výskytu neo-pohlavních chromosomů u studovaného modráška a včetně publikovaných metod a postupů pro určení pohlaví v raných stádiích vývoje motýlů. Mám jen tři upřesňující poznámky.

- Úvod, kap. 1.1.: je uvedena variabilita počtu chromosomů motýlů od $n=7$ do $n=226$, ale nejnižší haploidní počet je ještě menší – $n=5$ byl popsán u jihoamerického motýla *Hypothyris thea* (Nymphalidae; Brown et al. 2004) a u severoamerického soumráčníka *Agathymus aryxna* (Hesperiidae; De Prins & Saitoh 2003).
- Úvod, kap. 1.4., str. 3 dole: je uvedeno, že „Autozomy, které zfúzovaly s pohlavními chromozomy, přestaly díky chiasmatické meióze samců rekombinovat“ – má být „díky achiasmatické meióze“.
- Úvod, kap. 1.5., str. 6: dovoluji si nesouhlasit s tvrzením, že metoda určení pohlaví podle sex chromatinu je „velmi pracná a časově náročná“. Zabere přibližně 15 minut na jednoho jedince. Spíše mělo být uvedeno, že není jednoznačná u raných vývojových stádií larev a je prakticky nepoužitelná u embryí.

Kapitola Materiál a metody je zpracována vyčerpávajícím způsobem. Velmi oceňuji, že autorka úspěšně zvládla extrakci vysokomolekulární DNA a zejména sekvenování technologií Oxford Nanopore, též se úspěšně vypořádala s řadou programů pro bioinformatické analýzy. Mám jen doplňkový dotaz.

V kap. 3.3.3. na str. 14 je uvedeno, že byly vybrány i k-mery specifické pro samce. Proč jste předpokládala možný výskyt k-merů specifických pro samce, kteří mají pár pohlavních chromosomů Z a teoreticky nemají žádnou část genomu specifickou pro samce?

Výsledky práce jsou perfektně zpracovány a doloženy dobře popsanými tabulkami a obrázky. A hlavně jednoznačně dokládají, že autorka splnila cíle práce – tj. identifikovala unikátní sekvenci na chromosomu W, vyvinula duplexní PCR pro identifikaci pohlaví modráška jehlicového a otestovala ji na vzorcích modrášků z různých populací v ČR i na populacích z několika dalších evropských zemí. Mám tři následující dotazy.

Na str. 23 v Tabulce III je v předposledním řádku uvedena zkratka BUCBO. Nemá to být BUSCO?

Na str. 29 je na Obrázku 5 jediný negativní výsledek, tj. absence molekulárního markeru u samice F1H6. Z textu vyplývá, že marker nebyl prokázán ani u její matky a v diskusi je tento negativní výsledek odpovídajícím způsobem vysvětlován. Protože uvedená samice pocházela z chovu, pokusila jste se v této linii ověřit cytogeneticky přítomnost chromosomu W? Zvláště u druhu s polymorfní konstitucí pohlavních chromosomů mohlo dojít ke ztrátě W.

Na str. 31 na Obrázku 8 vykazují PCR produkty testování párů primerů č. 3 u třech samic španělské populace na fotografii gelu mnohem menší intenzitu než u ostatních samic a u samic A a C i než produkt kontrolního páru primerů pro 18S rRNA. Máte pro to nějaké vysvětlení?

Použité postupy a hlavní výsledky jsou odpovídajícím způsobem diskutovány v následující kapitole s ohledem na dostupnou literaturu a současný stav poznání v této problematice a úspěšné splnění hlavního cíle této práce je stručně a jasně shrnuto v závěrečné kapitole. K této části práce mám doplňující dotaz.

V kap. 5.3. na str. 38 je v posledním odstavci je uvedeno, že jednou z možností, jak nalézt kontigy z původně autosomální části chromosomu neo-W by bylo identifikovat příslušný autosom, který se na vzniku neo-W u *P. icarus* podílel a vybrat kontigy, které na tento chromozom mapují. S tím nelze než souhlasit. Znáte nějaký postup či postupy, jak by bylo možné tento autosom identifikovat?

Seznam použité literatury je pečlivě zpracován, mám jen jedinou drobnou připomínku k nejednotnému psaní názvů citovaných prací – v názvech by, kromě prvního slova, zeměpisných názvů, zkratk a jmen druhů, měla být všechna další slova psána s počátečním malým písmenem, což není vždy dodrženo.

Závěr

Diplomová práce Moniky Hrubé je velmi zdařilým dílem. Je pečlivě a čtivě napsaná a dobře motivovaná s jasně formulovanými a splněnými cíli. Prezentované výsledky jsou velmi kvalitní a samy o sobě publikovatelné; pro laboratoř školitele pak jsou dalším splněným krokem pro výzkum evoluce pohlavních chromosomů a pohlavně-vázaných genů modrásků. Předložená práce nepochybně splňuje požadavky kladené na diplomové práce a s velkým potěšením ji

doporučuji k obhajobě.

František Marec

V Českých Budějovicích, 7. ledna 2023