

Biofyzikální ústav AV ČR
Královopolská 135, 612 65 Brno



Oponentský posudek doktorské disertační práce RNDr. Martiny Pokorné
„Evoluce způsobů určování pohlaví a genomů u šupinatých plazů (Reptilia“ Squamata)“

Dizertační práce RNDr. Martiny Pokorné je zaměřena na studium evoluce pohlavní determinace u plazů. Je to problematika poměrně velmi málo probádaná. V učebnicích se obvykle konstatuje, že u plazů převládá teplotně řízená diferenciace pohlavnosti a u některých skupin (jako jsou třeba hadi) se vyvinula genetická determinace pohlaví, popřípadě i s pohlavními chromozomy. Jako určitá rarita teplotně řízeného pohlavního vývoje je skutečnost, že u některých plazů vede zvýšená teplota inkubace vajíček k tvorbě samčího pohlaví (aligátoři), zatímco u jiných k samičímu pohlaví (želvy). Proto jeden z mých dotazů dizertantce směřuje k tomu, zda jsou dnes již známy metabolické (biochemické) dráhy, které řídí diferenciaci gonád a jak jsou teplotně regulovány. Pokud se týká genetické determinace pohlaví, jsou u plazů zjevně oba heterogametní systémy (XY, ZW), výjimečně i s heteromorfními pohlavními chromozomy. Z literatury jsem se vždy domníval, že genetický systém diferenciace se evolučně vyvinul z environmentálního, zatímco někteří autoři (zřejmě prof. Gravesová) mezitím projevíli jiný názor. Z práce dizertantky vyplývá, že přechod od environmentálního ke genetickému systému determinace je jednostranný a irreverzibilní, což je (podle mě s dost básnickou nadsázkou) nazýváno evoluční pastí. Zjištěný hlavní závěr celé práce, že pohlavnost u plazů vznikla v rámci celé této rozsáhlé systematické skupiny mnohokrát, je velmi zajímavý a pro mě očekávaný. Studium pohlavnosti u plazů považuji za velmi důležité, neboť představují evoluci proměny environmentální na genetickou a současně představují i velmi časná stadia evoluce pohlavních chromozomů (vzhledem ke skutečnosti, že většina plazů s genetickou determinací má jen homomorfní pohlavní chromozomy).

Dizertační práce svým obsahem i rozsahem je úctyhodným dílem, jistě patří mezi velmi nadstandardní dizertace. Je připravena velmi pečlivě i s kvalitními ilustracemi, což je pro cytogenetickou práci jistě velmi důležité. Práce má patřičné úvodní a závěrečné texty v českém jazyce, což významně přispívá k rychlejší orientaci v dané problematice. Jinak tvoří práci 5 celků – publikací či dokončených rukopisů prací – což výrazně překračuje požadované výsledky doktoranda. Tři již publikované práce se objevily ve kvalitních impaktovaných časopisech (Zoological Journal of the Linnean Society, Chromosoma a

Chromosome Research) a věřím, že i dva zbývající rukopisy najdou uplatnění v renomovaných časopisech. Recenzovat již publikované práce je poněkud zbytečné, tak aspoň vyslovím krátký povinný komentář. Za zjevně nejvýznamnější práci považuji kapitolu I (článek ze Zoological Journal of the Linnean Society), která má syntetický charakter, nejširší dopad a bude zřejmě nejvíce citovanou prací. Autoři v této práci shromáždili a analyzovali údaje o 400 druzích šupinatých plazů a provedli fylogenetickou analýzu typu determinace pohlavnosti. Na základě tohoto širokospektrálního vzorku (zjevně dosud v literatuře největšího) docházejí autoři k závěrům zmíněným výše (zejména je to vede k formulaci evoluční pasti). K vyslovení fylogenetických závěrů použili autoři patřičné biostatistické přístupy a za základ fylogenetických stromů vzali molekulární (DNA) analýzy od jiných autorů. Má otázka tedy zní, zda autoři také sami plánují pracovat s DNA (popř. RNA) markery k určování fylogenetické příbuznosti druhů. V práci se uvádí, že genetickou determinaci pohlaví prozradí až celogenomové sekvenování. Domnívám se, že autoři nemají na mysli něco jako 454 či Illumina techniky, neboť tyto jsou k danému cíli neadekvátní. Mám však obavu, že ani úplné osekvenování genomů modelových plazů nepovede přímo ke kýženému cíli (zejména při skutečnosti, že nejsou k dispozici žádné kandidátní geny). Může mi dizertantka vysvětlit, jak si představuje dráhu od znalosti celogenomové sekvence k identifikaci sex-determinujících genů? Já se domnívám, že základem genetického mapování (včetně identifikace pohlavních chromozomů či příslušných vazebních skupin) jsou křížení a sledování segregace markerů (dnes obvykle AFLP).

Druhá kapitola (Chromosoma) se zabývá evoluční příbuzností ptáků a plazů. FISH-sonda připravená technikou třídění chromozomů (chromozom Z kuřete) byla použita k hybridizaci na metafázní chromozomy 28 druhů plazů. Závěr je jednoznačný – existuje syntenie větších oblastí genomu kuřete a plazů, avšak nehybridizují pohlavní chromozomy plazů. Pohlavní chromozomy plazů tedy evidentně nemají společný fylogenetický původ s ptáky. Třetí kapitola je krátké sdělení či konfliktní úvaha o evoluci pohlavní determinace u amniotických obratlovců. Čtvrtá kapitola (Chromosome Research) je špičkovou prací z oblasti cytogenetiky velké skupiny 12 sruhů gekonů s cílem identifikace heteromorfních pohlavních chromozomů. To se podařilo v podstatě u dvou druhů. Autoři tedy docházejí k závěru, že u gekonů většinou ještě nedošlo k evoluci heteromorfních pohlavních chromozomů. Pátá kapitola dizertační práce je věnována otázce akumulace DNA mikrosatelitů na pohlavních chromozomech některých ještěrek. Na rozdíl od fylogeneticky starších pohlavních chromozomů u savců dochází (alespoň u druhu *Coleonyx elegans*) k akumulaci různých mikrosatelitů na nepárujícím se pohlavním chromozomu W samiček. Podobné výsledky byly dosaženy na nepárujícím se chromozomu Y u dvoudomých rostlin *Silene latifolia* a *Rumex acetosa*. Je možné tedy vyslovit názor, že akumulace mikrosatelitů na chromozomech Y či W nastává pouze v ranných evolučních stádiích?

Pokud se týká používaných metodik, jde především o práci cytogenetickou na špičkové molekulární úrovni včetně třídění chromozomů. Můj dotaz v této oblasti zní, zdali se dizertantka také pokoušela

studovat meiotické preparáty plazů k identifikaci pohlavních chromozomů či jejich párujících se oblastí. Myslím, že by to zejména v případě samčího heterogametického systému (XY) mělo být snadno realizovatelné. Pokud se týká identifikace (homomorfních) pohlavních chromozomů, nebylo by možné využít třeba některé techniky proužkování chromozomů?

V práci popisujete dva systémy determinace pohlaví – teplotní a genetický. Znáte ještě v přírodě některé další? Byl již u plazů identifikován nějaký gen, který by hrál roli v pohlavní determinaci či byl alespoň pohlavně specificky exprimován? Byl u plazů nalezen homolog genu SRY? Jsou známy i jiné živočišné skupiny, kde můžeme sledovat postupný přechod od teplotní determinace ke genetické? Existuje u plazů pohlavní dimorfismus? Je nějaká pravděpodobnost, že by se u plazů s heteromorfními pohlavními chromozomy vyvinul mechanismus kompenzace dávky genů? Jaký je v současné době názor na existenci kompenzace dávky genů u ptáků?

Práci paní RNDr. Martiny Pokorné hodnotím jako vynikající a bez jakýchkoli připomínek ji doporučuji k obhajobě doktorského vědeckého titulu PhD.

V Brně dne 24. srpna 2011

Prof. RNDr. Boris Vyskot, DrSc.