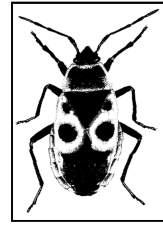




RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.  
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
a  
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav  
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05



## Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Marie Altmanové **Evoluce karyotypu a určení pohlaví u leguánů (Squamata: Pleurodonta)**

Diplomová práce se zabývala analýzou chromosomů 21 druhů leguánů, z nichž osm druhů dosud nikdy nebylo cytogeneticky zpracováno. Analýza měla několik dílčích cílů: získat chromosomální preparáty z vybraných druhů, sestavit karyotypy, prozkoumat distribuci heterochromatinu, detekovat případné intersticiální telomerické sekvence (ITS) a pohlavní chromosomy a konečně získané výsledky interpretovat.

Práce samotná je klasicky členěna na úvod, cíle, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a přehled použité literatury. Každá z těchto částí je přehledně členěna, vzhledem k množství dat je přiměřeně dlouhá a obsahuje minimum překlepů. Autorka odvedla velké množství práce a pro získání výsledků použila spektrum různých metod, od klasické cytogenetiky až po fluorescenční *in situ* hybridizaci včetně přípravy a značení sondy. Sympatické je vysvětlení principu metod u jejich popisu v metodice. Získané výsledky jsou dobře zdokumentovány a uvedeny ve formě tabulí s mikrofotografiemi a sestavenými karyotypy s podrobným komentářem. Velmi oceňuji přehled výsledků na obrázku 35, který obsahuje fylogenetické vztahy všech zkoumaných druhů, přičemž u každého druhu je schématické znázornění makrochromosomů s ITS a bloky heterochromatinu, počty makro- a mikrochromosomů, počty ramének a případné pohlavní chromosomy.

K práci mám následující připomínky a doporučení:

1) Jak název práce, tak její cíle slibují studium pohlavních chromosomů a způsobu určení pohlaví u zkoumaných druhů a velká část úvodu se zaměřuje na determinaci pohlaví, vznik a mechanismy evoluce pohlavních chromosomů. Nicméně u většiny zkoumaných druhů se pohlavní chromosomy identifikovat nepodařilo, což mohlo být způsobeno tím, že nejsou dostatečně odlišné a tím pádem jsou použitými metodami neidentifikovatelné. Na druhou stranu použité metody se pro tento účel příliš nehodily, protože vizualizují jen vysoce morfologicky odlišné pohlavní chromosomy (velikostně, obsahem heterochromatinu). Jak autorka zmiňuje v diskuzi, kolektiv, jež je součástí, prokázal u některých ze zkoumaných leguánů pohlavní chromosomy díky qPCR, čili i když chromosomy nejsou nutně odlišné morfologicky, liší se sekvencí DNA. Podle mé zkušenosti by tak pro jejich vizualizaci mohla být vhodná komparativní genomová hybridizace (CGH) odlišně značené samčí a samičí DNA na chromosomální preparát. Problémem je, že je potřeba DNA z obou pohlaví. Další možností (nevím jak u těchto druhů leguánů reálnou) je analýza bivalentů v meióze I, která by mohla odhalit případné multivalenty neo-pohlavních chromosomů či neobvykle se párující bivalenty pohlavních chromosomů.

2) Dle mého názoru práce trpí klasickým neduhem studentských prací, totiž jistou nerovnoměrností získaných dat, která je daná tím, že na počátku je mnoho plánů, z nichž se podaří realizovat jen určitou část. Získaná data je pak autorovi líto obětovat, i když kratší

verze by působila kompaktnějším, a tím i lepším dojmem. Narážím opět na malé množství druhů, kde se podařilo identifikovat pohlavní chromosomy, navíc ve všech případech se jednalo o již publikované karyotypy, a pohlavní chromosomy tak byly jen potvrzeny. Chápu, že problém byl pravděpodobně s dostupností jedinců obojího pohlaví, ale za těchto okolností by bylo lepší pohlavní chromosomy buď zcela pominout, nebo jen okrajově zmínit a soustředit se na ITS, distribuci heterochromatinu a jejich roli v evoluci karyotypu.

3) Vzhledem k tomu, že se u většiny druhů nepodařilo identifikovat pohlavní chromosomy, myslím, že je klíčové u těchto druhů vyšetřit obě pohlaví. Jak autorka píše v úvodu, leguáni jsou v určení pohlaví konzervativní a je u nich známa jen GSD se samčí heterogamií. Nicméně u ryb a obojživelníků jsou známy skupiny příbuzných druhů, které se liší systémem chromosomálního určení pohlaví (ZZ/ZW vs. XX/XY) a dokonce i druhy, kde oba systémy koexistují. Protože přítomnost homomorfních pohlavních chromosomů napovídá (ale nedokazuje), že se jedná o poměrně mladé pohlavní chromosomy, je možné, že se u některých druhů vyskytuje samičí heterogamie, a je proto důležité otestovat i samice.

4) U mnoha druhů byl analyzován pouze jeden jedinec, což bylo patrně způsobeno obtížností získat více jedinců. Nicméně získané karyotypy je potřeba interpretovat opatrně, protože zkoumaný jedinec může být aberantní. Příkladem je jediný testovaný samec *Anolis districhus*, u kterého byl na p raménku jednoho chromosomu z páteho páru detekovaný heterochromatinový blok. Vyšetření dalšího jedince by pomohlo odhalit, jestli je to standardní znak tohoto druhu, případně jestli se nejedná o další pár pohlavních chromosomů XY.

5) V metodice by všechny metody měly být popsány tak, aby podle nich bylo možné experimenty zopakovat, případně by tam měly být citovány práce, podle kterých se experimenty prováděly a které tyto informace obsahují. Toto je splněno jen v některých kapitolách, jinde naopak tyto informace chybí. V části o přípravě sondy pro FISH zcela chybí podmínky PCR (reakční mix, koncentrace značených nukleotidů, PCR profil), v popisu FISH chybí důležité informace o koncentraci sondy a DAPI. Chybí i složení hybridizačního mixu (kolik obsahoval kompetitorové DNA, zda obsahoval formamid...). Zároveň tato část neobsahuje jediný odkaz na literaturu, kde by šlo tyto informace dohledat. To kontrastuje s jinými částmi, kde je jak detailní popis metody včetně použitých roztoků, tak odkaz na literaturu.

6) Autorka píše, že nejprve používala pro C-pruhování Giemsu, ale pak přešla na barvení DAPI, které poskytovalo silnější signály. Nejsm si jistá, jestli Giemsa a DAPI barví vždy stejné oblasti genomu (DAPI silněji barví oblasti bohaté na AT), a podle mého názoru bylo lepší použít u všech druhů jen jeden typ barvení.

7) Doporučuji v budoucí publikaci nahradit černobílé obrázky invertovaných chromosomů po telomerické FISH původními barevnými, u černobílých by šlo teoreticky zaměnit telomerické signály s DAPI bloky.

Na závěr mám následující dotazy:

1) Proč nebylo místo jednoduchého barvení Giemsou použito G-pruhování? Tato metoda by mohla odhalit odlišný pattern proužků u případných pohlavních chromosomů, a pokud byly testovány blízké příbuzné druhy, G-pruhy by mohly poukázat na případné inverze nebo jiné přestavby u druhů s ITS a bez nich.

2) U *Anolis carolinensis* byly nalezeny rozdíly v heterochromatinu u některých chromosomálních párů samice, u samce ne. Nemůže se jednat o pohlavní chromosomy WZ?

Tyto komentáře jsou míněny jako doporučení pro budoucí vědeckou práci a nemají snížit hodnocení předložené práce, která je dobře napsaná, obsahuje velké množství výsledků získaných z řady druhů pomocí spektra cytogenetických metod. Proto jí jednoznačně doporučuji k úspěšné obhajobě.

V Českých Budějovicích  
6.9.2013

RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.